

Uniwersytet Warszawski

Wydział Fizyki



Piotr Surynt

Numer albumu: **328646**

***Synteza i właściwości analogów trimetylokapu znakowanych
fluorescencyjnymi molekularnymi rotorami***

Praca doktorska

Praca wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Jacka Jemielitego
w Centrum Nowych Technologii oraz Zakładzie Biofizyki
Instytutu Fizyki Doświadczalnej
Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego

Warszawa 2025

Podziękowania

Składam najserdeczniejsze podziękowania:

Promotorowi – prof. dr hab. Jackowi Jemielitemu za możliwość realizacji badań w jego zespole, przekazaną wiedzę i doświadczenie, cierpliwość i wsparcie w sprawach merytorycznych i formalnych

dr inż. Błażejowi Wojtczak za przekazaną wiedzę, pasję i pomoc w planowaniu i realizacji eksperymentów

dr Dorocie Kubackiej za pomoc we wdrożeniu do spektrofлуorymetrii i metod miareczkowań

dr hab. inż. Joannie Paneckiej-Hofman za wykonanie dockowania liganda w domenie wiążącej TMG kap snurportyny

dr Karinie Kwapiszewskiej za badania czasów życia fluorescencji i czasów dyfuzji związków w komórkach

mgr Tomaszowi Śpiewla za wyekspresjonowanie i oczyszczenie białka snurportyny

*Badania zrealizowano w ramach projektu Sonata, finansowanego
ze środków Narodowego Centrum Nauki, nr grantu UMO-2017/26/D/ST5/00901*

Spis treści

1. Wstęp.....	12
2. Abstrakt.....	14
3. Cele projektu.....	15
I.1. Bioróżnorodność struktur analogów 5' kapu i ich funkcje	17
I.1.1 Struktury kapu.....	17
I.1.2 Występowanie i biologiczne funkcje m ⁷ G i TMG kapu.....	20
I.1.3 Biosynteza TMG kapu.....	23
I.1.4 Degradacja m ⁷ G i TMG kapu	24
I.1.5 Zastosowanie syntetycznych analogów kapu.....	25
I.2. Snurportyna – funkcje, interakcje, właściwości i znaczenie	31
I.2.1 Funkcje	31
I.2.2 Specyfika wiązania TMG kapu przez snurportynę.....	33
I.2.3 Interakcje molekularne snurportyny z białkami lub genami.....	35
I.2.4 Właściwości fluorescencyjne.....	37
I.2.5 Znaczenie kliniczne	38
I.3. Fluorescencyjne Molekularne Rotory (FMR)	40
I.3.1 Zasada działania.....	40
I.3.2 Metody syntezy chromoforu GFP i jego analogów	41
I.3.3 Zastosowanie FMR	44
I.3.3.1 W obrazowaniu komórkowym, <i>ex vivo</i> i <i>in vivo</i>	44
I.3.3.2 Jako sondy molekularne białek	45
II.1. Syntezowane i zbadane związki	47
II.2. Syntezy chemiczne.....	50
II.2.1 Synteza dimetyloguanozyny	50
II.2.2 Syntezy mono- i difosforanów metodą Yoshikawy lub sprzęga-niem solami fosforanowymi.....	51
II.2.3 Synteza P-imidazolidów metodą Mukaiyamy-Hashimoto	53
II.2.4 Synteza dinukleotydowych analogów TMG kapu z funkcją 5'-tioestrową (TMG-5'-SpppG, TMGpppS-5'-G)	53
II.2.5 Synteza nukleotydów oraz FMR z linkerem i grupą azydkową lub propargilową .54	
II.2.5.1 Synteza nukleotydowych pochodnych w reakcji z CDI akcelеровanej mikrofalami	54
II.2.5.2 Synteza pochodnych FMR	56
II.2.6 Sprzęganie podjednostek nukleotydowych z utworzeniem wiązania pirofosforanowego	57
II.2.6.1 Wydzielanie regioizomerów metodą RP-HPLC.....	59

II.2.7	Synteza nukleotydowych koniugatów FMR z lub bez TMG kapu <i>via</i> 1,3-dipolarna cykloaddycja Huisgena azydki do alkinu (CuAAC)	60
II.3.	Właściwości spektralne FMR	64
II.4.	Właściwości spektralne nukleotydowych koniugatów z FMR.....	65
II.4.1	Widma absorpcji i emisji w buforach wodnych	65
II.4.2	Widma emisji i wzbudzania w układach DMSO-woda	67
II.5.	Właściwości fizykochemiczne FMR i nukleotydowych koniugatów z FMR.....	73
II.5.1	Zależności widm emisji i wzbudzania od pH	74
II.6.	Badanie powinowactwa ligandów do snurportyny oraz mIF4E metodą miareczkowania z wygaszaniem fluorescencji tryptofanów (FQT) synchronizowanym w czasie	79
II.6.1	Kryteria akceptacji	79
II.6.2	Aspekty techniczne	79
II.6.2.1	Efekt filtra wewnętrznego	79
II.6.2.2	Wady i zalety metody, FQT versus miareczkowanie z czynnikiem płytek	80
II.6.3	Charakterystyka oddziaływania analogów TMG kapu nie-zawierających FMR ze snurportyną.....	81
II.6.4	Charakterystyka oddziaływania nukleotydowych koniugatów z TMG kapem i FMR ze snurportyną.....	83
II.6.5	Charakterystyka oddziaływania nukleotydowych koniugatów i FMR niezawierających TMG kapu ze snurportyną	87
II.6.6	Badania zależności struktura-aktywność.....	91
II.6.6.1	Metoda miareczkowania FQT w badaniach zależności struktura-aktywność ligandów.....	91
II.6.6.2	Dokowanie molekularne	93
II.6.7	Charakterystyka oddziaływania analogów m ⁷ G kapu koniugatów z FMR z mysim eiF4E	95
II.6.8	Zestawienie właściwości fizykochemicznych i biofizycznych nukleotydowych koniugatów z DMHBI i o-HBI.....	96
II.7.	Odpowiedzi sond z FMR na wiązanie ze snurportyną i eiF4E	98
II.7.1	Odpowiedzi względne ($F_{\max}/F_0$).....	98
II.7.2	Odpowiedzi obliczone na podstawie regresji liniowej (parametr a)	100
II.7.3	Miareczkowania liganda snurportyną	102
II.7.3.1	Miareczkowania sond GpppG podwójnie znakowanych DMHBI lub HEMABI.....	111
II.7.4	Zależności odpowiedzi sond w miareczkowaniu snurportyną od pH	115
II.8.	Inne właściwości nukleotydowych koniugatów FMR	118
II.8.1	Wrażliwość na zmiany lepkości otoczenia.....	118
II.9.	Stabilność koniugatów z FMR w wodzie MQ.....	122

II.10.	Badania enzymatyczne koniugatów FMR i TMG kapowa-nych dinukleotydów z enzymem hNudt16	125
II.10.1	Podatność na hydrolizę enzymem hNudt16	125
II.10.2	Próby ilościowego określenia siły oddziaływania ligand-hNudt16.....	128
II.11.	Obrazowanie czasów życia fluorescencji w komórkach	131
II.12.	Badania współczynników dyfuzji w komórkach HeLa	133
III.1.	Rozpuszczalniki i reagenty wykorzystywane w syntezie	135
III.2.	Techniki chromatograficzne	135
III.2.1	Analityczna wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)	135
III.2.2	Półpreparatywna i preparatywna wysokosprawna chromato-grafia cieczowa (semi-prep/prepHPLC).....	135
III.2.3	Chromatografia jonowymienna	136
III.2.3.1	Izolacja produktów reakcji	136
III.2.3.2	Molowe współczynniki ekstynkcyj wybranych koniugatów FMR.....	136
III.2.3.3	Wymiana soli.....	138
III.3.	Jądrowy rezonans magnetyczny (NMR)	138
III.4.	Spektrometria mas (MS).....	138
III.5.	Zastosowanie mikrofal w syntezie	139
III.6.	Syntezy chemiczne	139
III.6.2	Synteza azydkowych i propargilowych pochodnych mono- i dinukleotydów	142
III.6.3	Synteza dinukleotydowych modyfikowanych pochodnych TMG kapu bez grupy propargilowej lub azydkowej	147
III.6.4	Synteza azydkowych i propargilowych pochodnych FMR	158
III.6.5	Synteza koniugatów FMR i nukleotydów	162
III.6.6	Synteza koniugatów FMR i dinukleotydowych analogów TMG kapów z guanozyną	163
III.6.7	Synteza koniugatów FMR i dinukleotydowych analogów TMG kapów z guanozyną modyfikowane w mostku fosforanowym	176
III.6.8	Synteza koniugatów FMR i dinukleotydowych analogów TMG kapów z adenozyzną	178
III.6.9	Synteza koniugatów FMR i tetranukleotydowych analogów TMG kapu.....	181
III.6.10	Synteza koniugatów FMR i dinukleotydowych analogów m ⁷ G kapów z guanozyną	184
III.6.11	Synteza koniugatów FMR i monofosforanu guanozyny	187
III.6.12	Synteza koniugatów dinukleotydowych analogów TMG kapu z guanozyną nie posiadających FMR	194
III.6.13	Synteza podwójnie znakowanych dinukleotydowych koniu-gatów FMR	195
III.6.14	Synteza C-fosfonianowych pochodnych FMR	199

III.7.	Metodyka badań, badania fizykochemiczne i biofizyczne	201
III.7.1	Pomiary spektrofotometryczne i spektrofluorymetryczne	201
III.7.2	Miareczkowanie z wygaszaniem fluorescencji (ang. FQT assay)	201
III.7.3	Badania miareczkowania liganda białkiem (saturacja)	203
III.7.3.1	Miareczkowania z wyznaczaniem stałych dysocjacji ze snurportyną	203
III.7.3.2	Miareczkowania z wyznaczaniem stałych dysocjacji z hNudt16	203
III.7.4	Badanie podatności na degradację enzymem hNudt16 oraz kinetyki reakcji degradacji	204
III.7.5	Badanie zależności widm emisji wolnych koniugatów w róż-nych układach Gly-Woda i Gly-EtOH	204
III.7.6	Badanie zależności widm emisji wolnych koniugatów w buforach o różnych pH..	207
III.7.7	Badanie obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM) w komórkach HeLa ..	208
III.7.8	Badanie spektroskopowe korelacji fluorescencji (FCS)	208
III.7.9	Dokowanie.....	209
III.7.9.1	Przygotowanie receptora.....	209
III.7.9.2	Przygotowanie liganda	209
III.7.9.3	Protokół dockowania	209
III.7.9.4	Analiza danych.....	210
III.7.10	Ekspresja i oczyszczanie snurportyny	210
IV.	Podsumowanie	211
V.	Bibliografia	214

Wykaz stosowanych w pracy skrótów

()nt	liczba nukleotydów w sekwencji
4E-BP	ang. 4E Binding Protein, białko wiążące czynnik inicjacji translacji 4E
Aa	Aminokwas
ACVJ	Amidocyjanowinylojulolidyna
AD	ang. Alzheimer Disease, choroba Alzheimerera
AIEC	Chromatografia anionowymienna
ALS	ang. Amyothropic Lateral Sclerosis, stwardnienie zanikowe boczne
ARCA	ang. Anti-Reverse Cap Analog, anty-rewersyjny analog kapu
BSA	Albumina Surowicy Bydłęcej
BUN	ang. Blood Urea Nitrogen, azot mocznikowy we krwi, powiązany parametr ze sprawnością i funkcjonalnością nerek
CBC	ang. Cap Binding Complex, kompleks wiążący kap
CDI	1,1'-Karbonylodiimidazol
CIEC	Chromatografia kationowymienna
CKD	ang. Chronic Kidney Disease, przewlekła choroba nerek
CoA	koenzym A
CRM1/XPO1	ang. Chromosome-Region-Maintenance-1, also exportin1, eksportyna1
CuAAC	Reakcja cykloaddycji azydku do alkinu katalizowana jonami miedzi (I) Cu^+
DBU	1,8-Diazabicyklo-[5.4.0]-undek-7-en
DCM	Dichlorometan
DCVJ	Dicyjnanowinylojulolidyna
DMABI	Dimetyloaminobenzylideno imidazolinon
DMABN	Dimetyloaminobenzonitryl
DMAPh	Dimetyloaminofenyl
DMF	Dimetyloformamid
DMG	Dimetyloguanozyna, $\text{m}_2^{2,7}\text{G}$
DMHBI	Dimetylohydroksybenzylideno imidazolinon
DTDP	Ditiodipirydyna
DXO	ang. Decapping Exoribonuclease, egzonukleaza dekapująca

eGFR	ang. estimated glomerular filtration rate, szacunkowy wskaźnik filtracji kłębuszkowej
eIF4E	Eukariotyczny czynnik inicjujący translację 4E
FAD	Dinukleotyd flawinoadeninowy
FMR	ang. Fluorescent Molecular Rotor, molekularny rotor fluorescencyjny
FQT	ang. Fluorescence Quenching Titration, miareczkowanie z wygaszaniem fluorescencji (tryptofanów)
FTD	ang. Fronto-Temporal Dementia, otępienie czołowo-skroniowe
G/Guo	Guanozyna, G
GFP	ang. Green Fluorescence Protein, fluorofor białka zielonej fluorescencji
GMP	Monofosforan guanozyny
HEMABI	N-hydroksyetylo,N-metyloaminobenzylideno imidazolinon
hNUDT16	Ludzki enzym z rodziny Nudix16
hTR (TERC)	ang. Human Telomerase RNA, RNA Telomerazy
IC	Konwersja wewnętrzna
impβ	Importyna β
K_D	Stała dysocjacji kompleksu
LGMD	ang. Limb Gardle Muscular Dystrophy, dystrofia mięśniowa obręczowo-kończynowa
lncRNA	ang. Long non-coding RNA, długie niekodujące RNA
MMG	Monometyloguanozyna, m ⁷ G
MD	ang. Muscular Dystrophy, dystrofia mięśniowa
mRNA	ang. Messenger RNA, informacyjny lub przekąźnikowy RNA
NAD	nikotynoamidoadeninowy dinukleotyd
NCC	ang. Non-Canonical Caps, niekanoniczne struktury kapu
NLS	ang. Nuclear Localization Signal (or Sequence), sygnał transportu dojądrowego
NMP	N-metylopirolidon
NPC	ang. Nuclear Pore Complex, kompleks porów jądrowych lub jądrowy kompleks porowy
OA	ang. Osteoarthritis, Choroba zwyrodnieniowa stawów
<i>o</i>-HBI	<i>orto</i> -hydroksybenzylideno imidazolinon
<i>p</i>-NHBI	<i>para</i> -nitrohydroksybenzylideno imidazolinon

RNGTT	ang. RNA guanylyltransferase and 5'-phosphatase, enzym katalizujący reakcję m ⁷ G kapowania RNA
RP-HPLC	Wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa z odwróconym układem faz
rRNA	ang. Ribosomal RNA, rybosomalne RNA
RSD	ang. Relative Standard Deviation, względne odchylenie standardowe
SL	ang. Splice leader, sekwencja występującej we wszystkich mRNA trypanosomatidów, przekazywana do pre-mRNA poprzez <i>trans</i> -splicing
SMA	ang. Spinal Muscular Atrophy, rdzeniowy zanik mięśni
SMN/SMN2	ang. Survival of Motor Neuron, białko SMN powiązane z rdzeniowym zanikiem mięśni (SMA) oraz tworzeniem spliceosomu
snoRNA	ang. Small nucleolar RNA, małe jąderkowe RNA
snRNA	ang. Small nuclear RNA, małe jądrowe RNA
snRNP	ang. Small nuclear ribonucleoproteins, małe jądrowe rybonukleoproteiny
SNUPN	gen kodujący snurportynę
SPN/SPN1	ang. snurportin1, Snurportyna
STS	ang. Short-Telomere Syndrom, syndrom krótkich telomerów
TBTA	Tris(benzylotriazolometylo)amina, ligand kompleksujący Cu(I)
TEA	Trietyloamina, również w pracy jako Et ₃ N
TEAB	Wodorowęglan trietyloaminy
TGS1	Trimetyloguanozyna syntaza
THPTA	Tris(hydroksypropylotriazolometylo)amina, ligand kompleksujący Cu(I)
TICT	ang. Twisted Intramolecular Charge Transfer, wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie ładunku ze skrzyżowaniem płaszczyzny
TMG/TMGuo	Trimetyloguanozyna, m ₃ ^{2,2,7} G
tRNA	ang. Transfer RNA, transportujący RNA
TSP	2,2,3,3-tetradeutero-3-(trimetylosililo)-propionian sodu
UDP-Glc	Urydyno-5'-difosfo-D-glukoza
UDP-GINac	Urydyno-5'-N-acetyloglukozamino difosforan

Zapis TMGpppG oznacza, że N^{2,2,7}-trimetyloguanozyna i guanozyna połączone są mostkiem 5',5'-trifosforanowym, natomiast zapis ApU oznacza, że nukleotydy połączone są wiązaniem 3',5'-fosfodiesterowym. W przypadku dłuższych sekwencji (zgodnie z nomenklaturą w kierunku 5'→3') pominięto oznaczenia reszt fosfodiesterowych (p) ze względu na przejrzystość zapisu.

1. Wstęp

Struktura trimetylokapu (TMG kap) obecna na 5' końcu łańcucha niektórych małych jądrowych RNA (small nuclear RNA, snRNA) bierze udział w procesach biologicznych związanych m.in. z transportem i dojrzewaniem pre-mRNA. TMG kap rozpoznawany jest przez białko adaptorowe - snurportynę, które w kompleksie z importyną β transportuje snRNA zakończone TMG kapem do jądra komórkowego.

Fluorescencyjne molekularne rotory (FMR) są dwu- lub wielosegmentowymi cząsteczkami, w których jeden segment obraca się swobodnie względem drugiego. Zahamowanie wewnętrznej rotacji jednego z segmentów znacznika wokół wiązania σ skutkuje promienistym (fluorescencja) procesem relaksacji. Taka wewnętrzna rotacja jest silnie zależna od oddziaływań między strukturą fluoroforu a jego mikrootoczeniem (rodzaju rozpuszczalnika, polarności, tworzących się wiązań wodorowych, izomeryzacji, etc.), dlatego zastosowanie FMR w badaniach biologicznych opiera się na zahamowaniu rotacji w wyniku wiązania się z białkiem, co umożliwia „włączenie” fluorescencji i może posłużyć np. do śledzenia transportu snRNA.

We wstępie literaturowym czytelnik zostaje zapoznany z trzema obiektami składającymi się na badane przeze mnie kompleksy białko-ligand i sondy molekularne i są to kolejno: trimetylokap, snurportyna oraz molekularne rotory. Przedstawiłem szczegółowo strukturę TMG kapu, jego biosyntezę, rolę w komórkach, szlak jego degradacji i enzymy dekapujące oraz zastosowania analogów TMG i m⁷G kapu ze szczególnym uwzględnieniem dinukleotydowych analogów, następnie budowę, funkcję snurportyny oraz jej charakterystykę oddziaływania z TMG kapem (TMGpppG), jak i również z innymi białkami czy genami oraz jakie pełni znaczenie biologiczne (transport dojądrowy polarnych i dużych leków lub białek) i kliniczne (patofizjologia). Na końcu tej części zamieściłem przykładowe struktury fluorescencyjnych molekularnych rotorów, ich zasadę działania i mechanizm odpowiedzialny za wzrost fluorescencji (przeniesienie elektronu i skręcenie płaszczyzny) oraz przykładowe zastosowania w biofizyce (poszukiwanie inhibitorów enzymów), biologii komórek i modelach zwierzęcych.

Część badań własnych rozpocząłem od przedstawienia struktur badanych związków

z podziałem i omówieniem na grupy, następnie wyszczególniłem i również podzieliłem tematycznie etapy syntezy związków finalnych, od syntezy fosforanów metodą Yoshikawy po reakcje koniugacji azydki do alkinu (typu „click”). Przedstawiona została także charakterystyka właściwości spektralnych FMR i ich nukleotydowych koniugatów, w tym solwatochromizm, właściwości fizykochemiczne jak pK_a grup fenolowych FMR czy wrażliwość na zmiany lepkości oraz biofizyczne jak powinowactwo do snurportyny (K_D) czy odpowiedzi sond na wiązanie białka mierzone jako krotność wzrostu fluorescencji (F_m/F_0) lub zmiany fluorescencji na jednostkę stężenia białka (dF/dC) po związaniu lub wysyceniu ze snurportyną, i na końcu omówiłem wyniki badań biologicznych w komórkach HeLa wyselekcjonowanych przeze mnie związków. Niektóre związki zostały dodatkowo zmodyfikowane w regionie mostkowym (metylenobisfosfonian CH₂), przez wydłużenie do tetrafosforanu lub w pozycjach 5'-O przez zmianę O na S, celem zapewnienia odporności na degradację enzymatyczną przez ludzki enzym Nudt16 i/lub utrzymanie powinowactwa do snurportyny. Spośród FMR przetestowałem pięć analogów chromoforu GFP-podobnego (pochodzących od białka zielonej fluorescencji) i dwie pochodne julolidyny. Ocena powinowactwa wiązania dla snurportyny nieoczekiwanie wykazała silnie stabilizujący efekt dla dinukleotydów analogów TMGpppG zawierających FMR podobny do GFP w pozycji 2'-O guanozyny. Te nowo odkryte związki są silnymi ligandami snurportyny z nanomolowymi wartościami K_D , które są o dwa rzędy wielkości niższe niż w przypadku naturalnego TMGpppG. Efekt jest zmniejszony o ~50-krotnie dla odpowiadających 3'-regio-

izomerów. Aby pogłębić zrozumienie zależności między strukturą a aktywnością, zsyntetyzowałem i przetestowałem koniugaty FMR pozbawione fragmentu TMG kapu oraz wykazałem, że ten nowo zaobserwowany efekt utrzymuje się również w kapach m⁷G i w mniejszym stopniu w analogach GMP, ale z niespecyficznymi interakcjami (tj. udowodniłem, że koniugaty kapu m⁷G-FMR wiążą się konkurencyjnie również z eIF4E). Moje badania eksperymentalne zostały poparte dokowaniem molekularnym i oba sugerują, że zwiększone powinowactwo wynika z dodatkowych oddziaływań hydrofobowych zapewnianych przez fragment FMR podobny do GFP, niezależnie od grup funkcyjnych w pierścieniu fenylowym. Badania FQT wyłoniły 9 najsilniejszych TMG kapowanych koniugatów FMR, z których te związane z DMHBI wykazały najkorzystniejsze zmiany fluorescencyjne ze snurportyną in vitro. Ostatecznie przedstawiłem również wyniki badań wyselekcjonowanych ligandów w żywych komórkach, pokazując, że w niektórych przypadkach wiązały się one w kompleksy o rozmiarach porównywalnych ze snurportyną, w tym jeden wspomniany koniugat z DMHBI oraz jeden z koniugatów wykazał zwiększony czas życia fluorescencji w komórkach.

W części trzeciej – eksperymentalnej, przedstawione zostały procedury i syntezy chemiczne, charakterystyka otrzymanych związków (MS, NMR), opisy wykonywanych eksperymentów od metod biofizycznych (FQT, wysycanie liganda, degradacja i kinetyka enzymatyczna), po badania spektralne (zależności widm emisji od czynników jak polarność czy pH) i badania biologiczne (obrazowania FLIM, badania czasów życia fluorescencji dla kompleksów w komórkach), również wzory i modele wykorzystane w analizie wyników i kończąc na potencjalnych dalszych zastosowaniach i obszarach rozwoju dla wyselekcjonowanych związków.

Część wyników została również opublikowana w dwóch czasopismach z listy filadelfijskiej:

Publikacje naukowe w czasopismach z listy filadelfijskiej:

- 1) P. Surynt, B. A. Wojtczak, J. Panecka-Hofman, K. Kwapiszewska, M. Chrominski, T. Kalwarczyk, D. Kubacka, T. Spiewla, R. Kasprzyk, R. Holyst, J. Kowalska, J. Jemielity, Trimethylguanosine cap-fluorescent molecular rotor (TMG–FMR) conjugates are potent, specific snurportin1 ligands enabling visualization in living cells, *Org. Biomol. Chem.*, 22, 6763 (2024); doi: 10.1039/d4ob01019a
- 2) B. A. Wojtczak, M. Bednarczyk, P. J. Sikorski, A. Wojtczak, P. Surynt, J. Kowalska and J. Jemielity, Synthesis and Evaluation of Diguanosine Cap Analogs Modified at the C8-Position by Suzuki-Miyaura Cross-Coupling: Discovery of 7-Methylguanosine-Based Molecular Rotors, *J. Org. Chem.*, 88, 11, 6827-6846 (2023); doi:10.1021/acs.joc.3c00126

Inne publikacje niezwiązane tematycznie z pracą dokorską:

- 1) N. Zeber-Lubecka, M. Kulecka, A. Jagiello-Gruszczyńska, M. Dabrowska, A. Kluska, M. Piatkowska, K. Baginska, M. Glowienka, P. Surynt, M. Tenderenda, M. Mikula, J. Ostrowski, Breast cancer but not the menopausal status is associated with small changes of the gut microbiota, *Frontiers in Oncology, Sec. Breast Cancer*, 14 (2024); doi: 10.3389/fonc.2024.1279132
- 2) K. Unrug-Bielawska i wsp. Human fecal transplantation modifies the gut microbiota but not metabolites in colon cancer patient-derived xenografts, *Cancer medicine*, 2025, w trakcie recenzji

2. Abstrakt

The trimethylguanosine (TMG) cap is a motif present at the 5' end of small nuclear and nucleolar RNAs, which are involved in RNA splicing. The TMG cap plays a crucial role in RNA processing and stability as it protects the RNA molecule from degradation by exonucleases and facilitates its export from the nucleus. In the cytoplasm in each cell the TMG cap plays a role in the recognition of snRNA by snurportin, a protein that initiates nuclear import formatting also complex with importin β . TMG cap analogs have been used as affinity resins in protein separation and purification from extracts or as nuclear localization signal for improving nuclear import of some polar and large biomolecules (DNA, streptavidin), however they can be used also in biochemical experiments and biological assays as molecular tools to substitute the natural TMG capped RNAs.

The main aim of my work was synthesis, physicochemical (free compounds) and biophysical characterization (complexed) of a series of dinucleotide TMG cap analogs and their conjugates with Fluorescent Molecular Rotors (FMR) in experiments with snurportin both *in vitro* and in cells. This functionalization was intended to open the possibility of detecting snurportin–ligand interactions *in vitro* and potentially *in vivo*. I have obtained large set (over 50) of final compounds with FMRs in different positions and different nucleotides part and evaluated as molecular probes for snurportin. Some compounds have been additionally modified either in bridging region (methylenebisphosphonate CH_2), by elongating to tetraphosphate or at 5'-O positions by changing O to S. These modifications were expected to ensure resistance to enzymatic degradation by human Nudt16 and/or maintain or enhance affinity towards snurportin.

Among FMRs five GFP-like chromophores (derived from green fluorescent protein) and two julolidine derivatives have been tested. The evaluation of binding affinities for snurportin showed unexpectedly a strongly stabilizing effect for TMGpppG-derived dinucleotides containing the GFP-like FMR at the 2'-O-position of guanosine. These newly discovered compounds are potent snurportin ligands with nanomolar K_D (dissociation constant) values, which are two orders of magnitude lower than that of natural TMGpppG. The effect is diminished by ~ 50 -fold for the corresponding 3'-regioisomers. To deepen the understanding of the structure–activity relationship, I have synthesized and tested FMR conjugates lacking the TMG cap moiety, which revealed, that this newly observed effect persist also in $m^7\text{G}$ caps and in less extend in GMP analogs, yet with unspecific interactions (ie. $m^7\text{G}$ cap-FMR conjugates were proved to bind competitively also with eIF4E). These experimental studies, have been supported by molecular docking, and both suggest, that the enhanced affinity arises from additional hydrophobic contacts provided by the GFP-like FMR moiety regardless of functional groups in phenyl ring. The strongest snurportin ligand, which also gave the greatest fluorescence enhancement (F_m/F_0) when saturated with the snurportin, were tested in living cells to detect interactions and visualize complexes by monitoring fluorescence lifetimes. This approach has potential applications in the study of RNA processing and RNA– protein interactions which is also discussed. Finally, 9 TMG cap-FMR conjugates have been identified in my studies as potent and specific snurportin ligands and among them 4 conjugates with DMHBI as FMR has shown beneficial fluorescence properties in complexes *in vitro*, while one exemplary conjugate from these have been tested in living cells and found to associate in complexes comparable in sized with snurportin.

3. Cele projektu

Ogólnym celem projektu będącego podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej była synteza chemiczna i zbadanie właściwości biofizycznych koniugatów dinukleotydowych analogów trimetyloguanozyny (TMG) kapu oraz TMG kapowanych oligomerów RNA znakowanych Fluorescencyjnymi Molekularnymi Rotorami (FMR) jako specyficznych narzędzi molekularnych do badania snurportyny, w warunkach *in vitro* oraz w warunkach komórkowych. Jako interesujące mnie właściwości badałem powinowactwo otrzymanych koniugatów do snurportyny (stałe dysocjacji K_D) oraz odpowiedzi sond molekularnych na tworzenie się kompleksu białko-ligand mierzone jako wzrost fluorescencji (F_m/F_0), a także odporność na degradację enzymatyczną enzymem z rodziny Nudix. Kolejnym celem pracy było opracowanie fluorescencyjnych narzędzi molekularnych opartych na analogach TMG kapu dla snurportyny oraz ocena ich przydatności do obrazowania procesów w żywych komórkach takich jak transport do jądra komórkowego.

Szczegółowe cele projektu doktorskiego:

1. Opracowanie metody syntezy pozwalającej na wprowadzenie funkcjonalnego linkera w różne pozycje nukleotydów (2',3'-OH, N1).
2. Synteza dinukleotydowych analogów TMG kapu zawierających linker z grupą azydkową lub propargilową do dalszych modyfikacji.
3. Synteza koniugatów TMG kap - FMR z wykorzystaniem reakcji typu „click”
4. Synteza tetranukleotydowego analogu TMG kapu (fragmentu naturalnie występującego U8 snRNA) z FMR.
5. Opracowanie metod oczyszczania dla wszystkich związków pośrednich i końcowych oraz ich pełna charakterystyka spektralna.
6. Charakterystyka spektralna koniugatów TMG-kap FMR (λ_{exc} , λ_{em}).
7. Zbadanie powinowactwa analogów TMG kapu z linkerami oraz koniugatów TMG kap – FMR do snurportyny.
8. Zbadanie zależności pomiędzy strukturą koniugatów analogu TMG kapu z FMR i powinowactwem snurportyny a w uzasadnionych przypadkach zastosowanie metod dokowania molekularnego dla wyjaśnienia wpływu oddziaływań stabilizujących oraz poszczególnych elementów strukturalnych na energię wiązania ligandów do snurportyny.
9. Zbadanie zmian fluorescencji koniugatów FMR pod wpływem oddziaływań ze snurportyną.
10. Określenie podatności ligandów z TMG kapem na degradację enzymem hNudt16.
11. Analiza danych eksperymentalnych pod kątem wyselekcjonowanie najlepszych związków do badań biofizycznych i biochemicznych nad funkcją snurportyny (w tym badań komórkowych metodą FLIM jako potencjalnych sond molekularnych dla snurportyny).
12. Obrazowanie czasów życia fluorescencji wybranych koniugatów (FLIM) w komórkach.
13. Przeprowadzenie badań czasów dyfuzji kompleksów w komórkach i ocena przydatności badanych sond molekularnych do monitorowania procesów komórkowych związanych ze snurportyną

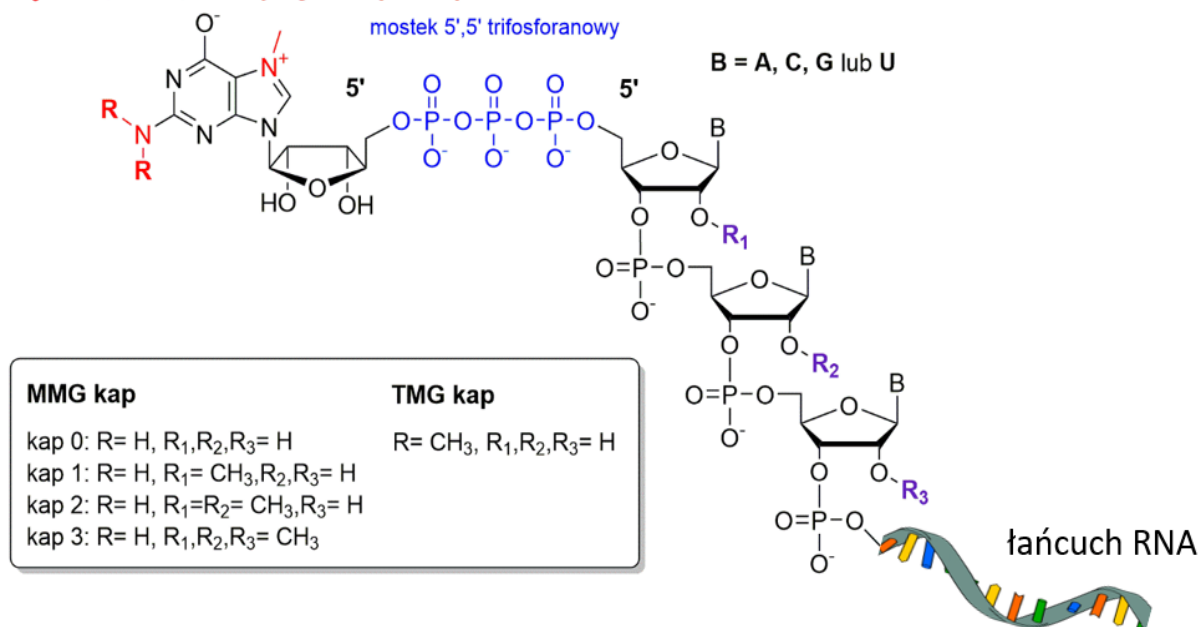
I.1. Bioróżnorodność struktur analogów 5' kapu i ich funkcje

I.1.1 Struktury kapu

Struktura kapu (lub też czapeczki) znajduje się na 5' końcu transkrybowanych RNA (przepisywanych z sekwencji DNA) i pełni szereg różnych funkcji, z czego głównym zadaniem jest m.in. chronić RNA przed degradacją przez 5'-egzonukleazy. Wśród kanonicznych struktur kapu wyróżnić możemy m^7G (MMG, monometyloguanozyno kap, jego odpowiednie 2'-O-metylowe pochodne oraz $m_3^{2,2,7}G$ (dalej TMG, trimetyloguanozyno kap. Na charakterystyczną budowę m^7G kapu składa się 7-metyloguanozyna (m^7Guo) połączona z łańcuchem RNA mostkiem 5',5'-trifosforanowym (Rys. 1) i określa się nazwą kap „0” lub po prostu m^7G kap. Jego pochodne zawierające dodatkowe grupy metylowe w pozycjach 2'-O kolejnych nukleotydów w sekwencji nazwano kolejno kap „1, 2, 3 i 4” co wskazuje odpowiednią liczbę metylowanych grup 2'-OH. Kapy typu „0, 1 i 2” występują naturalnie u człowieka^{1, 2}. Takie kapy mogą zawierać również grupy metylowe na zasadzie azotowej i tu najczęściej występującą modyfikacją jest m^6A . Z kolei kap „4” wykryty u pierwotniaków *Leishmania* posiada aż dwa dodatkowo modyfikowane na zasadzie nukleotydy: $m_2^6A_m$ i m^3U_m ^{3, 4}. Jako ważną modyfikację struktury kapu należy wyróżnić tę, która w reszcie 7-metyloguanozyny jest podwójnie metylowana w pozycji egzoaminowej N2 i taki kap nazywa się trimetyloguanozyno (TMG) kapem. Każdy z tych rodzajów kapu pełni nieco inne funkcje a ich syntetyczne analogi znajdują zastosowanie np. jako inhibitory procesów biochemicznych angażujących te kapy^{5, 6}, np. analogi m^7G kapu jako inhibitory procesu translacji⁷ (rozdz. I.1.5).

m^7G ; MMG ; monometyloguanozyno kap

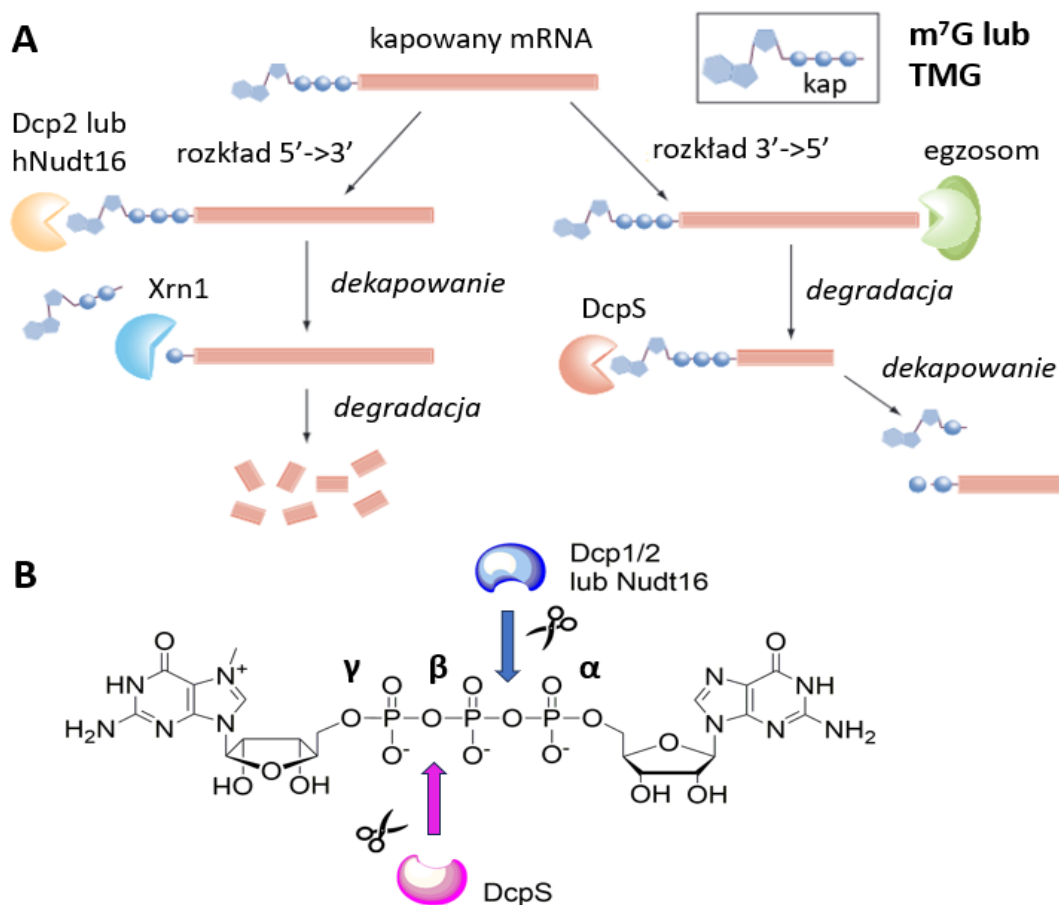
$m_3^{2,2,7}G$; TMG ; trimetyloguanozyno kap



Rys. I. 1 Struktury różnych kanonicznych kapów końca 5' różnych RNA (mRNA, ncRNA) u eukariontów

Dojrzałe mRNA zakończone na 5' kapem (głównie m^7G , ale niekiedy TMG również ulegają translacji, patrz I.1.2), po spełnieniu swojej funkcji w biosyntezie białek, ulegają rozpadowi z udziałem różnych enzymów takich jak 3' i 5'-egzonukleazy (odpowiednio egzosom i Xrn1), enzymy DcpS, Dcp2, Nudt16 (rys. I. 2). Sygnałem do rozkładu mRNA jest deadenyłacja 3'

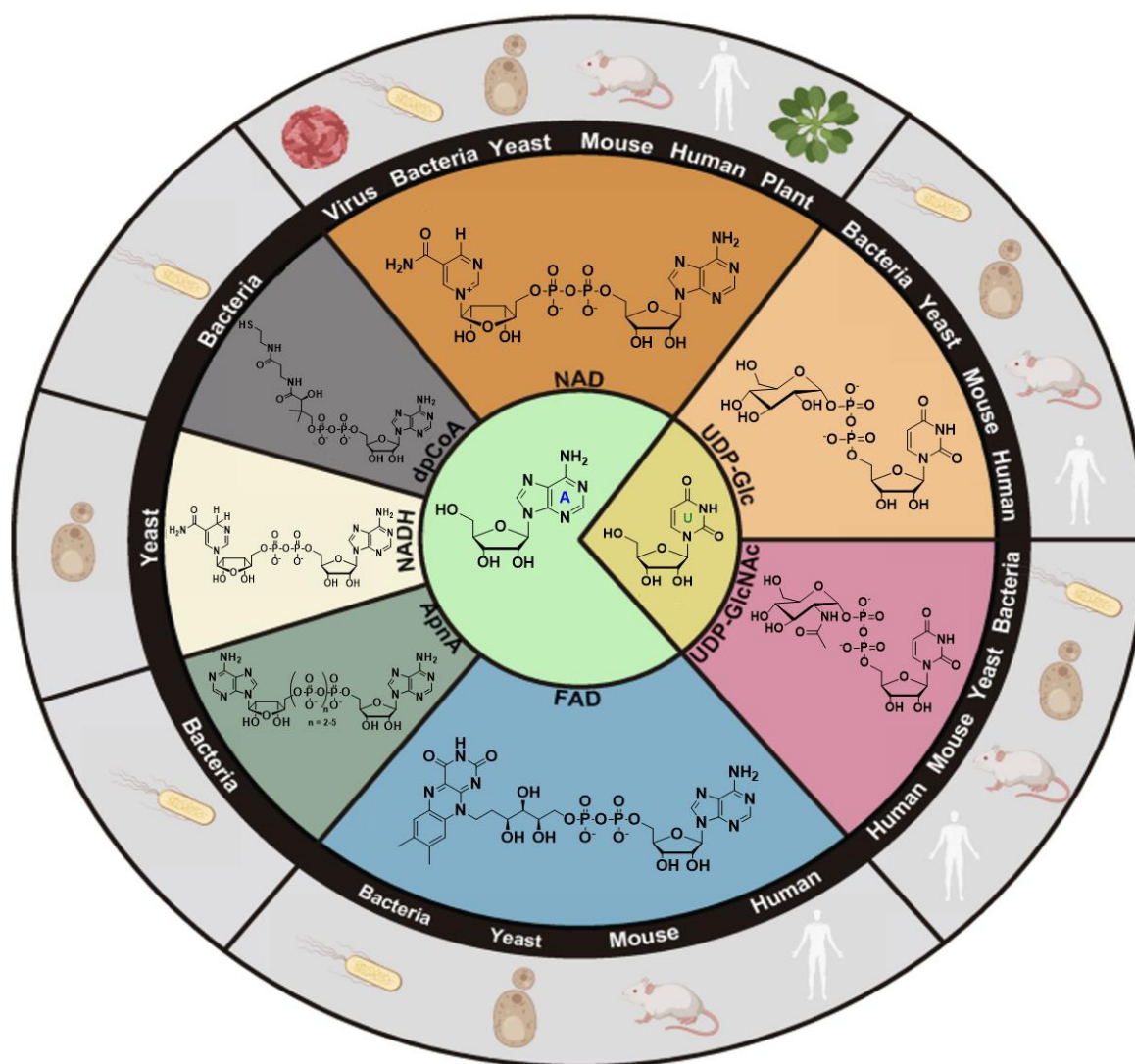
końca, następnie rozkład może zachodzić jednocześnie albo w kierunku od 3' do 5', albo 5' do 3'. Utylizacja rozumiana jako degradacja takich fragmentów jest szczególnie ważna w homeostazie życia komórek, np. w proliferacji komórek nowotworowych ważną rolę odgrywa białko eIF4E, którego nadekspresję powiązano z wieloma typami nowotworów⁹⁻¹² i które w takiej sytuacji powodują również inicjację translacji słabych, niekorzystnych mRNA i dla których kumulacja „śmieciowych” białek może indukować karcynogenezę¹³⁻¹⁵. W normalnych warunkach (poziomach białka eIF4E) ten proces jest nieznaczący i regulowany przez właśnie odpowiednie enzymy degradujące. Enzymy te katalizują reakcje dekapowania na różny sposób, np. Nudt16 i Dcp1/2 tną wiązanie fosfodiesterowe między atomami fosforu α i β , podczas gdy DcpS między pozycjami β - γ (rys. 1. 2B).



Rys. 1. 2 Schematyczne przedstawienie: A. ścieżki degradacji kapowanego mRNA; substratem dla Dcp1/2 lub hNudt16 są relatywnie dłuższe fragmenty mRNA a dla DcpS krótsze, które uległy już częściowej degradacji przez egzozom; B. miejsca cięcia w obrębie mostka 5',5'-trifosforanowego przez enzymy dekapujące kanoniczne (m^7G / TMG) kapy: Dcp1/2, Nudt16 i DcpS.

Do nie tak dawna (2009r.) uważano, że są to jedyne naturalne struktury kapu w żywych organizmach, jednak pojawiły się prace opisujące detekcję również niekanonicznych struktur kapu (ang. non-canonical caps, NCC)¹⁶⁻¹⁸. Do tej grupy kapów zalicza się metabolity nukleotydów: dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD), koenzym A (CoA), dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD), urydino 5'-difosfoglukozą (UDP-Glc) i 5'-N-acetylglukozamino difosforan urydyny (UDP-GlcNAc). Zostały one przedstawione na Rys. 2 wraz z zaznaczonymi organizmami w których je wykryto. NAD i CoA kapy wykryto początkowo w małych RNA bakterii¹⁹ i NAD jako pierwszy drożdży i człowieka²⁰. Julius i wsp.²¹ rozszerzyli zasób naturalnych kapów o FAD, UDP-Glc i UDP-GlcNAc, wskazując również że NCC pełnią funkcję

w regulacji ekspresji genów, np. bakteryjna polimeraza RNA katalizuje reakcje biosyntezy NAD i UDP kapowanych RNA. Wśród NCC wyróżnia się jeszcze polifosforany dinukleotydów (Np_nNs)^{22,23} (Rys. I. 2), które zidentyfikowano u bakterii i które w odróżnieniu od poprzednich nie są syntezowane przez koenzymy (tzw. koenzymowe kapy). Tak wysoka bioróżnorodność struktur kapu i pełnionych przez nich funkcji sprawiła, że naukowcy skierowali ostatnio ku nim swoje zainteresowanie^{6, 12}



Rys. I. 3 Struktury różnych niekanonicznych kapów końca 5' różnych RNA wraz z organizmami u których je wykryto (zmodyfikowany na podst.²⁴)

Biosynteza NCC zachodzi z udziałem polimeraz RNA w procesie transkrypcji, gdzie metabolity kapów są transkrybowane zamiast kanonicznych, np. preferowany NAD czy NADH nad ATP, szczególnie przez mitochondrialne polimerazy^{25, 26}. W kilku pracach^{25, 27} sugeruje się również, że kap NAD może powstać post-transkryptycznie z udziałem snoRNA, np. u ludzi. Mechanizm powstawania tej modyfikacji nie został jeszcze poznany. Stwierdzono, że NAD u eukariotów pełni rolę znacznika destabilizującego²⁶, tzn. NAD-RNA transfekowane do komórek eukariotycznych wykazały mniejszą stabilność niż niekapowane RNA. NCC występują w ok. 0,3% w ludzkim mRNA²⁸, a w mysim mRNA wykryto od 3,7 (wątroba) do 5,1% (komórki nerek) NCC w porównaniu do całkowitej ilości wykrytych kapów. U *Escherichia Coli* NCC stanowiło 100% całkowitej ilości kapu.

Enzymy katalizujące reakcje degradacji struktury kapu nazywa się potocznie dekapującymi i należą do nich hydrolazy (konkretniej fosfatazy). Degradację m⁷G i TMG kapu opisałem szerzej w dalszych rozdziałach (roz. I.1.4). Praca przeglądowa z 2022r. podaje obecnie poznane enzymy katalizujące reakcje degradacji NCC¹⁶ i zostały one przedstawione w tabeli 1 oraz rys. I. 4.

Tabela 1 Enzymy degradujące niekanoniczne kapy

Klasa	Enzymy	Substrat	Produkt
Hydrolazy 5'-hydroksy dinukleotydów	DXO/Rai1, Dxo1, Xrn1, Rat1	XppA-RNA	XppA + pRNA
Hydrolazy difosforanów nukleotydów połączonych z X (Nucleotide linked to x, Nudix)	NudC, Nudt2, Nudt7, Nudt8, Nudt12, Nudt15, Nudt16, Nudt19	XppA, XppA-RNA	Xp + pA-RNA
Hydrolaza pirofosforanu nukleotydów	RppH	XppA, XppA-RNA	Xp + pA-RNA
Hydrolaza polifosforanów dinukleotydów	ApaH	Npppp(p)N, Npppp(p)N-RNA	Npp + pp(p)N-RNA

“X” oznaczać może rybozyd nikotynoamidowy, rybitol, penteinę (NAD, FAD lub odpowiednio CoA) w zależności od substratu



Rys. I. 4 Schematyczne przedstawienie miejsc rozszczepienia wiązań estrowych przez hydrolazy (Nudix i DXO/Rai1)

W swojej pracy, ze względu na badanie analogów TMG kapu, omówiłem szerzej zagadnienia z nim związane jak biosynteza, występowanie, funkcje i enzymy dekapujące.

I.1.2 Występowanie i biologiczne funkcje m⁷G i TMG kapu

Struktura m⁷G kapu obecna jest na 5' końcu mRNA i jego najważniejszą funkcją jest inicjacja translacji (wiązanie z eIF4E, podjednostkami rybosomów i całą maszyną translacyjną). Wśród innych funkcji wyróżnić można eksport do cytoplazmy, poliadenylację, splicing (proces składania genów; wycinanie niekodujących fragmentów pre-mRNA), degradację (po

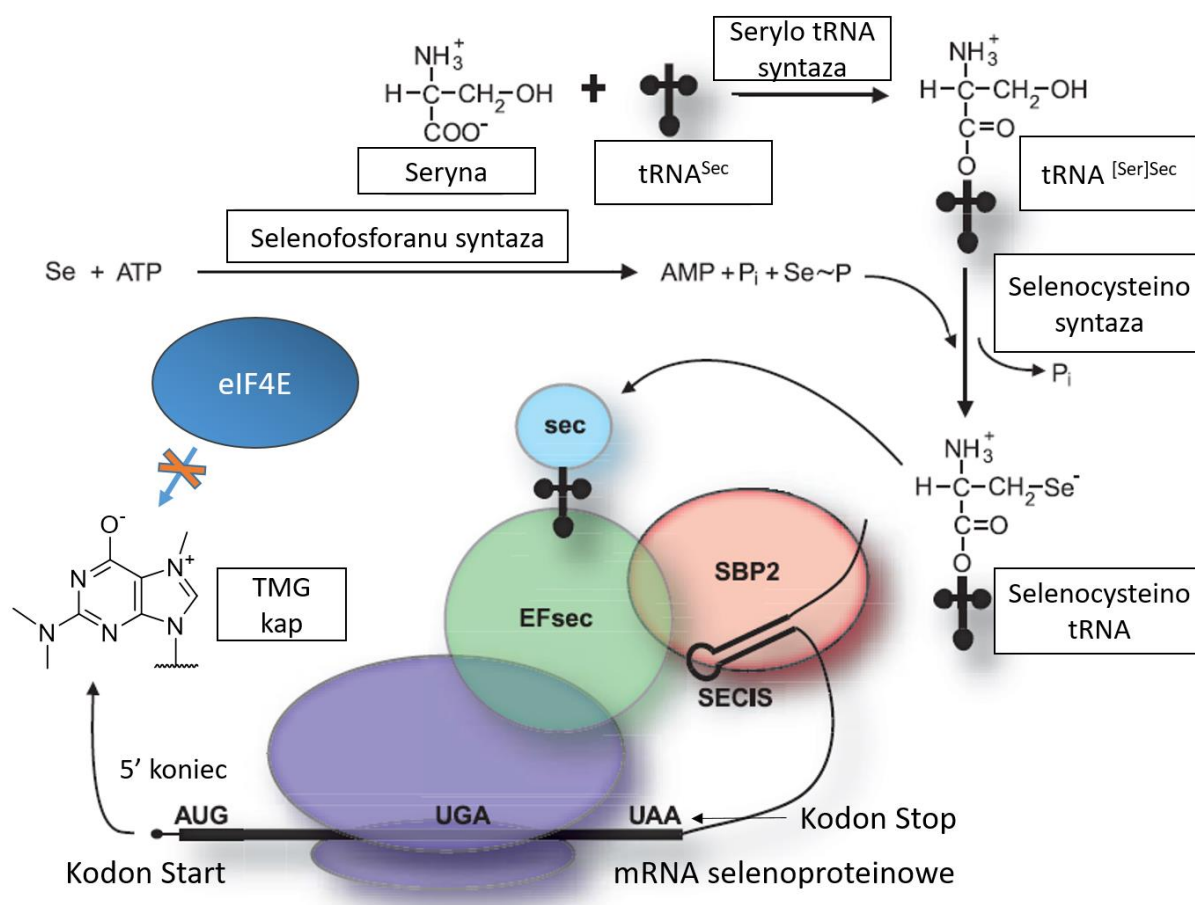
spełnieniu funkcji mRNA)²⁹. Niektóre m⁷G kapowane RNA ulegają dalej reakcji hipermetylacji do TMG kapu (katalizowana przez TGS1, rozdz. I.1.3)

TMG kap występuje na 5' końcu w większości niekodujących RNA jak małe jądrowe RNA (snRNA)³⁰, małe jądrowe RNA (snoRNA)³⁰⁻³⁶, RNA telomerazy (długie niekodujące RNA, lncRNA)³⁷⁻³⁹, ale również w przypadku niektórych mRNA⁴⁰⁻⁴⁴.

snRNA charakteryzują się dużą zawartością nukleotydów urydynowych, stąd często nazywane są U-bogatymi snRNA i należą do nich RNA stanowiące prekursor spliceosomu (U1, U2, U4/U6, U5, U7, U11, U12). Te snRNA można dalej podzielić na Sm RNA (wszystkie prócz U6) wiążące białko Sm i LSm (U6, U6atac) wiążące białka podobne do Sm (ang. Like-Sm, LSm). Sm RNA posiadają TMG kap, natomiast LSm RNA wyjątkowo posiadają kap 5'-monometylotrifosforanowy, tj. CH₃-pppG). TMG kap u snRNA umożliwia interakcje ze snurportyną, białkiem inicjującym translokację cytoplazmatyczno-jądrową. Kompleks transportowany jest do jądra komórkowego i tam następuje jego dysocjacja i dalej zachodzi splicing. Tym samym TMGpppN stanowi u snRNA sygnał transportu dojądrowego (ang. NLS)^{45, 46-51} i potencjalnie można go wykorzystać również w syntetycznych i terapeutycznych AONs (ang. antisense oligonucleotides) celem zmaksymalizowania ich stężenia w jądrze komórkowym. Moreno i wsp.⁵² wykazali, że użycie TMG kapu w AONs i innych RNA/DNA dużych rozmiarów faktycznie znacząco zwiększa ich lokalne stężenie w jądrze komórkowym. Metoda ta jest obiecująca jako, że nie wymaga przyłączania sekwencji aminokwasów wiązanych przez białka importujące (importyna α/β) metodą syntezy w fazie stałej (SPPS)⁵³⁻⁵⁵. Procesy zachodzące z snRNA w biosyntezie spliceosomu opisałem szerzej w rozdziale dotyczącym interakcji ze snurportyną (rozdz. I.2.1)

Do snoRNA zalicza się krótkie RNA: U3, U8, U13 a ich hipermetylacja zachodzi w przeciwieństwie do snRNA w jądrze komórkowym i katalizowana jest przez SF TGS1⁵⁶⁻⁵⁸. Po metylacji snoRNA kierowane są do ciałek Cajala, ulegają dojrzewaniu, a dalej transportowane są do jąderka³⁵ (suborganella). Jąderko jest miejscem biogenezy i transportu snoRNA i rybosomalnego RNA (rRNA). Sugeruje się, że TMG kap u snoRNA pełni rolę sygnału transportowego do jąderka niektórych komórek^{49, 59}, ale jednak nie wszystkich^{35, 60-64}.

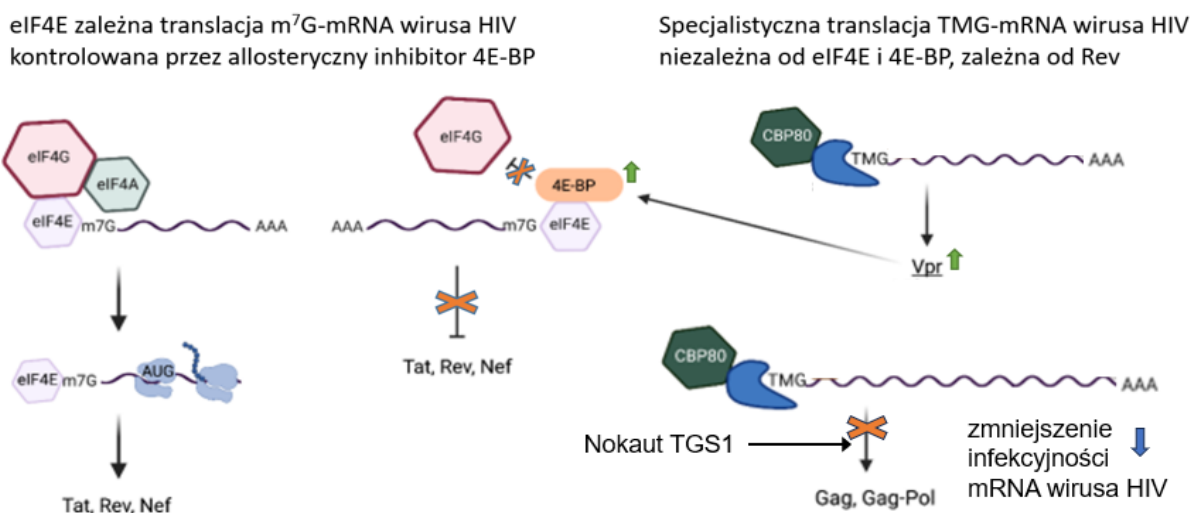
Niektóre mRNA kodujące sekwencję aminokwasową białek selenowych również posiadają na 5' końcu strukturę TMG kapu^{40, 63}. W tym przypadku TMG kap pełni rolę ochronną i oraz hamuje translację, tzn. uniemożliwia translację zależną od eIF4E, bo nie rozpoznaje ono mRNA kapowanych TMG. Inicjacja translacji zachodzi poprzez białko eEFSec oraz przez przyłączenie tRNA z antykodonem komplementarnym do UGA, co umożliwia jego odczytanie jako selenocysteiny zamiast jako kodon STOP. tRNA w tym przypadku niesie w ramieniu antykodonu aminokwas – serynę. Jej modyfikacja w wyniku reakcji translacji powoduje powstanie selenocysteiny. Przyłącza się kolejne białko SECIS2 (SBP2) (Rys. I. 5)^{34, 64}, następuje przyłączenie kompleksu Sec-tRNA-eEFSec-mRNA do jednostki rybosomu oraz translacja mRNA i biosynteza selenoproteiny. Selenoproteiny pełnią funkcje ochronne m.in. przed stresem oksydacyjnym, stanami zapalnymi, chorobami nowotworowymi, chorobami układu odpornościowego czy też męskiego układu rozrodczego^{19, 40, 65-67}



Rys. 1. 5 Schemat przedstawiający oddziaływania biomolekuł zaangażowanych w translację selenoproteinowych mRNA: eEFsec, SBP2, tRNA^{[Ser]Sec} i mRNA zakończone TMG kapem⁴⁰

TMG kap zlokalizowano również na 5' końcu wielu mRNA u nicieni czy świdrowców^{43, 68, 70-72} i pełni tam rolę regulatorową ekspresji genu, bierze udział w wielu procesach życiowych groźnych pasożytów (translacja mRNA). Geneza TMG kapowanych mRNA u nicieni związana jest z procesem *trans*-splicingu, który w odróżnieniu od zwykłego splicingu na połączeniu egzonów z dwóch odrębnych RNA^{68, 73}. W wyniku tego procesu dołączany jest TMG kap z krótką sekwencją SL, tzw. *splice leader*. Główną funkcją *trans* splicingu jest przetwarzanie (edytowanie) operonów^{44, 74, 75} oraz prawdopodobnie zapobiega terminacji transkrypcji w operonach. *Trans*-splicing do końca 5' mRNA dodaje TMG kap, który blokuje degradację egzonukleolityczną i umożliwia kontynuację transkrypcji przez pozostałą część operonu. Następnie ogon poli-A chroni RNA przed miejscem cięcia przed degradacją. U *C. elegans* ok. 70% genów ulega procesowi *trans*-splicingu, ale tylko ok. 9% znajduje się w procesie końcowym. Niektóre nicienie mogą nie zawierać operonów⁷⁶. Z tych powodów podejrzewano inne funkcje tego procesu jak zwiększona stabilność mRNA czy wydajność translacji, jednak wykazano, że TMG-SL-mRNA nie są ani bardziej stabilne, ani nie ulegają skuteczniej translacji niż mRNA niepodlegające temu splicingowi⁷⁷⁻⁷⁹. Na chwilę obecną *trans*-splicing wykryto w wielu organizmach, np. *Euglenozoa*, płazińce, nicienie, świdrowce czy skorupiaki^{44, 79}.

Hipermetylacji ulegają tak samo niektóre mRNA wirusa HIV^{68, 79}. Te mRNA określa się mianem późnych, a TMG kap umożliwia przeprowadzenie specjalistycznej translacji niezależnej od eIF4E i 4E-BP⁸⁰ (Rys. 1. 6).

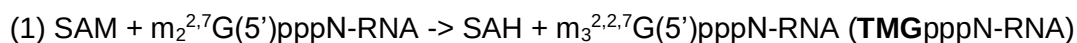
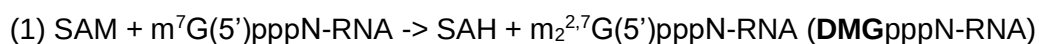


Rys. 1. 6 Szlaki translacji wczesnych i późnych mRNA wirusa HIV, które współzależnie kontrolują ekspresję wirusowych białek regulatorowych i białek strukturalnych/pomocniczych. Po lewej translacja wczesnych mRNA wirusa HIV zależna od eIF4E, po prawej translacja późnych mRNA wirusa HIV niezależna od eIF4E i 4E-BP i zależna od poziomu Rev; CBP80 – białko wiążące kap 80, Vpr – wirusowe białko R; Tat, Rev, Gag, Gag-pol – białka wirusowe służące namnażaniu wirusa, na podst. ⁸⁰

Wczesne mRNA HIV to w pełni przetworzone mRNA, które podlegają zależnej od eIF4E translacji do białek Tat, Rev i Nef. Hipofosforylowany 4E-BP allosterycznie wiąże eIF4E, blokuje interakcje z eIF4G i zatrzymuje inicjację translacji. TMG kapowane mRNA zależne od elementu Rev/Rev-responsywnego umożliwia specjalistyczną translację niezależnie od aktywności eIF4E. HIV niespliwowane i pojedynczo składane syntezują wirusowe białko R a to zwiększa 4E-BP⁸¹ i hamuje translację zależną od eIF4E. Translacja mRNA z kapem TMG trwa do czasu, gdy brak aktywności Tat/Rev ogranicza biosyntezę Vpr⁷⁹. Zmniejszenie poziomu mRNA z TMG kapem (np. przez nokaut enzymu TGS1) kodujących wirusowe białka pomocnicze (Gag, Gag-Pol) osłabia proliferację komórek. Zahamowanie tego rodzaju translacji przez nokaut TGS1 zmniejsza infekcyjność wirionów o kilka rzędów wielkości⁷⁹. To badanie pokazuje, jak mało jeszcze wiemy o funkcjach biologicznych TMG kapu i jego występowaniu.

I.1.3 Biosynteza TMG kapu

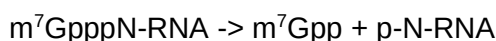
Biosynteza TMG kapu odbywa się w wyniku reakcji hipermetylacji azotu grupy aminowej N2 przez grupę CH₃ AdoMet zachodzącej wg mechanizmu reakcji SN²⁵² i katalizowanej przez enzym trimetyloguanozyno syntazę (TGS1). Enzym ten występuje zarówno w cytoplazmie jak i jądrze i został dobrze poznany a różne organizmy posiadają różne jego homologię⁸³⁻⁹⁷, od małych (283 aa, *S. Pombe*) po duże (853 aa, ludzka)^{85, 90, 96}. Forma krótka (SF) odpowiedzialna jest za metylację w jądrze komórkowym i dotyczy snoRNA u drożdży i ludzi, zaś długa (LF) odpowiada za metylację m⁷G kapu w cytoplazmie i dotyczy snRNA. Hipermetylacja dotyczy również niektórych mRNA, np. kodujących selenoproteiny i w tym przypadku może zachodzić np. u człowieka zarówno w jądrze (SF) jak i w cytoplazmie (LF TGS1)^{83, 84}. Niezależnie od miejsca reakcji, enzym wykorzystuje SAM (S-adenozyl-L-metioninę) i m⁷G kapowane RNA jako substrat. Reakcja jest dwuetapowa i w każdym etapie atom wodoru egzoaminowej grupy NH₂ ulega substytucji na jedną grupę metylową (CH₃):



I.1.4 Degradacja m⁷G i TMG kapu

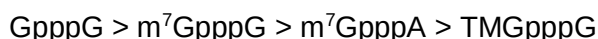
Degradacja m⁷G kapowanych RNA zachodzi z udziałem pirofosfataz: Dcp1/Dcp2⁹⁸⁻¹⁰², DcpS¹⁰³⁻¹⁰⁹, hNudt16¹¹⁰⁻¹¹². Charakteryzują się one różną specyficznością substratową i regioselektywnością. Substratem dla ludzkiego kompleksu Dcp1/Dcp2 są dłuższe (>25 nt) mRNA z m⁷G kapem, dla ludzkiego DcpS krótkie (~10-15 nt) oligonukleotydy również z m⁷G kapem. Warto wspomnieć, że enzymy te ekspresjonowane z różnych organizmów posiadają różne specyficzności substratowe i tak przykładowo DcpS z *Ascaris suum* (AsDcpS) katalizuje również reakcje N2-monopodstawionych syntetycznych analogów m⁷G kapu¹⁰⁸ z różnymi podstawnikami: metylowy, etylowy, propylowy, butylowy, izopropylowy, podczas gdy hDcpS tylko dla nierozbudowanych sterycznie (metyl, etyl). Rekombinowany DcpS (*C. Elegans*, CeDcpS) różni się od ludzkiego ortologa pod względem zdolności do hydrolizy TMGpppN, hydrolizując tylko substraty do długości 3 nt¹⁰³

Z wymienionych enzymów, ludzki enzym Nudt16 wykazuje również aktywność względem TMG kapu^{111, 113-115}. Ludzkie białko Nudt16 (ang. human Nudt16) jest hydrolazą z rodziny Nudix o aktywności fosfordiesterazy i katalizuje reakcje hydrolizy wiązania fosfodiesterowego między atomami P_α i P_β. hNudt16 występuje w komórkach wszystkich analizowanych tkanek, wykazuje lokalizację cytoplazmatyczno-jądrową¹¹² oraz hydrolizuje mono- i hipermetylowany kap występujący np. na małych jąderkowych RNA. Nadal niewiele wiadomo o specyficzności substratowej tego enzymu. Wiadome jest, że enzym katabolizuje takie substraty jak kanoniczne (d)NTPs, dinukleotydy i kapowane mRNA, jednak ostatnio wykazano, że substratem są też poliADP-rybozylowane (w wyniku modyfikacji post-translacyjnych) białka^{110, 116}. Enzym wykorzystuje różne dwuwartościowe jony, m.in. magnezu lub manganu jako kofaktory w reakcji a ich obecność lub brak determinuje specyficzność substratową. Dotychczas potwierdzono małe jąderkowe RNA (snoRNA) U8 jako substrat w obecności Mg²⁺ oraz m⁷G kapowane mRNA w obecności Mg²⁺ lub Mn²⁺¹¹⁷. Degradacja 5' końca mRNA zachodzi wg następującego schematu:



Podobnie zachodzi dla trimetylokapu (TMG) w wyniku czego powstaje TMGDP i p-N-RNA. Co ciekawe, niektóre mRNA, które uległo już degradacji może dalej podlegać procesowi rekapowania, tj. odtworzenia struktury kapu¹¹⁸. Proces ten wymaga jako substratu difosforanu kapu i fragmentu p-N-RNA oraz enzymu RNGTT. Pokazuje to, że biosynteza kanonicznych kapów może zachodzić nie tylko kotranskrypcyjnie, ale też post-transkrypcyjnie.

hNudt16 katalizuje również reakcje degradacji NAD, NADH, CoA oraz FAD kapów^{110, 112, 119, 120}, przy czym preferuje znacząco NAD nad pozostałe¹¹⁰. Jest zatem niespecyficzny, lecz selektywny. Znana dotąd specyficzność substratowa kanonicznych kapów jest następująca (wg kolejności od najsilniejszych substratów)¹¹¹:



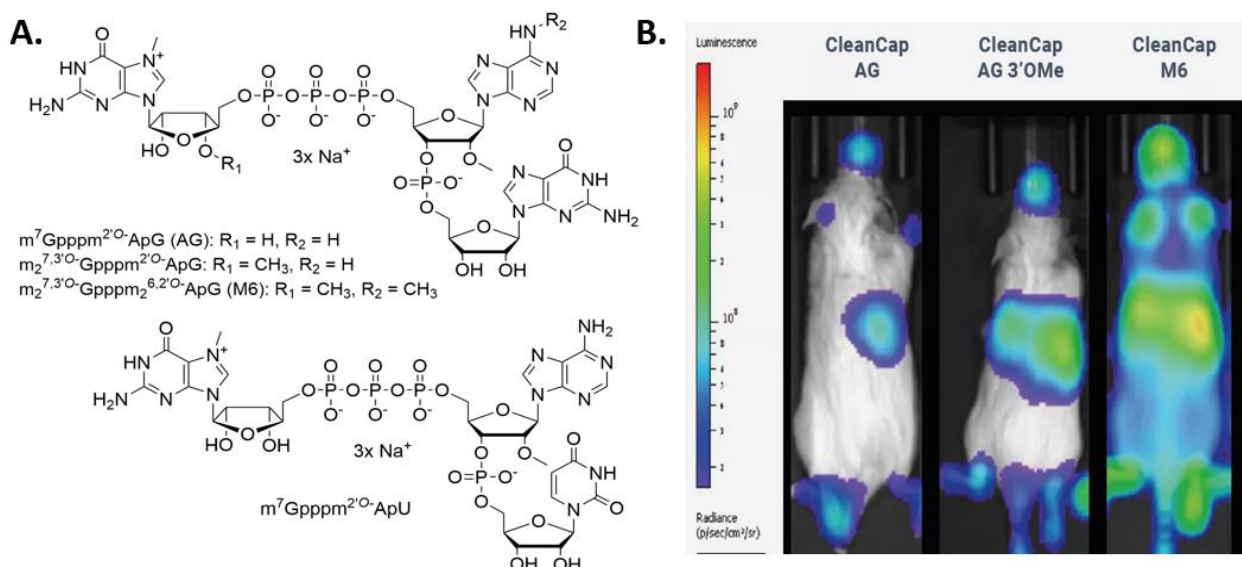
Białko *Xenopus laevis* X29 jest homologiem ludzkiego enzymu Nudt16 i zostało zidentyfikowane przez jego wysokie powinowactwo do wiązania się z małym jąderkowym RNA U8 (U8 snoRNA)¹²¹, niezbędnym do biogenezy rybosomów. Białko te może usuwać m⁷G i TMG kapy z RNA^{117, 121}, czyniąc je substratami dla 5'-egzonukleaz do degradacji. Podobnie do Nudt16, w obecności Mg²⁺ białka hydrolizują kap 5' z tylko jednego substratu TMG-RNA - U8

snoRNA, jednak w obecności Mn^{2+} lub Co^{2+} wszystkie kanoniczne RNA są substratami oraz wydajność degradacji jest wyższa¹¹⁷

I.1.5 Zastosowanie syntetycznych analogów kapu

W literaturze dość szeroko zbadano i opisano wykorzystanie syntetycznych analogów m⁷G kapu. Wiodącym zastosowaniem kapowanych mRNA jest terapia i prewencja chorób, w tym szczepionki mRNA. Pierwsze prace opisujące biologicznie aktywną produkcję mRNA zostały opublikowane w 1984 r. przez Kriega i wsp¹²². W 2000 r. Hoerr i wsp. wykazali, że bezpośrednia iniekcja mRNA może wywołać odpowiedź immunologiczną u myszy¹²³. W 2008 r. dwa koncerny farmaceutyczne Novartis i Shire utworzyły działy badań mRNA, przy czym pierwsza firma skupiła się na szczepionkach, a druga na terapiach. W tym czasie firmy BioNTech i Moderna również dołączyły do prac nad rozwojem technologii opartych na mRNA. Do 2019 r. Moderna opracowała dziewięć kandydatów na szczepionki mRNA przeciwko chorobom zakaźnym wywoływanym przez koronawirusa, ludzki metapneumowirus, wirus RSV, cytomegalowirus, wirus grypy, Epsteina-Barra, wirus HIV, Zika oraz Nipah, jednak żadna z tych szczepionek nie została dopuszczona jeszcze do obrotu¹²⁴ a problemami są wysoka niestabilność mRNA, właściwości immunogeniczne czy trudności w przenikaniu przez błony komórkowe. Praktyczne wykorzystanie szczepionek opartych na mRNA zyskało znaczenie z początkiem 2020 roku, po wybuchu pandemii COVID-19. Pierwsza szczepionka mRNA-1273 przeciwko zespołowi ostrej niewydolności oddechowej wywołanej koronawirusem SARS-CoV-2 została stworzona przez amerykańską spółkę Moderna w bezprecedensowo krótkim czasie poniżej roku. W podobnym czasie również firmy BioNTech i Pfizer stworzyły szczepionkę mRNA przeciwko COVID-19¹²⁵, a obecnie Moderna planuje również szczepionki COVID-19 nowej generacji, stabilne w lodówce (mRNA-1283) i obecnie znajdują się w badaniach 3-ciej fazy. Do zalet szczepionek mRNA należą: a) skuteczna aktywacja specyficznej komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej bez indukcji odpowiedzi antywektorowej, b) szybka, skalowalna produkcja zapewniająca wysokie wydajności w warunkach *in vitro*, c) niska reaktogenność w przeciwieństwie do klasycznych inaktywowanych szczepionek wirusowych.

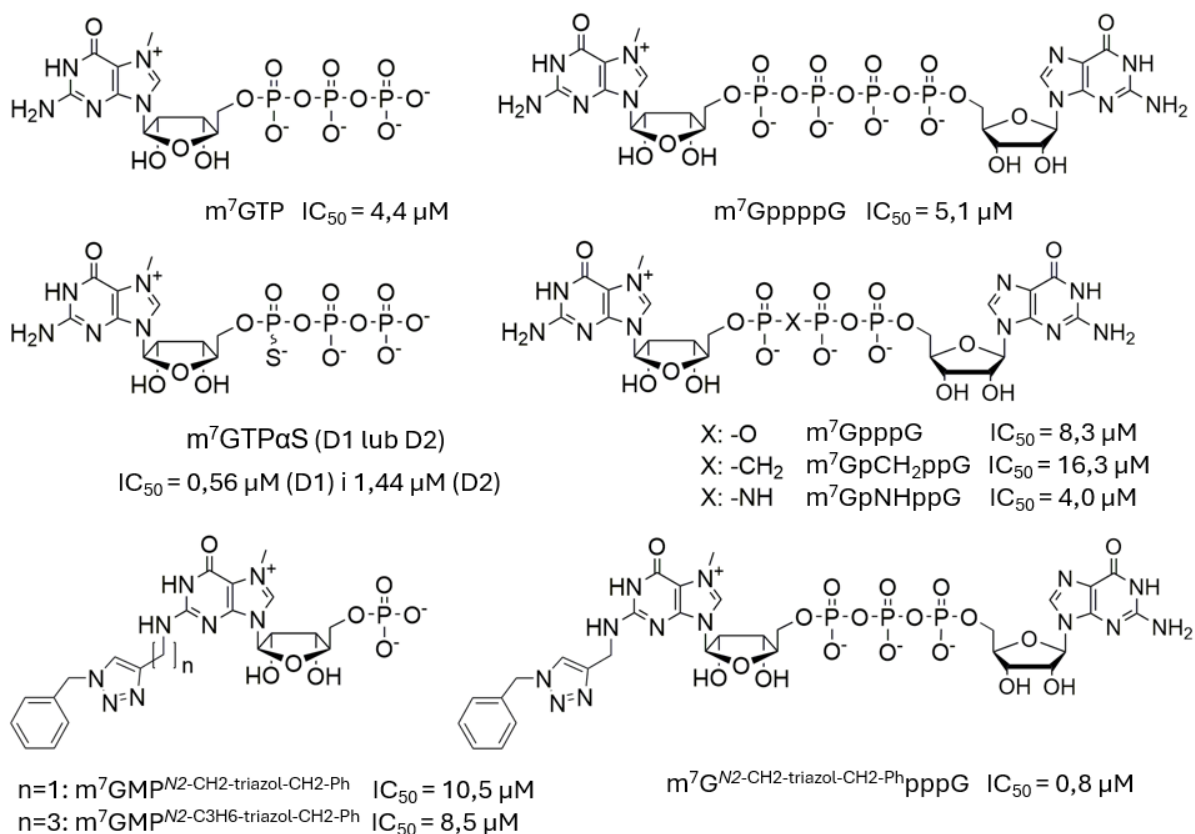
Transkrypcja *in vitro* jest szeroko stosowaną metodą produkcji mRNA do celów badawczych i rozwoju terapeutycznego. Struktura m⁷G kapu i jego analogów w mRNA, kluczowa dla stabilności i translacji, nie jest domyślnie włączana w tej metodzie. Kilka analogów kapu znalazło w tym obszarze zastosowanie komercyjne i pomagają wielokrotnie zwiększyć wydajność translacji, jak np. analog m₂^{7,30}-GpppG ARCA (Rys. I. 12) i analogi CleanCap® (Rys. I. 7), które są z kolei opatentowanymi trinukleotydowymi analogami kapu-1, a niektóre również analogami ARCA (m₂^{7,3'-O}Guo).



Rys. 1. 7 A. Trinukleotydowe analogi CleanCap® służące zwiększeniu wydajności translacji mRNA, B. Obrazy pokazujące różnice aktywności lucyferazy i wydajności translacji różnych Fluc mRNA u myszy, 24 h po podaniu jednokrotnym (d = 1 mg/kg) ¹²⁶

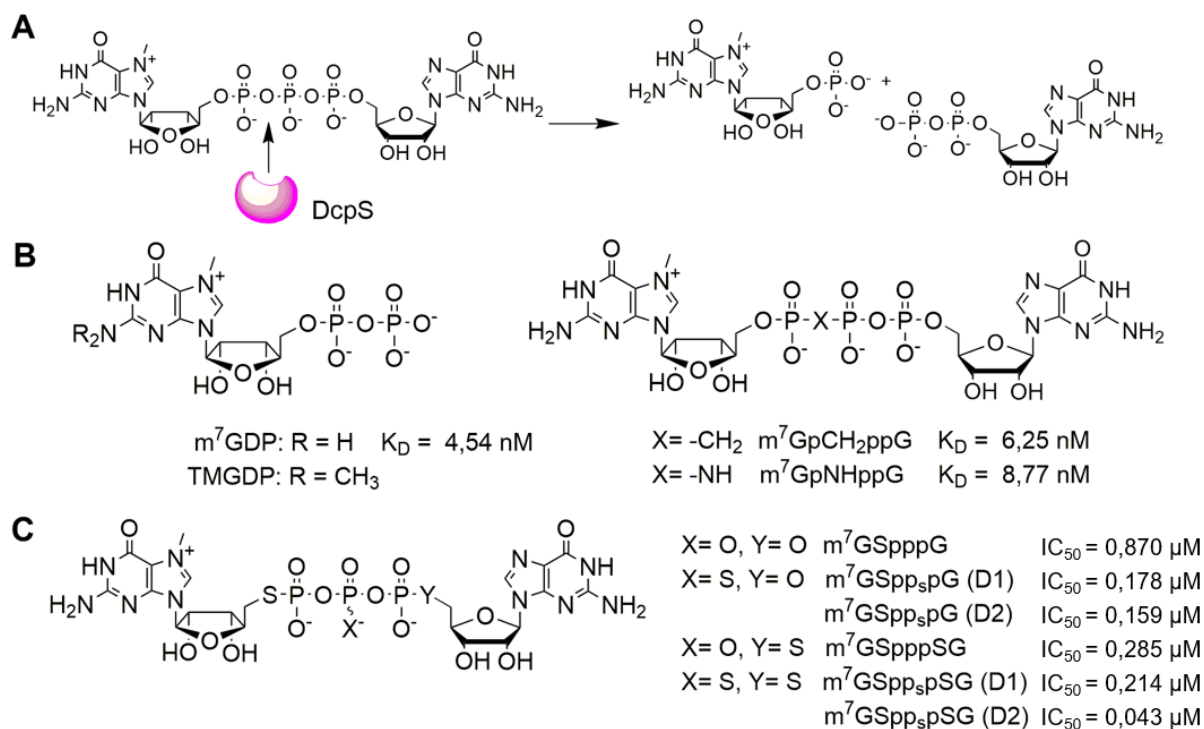
Technologia CleanCap® firmy TriLink oferuje łatwe, wydajne (>95%) rozwiązanie dla ko-transkrypcyjnej reakcji wprowadzania kapu bezpośrednio do 5' końca mRNA. Analog CleanCap® M6 z modyfikacją $m_2^{6,2'-O}A$ jest najnowszym, czwartym w ofercie analogiem m^7G oraz zwiększa ekspresję białka o ponad 30% w porównaniu z poprzednimi analogami. Zastosowanie tej technologii zwiększa wydajność kapowania (>95%) w porównaniu do analogu ARCA (~60-80%) oraz skraca czas produkcji mRNA (zmniejsza wymagania co do etapów oczyszczania). CleanCap® jest stosowany na przykład przez BioNTech/ Pfizer w produkcji szczepionek mRNA BNT162b1 i BNT162b2 przeciwko SARS-CoV-2 ¹²⁷⁻¹³⁰

Niektóre analogi fosforanów m^7Guo i dinukleotydowe analogi m^7G kapu znalazły zastosowanie również jako inhibitory translacji (Rys. 1. 9). Są to związki inhibujące białko eIF4E, które przez wiązanie m^7G kapowanych mRNA rozpoczyna maszynę translacyjną związana z innymi białkami czy tRNA. Wspomniane związki blokują dostęp dla substratów komórkowych uniemożliwiając ich translację. Wśród nich, analog dinukleotydowy modyfikowany w poz. N2 triazolem i pierścieniem fenylovym wykazał jedne z najsilniejszych właściwości inhibujących ¹³¹. Tu warto podkreślić, że nadmierna translacja zachodzi w komórkach nowotworowych, które szybko i niekontrolowanie się namnażają i w wielu typach nowotworów zaobserwowano zwiększone poziomy eIF4E ^{7-10,132-134} a szczególnie jego fosforylowanej formy (p-eIF4E) ^{9,135-138}, które uznano za onkogenne białko. Zmniejszanie aktywności eIF4E, konkretnie w zmienionych nowotworowo komórkach może przynieść korzyści terapeutyczne (brak dalszego namnażania)



Rys. I. 8 Przykłady silnych inhibitorów translacji w oparciu o analogi tri- i monofosforanów $m^7\text{Guo}$ i $m^7\text{G}$ kapu wraz z wartościami IC_{50} wobec ludzkiego eIF4E^{131, 139}

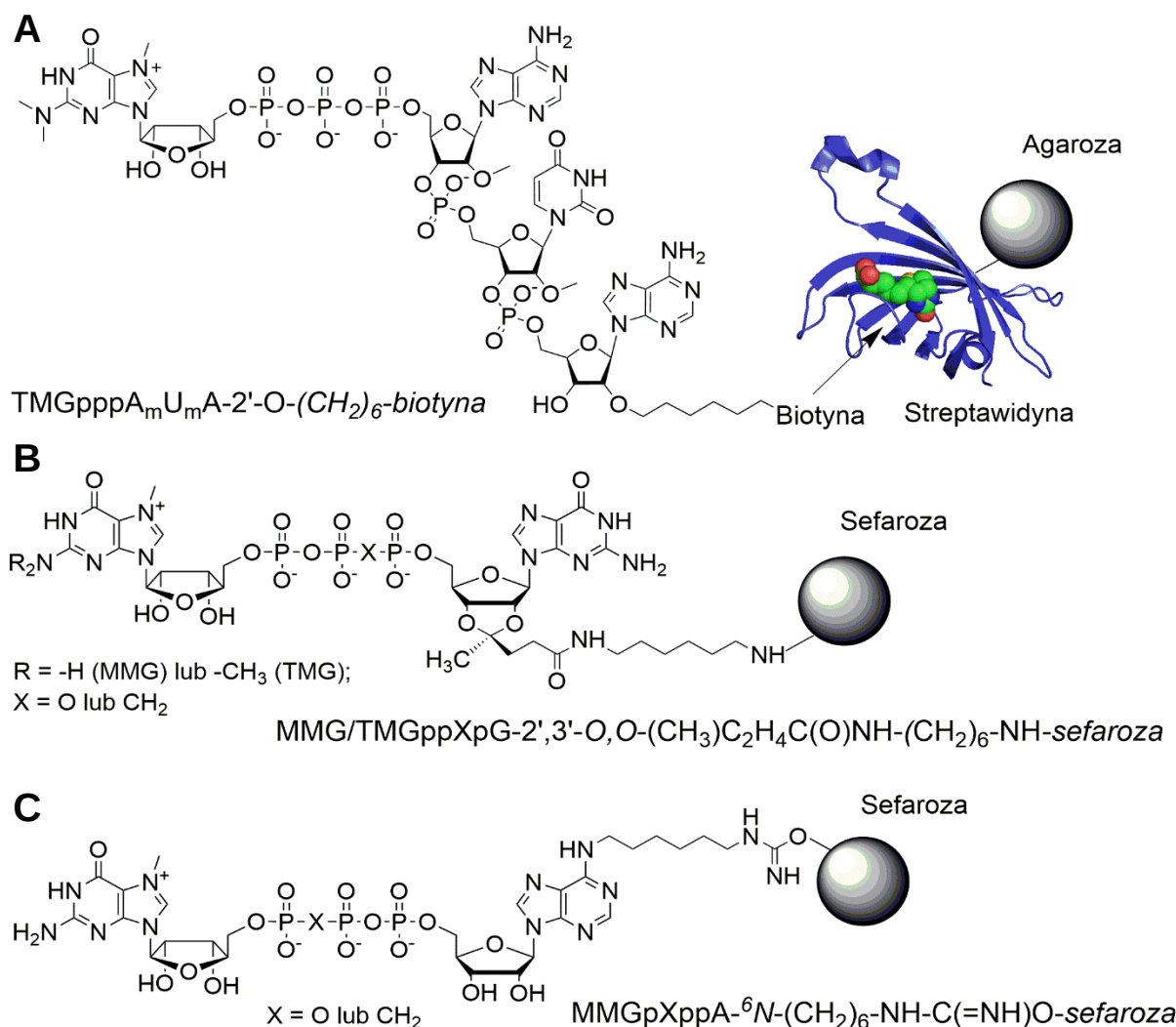
Wśród silnych ligandów enzymu hDcpS będących jednocześnie odpornymi na degradację sklasyfikowano $m^7\text{GDP}$ oraz dwa analogi $m^7\text{G}$ kapu modyfikowane w mostku 5',5'-trifosforanowym w poz. β - γ (miejsce cięcia) (Rys. I. 9A,B). Ponadto zaobserwowano, że $m^7\text{GDP}$ i TMGDP wiążą się z wysokim powinowactwem i inhibują reakcje hydrolizy $m^7\text{GpppG}$ (substrat, rys. I. 9A) enzymem DcpS (różne jego homologi: ludzki, z drożdży, nicieni) *in vitro*¹⁴⁰. Podobnego efektu oczekuje się od wspomnianych dwóch ligandów będących niehydrolizowalnymi analogami $m^7\text{G}$ kapu (panel B), jednak to nie zostało jeszcze zweryfikowane eksperymentalnie^{105, 141}. Opracowano 5'-tiofosforanowe dinukleotydowe analogi $m^7\text{G}$ kapu wykazujące właściwości inhibitorów hDcpS¹⁴², (panel C) i wśród nich najlepszy inhibitorem enzymu okazał się związek $m^7\text{SGpp}_\text{S}\text{pSG}$ zawierający aż trzy modyfikacje z wprowadzonym atomem siarki którego diastereoizomer D2 wykazuje nanomolowe stężenie inhibitujące IC_{50} . Znanymi dotąd aplikowalnymi klinicznie inhibitorami tego enzymu są C5-podstawione 2,4-diaminopochodne chinazoliny, małe cząsteczki otrzymane z $m^7\text{GpppG}$ jako struktury wiodącej, które oprócz tego, że wykazują inhibicję reakcji, to wykazują również indukcję ekspresji białka SMN2, które z kolei powiązane z rdzeniowym zanikiem mięśni (SMA, ang. spinal muscular atrophy). Okazuje się bowiem, że niedobór tego białka związany jest ze wzmożoną aktywnością enzymu DcpS i co ciekawe, badania z użyciem wspomnianych związków wskazały tę relację oraz na enzym DcpS jako potencjalny cel terapeutyczny (podczas gdy w projektowaniu leków zwykle cel molekularny jest już znany a poszukuje się jego inhibitorów). Wśród nich dobrze poznanym inhibitorem jest cząsteczka RG3039, która wykazuje porównywalne wartości IC_{50} ($0,071 \mu\text{M}$)¹⁴² do wspomnianego już analogu $m^7\text{SGpp}_\text{S}\text{pSG}$ D2, chociaż nowe prace mówią o pochodnych chinazoliny z wartościami rzędu $\sim 5\text{-}10 \text{ nM}$ ¹⁴³.



Rys. I. 9 A. Schemat degradacji $m^7\text{G}$ kapowanego dinukleotydu przez enzym DcpS i przykłady analogów kapu, odpornych na degradację B. będących silnymi ligandami DcpS wraz z wartościami stałych dysocjacji kompleksów ligand-hDcpS ¹⁴⁰, C. silnymi inhibitorami wraz z wartościami IC_{50} ¹⁴²

Oprócz tego niektóre analogi wykazują aktywność przeciwwirusową, np. $m^{2,7}\text{GMP}$ (DMGMP), $m^{2,7}\text{GpppG}$ (DMGpppG) wykazują aktywność inhibitującą względem wirusowej 7-metyloguaninotransferazy ¹⁴⁴ a $m^7\text{GMP}$ oraz $m^7\text{GpppG}$ względem RNA polimerazy wirusa *Influenza* ¹⁴⁵. Spektrum zastosowania analogów kapu w obszarze wirusów wiążących kap stale rośnie, i tak przykładowo mechanizm kapowania (jego przyłączania) wykorzystują również wirusy poprzez NS5 metylotransferazę, 2'-O-metylotransferazy czy guanylotransferazy, które mogą stanowić cel molekularny a wśród nich również wirus HIV wykorzystuje w komórce gospodarza enzym TGS1 do przyłączania TMG kapu, co zostało już wspomniane (r.l.1.2) i dzięki czemu chroni swoje mRNA przed degradacją i zapewnia selektywną regulację ekspresji białek. Nakierowanie leku na ten etap (TGS1 i translację TMG-mRNA) może znacząco zmniejszyć infekcyjność wirusa.

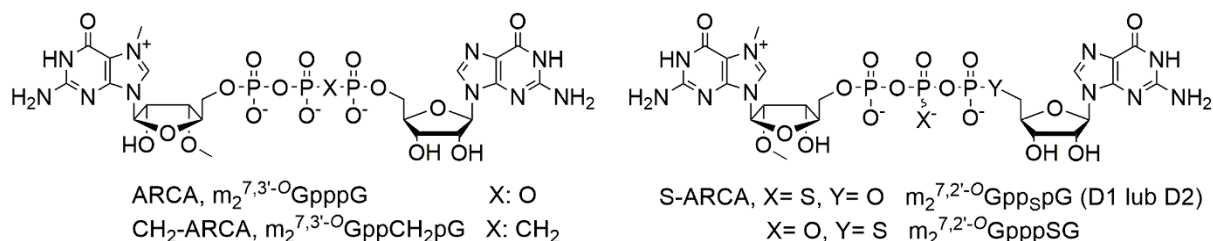
Struktury TMG i MMG kapu wykorzystano w wielu złożach powinowactwa ¹⁴⁶⁻¹⁴⁸, łącząc je syntetycznie z użyciem linkerów alkilowych lub aminoalkilowych (Rys. I. 10). Przykładowo M. Jankowska i wsp. wykorzystali złoża sefaryzowe zakończone zarówno $m^7\text{GpppG}$ jak i TMGpppG oraz ich analogami do oczyszczania izoformy białka IFE-5 wykazującego podwójną, konkurencyjną specyficzność wobec tych kapów ¹⁴⁶, Huber i wsp. TMG kapowane złoża agarozowe z silnym połączeniem biotyna-streptawidyna do wiązania i oczyszczania snurportyny, białka specyficznego wiążącego TMG kapowane RNA ¹⁴⁷ a Szczepaniak i wsp. złoża sefaryzowe z $m^7\text{GpppA}$ lub jego modyfikowaną grupą metylenową analogiem do oczyszczania mysiego eIF4E lub DcpS (analog CH_2) lub mieszaniny wielu białek wiążących kap w ekstrakcie z drożdży ¹⁴⁸.



Rys. 1. 10 Przykłady żywic powinowactwa do oczyszczania białek wiążących kanoniczne kapy, oparte na strukturach TMG lub MMG kapu: A. łączony przez linker i biotynę-streptawidynę ¹⁴⁹, B. łączony przez modyfikowaną kwasem lewulinowym rybozę, C. łączony przez linker 1,6-diaminoheksanowy na zasadzie adeninowej ¹⁴⁸

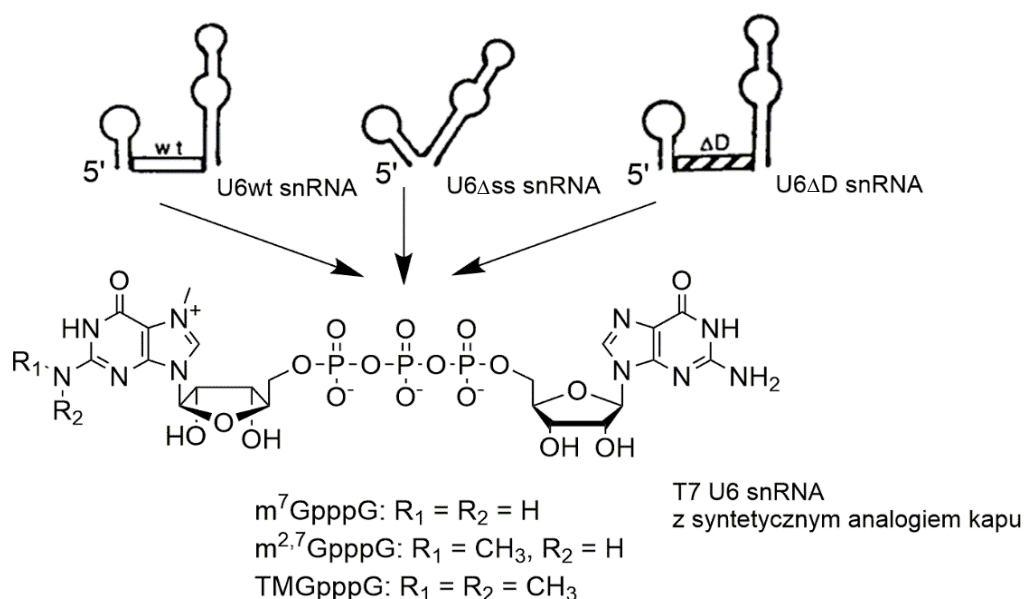
mRNA z analogami m⁷G kapu takimi jak anty-rewersyjne analogi kapu (ARCA, S-ARCA, CH₂-ARCA) pokazane na rys. 1. 11 wykorzystano do zwiększenia efektywności translacyjnej i biosyntezy białek, np. lucyferazy, co jest szczególnie ważne z punktu widzenia ekonomii i syntezy w dużej skali (alternatywą jest np. stosowanie drogiego enzymu VCE, kapującego enzymu wirusa *Vaccinia*, jednak służy on jedynie przyłączaniu m⁷GpppN (kap 0)). Analog ARCA m₂^{7,3'-O}GpppG jest obecnie powszechnym komercyjnym reagentem do syntezy mRNA o wysokiej aktywności translacyjnej ⁵. Analog ten zwiększa 2-krotnie efektywność translacji ¹⁵⁰ poprzez powstawanie transkrybowanych mRNA tylko o jednej, określonej orientacji (przyłączone od strony Guo). Analog m₂^{7,3'-O}GppCH₂pG chociaż zapewnia odporność na degradację ludzkimi enzymami DcpS i kompleksem Dcp1/2, to zmniejsza powinowactwo do eIF4E i efektywność translacji ¹⁰⁵, stąd powstała kolejna generacja, S-ARCA a wśród niej analog m₂^{7,2'-O}GppspG D2 (β-S-ARCA) jest odporny na hydrolizę enzymem DcpS, zapewnia większą stabilność w warunkach komórek ssaczych (3-krotnie dłuższy czas biologicznego półtrwania t_{1/2} od m⁷GpppG) oraz zwiększa efektywność translacji mRNA lucyferazy 2,4- oraz 5,8-krotnie względem odpowiednio analogu ARCA i niemodyfikowanego analogu m⁷GpppG ¹⁵¹, chociaż inne badania w komórkach HeLa wskazały na słabszy efekt

(2,8x względem m^7GpppG)¹⁴². Inny syntetyczny analog $m_2^{7,2'-O}GpppSG$ wykazał odporność na hydrolizę enzymem Dcp2 oraz 2,8x wzrost efektywności translacyjnej lucyferazy, taki sam jak β -S-ARCA.



Rys. I. 11 Przykłady analogów m^7G kapu typu ARCA, CH_2 -ARCA i S-ARCA w projektowaniu mRNA o zwiększonej aktywności translacyjnej

Darzynkiewicz i wsp. zastosowali dinukleotydowe analogi m^7G i TMG kapu do reakcji kapowania U6 snRNA z (wt), bez (Δss) lub ze zmienionym fragmentem Sm site (ΔD) (rys. I. 12) z pomocą T7 polimerazy¹⁵² i dalej do oceny ich zdolności do przenikania do jądra komórkowego żabich oocytów. Okazuje się, że tylko TMG kapowany U6 snRNA z niezmienionym fragmentem (typu dzikiego, wt) wykazywał taką zdolność.



Rys. I. 12 Przykłady wykorzystania syntetycznych analogów kapu do przyłączania na 5' końcu różnych U6 snRNA: a) typu dzikiego, b) z delecją fragmentu 20-25 nt (wiążący Sm site), c) ze zmienionym fragmentem 20-25 nt, celem weryfikacji importu dojądrowego semisyntetycznych snRNA (SDS-PAGE)

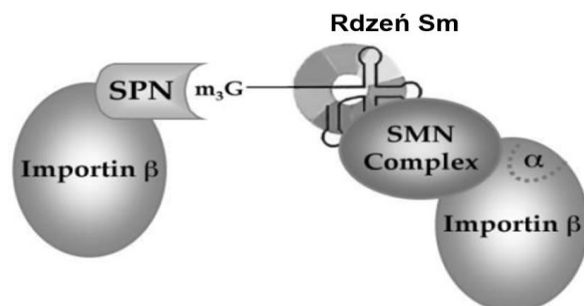
Podejrzewa się, że zaburzenia metabolizmu RNA mogą być przyczyną niektórych chorób neurodegeneracyjnych¹⁵³⁻¹⁵⁹ (np. akumulacja snRNA z TMG kapem w chorobie Alzheimera (AD) i następująca agregacja białek tau,- białek wiążących RNA¹⁶⁰. Analogi TMG kapu znakowane fluorescencyjnie można by wykorzystać do śledzenia procesów agregacji snRNA w komórkach AD. Analogi TMG kapu będące inhibitorami trans-splicing (składania egzonów z różnych transkrybowanych mRNA, które są poddawane ligacji) można by wykorzystać potencjalnie w chorobach związanych z niektórymi groźnymi pasożytami (tasiemce, świrdrowce), które są zwykle trudne do wyleczenia i występują na dużą skalę (schistosomatoza¹⁶¹⁻¹⁶⁴).

Podsumowując tę część, przedstawiłem szerokie wykorzystanie syntetycznych analogów kapu różnorodnie modyfikowanych: w łańcuchu fosforanowym (inhibitory DcpS, eIF4E, analogi S-ARCA), na rybozie (np. złoża w chromatografii powinowactwa) oraz zasadzie azotowej (inhibitory eIF4E).

I.2. Snurportyna – funkcje, interakcje, właściwości i znaczenie

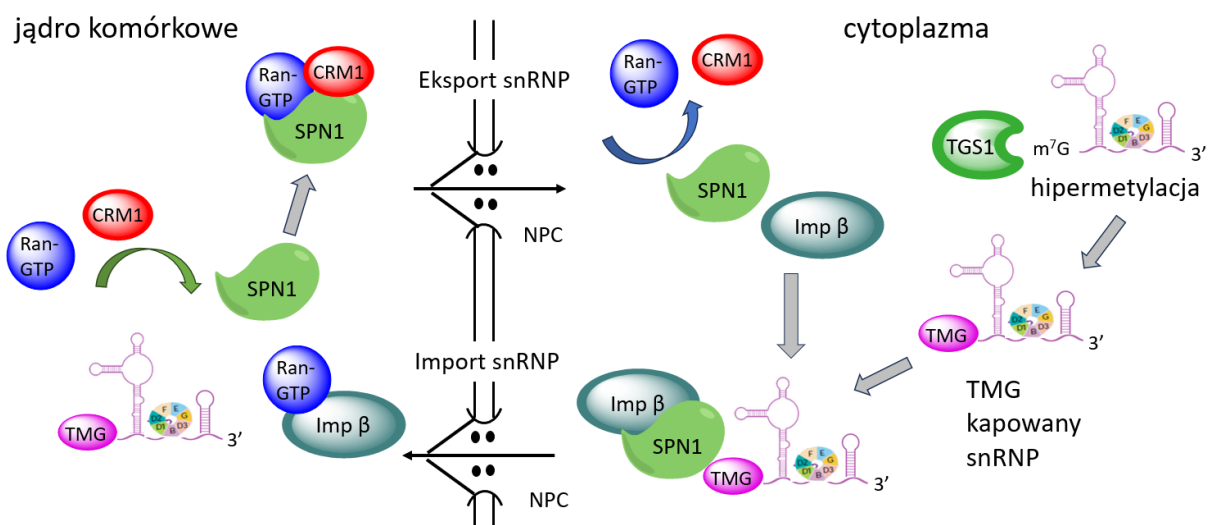
I.2.1 Funkcje

Snurportyna (SPN1, snurportyna1) jest białkiem adaptorowym, które znajduje się w cytoplazmie i jądrze komórkowym, w komórkach każdej analizowanej tkanki w podobnych ilościach, niezależnie od typu komórek¹⁶⁵. Należy do karioferyn, sklasyfikowana ściślej do importyn¹⁶⁶. W cytoplazmie specyficznie rozpoznaje strukturę trimetylokapu (TMG, m₃G) m.in. w jądrowych RNA¹⁴⁷ (np. U1 snRNA), które dalej tworzą rdzeń spliceosomu. Snurportyna wiąże TMG kapowane RNA, następnie wiąże się z innym białkiem, importyną β (Rys. I. 13) i taki kompleks białkowy transportuje RNA z cytoplazmy do jądra komórkowego^{147, 168-170}. Snurportyna jest zatem mediatorem transportu snRNA i snoRNA do jądra komórkowego. Tam ostatecznie kompleks rdzenia Sm z jądrowymi RNA bogatymi w urydynę (gł. U1, U2, U4/U6, U5) wraz z siedmioma białkami Sm (B/B', D1, D2, D3, E, F i G, rys. I. 17), które są wspólne dla każdej cząstki snRNA oraz ze specyficznymi białkami, które łączą się tylko z określoną cząsteczką snRNA tworzy spliceosom i zachodzi proces dojrzewania mRNA⁸³.

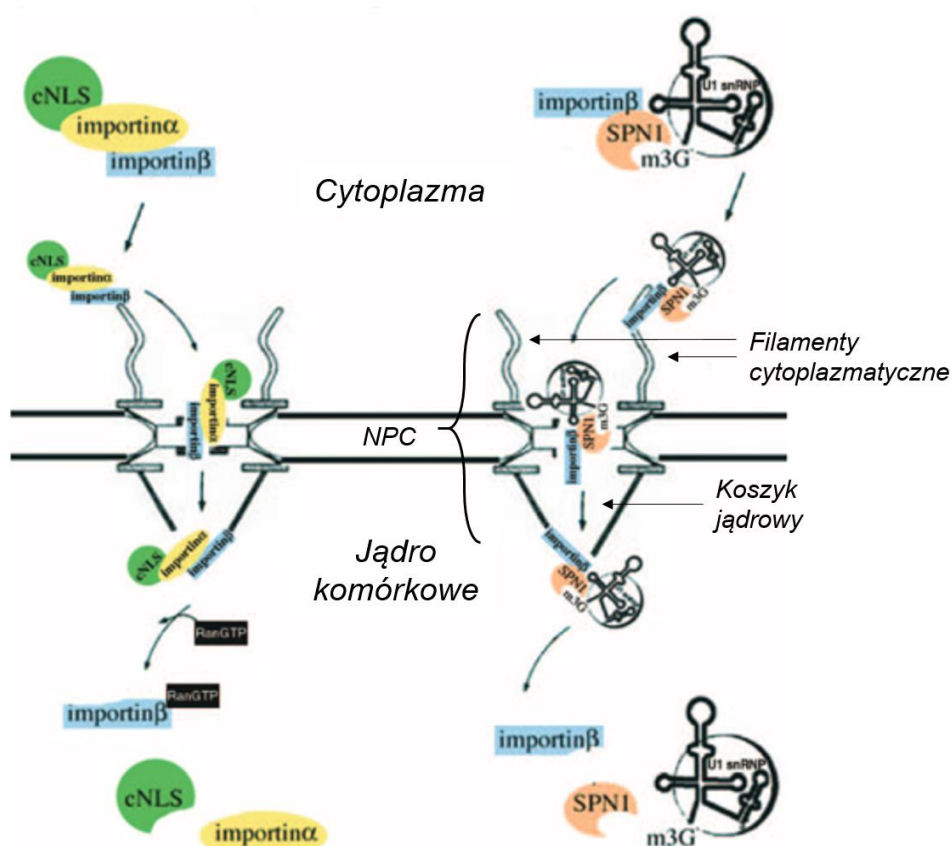


Rys. I. 13 Model kompleksu U snRNP. SPN wiąże TMG kapowany snRNA i importynę β¹⁷¹

Ujmując w uproszczeniu funkcję snurportyny, uczestniczy ona pośrednio w tworzeniu spliceosomu, a zubożony jej dostęp u człowieka może powodować hamowanie procesu splicingu (wycinanie intronów – fragmentów mRNA niekodujących aminokwasy). Większość intronów jest przetwarzana przez główny (zależny od U2) spliceosom składający się z U1, U2, U4/U6 i U5 snRNP, podczas gdy niewielka grupa intronów jest przetwarzana przez alternatywny (zależny od U12) spliceosom składający się z U11, U12, U4atac/U6atac i U5 snRNP. Biogeneza głównych i mniejszych snRNP jest procesem wieloetapowym, który wymaga kompleksu SMN^{171, 172} (ang. Survival Motor Neuron, Rys. I. 14). Kompleks SMN pełni funkcję modulatora, tj. element kontrolujący jakość składania kompleksu białko-nukleotydowego. Kompleks SMN działa jako molekulary chaperon RNP, narzucając wydajność i swoistość procesowi biogenezy spliceosomalnego snRNP. Po utworzeniu snRNP następuje hipermetylacja z udziałem enzymu TGS1 (trimetyloguanozyno syntetaza), co daje znak snurportynie do inicjacji transportu (Rys. I. 14).



Rys. I. 14 Schematyczne zobrazowanie importu snRNP z udziałem snurportyny; SPN1 – snurportyna, SMN - białko umożliwiające przeżycie neuronu ruchowego; zmodyfikowany na podst. ¹⁷²



Rys. I. 15 Porównanie dwóch szlaków importu dojądrowego – cNLS i zależnego od TMG kapu (snurportyna). Oba zachodzą poprzez kompleks porów jądrowych (NPC) i z udziałem importyny β. cNLS – RanGTP zależny, snurportyna – RanGTP niezależny; zmodyfikowany na podst. ¹⁷²

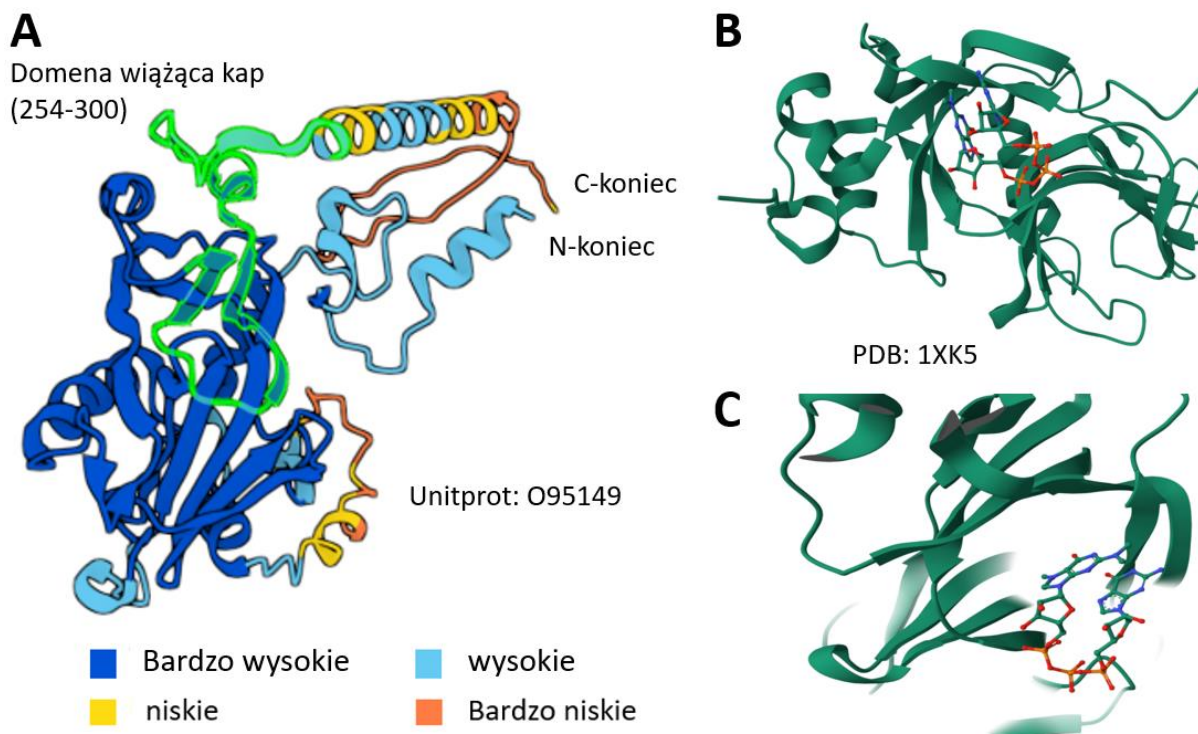
Względne stężenia snurportyny i podstawowego czynnika rozpoznającego NLS Sm mogą również różnić się w sposób specyficzny dla tkanki. Na przykład zaobserwowano, że import jądrowy U1 snRNP *in vitro* jest mniej wrażliwy na hamowanie przez dinukleotyd TMGpppG, gdy jest przeprowadzany w lizacie z retikulocytów, w przeciwieństwie do cytozolu komórek

HeLa¹⁷⁴. Sugeruje to, że import U1 snRNP w lizatach z retikulocytów odbywa się głównie za pośrednictwem szlaku importu rdzenia Sm zależnego od cNLS (Rys. I. 15).

Faktyczna dysocjacja snurportyny od importyny β nie następuje natychmiast po pasażu NPC, ale dalej w jądrze. Snurportyna musi uwolnić importowany substrat z TMG kapem, zanim będzie mogła utworzyć trimeryczny kompleks eksportowy z CRM1 i RanGTP. Powstanie tego kompleksu jest wysoce kooperatywne (znacząco mniejsze K_D w porównaniu tylko do CRM1+snurportyna).

I.2.2 Specyfika wiązania TMG kapu przez snurportynę

Baza danych białek (PDB) podaje kilka struktur krystalograficznych snurportyny w kompleksie importu jądrowego (identyfikatory PDB: 2p8q, 2q5d, 2qna i 3lww) i eksportu (identyfikatory PDB: 3gb8, 3gjx, 3nby, 3nbz, 3nc0, 5dis) i tylko jedną strukturę eksperymentalną snurportyny związanej z TMGpppG, substratem dinukleotydowym (identyfikator PDB: 1xk5). W strukturach kompleksów importowych jedyną rozwiązaną częścią była domena wiążąca importynę β (IBB) na N-końcu (11-73), podczas gdy kompleksy eksportowe zawierały również współrzędne dla centralnej domeny (97-254) i wiążącej TMG kap (254-280). Jedynym modelem strukturalnym zawierającym współrzędne atomowe dla wszystkich reszt białkowych jest ten przewidywany przez algorytm AlphaFold, który jest dostępny w bazie danych AlphaFold Protein Structure Database¹⁷⁵. Przewidywanie regionów wewnątrznie nieuporządkowanych przeprowadzono przy użyciu wielu serwerów predykcyjnych i uczenia maszynowego. Przedstawiłem kilka reprezentacji struktur ludzkiej snurportyny (Rys. I. 16) z użyciem tych baz danych, pokazując ułożenie i strukturę domeny wiążącej kap oraz ułożenie liganda TMGpppG w tej domenie.



Rys. I. 16 Struktury ludzkiej snurportyny z użyciem A. AlphaFold wraz ze stopniem pewności dopasowania modelu, B i C. Protein Databank. Na panelu C. przedstawiona jest struktura TMGpppG w ułożeniu stackingowym (nakładania się guanin) i sąsiadujące aminokwasy

W tej strukturze krystalicznej widać wyraźnie, że guanina i trimetyloguanina są ułożone względem siebie niemal równolegle, jak warstwy. Takie boczne oddziaływanie pierścieni nazywa się stackingującym lub warstwowym i jest wzmacniane przez oddziaływanie z Trp276 (również ustawiony równolegle). TMG kap oprócz oddziaływań warstwowych wykazuje również stabilizujące kompleks oddziaływania hydrofobowe z resztami Glu106 i Trp107. Guanina tworzy wiązania wodorowe z Ser105 (NH₂-OH) gdzie atom azotu N1 tworzy wiązanie wodorowe z grupą karbonylową łańcucha głównego. Struktura jest stabilizowana również przez oddziaływania z mostkiem trifosforanowym, np. Lys128 i Arg129 oddziałują z atomami tlenu jak również Lys144 jest w bliskim kontakcie łańcucha fosforanowego. Ryboza wydaje się nie odgrywać przeważającej tu roli w stabilizacji struktury, chociaż Lys144 oddziałuje z cyklicznym atomem tlenu rybozy. Patrząc jedynie na powyższą strukturę można stwierdzić, że wprowadzenie modyfikacji w obszarze zasady azotowej lub mostka fosforanowego może mieć wpływ na oddziaływanie z białkiem, z kolei ciężko wnioskować o to w przypadku rybozy, np. poz. 2',3'-OH.

Zbadane zostały również oddziaływania analogów TMG kapów ze snurportyną (tab. 2). Strasser i wsp. wykazali, że jego analog tetranukleotydowy wiąże się 5 razy silniej (tab. 2) oraz m⁷G kap wiąże się dwa rzędy wielkości słabiej niż ligand TMGpppG¹⁸². W naturalnych warunkach snurportyna preferencyjnie wiąże oligorybonukleotydy, jak TMG kapowane U1 (164 nt) czy U2 snRNA (188 nt)^{176, 177}. Różnica w powinowactwie m⁷G kapowanego związku i TMG kapowanego do snurportyny związana jest otoczką hydratacyjną. Podczas gdy dla TMG kapu nie tworzą się dodatkowe wiązania wodorowe z cząsteczkami wody (ale tworzą się oddziaływania hydrofobowe podstawników metylowych i Trp107), atom azotu N2 m⁷G kapów tworzy dwa wiązania wodorowe z cząsteczkami wody, które muszą zostać uwolnione (dehydratacja) a to wymaga dostarczenia energii. Inną możliwą przyczyną może być różnica w oddziaływaniu typu kation- π . Obecność dodatkowych grup metylowych najprawdopodobniej zmienia rozkład dodatniego ładunku w pierścieniu TMGuo i co przekłada się na różnicę w oddziaływaniu kation- π . Wiązanie kapu m⁷G jest tutaj zbyt słabe a nade wszystko niespecyficzne dla snurportyny by mieć znaczenie biologiczne.

Tabela 2 Stałe dysocjacji K_D różnych TMG (i m⁷G) kapowanych di- i oligorybonukleotydów wyznaczone dla ludzkiej snurportyny

Analog kapu	Stała dysocjacji K _D [μ M]	Ref
TMGpppG	1,00 $\pm$ 0,03	149
TMGpppA	12,1 $\pm$ 0,03	149
m ⁷ GpppA	>170 $\pm$ 12,9	149
TMGpppA _m U _m A	0,23 $\pm$ 0,02	149
TMGppCH ₂ pG	1,32 $\pm$ 0,02	178
TMGppNHpG	0,71 $\pm$ 0,05	178, 179
TMGpppsG D1	0,43 $\pm$ 0,05	178
TMGpppsG D2	0,77 $\pm$ 0,10	178
TMGppspG D1	0,83 $\pm$ 0,01	178
TMGppspG D2	0,71 $\pm$ 0,05	178
TMGppppG	0,42 $\pm$ 0,03	178

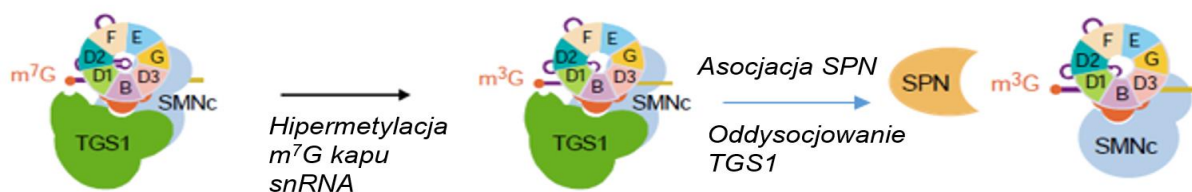
Małgorzata Waszczuk wykazała, że wydłużenie łańcucha fosforanowego zwiększa powinowactwo do snurportyny ok. 3-krotnie¹⁷⁸, natomiast wprowadzenie modyfikacji takich jak podstawnik boranowy BH₃, metylenowy CH₂ czy zamiana atomu tlenu na siarkę w mostku fosforanowym (poz. β i α) nie wpływają na powinowactwo, za wyjątkiem analogu TMGppp_sG, gdzie jeden diastereoizomer wiąże się dwa razy silniej. Wprowadzenie grupy imidowej między reszty fosforanowe również nie wydaje się wpływać na powinowactwo.

Oddziaływanie TMG kap-snurportyna zostało wykorzystane do importu oligonukleotydów i białka streptawidyny do jądra komórkowego¹³. Streptawidyna z krótką sekwencją oligonukleotydową i TMG kapem została z sukcesem wprowadzona do jądra żabich (*Xenopus*) oocytów z wydajnością 80% w porównaniu do jedynie 8% białka bez sekwencji TMG kapu. Konstrukty streptawidyna-biotyna-TMG kap posiadały masę 60-70 kDa i miały bardzo ograniczoną zdolność do pasywnej dyfuzji w głąb jądra komórki (8%). Import z udziałem snurportyny obserwowano za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej (znakowane znacznikiem Alexa488 z zakresu zielonej fluorescencji) i w analizie Western-Blot z wykorzystaniem przeciwciał anty-streptawidynowych. Przyłączenie TMG kapu pełni tu rolę sygnału do rozpoznania przez snurportynę i zainicjowania transportu. Może to zatem pomóc w dostarczaniu leków do jądra, szczególnie dużych i polarnych jak AONs, siRNA, które samodzielnie nie są w stanie.

1.2.3 Interakcje molekularne snurportyny z białkami lub genami

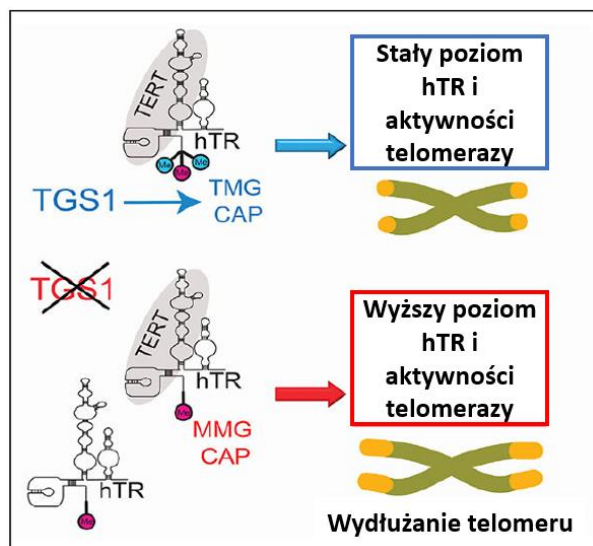
Baza BioGRID¹⁸⁰ pokazała 44 interakcje snurportyny z innymi białkami lub genami, z czego najwięcej publikacji dotyczy opisu oddziaływania snurportyna-eksportyna (XPO-1/CRM1)^{169, 181-184}. Znaczeniem tego oddziaływania jest eksport snurportyny do cytoplazmy. Innymi głównymi interaktorami SPN są małe rybonukleoproteiny: Sm-D3, Sm-F, Sm-B1, Sm-B, Sm-D1, Sm-G. Teoretycznie zmniejszony dostęp do snurportyny (np. w wyniku inhibicji białka) może mieć wpływ na każdy z procesów w którym udział biorą te białka, jednak ciężko przewidzieć jednoznacznie rezultat takiego działania.

Jak już wspomniałem, SMN jest niezbędny do złożenia rdzenia Sm (rys. I. 17) i kontroluje jakość i wydajność składania całego kompleksu m⁷G-snRNP, jednak etap ten nie wymaga snurportyny. Dopiero po etapie hipermetylacji, snurportyna przyłącza się do kompleksu. Rola SMN nie ogranicza się tylko do tej wspomnianej, bowiem stwierdzono że jest obecna też na etapie hipermetylacji m⁷G kapu, gdzie oddziałuje bezpośrednio z TGS1 a nawet na etapie importu, gdzie oddziałuje pośrednio ze snurportyną i importyną β¹⁷¹. TGS1 oddysocjuje i przyłącza się dopiero snurportyna poprzez m³G-snRNA⁸³. SMN towarzyszy snurportynie przy asocjacji importyny β aż do jądra komórkowego, jednak dzieje się to za pośrednictwem właśnie TMG kapowanego RNA.



Rys. I. 17 Hipermetylacja m⁷G kapu snRNA przez TGS1 i przyłączenie snurportyny⁸³; zilustrowano 7 białek rdzenia Sm: SmB/B', SmD1–3, SmE, SmF, SmG oraz SMNC – kompleks SMN

Mimo że TGS1 i snurportyna nie oddziałują ze sobą to ich działanie jest zależne od siebie¹⁶⁹, tzn. jeśli aktywność TGS1 będzie zbyt duża a poziom dostępnej snurportyny w komórce niewielki, to nastąpi odkładanie m³G kapowanych snRNA w cytoplazmie lub organizm może zwiększyć poziom ekspresji snurportyny. Taka sytuacja ma miejsce w syndromie krótkich telomerów (ang. STS), gdzie zubożona ilość snurportyny w cytoplazmie i duża aktywność TGS1 wpływa na zmniejszoną wydajność biosyntezy ludzkiej RNA telomerazy (htR) – enzymu odpowiadającego za wydłużanie telomerów (rys. I. 18)⁹⁶.



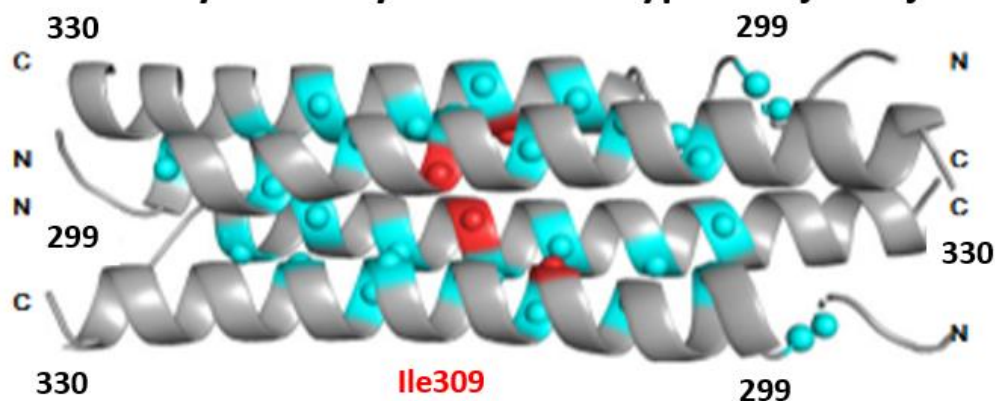
Rys. I. 18 Schematyczne przedstawienie wpływu aktywności TGS1 na poziom ludzkiego RNA telomerazy i długość telomerów, zmodyfikowany na podst.⁹⁶. hTR (RNA telomerazy, TERC) zakończone MMG kapem wykazuje większe powinowactwo do CBC i kompleksu Sm, co skutkuje wyższą aktywnością telomerazy

W normalnych warunkach snurportyna reguluje import RNA telomerazy do jądra. Z kolei utrata enzymu TGS1 zwiększa asocjację hTR z kompleksem wiążącym kap (ang. CBC) i kompleksem Sm i powoduje wzrost akumulacji dojrzałego hTR zarówno w jądrze jak i cytoplazmie⁹⁶.

Wśród innych interakcji SPN wymienić można te z genami np. EGFR i KRAS¹⁸⁵ czy białkami należącymi do rodziny ATPaz związanych z różnymi aktywnościami komórkowymi jak torsyna A¹⁸⁴, troponina T¹⁸⁷, dyneina¹⁸⁶, chociaż znaczenie tych oddziaływań nie zostało do końca poznane. W tym miejscu warto jednak zaznaczyć, że podejrzewa się że snurportyna odgrywa kluczową rolę w homeostazie mięśni, regulacji powstawania cytoszkieletu¹⁸⁸ a nawet procesów neurologicznych^{157, 189, 190} (patrz rozdział 1.2.5 Znaczenie kliniczne), jednakże są to zupełnie nowe odkrycia dla tego białka i wymagają głębszych dalszych badań.

Snurportyna wykazuje również samointerakcje, tzn. tworzy kompleksy oligomerowe w cytoplazmie, ale nie w jądrze (monomer)¹⁸⁸. Snurportyna typu dzikiego tworzy dimery (100 kDa) i tetramery (150 kDa) a zakłócenie tego procesu oligomeryzacji np. w mutantach SPN1 (np. z zamienioną resztą Ile109, rys. I. 19) z powodu częściowej lub całkowitej utraty helisy α na C-końcach, jest przyczyną występowania podtypu dystrofii mięśniowej LGMD¹⁸⁸ (patrz rozdział 1.2.5 Znaczenie kliniczne) i stopień utraty struktury drugorzędowej jest skorelowany z ciężkością osłabienia i zaniku mięśni w chorobie. Wynika z tego, że oligomeryzacja SPN1 jest w pewien sposób niezbędna do jej pełnej funkcjonalności.

Oddziaływania hydrofobowe typu zwój-zwój



Rys. I. 19 Model tworzenia tetrameru z regionem C-końcowym (reszty 299-330) oparty na przewidywaniach AlphaFold2 Colab i Socket2 coiled-coil. Ile309 jest zaznaczona na czerwono, a reszty dla których przewiduje się tworzenie oddziaływań hydrofobowych, na niebiesko; na podst.¹⁸⁸

I.2.4 Właściwości fluorescencyjne

Snurportyna posiada dwa tryptofany w kieszeni wiążącej TMG kap. Tryptofan ($\lambda_{em} = 360$ nm) i tyrozyna (300 nm) to dwa główne aromatyczne (układ wiązań sprzężonych π) aminokwasy białkowe wykazujące właściwości fluorescencyjne, przy czym Trp ma większy współczynnik ekstynkcji molowej i znacząco bardziej wpływa na fluorescencję białek. Tworzenie kompleksu i oddziaływań reszt tryptofanu z analogami TMG kapu powoduje wygaszanie fluorescencji snurportyny. Ta właściwość może zostać wykorzystana do pomiarów równowagowych stałych asocjacji (lub dysocjacji) kompleksu ligand-snurportyna. Spektroskopia fluorescencyjna jest metodą często stosowaną w badaniach białek a wśród jej najważniejszych zalet wymienia się wysoką czułość, małe wymagania ilości próbek czy wysoka użyteczność (dostarcza szereg informacji o strukturze przestrzennej białka i jego oddziaływań). Dla różnych białek na fluorescencję różny wpływ będzie miał stan protonacji (pH) czy solwatacji (rodzaj rozpuszczalnika).

Z kolei sam TMG kap też wykazuje fluorescencję ($\lambda_{em} = 400$ nm) i jest wynikiem obecności pierścienia guanozyny oraz dodatniego ładunku na atomie azotu. Właściwości fluorescencyjne TMG kapów zależne są od pH co związane jest z rozkładem tego ładunku w różnych formach zdysocjowanych, np. dla formy zwitterjonu intensywność fluorescencji drastycznie maleje.

I.2.5 Znaczenie kliniczne

Do 2024 r. snurportyna ani jej zmieniony poziom nie był związany z żadną chorobą¹⁶⁶, wliczając w to mutację białka, którą powiązano jedynie z nadciśnieniem (objaw medyczny) o różnym nasileniu^{191, 192}. Zmniejszona dostępność snurportyny w jądrze została natomiast zasugerowana jako możliwa przyczyna stwardnienia zanikowego bocznego (ALS) i otępienia czołowo-skroniowego (FTD)^{157, 189, 193, 194}. Patogeneza ALS nadal nie została jednoznacznie ustalona¹⁹³, chociaż jedną z hipotez jest dysregulacja alternatywnego splicingu jako efekt zaburzonego szlaku transportu snurportyna-importyna β^5 .

Najnowsze doniesienia (2024r.)^{188, 195} pokazują, że bialleliczne warianty genu *SNUPN* m1-m9 powodują dystrofię mięśniową (MD), która jest pierwszą jak dotąd chorobą związaną ze snurportyną. W pracy Nashabat i wsp.¹⁸⁸ wśród 18 dzieci (z 15 rodzin) dotkniętych chorobą i wykazujących osłabienie i progresywny zanik mięśni, stwierdzono 9 zmian genetycznych prowadzących do MD o różnym fenotypie, mające przebieg od łagodnego do bardzo ciężkiego. W innej pracy zbadano 5 pacjentów z dystrofią mięśniową obręczowo-kończynową (LGMD)¹⁹⁵, podtypem MD wywołanym przez patogenny wariant p.Ile309Ser SPN1 (m1), który skutkuje łagodniejszym fenotypem. W obu tych badaniach wszyscy pacjenci mieli postępujące osłabienie kończyn górnych i dolnych oraz przykurcze mięśni. W pracy Nashabat i wsp. dodatkowo wszyscy badani pacjenci mieli miopatię, nieprawidłowe zwłóknienie mięśni, a znaczna liczba prezentowała defekty neurologiczne (zanik mózdzku, 56%) i niewydolność oddechową (61%). W późnym stadium (okres dojrzewania) większość z nich nie potrafiła chodzić i nie przeżywała 20. roku życia. Choroba ta jest dziedziczona w sposób recesywny. Analiza sekwencjonowania całego egzomu¹⁹⁵ wykazała, że mutant SPN p.Ile309Ser (m1) nie zmienia poziomów mRNA *SNUPN*, ani całkowitej lub ekspresji natywnego białka SPN (typu dzikiego), ani ogólnej ekspresji białek specyficznych dla snRNP lub poziomu U-snRNA. Praca Nashabat z kolei wiąże niedobór SPN jako przyczynę recesywnej dystrofii mięśniowej (m1-częściowo zmniejszony, m2-m8- znacząco zmniejszony poziom SPN). Podczas gdy Western Blot wyraźnie wskazał ten związek w proteoformach m2, m3 i m6, relacje m1 i m9 pozostają niepewne. W tym samym badaniu analiza ilościowa PCR nie wykazała żadnych zmian w całkowitych względnych poziomach transkryptów *SNUPN* w fibroblastach skórnych pacjentów. Oba badania pokazują cytoplazmatyczną akumulację składników snRNP, w tym SPN1. Setki białek uległy nadeskompresji¹⁹⁵ (krotność zmiany >2, p<0,05), a immunofluorescencja wskazała na agregaty białek cytoplazmatycznych w tkankach mięśniowych (próbki biopsyjne). Nashabat i in. zgłosili związek przyczynowy między utratą funkcjonalnego SPN1, aberracjami w splicingu mRNA i homeostazą mięśni. Mutanty SPN1 nie tworzą oligomerów w cytoplazmie¹⁸⁸, co prowadzi do agregacji cytoplazmatycznej SPN1 i skutkuje dysregulacją splicingu. Prowadzi to do ogólnej regulacji ponad 500 genów w górę i 100 w dół¹⁹⁵ w mięśniach pacjentów, a analiza ontologii genów (GO) przypisała je do składników miofibryli i sarkomerów, ale także do biologii neuronów, regulacji cytoszkieletu, procesów związanych z kolagenem czy szlaków metabolicznych zależnych od ATP. Przedstawia to wysoką złożoność genetycznego tła choroby i podczas gdy geny *SNUPN* o niskiej częstotliwości są zmienione, na ciężkość MD wpływa ok. 30 różnych genów¹⁹⁶. W panelu ekspertów ClinGen¹⁹⁷ 31 genów powiązanych z LGMD zostało poddanych testowi walidacyjnemu i tylko trzy z nich zostały wskazane jako istotne lub o ograniczonym znaczeniu. Daje to nowe wskazówki diagnostyczne dla klinicystów i genetyków molekularnych i chociaż gen *SNUPN* i mutacje nie zostały uwzględnione w badaniu, zostały wskazane jako nowe odkrycia.

Patogenne warianty m1-m8 znajdują się w regionie snurportyny 254-320 i nie zostały jeszcze scharakteryzowane, ale oczekuje się, że zmieniają domenę wiążącą TMG (254-300) i/lub domenę C-kończową (300-320), która jest wymagana w postaci α helisy do oligomeryzacji snurportyny w cytoplazmie¹⁸⁸. Mutanty m6 i m7, które miały najbardziej zaburzone struktury drugorzędowe na C-końcu, zostały zidentyfikowane u pacjentów z najcięższymi fenotypami, podczas gdy SPN1^{Ile309Ser} (m1), który wykazuje najmniej zaburzony C-koniec, został znaleziony u pacjentów z łagodniejszymi fenotypami. Co ciekawe, baza UniProt pokazała dla ludzkiej snurportyny 366 wariantów (mutantów)¹⁹⁸, wszystkie z badań wieloskalowych oraz o przewidzianym skutku (np. przesunięcie ramki odczytu) i wpływie na funkcjonalność (uszkadzający), w tym zawiera kilka wymienionych z pracy Nashabat: m1(Ile309>Ser), m4(Ser283ter), m5(Gln308ter) i m9(Arg55>Gln), jednakże żadne nie zostało zakwalifikowane tam jako patogeniczne (chorobotwórcze). Pozostałych patogenicznych mutantów brakuje (m2, m3, m6-8). Wyniki te sugerują, że ukierunkowanie dalszych badań na snurportynę i *SNUPN* może być obiecujące w korygowaniu montażu spliceosomu i pomóc w opracowaniu skutecznych metod leczenia osób z MD. Rzuca to również nowe światło na nieopisaną wcześniej rolę SPN1 w homeostazie mięśni i procesach neurologicznych.

W tym samym czasie, gen *SNUPN* wraz z powiązaniem z chorobą zwyrodnieniową stawów (OA)¹⁹⁹ oraz zwiększony poziom snurportyny w osoczu powiązany z przewlekłą chorobą nerek (CKD)²⁰⁰, chociaż związek tych czynników jak i patogeneza chorób nie została jeszcze poznana. W przypadku OA autorzy wnioskuje o możliwej dysregulacji m⁷G kapowania przez metylotransferazy jako przyczynie choroby, a snurportynę jak i Dcp2 czy eIF4E2 wskazano jako kluczowe regulatory tego procesu (i/lub translacji) na podstawie testów walidacyjnych i metod uczenia maszynowego¹⁹⁹. W przypadku CKD ustalono, że gen *SNUPN* i białko SPN1 mają związek przyczynowy z chorobą o nieokreślonym dotąd mechanizmie powstawania. Większy poziom snurportyny w osoczu prowadzi do zwiększonego prawdopodobieństwa CKD, zwiększonego poziomu azotu mocznikowego we krwi (BUN) i niższego wskaźnika filtracji kłębuszkowej eGFR. CKD charakteryzuje się trwałymi zmianami struktury i funkcji nerek, które mogą wywoływać obrzęk, dysfunkcje metaboliczne, nadciśnienie i choroby układu krążenia. Proteom osocza ludzkiego w CKD został wyprofilowany w badaniu²⁰¹, w którym próbki osocza 7213 europejskich uczestników zrekrutowanych w USA zostało ocenionych w badaniu asocjacyjnym całego proteomu (PWAS), a względne ilości białek osocza mierzono za pomocą podejścia opartego na zmodyfikowanym aptamerze o powolnej szybkości dysocjacji (SOMAmmer). Spośród ponad tysiąca białek PWAS wykazał 22 białka statystycznie istotnych w CKD i 17 w BUN (adj. p <0,05). Łącznie 119 białek spośród wszystkich 1300 zostało poddanych dalszej randomizacji mendelowskiej (MR) w celu oceny zintegrowanego podejścia między genami i białkami (PWAS) związanymi z CKD. MR wykazało odpowiednio 17, 15 i 71 białek istotnych dla CKD, BUN i eGFR, lecz tylko 3 z nich, w tym SPN1 (i odpowiadający mu gen *SNUPN*), były wspólne dla wszystkich trzech stanów medycznych.

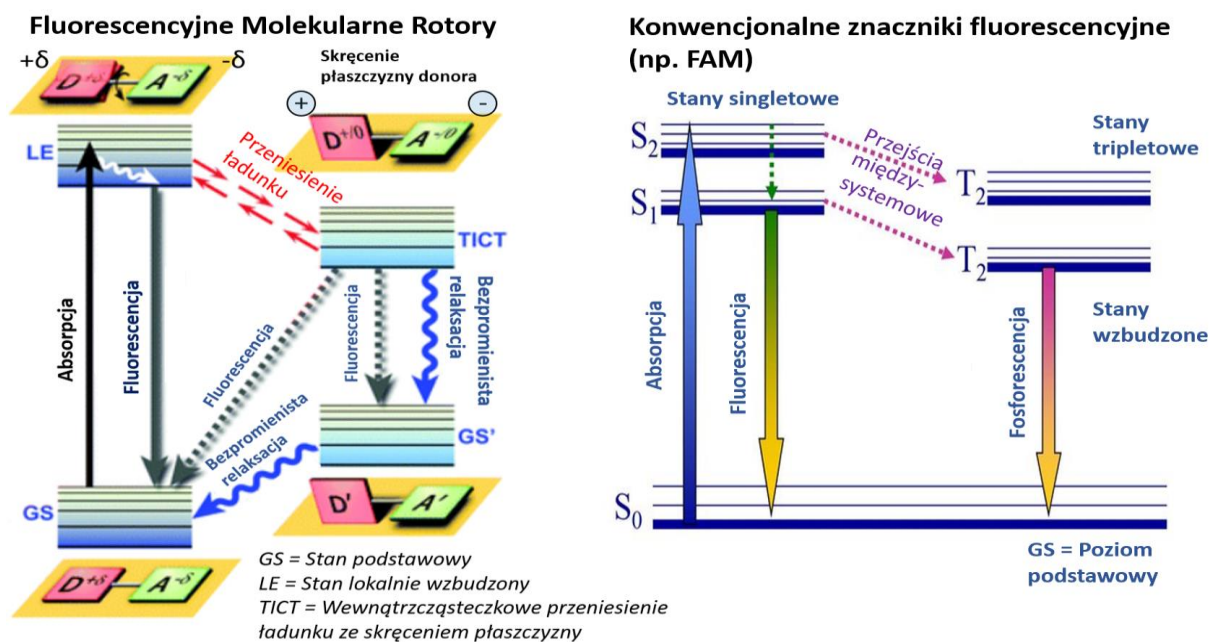
Warto wspomnieć, że niektóre karioferyny podobne do snurportyny, są obecnie celem molekularnym w wielu typach nowotworów^{166, 202-204} i opracowano wiele selektywnych inhibitorów eksportu jądrowego ukierunkowanych na eksportyny jak XPO1 lub XPO5^{203, 205-211}, podczas gdy jeden z nich (selineksor) został zatwierdzony przez FDA w 2019 r. do leczenia nawrotowego chłoniaka B-komórkowego i szpiczaka mnogiego^{166, 209} i jest obecnie badany w wielu innych badaniach klinicznych^{166, 207, 209}. Jednakże, w przeciwieństwie do wspomnianych eksportyn i eksportu onkogenego białka PTEN z powiązaną karcynogenezą, obecnie nie ma choroby związanej ze zwiększonym importem pośredniczoną przez snurportynę.

Dlaczego istnieje tak wiele ostatnich odkryć dotyczących *SNUPN*, *SPN1* i patogenezы? Odpowiedź leży w bardzo niskiej częstotliwości mutacji genu *SNUPN* ($p = 0,000005472$ w MD, genomAD¹⁹⁵ i niskiej abundancji *SPN1* w osoczu (*SPN1* jest zlokalizowany głównie w tkankach)²⁰⁰. Mówiąc wprost, aby dokonać takich odkryć, konieczne było zastosowanie wysoce wyspecjalizowanych metod, takich jak wzbogacanie funkcjonalne czy ilościowa proteomika z wykorzystaniem wielu testów biostatystycznych i walidacyjnych.

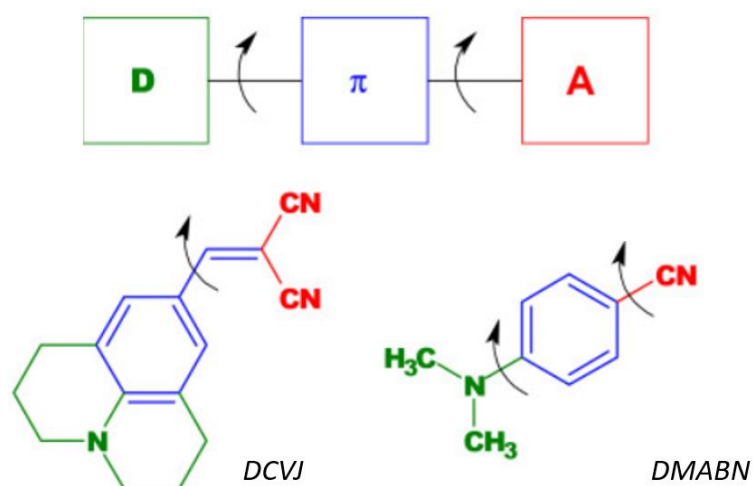
I.3. Fluorescencyjne Molekularne Rotory (FMR)

I.3.1 Zasada działania

FMR należą do klasy szczególnych barwników, w których w cząsteczce jeden segment obraca się wokół płaszczyzny drugiego segmentu a „włączanie” fluorescencji opiera się na blokowaniu mechanizmu przeniesienia ładunku, któremu towarzyszy skręcenie płaszczyzny donora elektronów (TICT, rys. I. 20)²¹². Na skutek wiązania się z białkiem następuje usztywnienie rotora i zahamowanie rotacji donora, co następnie skutkuje jedynie promienistą relaksacją stanu wzbudzonego. FMR stanowią niekonwencjonalną klasę znaczników. Wykorzystanie Fluorescencyjnych Molekularnych Rotorów jako znaczników ma kilka zasadniczych zalet w porównaniu ze standardowymi znacznikami fluorescencyjnymi nieopartymi na mechanizmie wewnątrz-cząsteczkowego przeniesienia ładunku ze skręceniem płaszczyzny (TICT): a) molekularne rotory dają silny sygnał fluorescencyjny w momencie hamowanej rotacji donora elektronowego, m.in. w przypadku wiązania się z białkiem. Wzrost intensywności fluorescencji skorelowany jest dodatnio z powinowactwem do białka, b) charakteryzują się długimi czasami życia fluorescencji (niezależność sygnału od stężenia sondy jest korzystne i pożądane w obrazowaniu w żywych komórkach lub innych skomplikowanych układach biologicznych), c) niska fluorescencja w stanie niezwiązanym.



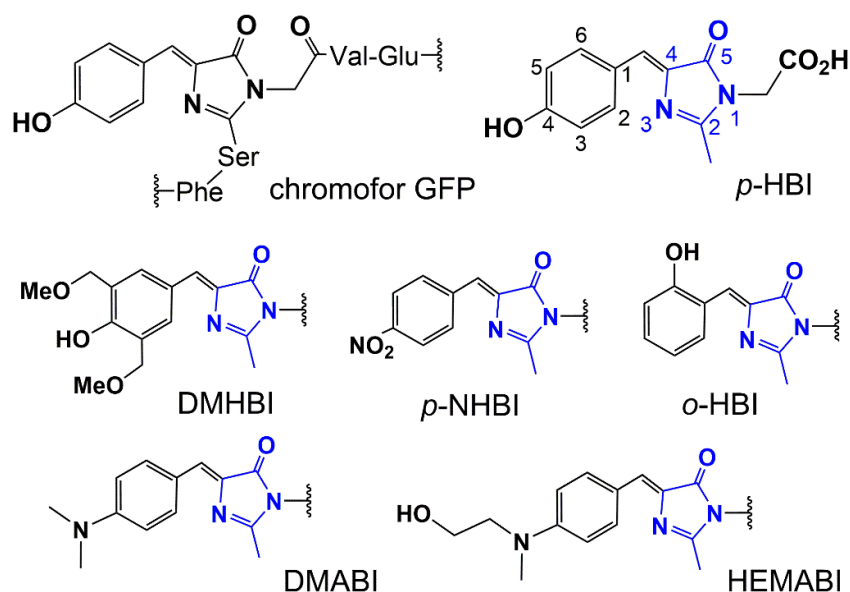
Rys. I. 20 Porównanie diagramów Jabłońskiego (schematycznego przedstawienia zjawisk luminescencyjnych) dla FMR i konwencjonalnych znaczników fluorescencyjnych jak np. fluoresceina, rodamina



Rys. I. 21 Przykładowe struktury FMR wraz z uwzględnieniem podziału na donor (zielony), linker bogaty w elektrony (niebieski) i akceptor elektronów (czerwony), na podst. ²¹²

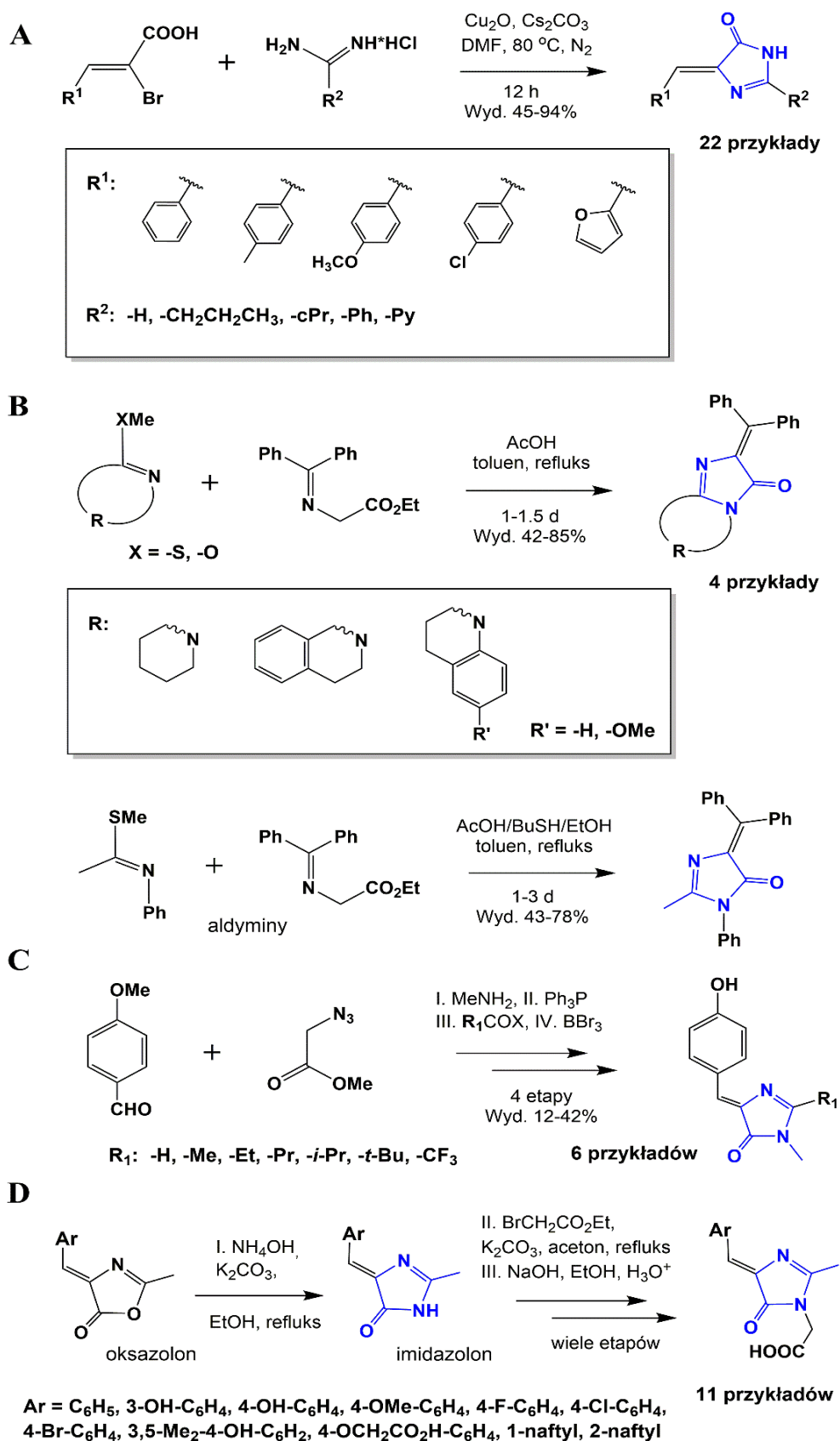
I.3.2 Metody syntezy chromoforu GFP i jego analogów

W pracy wykorzystałem 5 różnorodnych pod kątem chemicznym (fenole, alkohole, aminy, zw. nitrowe) analogów chromoforu GFP (rys. I. 22) oraz jeden FMR nienależący do tej klasy związków (ACVJ), dlatego w tej części poświęciłem uwagę metodom otrzymywania wspomnianych analogów (również znanych jako związki GFP-podobne, ang. *GFP-like*).



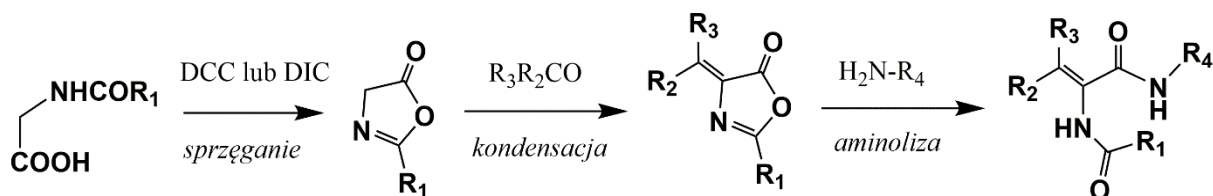
Rys. I. 22 Chromofor białka GFP z meduzy *Aequorea victoria* oraz struktura wiodąca chromoforu GFP (p-HBI) i analogi chromoforu GFP użyte w niniejszej pracy wraz z ich skrótowymi nazwami (patrz: wykaz skrótów). Niebieskim kolorem zaznaczono powtarzający się motyw metylimidazolinonu

Opracowano wiele podejść syntetycznych dla otrzymywania chromoforu GFP i jego różnych funkcjonalizowanych analogów, w tym klasyczną syntezę azlaktonu Erlenmeyera^{213, 214}, cyklizację z aromatycznymi aldiminami^{215, 216}, kondensację nasyconych imidazolonów z aldehydami²¹⁷ i katalizowaną miedzią kondensację amidyn z kwasem 2-bromocynamonowym²¹⁸. Różne podejścia zostały przedstawione na rys. I. 23.



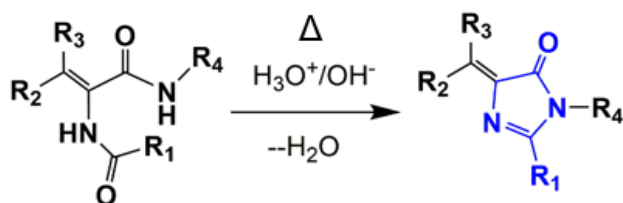
Rys. I. 23 Przykłady syntezy: A. 2,4-dipodstawionych imidazolonów przez N-arylację katalizowaną jonami miedzi²¹⁸, B. imidazolonów, w tym cyklicznych, metodą cyklizacji i kondensacji aldimin²¹⁶, C. analogów chromoforu GFP (p-HBI) z 3-azydocynamonianu²¹⁹, D. 4-arylometylenoimidazolonów modyfikowaną metodą Erlenmeyera^{220, 221} (protok. Niwa i wsp.)

Niektóre ze wspomnianych prac syntetycznych^{216, 218} podają również prawdopodobne mechanizmy zachodzących reakcji jak np. tworzenie adduktu miedziorganicznego (II) i bromu i kondensacja w obecności związków cezu²¹⁸, jednak nie będą one stanowiły tematu tego rozdziału. Najczęściej wykorzystywaną metodą jest synteza azlaktonu (oksazolonu) Erlenmeyera kontrolowana etapami (step-wise)²²²⁻²²⁴ z następującą jego aminolizą do amidu N-acylohydroaminokwasu (rys. I. 24) i cyklizacja w wyniku ogrzewania i dehydratacji²²⁵⁻²²⁷ (rys. I. 25).



Rys. I. 24 Schemat syntezy oksazolonu metodą Erlenmeyera wraz z jego aminolizą

Do kondensacji w metodzie Erlenmeyera stosowano m.in. takie związki jak octan ołowiu (II) lub cynku²²⁸, tlenek glinu²²⁹, jak i ich mieszaniny z bezwodnikiem octowym^{230, 231}, żywice jonowymienne lub zeolit²³², DCC ze wspomaganie mikrofalami²³³ i osiągnęto wysokie wydajności (>60%). Zastosowanie octanu sodu, potasu lub jego bezwodnika wiązało się z ubocznym produktem reacetylacji substratu o niskiej reaktywności^{234, 235}, natomiast zastosowanie w pierwszym kroku (sprzęganie) DCC²³⁶ i jego analogów^{222, 237}, wydzielenie produktu (step-wise) i dalej jego kondensacja ze związkami karbonyłowymi pomaga efektywnie prze-reagować wysoce wrażliwe substraty oraz ogranicza reakcje uboczne (np. reakcja Perkina)²³⁴. Historyczne początki ustanowienia reakcji Erlenmeyera sięgają 1893 roku²³⁸ i rozwijano ją intensywnie pod koniec XX wieku. Istnieje na ten temat dość obszerna praca przeglądowa²¹³, dlatego w tym miejscu pominę dalsze rozważania odnośnie tego etapu i reakcji aminolizy a skupię na reakcji cyklizacji do imidazolonu (Rys. I. 25).



Rys. I. 25 Cyklizacja amidu N-acealdehydroaminokwasowego do imidazolonu

Cyklizacji do imidazolonu można dokonać na kilka sposobów: a) termiczną aktywacją substratu, b) refluksowaniem z dodatkiem kwasu, c) refluksowaniem z dodatkiem zasady (rys. I. 25). Metoda termiczna w warunkach obojętnych z dodatkiem sit molekularnych jest najprostszą, jednak również najmniej efektywną^{239, 240} (W≈40-60%). Dodatek kwasowych reagentów jak bezwodnika octowego, kwasu octowego²⁰⁴ lub HCl^{192, 242} przynosi również korzyści (W≈50-60%), ale najlepszym rozwiązaniem okazuje się dodatek zasadowych reagentów jak K₂CO₃²⁴⁰, metale alkaliczne²⁴³⁻²⁴⁵, pirydyna^{246, 247} czy Et₃N²⁴⁸ (W>60%).

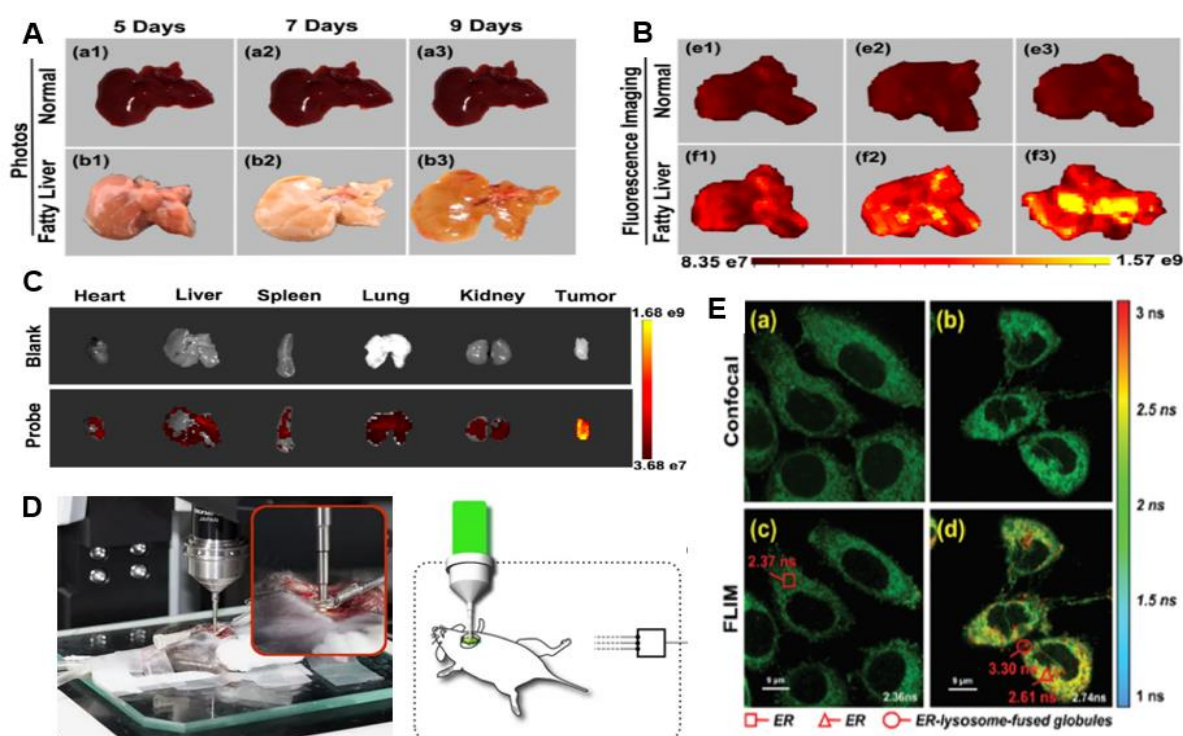
Inne metody syntezy imidazolonu obejmują np. i. reakcję imidanianu z estrami glicyny oraz dalsza kondensacja ze związkami karbonyłowymi, ii. sprzęganie alkaloidu pochodnej kwasu cynamonowego z estrem tryptofanu, iii. kondensację amidyn z różnymi związkami karbonyłowymi, iv. hydrolizę diketopiperazyny, v. kondensację ortoestrów z amidem glicyny, vi. Cyklo-addycję imidanianu do aldimin, vii. kondensację amidyn z kwasem α-bromocynamonowym, jednak odgrywają one mniejszą rolę niż wcześniej wspomniane.

I.3.3 Zastosowanie FMR

I.3.3.1 W obrazowaniu komórkowym, *ex vivo* i *in vivo*

Wyjaśnienie związku między chorobami a lepkością środowiskową pozostaje dużym wyzwaniem ze względu na brak badań na żywych zwierzętach z wieloma chorobami. W tym kontekście wielu naukowców zwróciło uwagę na projektowanie i rozwój celowanych i przełączalnych sond zawierających FMR. Ich długi czas życia fluorescencji i zależność wydajności kwantowej w różnych warunkach lepkości czyni je użytecznymi narzędziami nie tylko do obrazowania mikroskopowego w płynach ustrojowych (np. lepkości krwi), ale także w niektórych narządach i nowotworach. Może to służyć do diagnostyki i przewidywania różnych stanów patologicznych, a także może pozwolić nam lepiej zrozumieć molekularne podstawy powstawania chorób, np. zmniejszoną lepkość w błonach leukocytów powiązano z agregacją β -amyloidu i z chorobą Alzheimera (AD)²⁵⁰⁻²⁵³.

Fluorescencyjne Molekularne Rotory, ze względu na swoją wrażliwość na lokalne zmiany mikrośrodowiska, dość powszechnie stosowane są do obrazowania zmian patofizjologicznych tkanek i narządów, np.: u zwierząt w stanach zapalnych, przypadkach stłuszczenia wątroby²⁴⁹, stanach nowotworowych²⁴⁹, w zmianach neuronalnych błon plazmatycznych (stres oksydacyjny w neuronach)²⁵⁴, również w stanach hiperglikemii²⁵⁵ (zwiększony poziom cukru zwiększa lepkość krwi a co za tym idzie odpowiedź sondy). FMR to sondy fluorescencyjne czułe na zmiany otoczenia, m.in. zmiany w lepkości, zmiany pH, temperatury, zmiany strukturalne czy też polarności środowiska (solwatochromizm) lub na wiązanie liganda przez inne biomolekuły. Wszystko to powoduje, że FMR można wprowadzać do heterogenicznych złożonych układów biologicznych i obserwować interesujące procesy i stany, np. FLIM i FMR wykorzystano w obrazowaniu raka jamy ustnej u żywej, poddanej znieczuleniu myszy²⁵⁶ (rys. I. 26)



Rys. I. 26 Przykłady obrazowania z użyciem sond FMR: A. zwykłe zdjęcia oraz B. zdjęcia wykonane fluorescencyjnym mikroskopem konfokalnym wątroby mysiej *ex vivo* w różnych dniach podania

deksametazonu²⁴⁹, C. obrazowanie *ex vivo* mikroskopem konfokalnym różnych stanów patofizjologicznych tkanek mysich²⁴⁹, D. obrazowanie *in vivo* mikroskopem konfokalnym na żywej, poddanej anestezji myszy z modelem raka jamy ustnej^{256, 257}, E. obrazowanie siateczki śródplazmatycznej (ER) i zmian lepkości otoczenia podczas retikulofagii mikroskopem konfokalnym (a,b) i typu FLIM (c,d) (wzb. 488 nm, em. 530 nm) w komórkach HeLa²⁵⁸

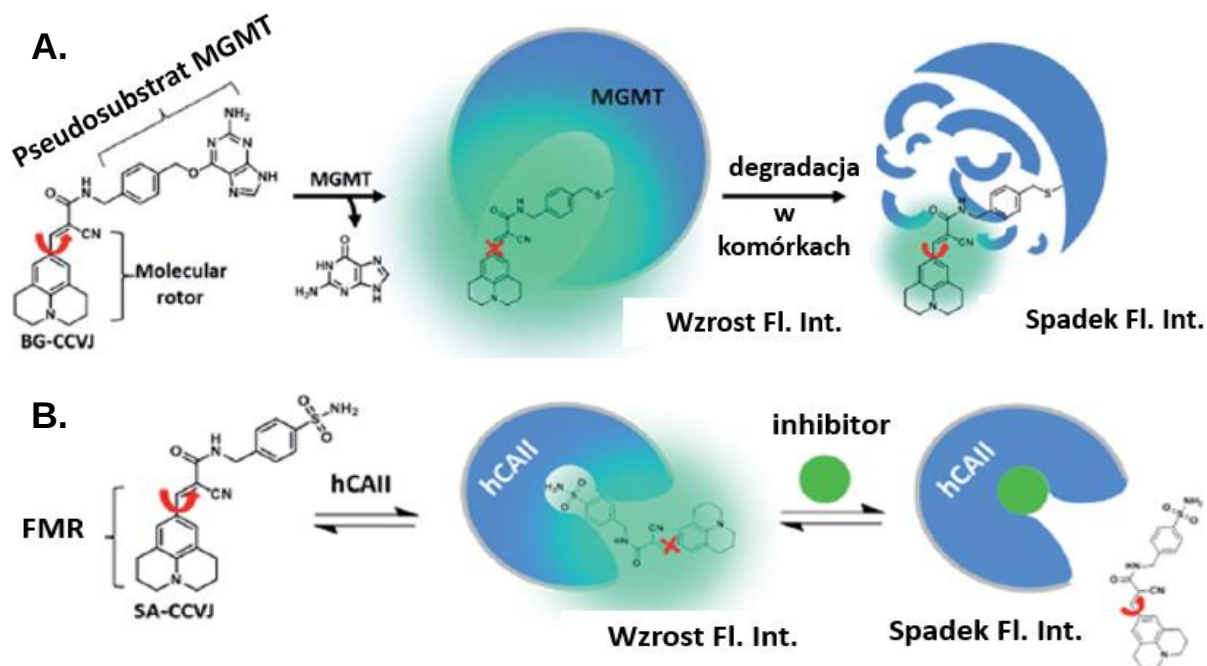
I.3.3.2 Jako sondy molekularne białek

Wykorzystanie Fluorescencyjnych Molekularnych Rotorów jako znaczników ma kilka zasadniczych zalet w porównaniu ze standardowymi znacznikami fluorescencyjnymi nieopartymi na mechanizmie wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia ładunku (TICT): a) molekularne rotory dają silny sygnał fluorescencyjny w momencie hamowanej rotacji donora elektronowego, m.in. w przypadku wiązania z białkiem. Wzrost intensywności fluorescencji skorelowany jest wtedy dodatkowo z powinowactwem do białka, b) charakteryzują się długimi czasami życia fluorescencji (niezależność sygnału od stężenia sondy jest korzystne i pożądane w obrazowaniu w żywych komórkach lub innych skomplikowanych układach biologicznych), c) niska autofluorescencja w stanie wolnym.

W jednej pracy zsyntezowano amidofosforyn urydyny z grupą propargilową i włączono w łańcuch DNA stosując automatyczną syntezę w fazie stałej, następnie poddano post-syntetycznej reakcji typu „click chemistry” z pochodnymi chromoforu GFP w której jednostkę prekursorową przekształcono do Ury-2'-O-linker-o-HBI lub -o-MBI²⁵⁹. Utworzono duplekisy DNA z komplementarną nicią i zmierzono ich temperatury mięknienia oraz przesunięcia Stokesa ($\Delta\lambda$). Autorzy podają, że takie syntetyczne podejście jest alternatywne do standardowo znakowanych DNA i ma przewagę w postaci dużych przesunięć stokesowskich (>200 nm), jednak brak wykorzystania mechanizmu TICT charakterystycznego dla tej klasy związków (np. w wyniku tworzenia struktur wyższego rzędu lub w badaniach białko-DNA) stanowi niewykorzystanie potencjału FMR jako niekonwencjonalnych znaczników fluorescencyjnych. W 2012r. pojawiła się inna praca²⁶⁰ w której autorzy otrzymali modyfikowaną cytydynę posiadającą pochodną fluoroforu GFP poddając trifosforan jodocytydyny reakcji Sonogashiry z propargilową pochodną DFHBI (difluorohydroksybenzylideno imidazolinon) lub DMHBI (dimetoksyhydroksybenzylideno imidazolinon). Tak modyfikowane trifosforany 2' deoksynukleotydów (dNTP) rozpoznawane są przez polimerazę i przyłączane do DNA. Sonda DNA (50-mer) z 11 modyfikowanymi jednostkami dC^{DMHBI} lub dC^{DFHBI} (6 w obszarze wiążącym białko p53 i 5 jednostek poza) wykazywały niską fluorescencję w stanie niezwiązanym oraz 2-3-krotnie większą po związaniu z białkiem p53. To samo DNA nie wykazało wzrostu fluorescencji z albuminą surowicy bydlęcej (BSA). W 2015r. ta sama grupa badawcza²⁶¹, przyłączyła dCTP zawierający odpowiedni wrażliwy na środowisko reporter fluorescencyjny (CVJ) do DNA z użyciem polimerazy. Otrzymane sondy (30-mer DNA z dwoma modyfikowanymi nukleotydami dC^{CVJ}) wykazywały odpowiedź w postaci 4-krotnego wzrostu fluorescencji po związaniu z białkami (SSB, ang. single strand binding protein). Zaprojektowanie bardziej wrażliwych fluoroforów jest wysoce pożądane, ponieważ mogą one mieć potencjalnie znaczenie w diagnostyce markerów chorobotwórczych (określeniu stężenia białek *in vivo*, badaniu aktywności enzymów w komórkach) lub mogą służyć obrazowaniu procesów biochemicznych angażujących konkretne białka.

Opracowano sondę opartą o motyw substratu MGMT²⁶² (O6-metyloguaninometylotransferazy) do której przyłączono karboksycyjanowinylojulolidynę (CCVJ) celem badania aktywności tego enzymu, tj. w procesie tworzenia kompleksu białko-ligand. Poziom aktywności MGMT w komórkach został zaproponowany jako marker prognostyczny oporności nowotworu

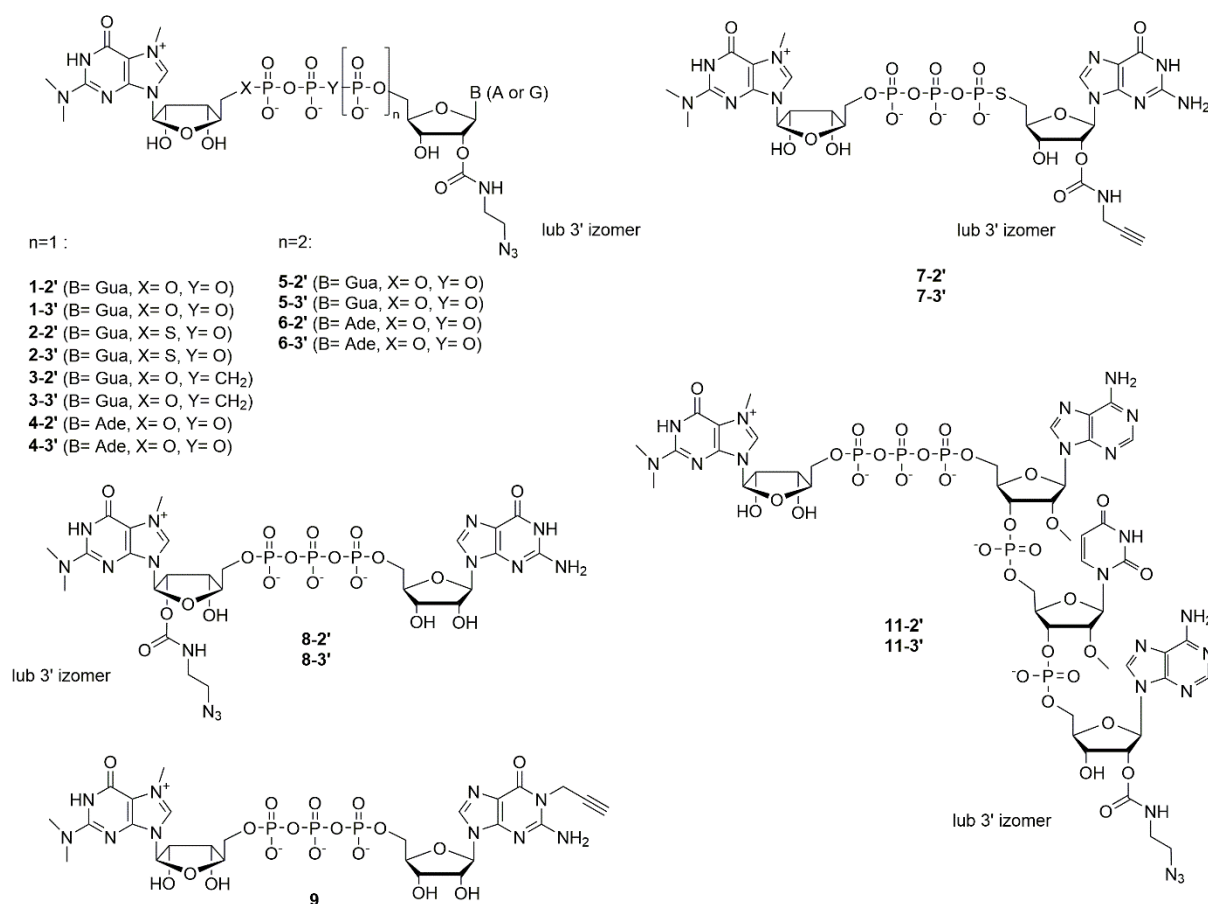
na środki O⁶-alkilujące. Chociaż opracowano kilka metod określania poziomów MGMT w komórkach, w tym zastosowanie radioizotopowo-znakowanego pseudosubstratu O⁶-benzylo-guaniny, testy immunologiczne i PCR, wszystkie z nich są praco- i czasochłonne. Badano degradację MGMT w oparciu o tę sondę (rys. 1. 27, A), wykorzystano również konfokalny laserowy mikroskop skaningowy do obrazowania aktywności MGMT w żywych komórkach (HEK293). W tej samej pracy wykorzystano również inną sondę opartą o CCVJ w badaniach wiązania kompetycyjnego do poszukiwania potencjalnego inhibitora enzymu ludzkiej anhidrazy węglanowej II (hCAII). W tej metodzie z kolei wykorzystano „wyłączanie” fluorescencji sondy na skutek wypierania i odłączenia z kieszeni wiążącej enzymu przez inny ligand o większym powinowactwie do enzymu (rys. 1. 27, B)



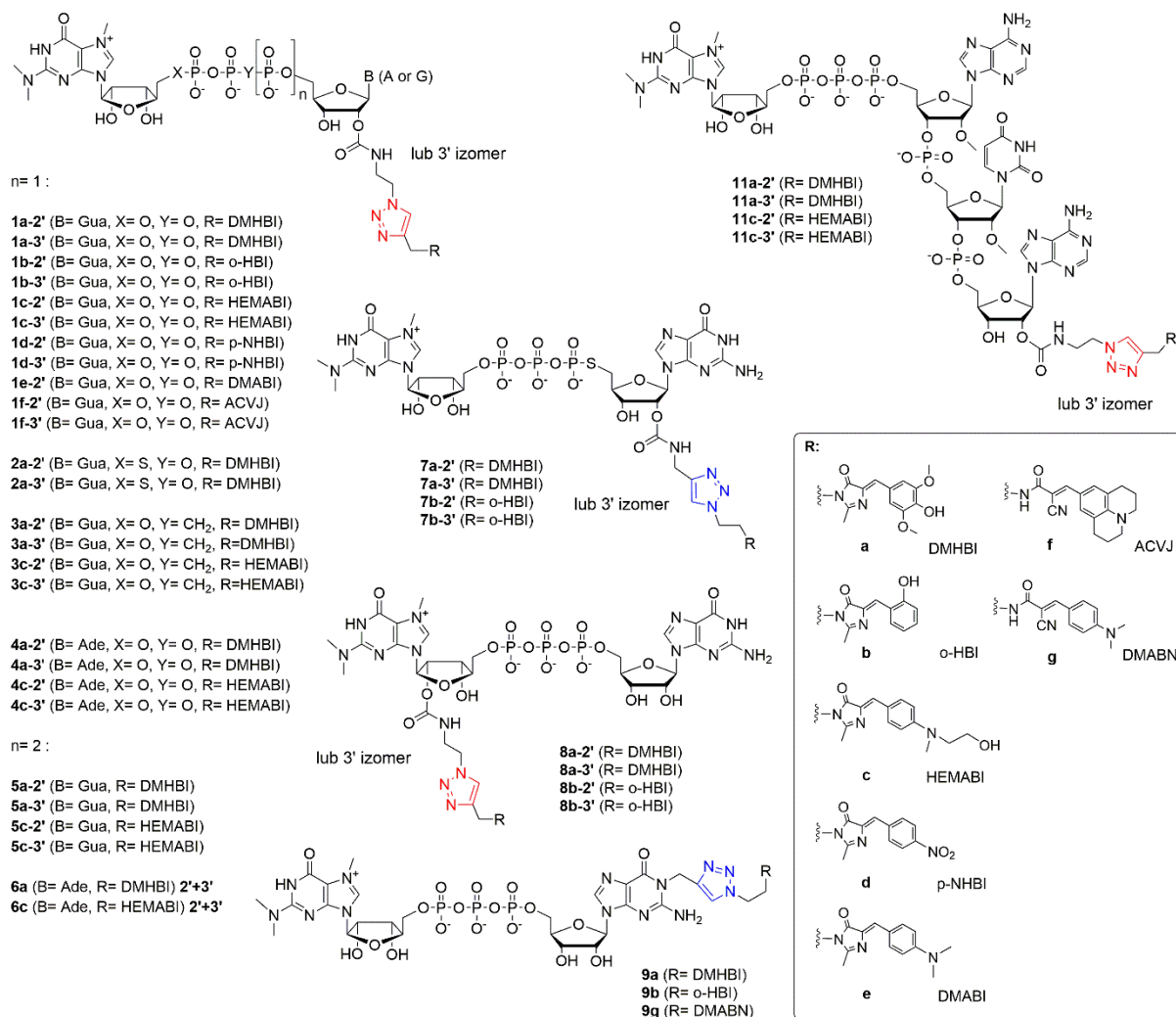
Rys. 1. 27 A. Idea badania degradacji enzymu MGMT w komórkach za pomocą liganda znakowanego CCVJ, B. idea metody poszukiwania inhibitora hCAII poprzez wypieranie liganda z CCVJ; Fl. Int = intensywność fluorescencji

II.1. Syntezowane i zbadane związki

Założone cele niniejszej pracy są interdyscyplinarne, mieszczące się w obszarze chemii nukleotydów i biofizyki i zawierają zarówno syntezy docelowych związków, uwzględniając ich pełną charakterystykę, a dopiero następnie badania fizykochemiczne i biofizyczne z białkami. Synteza docelowych koniugatów FMR metodą reakcji typu „click” wymagała uprzednio syntezy dwóch reagentów, - propargilowych i azydkowych pochodnych FMR i analogicznie dla analogów trimetylokapu (lub innych nukleotydów). Ze względu na liczebność i różnorodność badanych związków końcowych i wielowątkowość pracy, podzieliłem je na kilka grup: **A.** zawierające w swojej strukturze TMG kap i zawierające ugrupowanie azydkowe lub propargilowe, **B.** TMG kapowane koniugaty nukleotydowe i FMR, **C.** C8-podstawiony analog TMG kapu, **D.** Koniugaty z FMR niezawierające TMG kapu, **E.** Koniugaty i analogi TMG kapu niezawierające FMR, **F.** Podwójnie znakowane koniugaty analogu GpppG z FMR, a ich struktury zostały przedstawione na rys. II. 1-6. Praca ta obejmuje zarówno ich syntezę, charakterystykę, właściwości fizykochemiczne, jak i badania z białkami, głównie ze snurportyną. W numeracji koniugatów z FMR użyłem połączenia numerów **1–22** oznaczających struktury nukleotydowe, liter **a–g** określających przyłączony FMR oraz **2'** lub **3'** dla rozróżnienia regioizomerów (jeśli takie są).

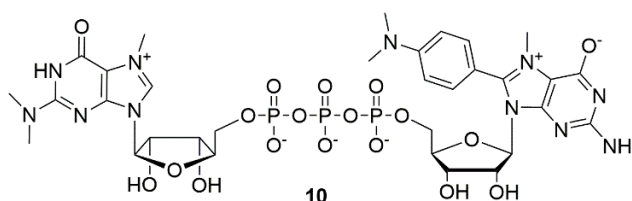


Rys. II. 1 Struktury TMG kapowanych nukleotydów zawierających ugrupowanie azydkowe lub propargilowe (**1–9, 11**) (**A**)

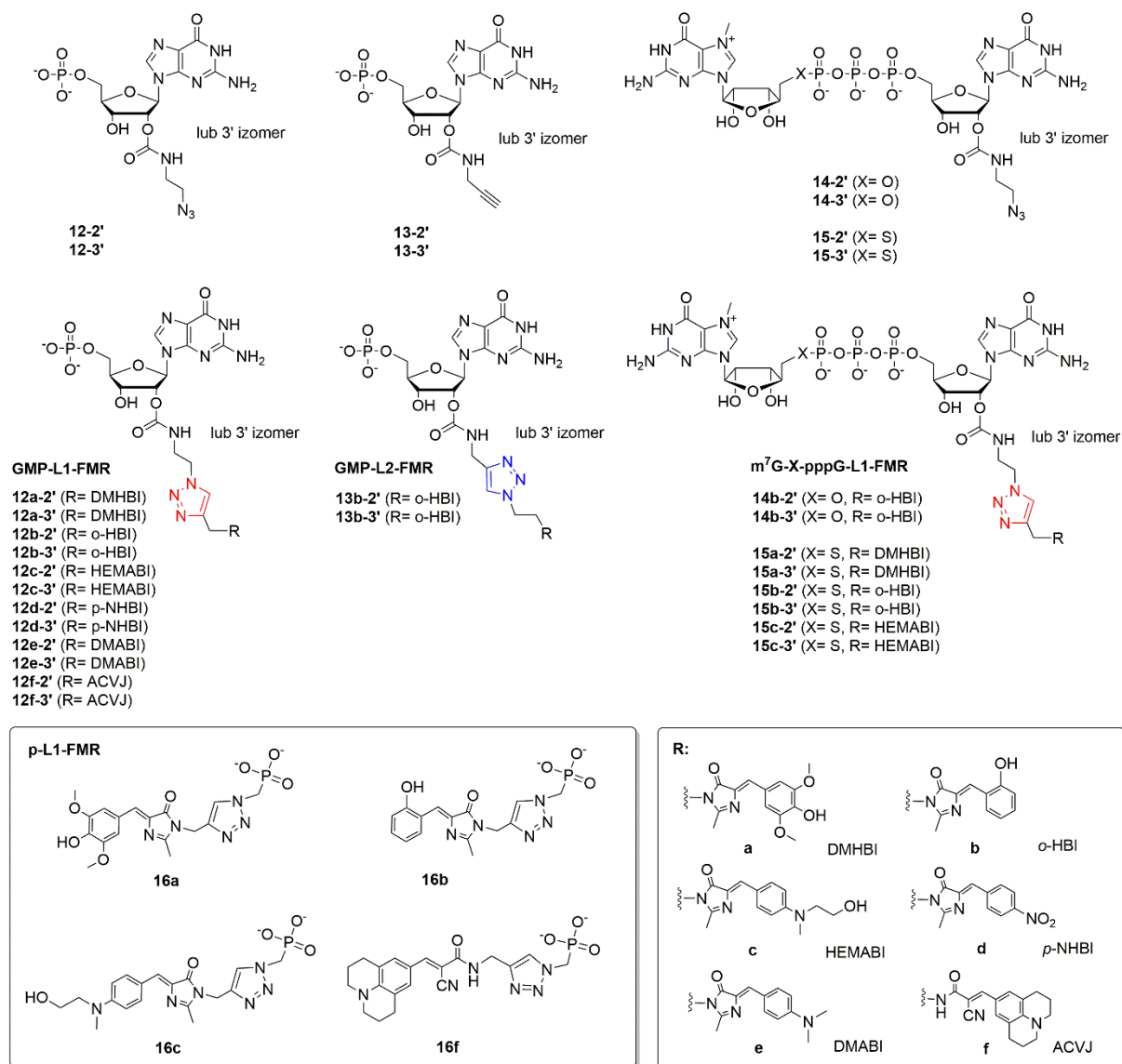


Rys. II. 2 Struktury TMG kapowanych koniugatów nukleotydowych z FMR (1–11,a–g) (B)

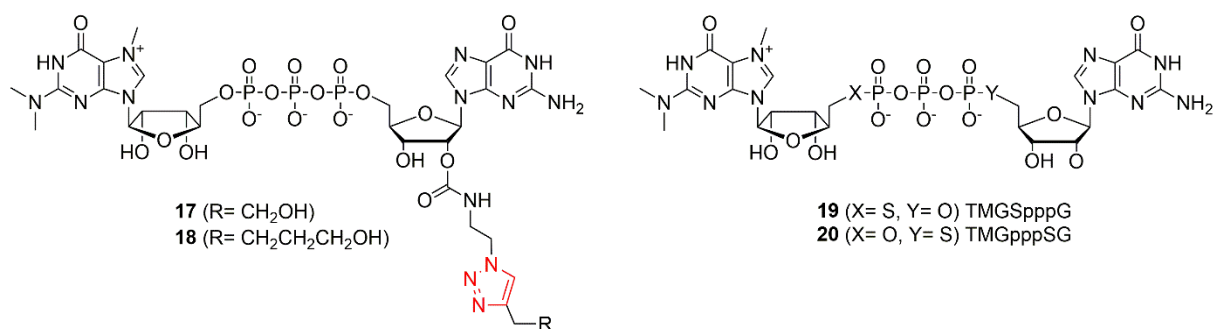
Koniugaty z linkerem zawierającym fragment triaz-1-olowy oznaczyłem wzdłuż pracy (części I oraz II pracy) kolorem czerwonym (L1) a te z fragmentem triaz-4-olowym zostały zaznaczone na schematach kolorem niebieskim (L2), lecz nie rozróżniałem ich dodatkowo w skrótach (numerach) koniugatów. Wszystkie te różne elementy strukturalne mają pewien różny wpływ na ich właściwości z białkami, szczególnie ze snurportyną, co dalej omawiam konkretnie w pracy.



Rys. II. 3 Struktura analogu TMG kapu modyfikowanego DMAPh w poz. C8 m⁷guanozyny (10) (C)



Rys. II. 4 Struktury koniugatów z FMR niezawierających TMG kapu (12–16, a–f) (D)



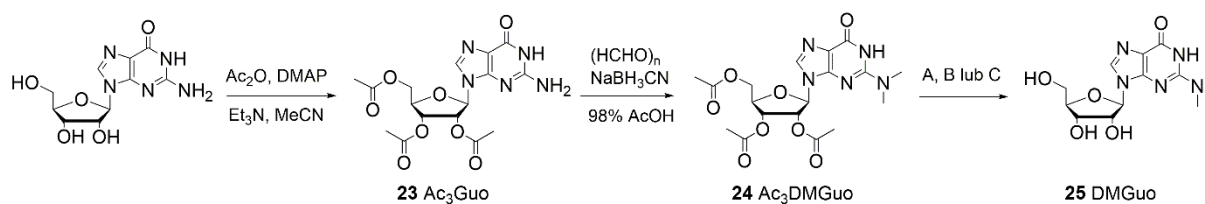
Rys. II. 5 Struktury analogów TMG kapu niezawierających FMR (17–20) (E)



Głównym celem syntetycznym było otrzymanie szeregu różnorodnych nukleotydowych koniugatów z FMR, które zawierają TMG kap, jednak w toku badań ze snurportyną i w związku z interesującymi właściwościami niektórych z nich postanowiliśmy zsyntezować również związki kontrolne, tj. koniugaty z FMR niezawierające TMG kapu lub koniugaty z TMG kapem bez znacznika FMR. Synteza koniugatów TMG kapów wymagała wieloetapowych syntez związków pośrednich i tu najważniejszymi są 5'-mono- i difosforan trimetyloguanozyny.

1. Synteza dimetyloguanozyny
2. Synteza 5'-monofosforanu i difosforanu trimetyloguanozyny
3. Synteza modyfikowanych difosforanów guanozyny metodą Yoshikawy
4. Synteza aktywnych P-imidazolidów metodą Mukaiyamy-Hashimoto
5. Synteza mono- i dinukleotydowych analogów zawierających linker z grupą azydkową lub propargilową w reakcjach z CDI i aminą
6. Synteza dinukleotydowych analogów TMG kapu z funkcją 5'-tioestrową (5'-S-)
 - Synteza 5'-deoksy-5'-jodowanych analogów nukleotydowych
 - Synteza 5'-tiofosforanów nukleotydów
7. Sprzęganie dwóch podjednostek nukleotydowych z utworzeniem wiązania pirofosforanowego (NpppN)
8. Wydzielenie regioizomerów metodą preparatywnego RP-HPLC
9. Synteza pochodnych FMR z grupą azydkową lub propargilową
10. Koniugacja nukleotydów znacznikami FMR (lub alkoholami alkinowymi) przez 1,3-dipolarną cykloaddycję Huisgena (CuAAC)
11. Wydzielenie produktów końcowych
12. Charakterystyka spektroskopowa związków

Syntezę N2,N2-dimetyloguanozyny (DMGuo, **25**) przeprowadziłem trójetapowo (rys. II. 7). W pierwszym kroku zablokowałem wszystkie grupy hydroksylowe acetylową grupą ochronną, w drugim poddałem aminowaniu redukcyjnemu z cyjanoborowodorkiem sodu (NaBH_3CN) i formaldehydem, w trzecim odblokowałem acetylowe grupy ochronne (Tabela 3).



Rys. II. 7 Schemat syntezy N2,N2-dimetyloguanozyny (DMGuo)

Reakcje odblokowania grup acetylowych przeprowadziłem stosując różne warunki (tab. 3): a) K₂CO₃ w metanolu, b) 25% NH₃ w metanolu, c) trietyloamina w mieszaninie MeOH/H₂O (1:1, v/v) akceleratora mikrofalemi (Tabela 4). Wszystkie metody są wydajne (>80%), jednak wymagają różnych czasów reakcji oraz metod izolacji produktu.

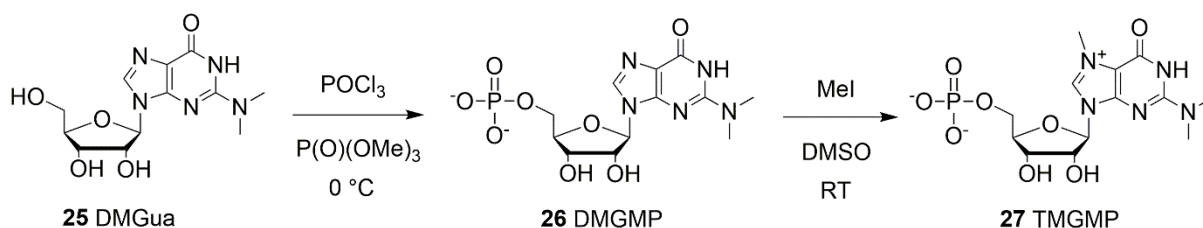
Tabela 3 Porównanie warunków (czas, temperatura) i wydajności różnych metod deprotekcji grup acetylowych z Ac₃DMGuo

Nr	Reagenty	Warunki reakcji	Izolacja produktu	Wydajność [%]
A	K ₂ CO ₃ , MeOH	3 h, RT	Dodatek stęż. HCl, zanieczyszczony KCl	90
B	Stęż. NH ₃ , MeOH	>12 h, RT	Odprowadzenie NH ₃	85
C	Et ₃ N, mikrofale MeOH/H ₂ O (1:1)	8 min, 50 W, 70°C	Odprowadzenie	97

Metoda A jest szybsza od metody B, jednak zarówno DMGuo jak i K₂CO₃ są rozpuszczalne w wodzie i nierozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych, stąd ciężko je odseparować. Sól węglanową przekształciłem w chlorek dodając 36% HCl (węglan rozpada się do wody i CO₂) i otrzymałem mieszaninę produktu i KCl. W przypadku zastosowania amoniaku (war. B) odparowałem go pod zmniejszonym ciśnieniem, jednak reakcja wymaga długiego czasu. Zaobserwowałem całkowity zanik substratu dopiero po nocy. Najlepszą metodą pod kątem czasu i nakładu pracy jest ta z trietyloaminą (war. C) wymagająca wspomagania mikrofalemi.

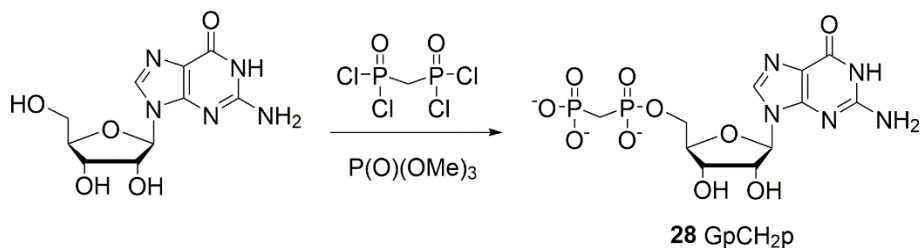
II.2.2 Syntezy mono- i difosforanów metodą Yoshikawy lub sprzężeniem solami fosforanowymi

Monofosforan i difosforan trimetyloguanozyny (TMGMP, TMGDP) stanowiły w mojej pracy dwa najszerzej wykorzystywane związki nukleotydowe z uwagi na specyficzne oddziaływanie snurportyny i analogów trimetylokapu i posłużyły mi do syntezy di- i tetranukleotydowych analogów TMG kapu. W pierwszym kroku zsyntezowałem DMGMP (**26**) w reakcji Yoshikawy²⁵⁰ z przedestylovanym POCl₃, a następnie przeprowadziłem metylację w poz. N7 jodkiem metylu (rys. II. 8) i otrzymałem TMGMP (**27**).



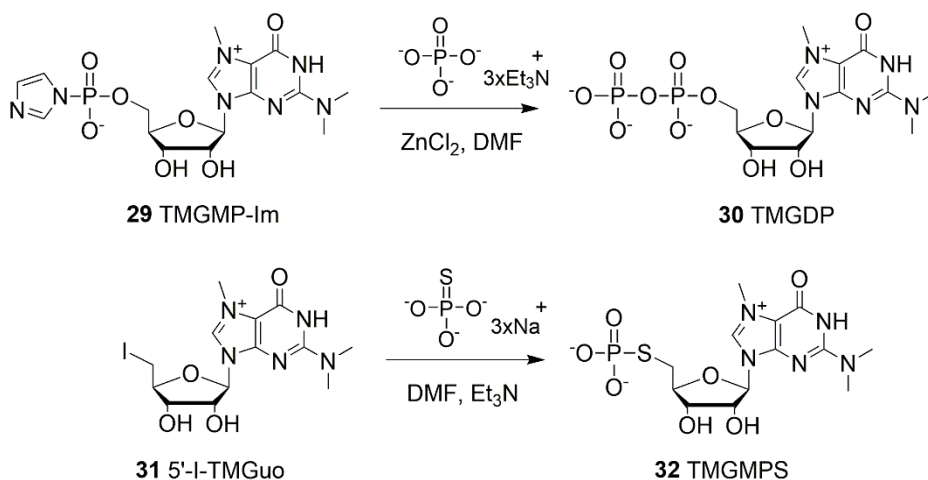
Rys. II. 8 Fosforylacja dimetyloguanozyny metodą Yoshikawy oraz reakcja metylowania atomu N7

Modyfikowany grupą metylenową ($-\text{CH}_2-$) w wiązaniu fosfodiesterowym difosforan guanozyny (GpCH_2p , **28**) otrzymałem również w reakcji fosforylacji Yoshikawy z odpowiednimi odczynnikami fosforylującymi, chlorkiem metylenobisfosfonylowym (rys. II. 9) w fosforanie trimetylu. Metoda Yoshikawy jest znaną w literaturze metodą otrzymywania 5'-fosforanów ze względu na brak konieczności stosowania grup ochronnych dla grup 2', 3'-OH i na wysoką regioselektywność i wydajność (80%, **26** oraz 75%, **28**). Fosforan trimetylu stanowi tutaj zarówno rozpuszczalnik jak i reagent²⁶³. Reakcje prowadziłem w 0 °C a ich postęp monitorowałem metodą RP-HPLC i prowadziłem do momentu zaobserwowania produktów ubocznych (2-3h)²⁶⁴.



Rys. II. 9 Fosforylacja guanozyny chlorkiem metylenobisfosfonylowym metodą Yoshikawy

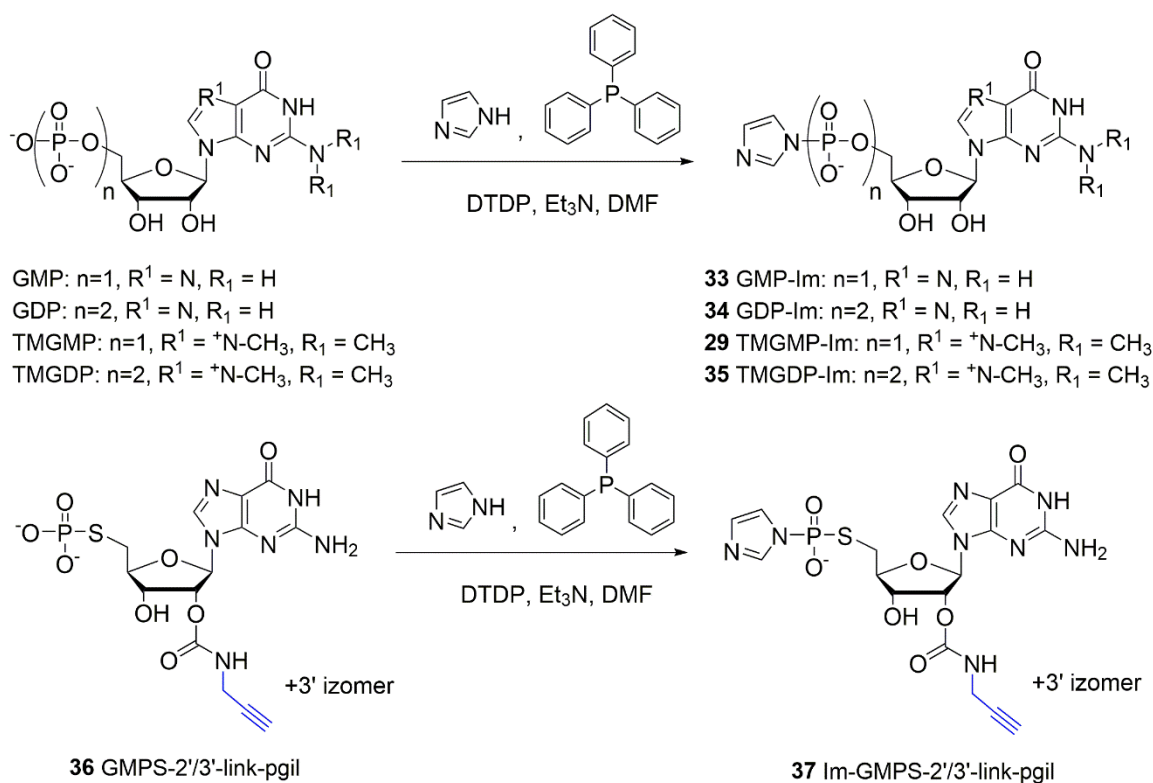
Dwa związki otrzymałem w innych reakcji fosforylacji: TMGDP z P-imidazolowej pochodnej TMGMP-Im (**29**) z fosforanem trietyloaminy ($\text{PO}_4^{3-}/\text{Et}_3\text{N}$) w nadmiarze ZnCl_2 i 5'-tiomono-fosforan trimetyloguanozyny (TMGMPS, **32**) w reakcji 5'-I-TMGUo (**31**) z tiofosforanem trisodu ($\text{PSO}_3^{3-}/\text{Na}$) w DMF z Et_3N (rys. II. 10). W tych przypadkach regioselektywność zapewnia wysoka reaktywność podstawnika imidazolowego i jodkowego w poz. 5'.



Rys. II. 10 Synteza TMGDP (**30**) i TMGMPS (**32**) metodą sprzęgania z solami fosforanowymi

II.2.3 Synteza P-imidazolidów metodą Mukaiyamy-Hashimoto

Do syntezy P-imidazolidów nukleotydów, w przewadze niezawierających linkerów (GMP-Im, GDP-Im, TMGMP-Im, TMGDP-Im), wykorzystałem reakcję Mukaiyamy i Hashimoto²⁶⁵. W tej reakcji do nukleotydu (mono- lub difosforanu) dodawałem imidazol, ditiodipirydynę (DTDP), trietyloaminę (Et₃N) i na koniec PPh₃ służący jako aktywator imidazolu i umożliwienie podstawienia grupy O⁻ na imidazol (rys. II. 11). Po dodaniu aktywatora mieszanina od razu przybierała żółte zabarwienie.



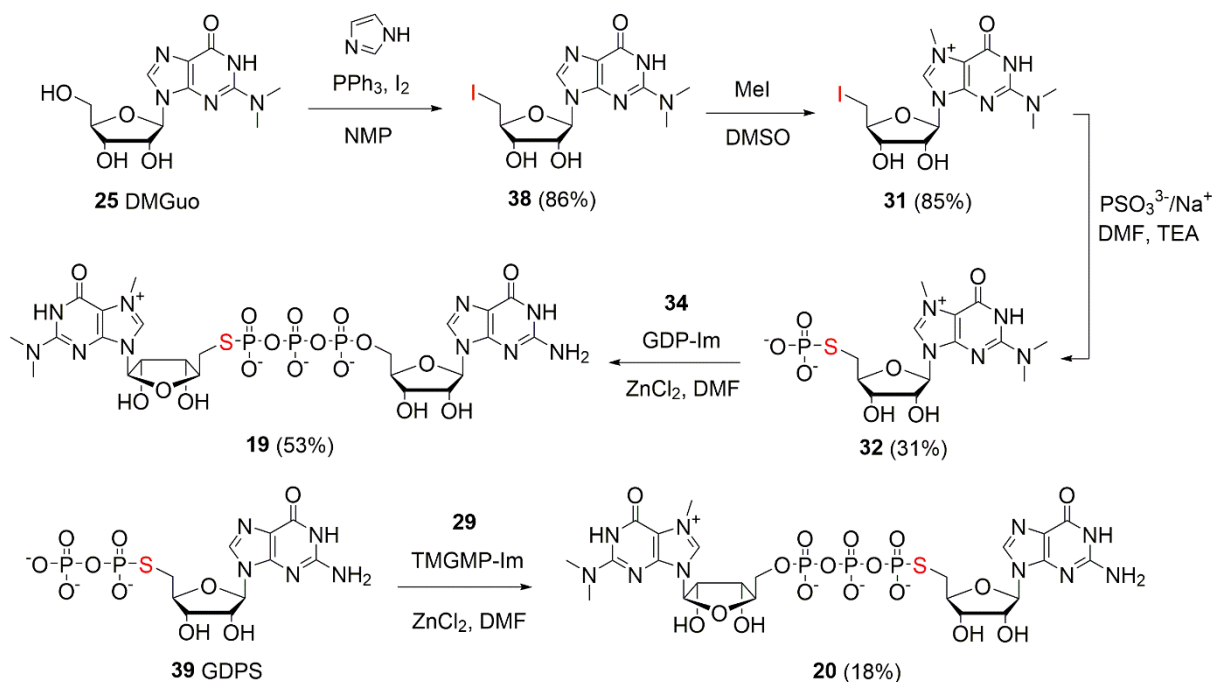
Rys. II. 11 Schemat syntezy P-imidazolidów nukleotydów metodą Mukaiyamy-Hashimoto

Tę samą reakcję imidazolowania wykorzystałem również w syntezie pochodnej 5'-tiomonofosforanu guanozyny z linkerem i grupą propargilową (**36**), ponieważ wyjątkowo tu linker wprowadziłem w reakcji substratu (5'-I-Guo) dla którego imidazol z uwagi na obecność atomu jodu nie miał szans się podstawić w pozycji 5' (rozdz. II. 2.5.1). Dopiero po wprowadzeniu grupy propargilowej przeprowadziłem fosforylację metodą Yoshikawy i dalej aktywowałem grupę fosforanową imidazolem w reakcji Mukaiyamy (rys. II. 10).

II.2.4 Synteza dinukleotydowych analogów TMG kapu z funkcją 5'-tioestrową (TMG-5'-SpppG, TMGpppS-5'-G)

Otrzymałem dwa analogi TMGpppG z funkcją 5'-tioestrową (od strony trimetyloguanozyny lub guanozyny, **19**, **20**, rys. II. 12). W tym celu zsyntezowałem 5'-tiomonofosforan trimetyloguanozyny (TMGMPS, **32**) oraz 5'-tiodifosforan guanozyny (GDPS, **39**) i przeprowadziłem na nich reakcje sprzęgania z odpowiednim P-imidazolidem nukleotydu w obecności Zn²⁺ w bezwodnym DMF. TMGMPS (**32**) otrzymałem w 3-etapowej reakcji wychodząc z DMGuo, następująco: 1) DMGuo (**25**) rozpuszczony w NMP przereagowałem z jodem, trifenylofosfiną i imidazolem; 2) Otrzymany 5'-I-DMGuo (**38**) wytrąciłem, wysuszyłem i dalej bez oczyszczania

poddąłem reakcji z CH_3I w DMSO; 3) Po precypitacji, przemyciu i wysuszeniu osadu, przeprowadziłem reakcję z PSO_3^- (sól trisodowa) w DMF z trietyloaminą. Stosując chromatografię jonowymienną otrzymałem czysty TMGMPS (W=32%). GDPS (**39**) otrzymałem wg procedury¹⁴². Synteza TMGpppSG (**20**) okazała się mniej wydajna (18% versus 53%) ze względu na częściową hydrolizę substratu TMGMP-Im (**29**) podczas sprzęgania (obecne niewielkie ilości wody lub wilgoci, powodowało to również powstawanie niepożądanego dimeru TMGppTMG).

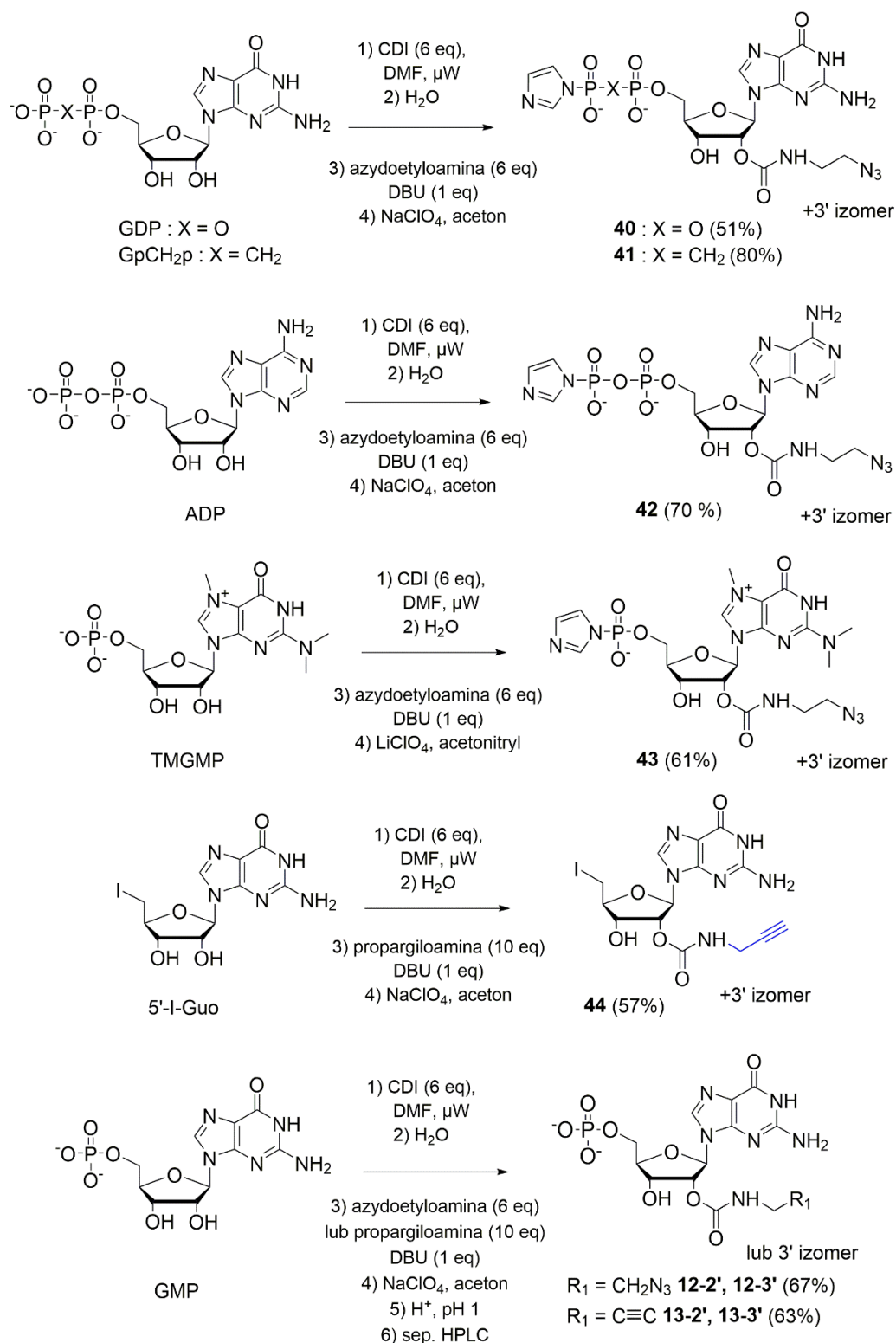


Rys. II. 12 Schemat syntezy analogów TMGSpppG (**19**) oraz TMGpppSG (**20**)

II.2.5 Synteza nukleotydów oraz FMR z linkerem i grupą azydkową lub propargilową

II.2.5.1 Synteza nukleotydowych pochodnych w reakcji z CDI akcelerowanej mikrofalami

Związki nukleotydowe z grupą azydkową lub propargilową zsyntezowałem w reakcji z 1,1'-karbonyldiimidazolem (CDI) akcelerowanej mikrofalami wg protokołu opisanego w pracy Warmiński i wsp.²⁶⁶ (szczegóły część eksperymentalna) a następnie przereagowałem P-imidazolowane 2',3'-O-węglany nukleotydów z 6-krotnym nadmiarem azydoetyloaminy lub 10-krotnym propargiloaminy (rys. II. 13). Syntezy są wydajne (50-80%), nawet w przypadku **43**, który jest bardziej hydrofobowy i częściowo rozpuszczalny w acetonie, stąd użyłem czysty acetonitryl do precypitacji. Substytucja grupy węglanowej aminą zachodzi w ciągu 6 lub 12 h (noc).

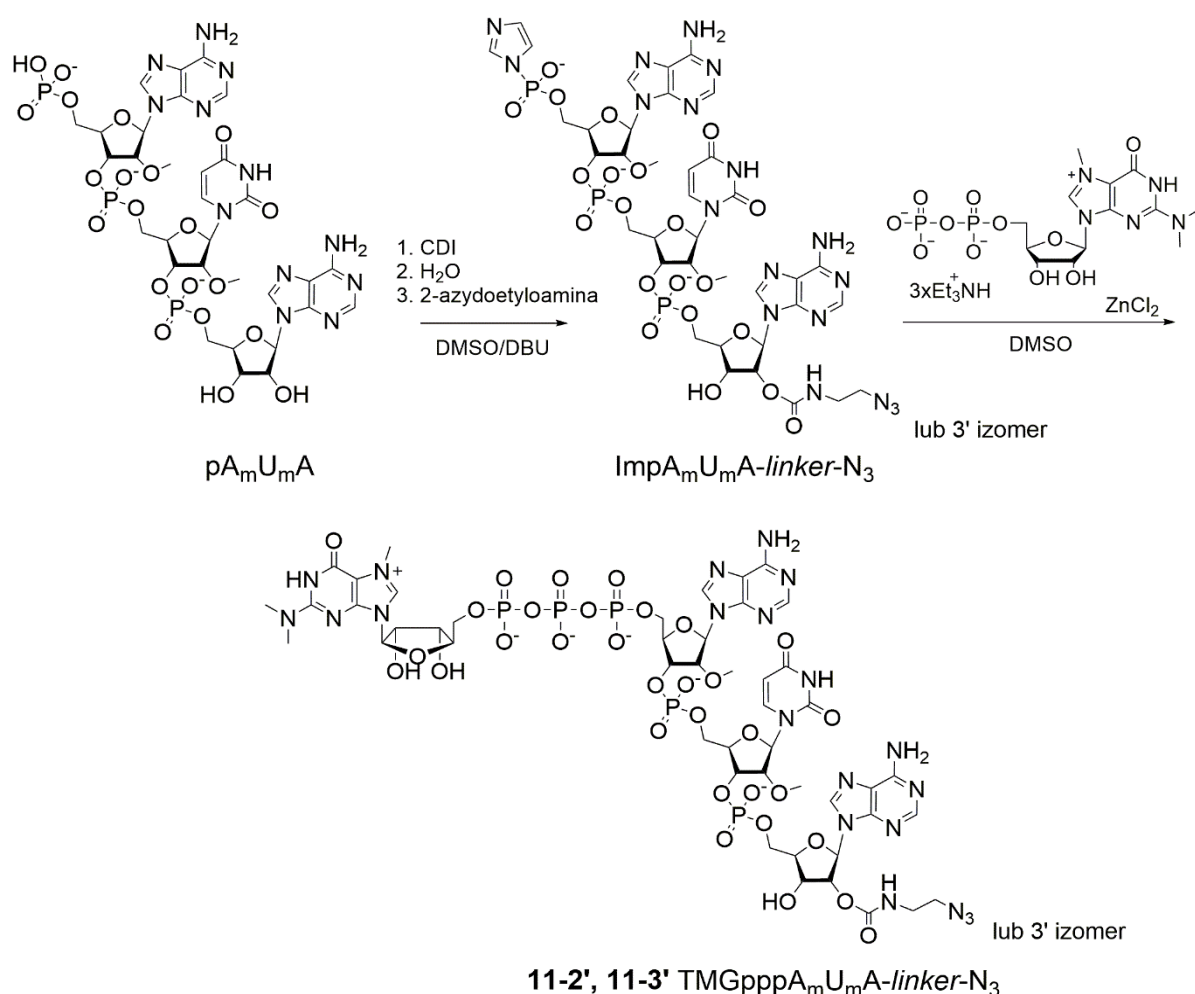


Rys. II. 13 Schemat syntezy nukleotydów z karbaminianem i grupą azydkową lub propargilową

Produkty wytrąciłem w schłodzonym (0 °C) acetonie lub acetonitrylu (**43**, pochodna TMGMP) z dodatkiem nadchloranu sodu lub litu (**43**), następnie zwirowałem, zdekantowałem roztwór, przemyłem jeszcze dwukrotnie i wysuszyłem w eksykatorze znad P₄O₁₀. Tak otrzymane P-imidazolidy użyłem w reakcjach CuAAC bez wcześniejszego oczyszczania. Jedynie w przypadku pochodnych GMP, produkty (**12-**, **13-2'/3'**) oczyściłem metodą RP-HPLC, ponieważ

je poddawałem bezpośrednio koniugacji bez sprzęgania. Pochodne GMP zsyntezowałem zarówno z grupą propargilową jak i azydkową (rys. II. 13). Do syntezy Im-GMPS z grupą propargilową (**36**) jako substrat wykorzystałem 5'-I-Guo i dopiero produkt **44** po reakcji z CDI i aminą poddałem reakcji fosforylacji. Próby podstawienia aminą związku z grupą 5'-tiofosforanową (GMPS) były nieudane. Reakcje propargiloaminą są bardziej wymagające oraz powodują powstawanie P-podstawionego produktu (fosforan) oraz również bis-podstawionego (fosforan i ryboza). Dodatkowo, P-podstawienie aminą zachodzi szybciej niż O-substytucja. Z tego powodu produkt bis-podstawiony poddałem hydrolizie na grupie fosforanowej w pH 1 (HCl), oczyściłem metodą HPLC i dalej poddałem sprzęganiu lub znakowaniu (GMP pochodne).

Syntezę tetrameru TMG kapu funkcjonalizowanego grupą azydkową pokazaną na rys. II. 14 wykonał dr inż. Błażej Wojtczak.

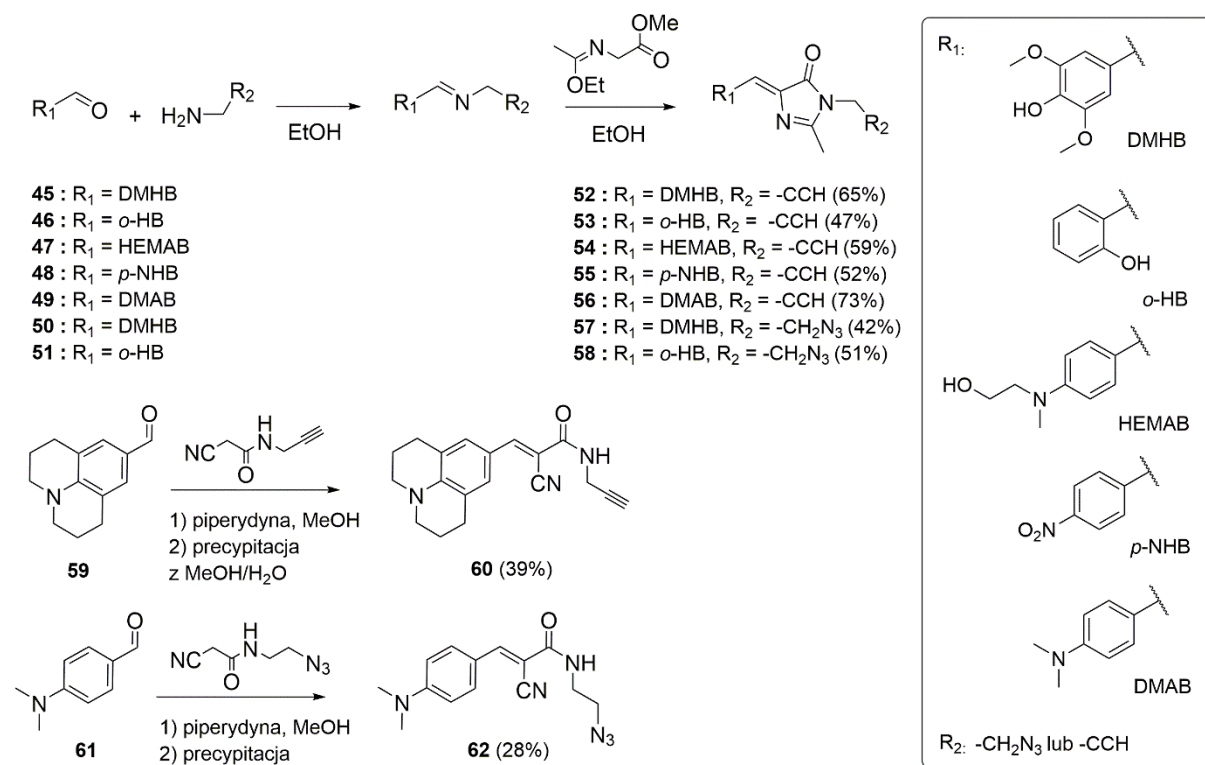


Rys. II. 14 Schemat syntezy tetranukleotydu TMGpppAmUmA z linkerem i grupą azydkową (**11-2'**, **11-3'**)

II.2.5.2 Synteza pochodnych FMR

Syntezy pochodnych FMR wykonał dr inż. Błażej Wojtczak. GFP-podobne FMR otrzymał wg przepisu Baldridge²⁶⁹ reakcji imidnianiu z odpowiednią iminą generowaną *in situ* w bezwodnym etanolu (rys. II. 15). Produkt wytrącił, przemył EtOH i wysuszył. Pochodne julolidyny (ACVJ, **60** i DMABN, **62**) otrzymał w reakcji odpowiedniego aldehydu z 2-cyjanoacetamidem

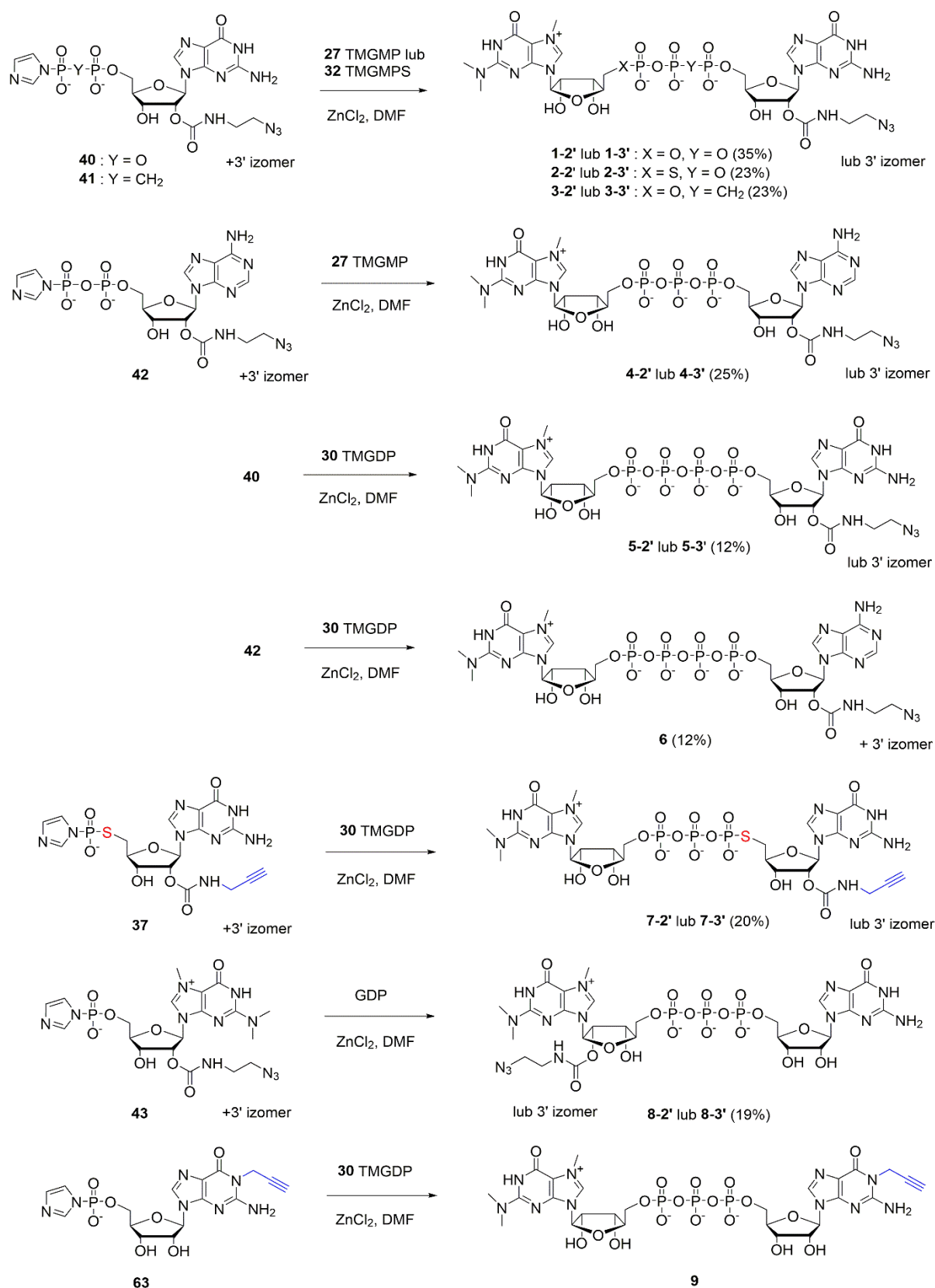
z propargilem lub azydkiem w metanolu i piperydynie i następnie wytrącił z mieszaniny MeOH/H₂O. Produkty scharakteryzował metodami ¹H i ¹H-¹H COSY NMR i HRMS.



Rys. II. 15 Schemat syntezy funkcjonalizowanych pochodnych FMR

II.2.6 Sprzęganie podjednostek nukleotydowych z utworzeniem wiązania pirofosforanowego

Do sprzęgania dwóch podjednostek nukleotydowych wykorzystałem aktywowane P-imidazolidyny nukleotydowe oraz odpowiednie mono- lub difosforany nukleotydów: GDP, TMGMP, TMGMPS lub TMGDP, w obecności jonów Zn²⁺ w DMF (rys. II. 16).

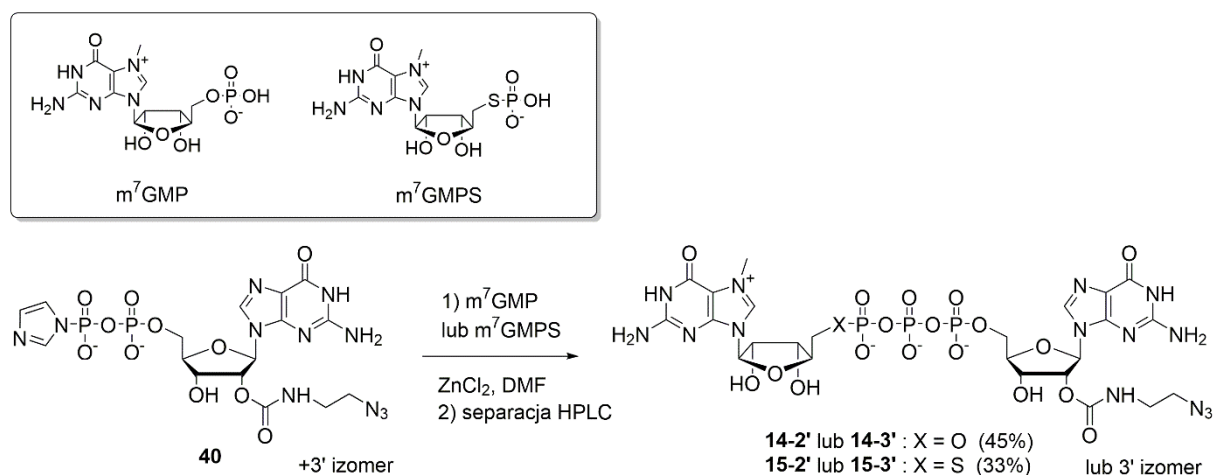


Rys. II. 16 Syntezy dinukleotydowych analogów TMG kapu z linkerami i grupą azydkową lub propargilową

Warto zaznaczyć, że był to najtrudniejszy etap syntezy związków finalnych z kilku powodów: a) analogi trimetyloguanozynowe sprzęgają się mniej wydajnie niż guanozynowe,

b) warunki muszą być ściśle bezwodne (kontrola hydrolizy imidazolidu), c) produkty oczyszczałem podwójnie, stosując najpierw chromatografię jonowymienną, następnie chromatografię z odwróconym układem faz (szczegóły w sekcji eksperymentalnej). Takie podejście umożliwiło mi izolację czystych izomerów nukleotydowych (jeśli modyfikowane były na rybozie). Analog dinukleotydowy z N-propargiloguanozyną (**9**) zsyntezowałem z TMGDP i Im-GMP-N1-propargilu (**63**), który z kolei otrzymałem wg protokołu opisanego przez Kopciał i wsp.²⁶⁷.

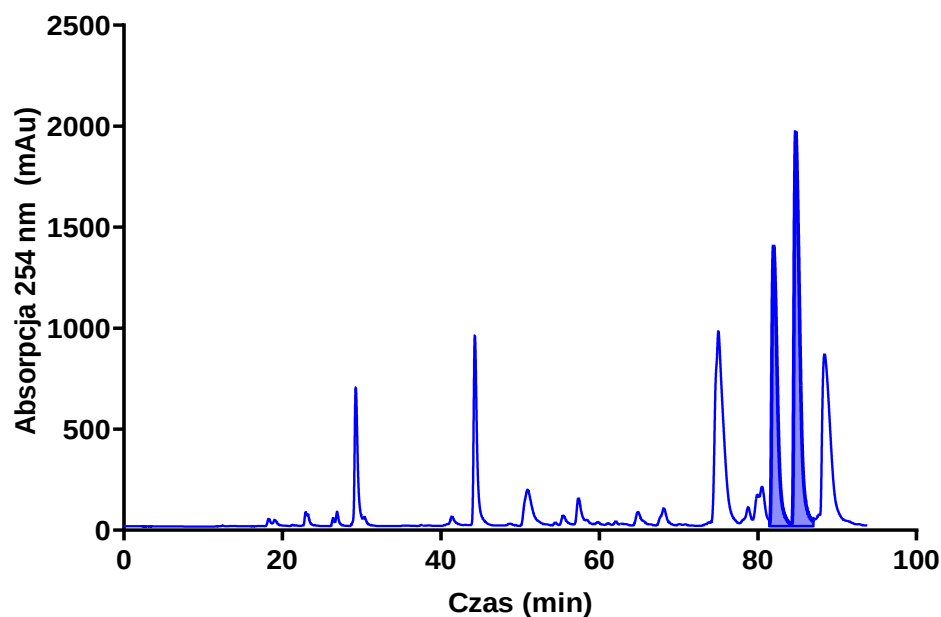
Analogi monometylowanego kapu zsyntezowałem podobnie do analogów TMG kapu, sprzęgając Im-GDP-2'+3'-O-L-N₃ (**40**) z m⁷GMP lub m⁷GMPS (rys. II. 17), a sprzęganie dla analogu tetranukleotydowego zostało pokazane wcześniej na rys. II. 14.



Rys. II. 17 Schemat syntezy nukleotydowych analogów bez TMG kapu z linkerem i grupą azydkową

II.2.6.1 Wydzielanie regioizomerów metodą RP-HPLC

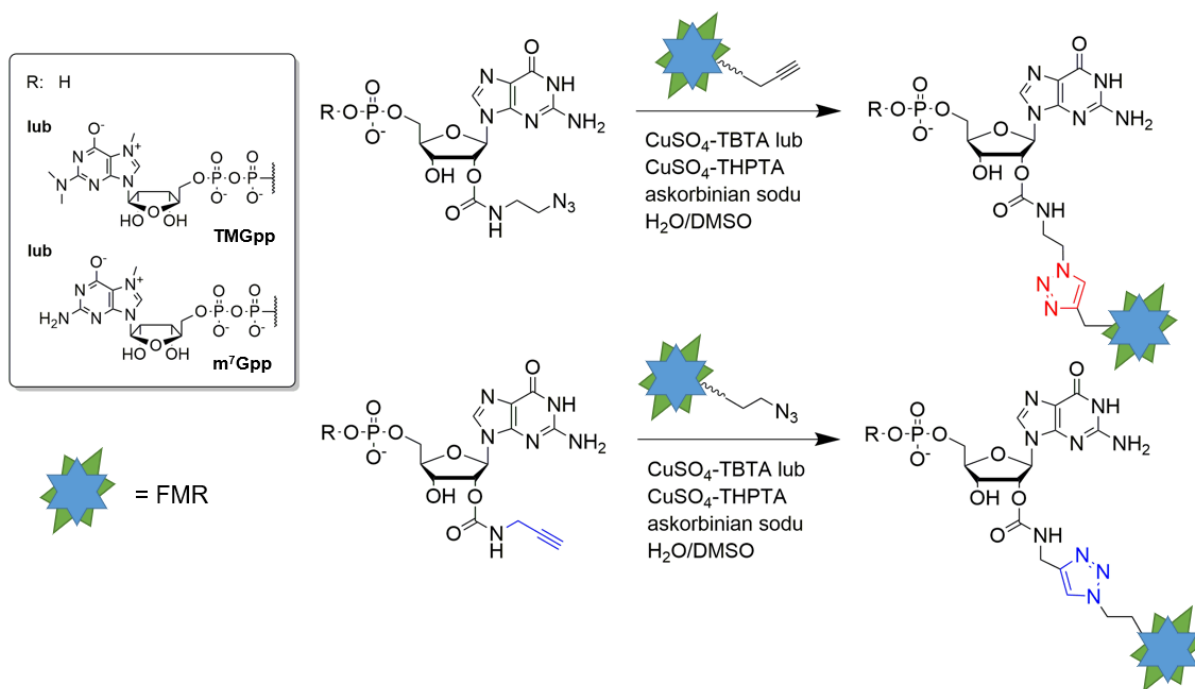
Regioizomery produktów lub też po prostu produkty sprzęgania oczyszczałem w gradiencie acetonitrylu metodą RP-HPLC w skali półpreparatywnej. Rys. II. 18 przedstawia przykładowy chromatogram z oczyszczania 2' i 3' izomeru TMGpppG z grupą azydkową. Do kontroli frakcji wykorzystałem tu detekcję absorpcji 254 nm oraz niskorozdzielczą spektrometrię mas.



Rys. II. 18 Chromatogram RP-HPLC z oczyszczania TMGpppG_{2'}/3'-O-L-N₃ (**1-2'** i **1-3'**)

II.2.7 Synteza nukleotydowych koniugatów FMR z lub bez TMG kapu *via* 1,3-dipolarna cykloaddycja Huisgena azydku do alkinu (CuAAC)

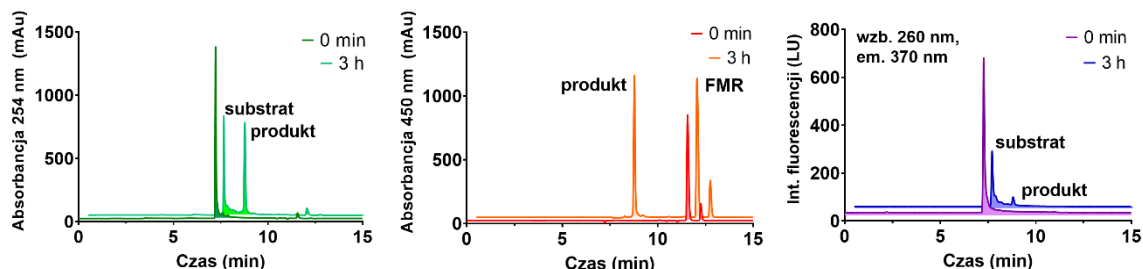
W celu wyznakowania różnych nukleotydowych analogów z Fluorescencyjnymi Molekularnymi Rotorami przeprowadziłem szereg reakcji „click” cykloaddycji azydku do alkinu katalizowaną jonami miedzi (I) (ang. Cu catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition, CuAAC) (rys. II. 19) w różnych układach DMSO/H₂O (1:1 lub 2:1, v/v). W większości przypadków wykorzystałem analogi nukleotydów z grupą azydkową i propargilowane pochodne FMR, chociaż TMGpppSG analog z grupą azydkową okazał się być niestabilny, stąd zsyntezowałem odpowiedni analog z grupą propargilową i dla niego przeprowadziłem reakcje CuAAC.



Rys. II. 19 Przykładowy schemat syntezy różnych nukleotydowych koniugatów (TMGpppN, m⁷GpppN, GMP) z FMR w dwóch wariantach syntetycznych- z propargilowanym FMR lub FMR z grupą azydkową

Do reakcji koniugacji użyłem czystych izomerów nukleotydów za wyjątkiem dwóch reakcji dla TMGppppA-L1-N₃ i m⁷GpppG-L1-N₃ dla których reakcje przeprowadziłem na mieszaninie izomerów. W pierwszym przypadku nie udało się odseparować izomerów dla koniugatów z DMHBI i HEMABI, które eluują zbyt blisko siebie, jednak koniugaty z o-HBI dobrze się separują podczas chromatografii i udało się wyizolować czyste produkty, jednak z mniejszymi wydajnościami. Jak się później okazało, regioizomery z niektórymi FMR wykazują bardzo różne właściwości ze snurportyną, stąd separacja substratowych związków metodą HPLC była kluczowym etapem.

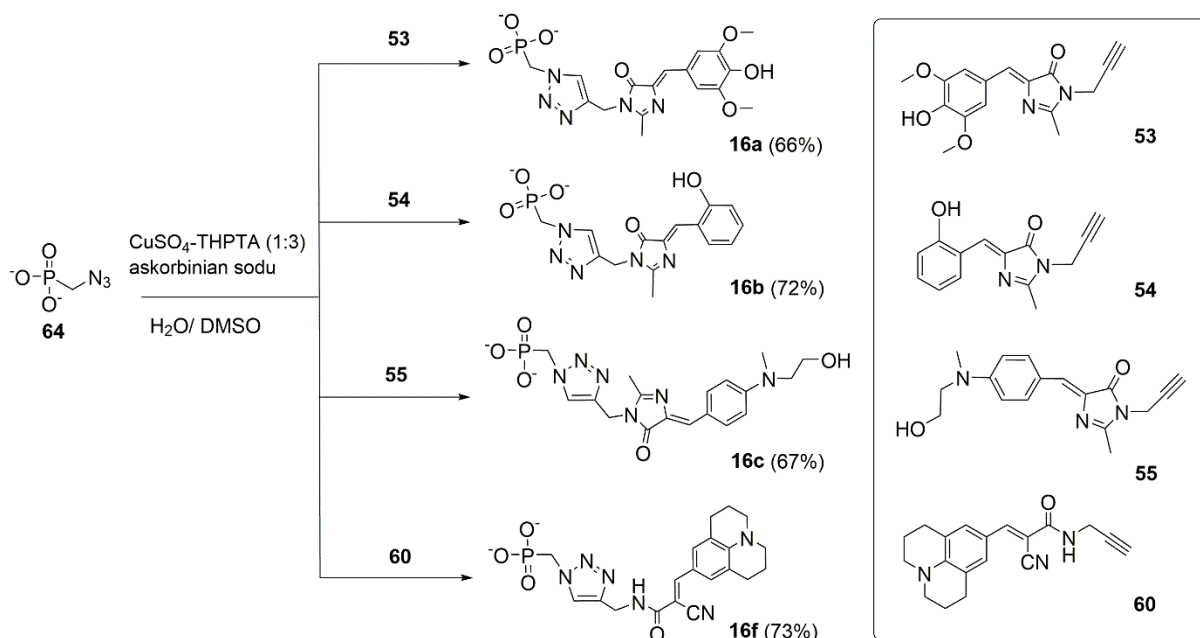
Większość substratów uległa konwersji w przeciągu 2 do 4 h, jednakże niekiedy reakcje wymagały dodania kolejnej porcji katalizatora i/lub FMR. Postęp reakcji monitorowałem metodą RP-HPLC z detekcją absorpcji w 254 nm oraz w długości fali odpowiadającej absorpcji FMR a także za pomocą detekcji fluorescencji w 370 nm (7-metyloguanozyna) (rys. II. 20).



Rys. II. 20 Przykładowy chromatogram reakcji CuAAC z syntezy TMGpppG_{2'-O-L1-ACVJ} z różną detekcją

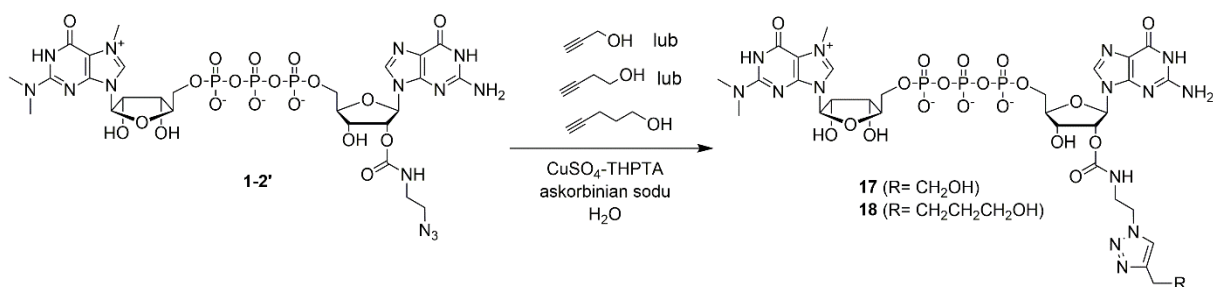
Wydajności reakcji, stosując czyste izomery jako substraty, wynosiły przeważnie ponad 40% (tab. 4). Mniejsze wydajności reakcji zaobserwowałem dla analogów tetrafosforanowych z grupą azydkową, gdzie problemem była izomeryzacja substratu, dla analogów znakowanych

HEMABI w pozycjach 3' rybozy ze względu na izomeryzację produktu oraz dla analogu modyfikowanego od strony trimetyloguanozyny ze względu na brak całkowitej konwersji. Ze względu na interesujące właściwości modyfikowanych guanozynowych pochodnych z TMG kapem (TMGpppG) w badaniach ze snurportyną postanowiliśmy zsyntezować wszystkie możliwe kombinacje z FMR z tym dinukleotydem, za wyjątkiem DMABN, dla którego nie miałem pochodnej propargilowej. W ten sposób otrzymałem dwanaście analogów TMGpppG-2'/3'-O-L1-FMR z pięcioma GFP-podobnymi FMR i jednym analogiem julolidyny. Na podstawie oceny ich stabilności i przydatności w badaniach ze snurportyną, wyselekcjonowałem trzy FMR dla których syntezowałem dalsze modyfikowane analogi nukleotydowe i są to kolejno DMHBI, HEMABI i o-HBI. Właściwości tych koniugatów TMGpppG z różnymi FMR omawiam w rozdziałach II. 4 – II. 8. Najciekawszymi okazały się dla mnie koniugaty z DMHBI, stąd są najliczniejszą i najbardziej ekstensywnie zbadaną przeze mnie grupą wśród koniugatów FMR. W analogiczny sposób zsyntezowałem koniugaty z FMR, które nie zawierały TMG kapu takie jak monometylokapowane koniugaty, GMP, fosfoniany FMR (rys. II. 21) (szczegóły w części eksperymentalnej).



Rys. II. 21 Schemat syntezy koniugatów z FMR niezawierających TMG kapu (**16a-c**, **16f**)

Do syntezy koniugatu z TMG kapem niezawierającego FMR wykorzystałem reakcje z alifatycznymi alkoholami z terminalną funkcją alkinową (rys. II. 22): propargilowy, 3-buty-nylowy i 4-pentynylowy. Nie udało mi się otrzymać produktu w przypadku alkoholu 3-buty-nylowego.



Rys. II. 22 Schemat syntezy koniugatów bez FMR zawierających TMG kap (**19**, **20**)

Tabela 4 Wydajności reakcji CuAAC dla różnych nukleotydowych koniugatów z FMR

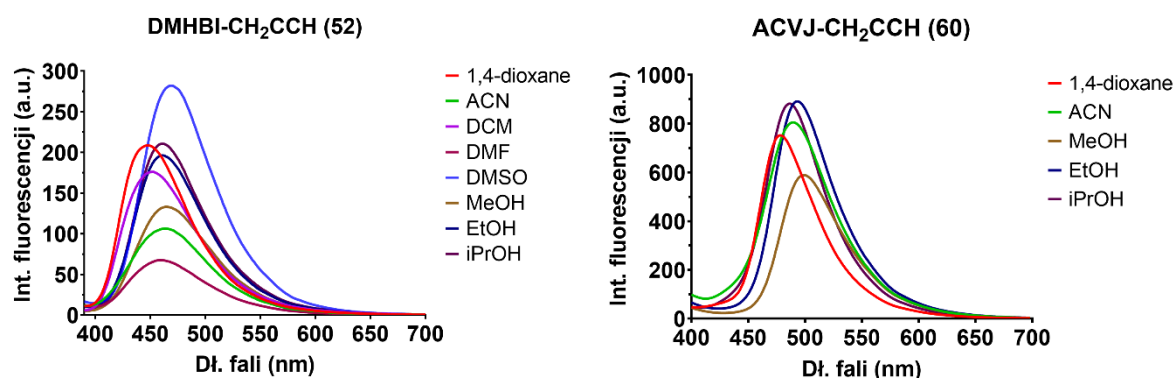
Substraty	Produkt	Wydajność [%]
TMG kapy		
1-2' + 52	1a-2'	55
1-3' + 52	1a-3'	74
1 + 53	1b-2'	22
	1b-3'	37
1-2' + 54	1c-2'	75
1-3' + 54	1c-3'	61
1-2' + 55	1d-2'	80
1-3' + 55	1d-3'	94
1-2' + 56	1e-2'	92
1-3' + 60	1f-2'	79
1-2' + 60	1f-3'	85
2-2' + 52	2a-2'	88
2-3' + 52	2a-3'	78
3-2' + 52	3a-2'	90
3-3' + 52	3a-3'	49
3-2' + 54	3c-2'	42
3-3' + 54	3c-3'	33
4-2' + 52	4a-2'	61
4-3' + 52	4a-3'	77
4-2' + 54	4c-2'	65
4-3' + 54	4c-3'	30
5-2' + 52	5a-2'	22
5-3' + 52	5a-3'	20
5-2' + 54	5c-2'	39
5-3' + 54	5c-3'	24
6 + 52	6a	51
6 + 54	6c	56
7-2' + 57	7a-2'	63
7-3' + 57	7a-3'	83
7-2' + 58	7b-2'	53
7-3' + 58	7b-3'	84
8-2' + 57	8a-2'	31
8-3' + 57	8a-3'	35
8-2' + 58	8b-2'	43
8-3' + 58	8b-3'	72

9 + 57	9a	48
9 + 58	9b	91
9 + 62	9g	65
11-2' + 52	11a-2'	81
11-3' + 52	11a-3'	95
11-2' + 54	11c-2'	68
11-3' + 54	11c-3'	76
GMP i m ⁷ G kapy		
12-2' + 52	12a-2'	30
12-3' + 52	12a-3'	49
12-2' + 53	12b-2'	65
12-3' + 53	12b-3'	63
12-2' + 54	12c-2'	72
12-3' + 54	12c-3'	63
12-2' + 55	12d-2'	34
12-3' + 55	12d-3'	46
12-2' + 56	12e-2'	95
12-3' + 56	12e-3'	92
12-2' + 60	12f-2'	51
12-3' + 60	12f-3'	60
13-2' + 57	13a-2'	54
13-3' + 57	13a-3'	47
13-2' + 58	13b-2'	73
13-3' + 58	13b-3'	45
14-2' + 53	14b-2'	52
14-3' + 53	14b-3'	57
15-2' + 52	15a-2'	42
15-3' + 52	15a-3'	55
15-2' + 53	15b-2'	52
15-3' + 53	15b-3'	32
15-2' + 54	15c-2'	60
15-3' + 54	15c-3'	42
21-2'+2' + 52	21a-2'+2'	61
22-2'+3' + 52	22a-2'+3'	56
22-2'+3' + 54	22c-2'+3'	43

Zaznaczone zostały kolorem beżowym syntez w odwróconej konfiguracji (linker typu 2)

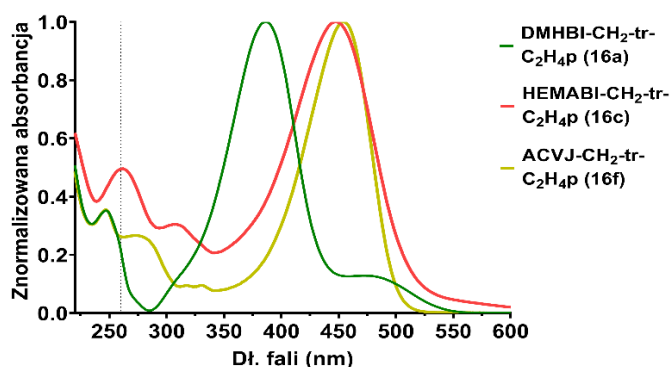
II.3. Właściwości spektralne FMR

FMR to związki wykazujące solwatochromizm, tzn. przesunięcia maksimum emisji w wyniku zmiany środowiska/rozpuszczalnika²⁷⁰⁻²⁷³. Zbadałem widma emisji kilku pochodnych FMR z grupą azydkową lub propargilową: DMHBI-propargil (**52**), ACVJ-propargil (**60**), w rozpuszczalnikach organicznych i nieorganicznych o różnej polarności (rys. II. 23): alkohole, DMSO, DMF, DCM, dioksan. Największe wydajności kwantowe FMR osiągają w DMSO, są również w nich bardzo dobrze rozpuszczalne, z kolei w wodzie i buforach wodnych ich rozpuszczalność jest bardzo ograniczona. Wyraźniejszy solwatochromizm wykazała w tym przypadku pochodna DMHBI.



Rys. II. 23 Widma emisji różnych pochodnych FMR użytych do znakowania nukleotydów

Dalej zbadałem widma absorpcji i emisji C-fosfonianów FMR, z łącznikiem triazolowym i ujemnie naładowaną grupą fosforanową (rys. II. 24). Związki te posiadają znacznie lepszą rozpuszczalność w wodzie i buforach, co umożliwiło mi zmierzenie widm w buforze fosforanowym o pH 7 (absorpcja) i buforze HEPES o pH 7,2 (emisja).



Rys. II. 24 Znormalizowane widma absorpcji i emisji dla fosfonianowych pochodnych FMR

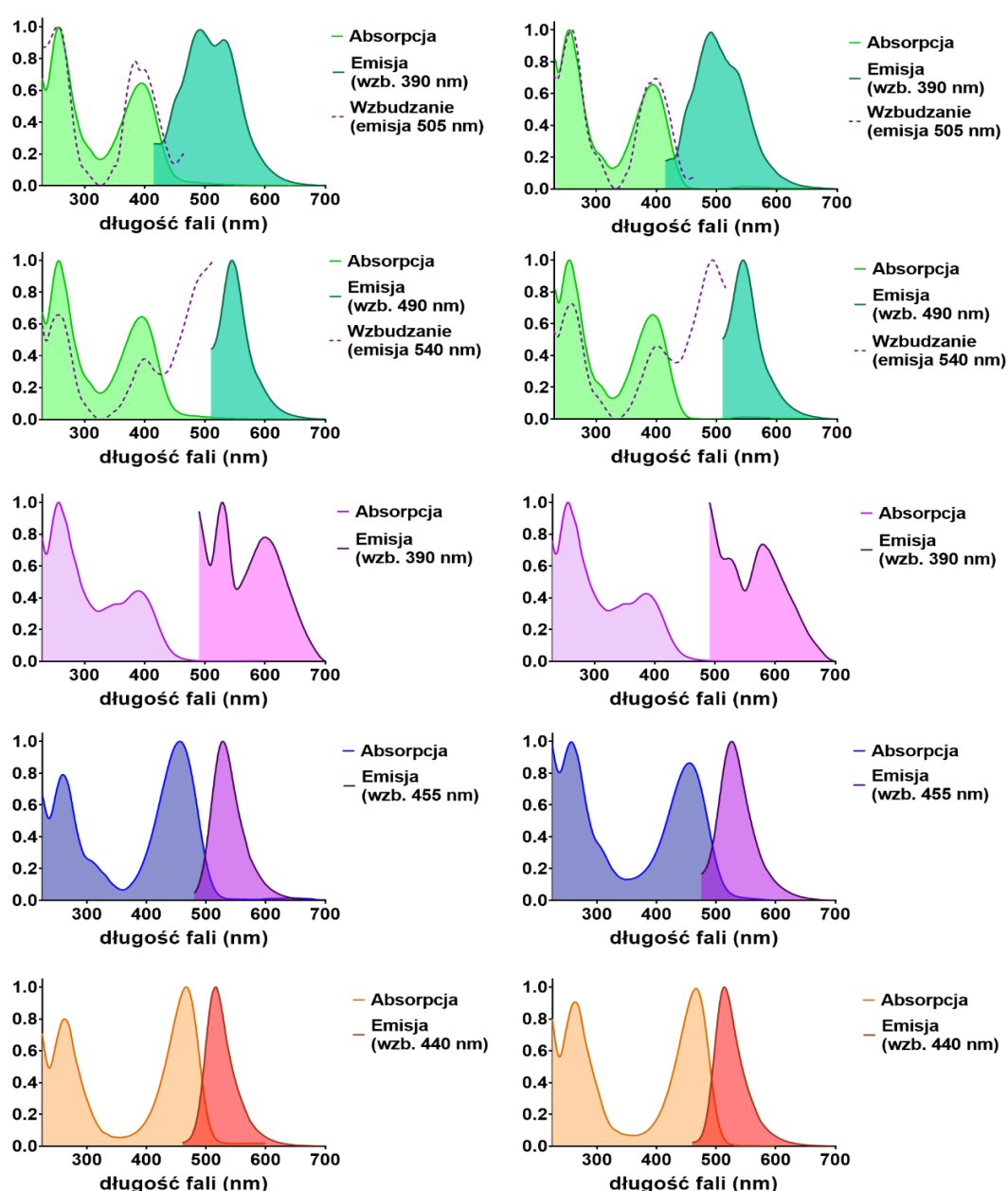
Na podstawie widma absorpcji można zaobserwować, że związki w niewielkim stopniu absorbują promieniowanie o długości 260 nm, w największym stopniu poch. HEMABI **16c**. Znając współczynniki ekstynkcji dla długości fali charakterystycznej dla FMR przeliczyłem jaką poprawkę powinienem zastosować w koniugatach nukleotydowych z FMR wyznaczając stężenie przy tej długości fali. Fosfonianowa pochodna DMHBI (**16a**) posiada dwa maksima absorpcji, pierwsze odpowiada formie fenolowej (390 nm), drugie formie fenolanowej (470 nm), która w niewielkim stopniu występuje również w tym pH.

II.4. Właściwości spektralne nukleotydowych koniugatów z FMR

Przed przystąpieniem do badań z białkami niezbędne było określenie właściwości spektralnych wolnych ligandów w szczególności widm emisji, wzbudzenia czy długość fali dla maksimum emisji. Widma absorpcji były zaś niezbędne do określenia stężeń produktów końcowych. W przypadku kilku maksim należy określić również które uczestniczy w wiązaniu ze snurportyną

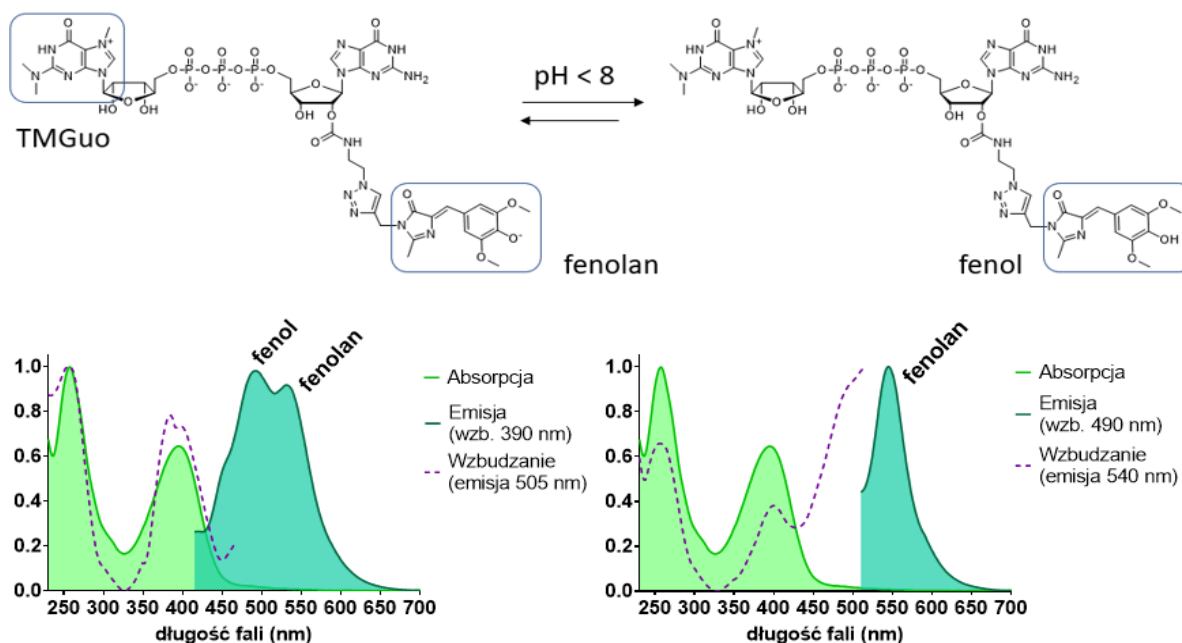
II.4.1 Widma absorpcji i emisji w buforach wodnych

Zbadałem widma emisji 43 koniugatów z różnymi FMR w buforze HEPES pH 7,2. i widma absorpcji w buforze o pH 7. Poniżej prezentuje znormalizowane widma absorpcji i emisji dla kilku wybranych TMG kapów z różnymi FMR (rys. II. 25) a dla pozostałych w artykule²⁷⁴ (SI).



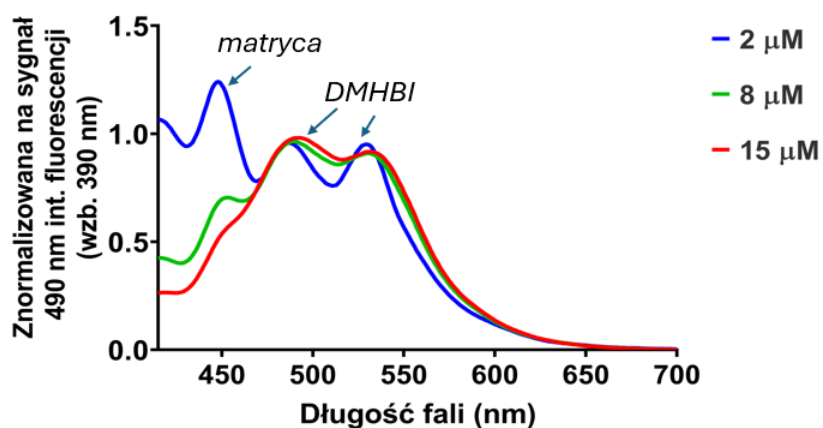
Rys. II. 25 Znormalizowane widma absorpcji, wzbudzenia (dla DMHBI) i emisji dla analogów TMGpppG z czterema różnymi FMR (1a-d), kolejno: DMHBI, o-HBI, HEMABI i ACVJ w poz. 2' (lewo) i 3'-O (pravo)

Koniugaty DMHBI w buforze o pH 7,2, bliskim fizjologicznemu, wykazują podwójną emisję (rys. II. 26) (lub nawet potrójną wliczając fluorescencję od m⁷guaniny wzbudzaną dług. 290 nm) o różnych stosunkach intensywności odpowiadające formie fenolowej w 490 nm i fenolanowej w 540 nm. Dodatkowo posiadają dwie długości wzbudzenia w 390 i 490 nm. Wzbudzenie 390 nm umożliwia obrazowanie tej podwójnej emisji na widmie, a 490 nm tylko emisję formy fenolanowej.



Rys. II. 26 Schemat równowagi kwasowo-zasadowej dla TMGpppG2'-O-L1-DMHBI oraz znormalizowane widma absorpcji, emisji i wzbudzenia (przerywana linia) wraz z przypisanymi fluorescencyjnymi motywami strukturalnymi

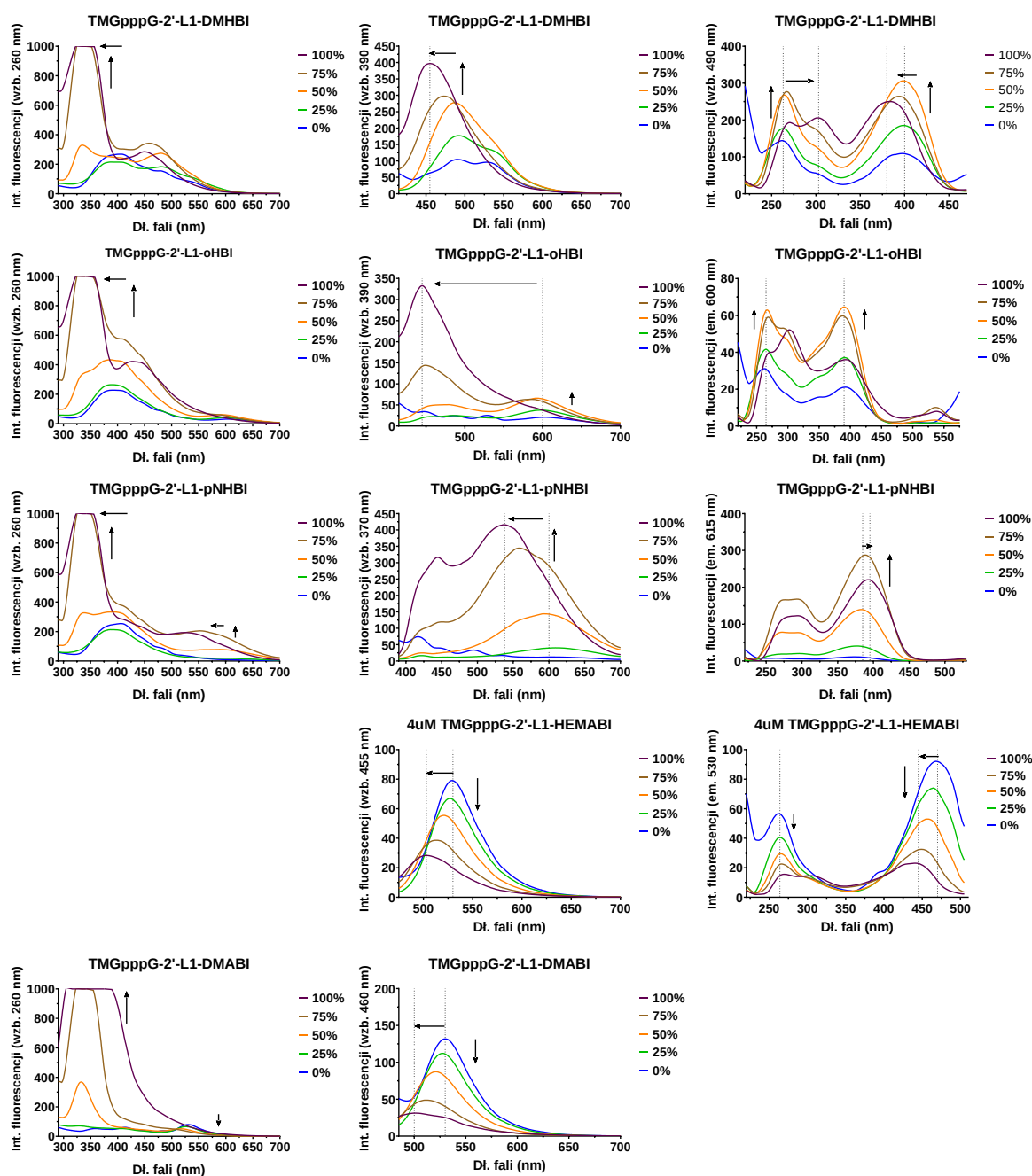
Warto w tym miejscu zwrócić uwagę, że emisja kwantowa koniugatów z DMHBI i o-HBI jest silnie wygaszana w roztworach wodnych, kształt widm emisji zależy silnie od zastosowanego stężenia związku i tak, np. zbyt niskie stężenie uniemożliwia zarejestrowania prawidłowego kształtu widma od związku z DMHBI (rys. II. 27). Dla 2 μ M stężenia na widmie emisji przeważa sygnał 450 nm, który jest sygnałem od matrycy (rys. II. 27) a dopiero dla >8 μ M stężenia widać jednoznacznie dwa sygnały emisyjne pochodzące od związku (sygnał od matrycy jest przykryty sygnałem od związku). W przypadku sond z o-HBI pasmo emisji związku widoczne jest dla ~10-15 μ M.



Rys. II. 27 Porównanie kształtu widm emisji koniugatu TMGpppG_{3'}-O-L1-DMHBI (**1a-3'**) dla różnych stężeń

II.4.2 Widma emisji i wzbudzenia w układach DMSO-woda

Wykonałem widma emisji i wzbudzenia TMG kapowanych koniugatów z guanozyną i różnymi analogami fluoroforu GFP (DMHBI, *o*-HBI, *p*-NHBI, HEMABI, DMABI) w pozycji 2'-O-guanozyny w różnych układach woda-DMSO: 0, 25, 50, 75 i 100% DMSO (rys. II. 28). Wykorzystałem różne stężenia związków, w taki sposób, aby obserwowalna była emisja znacznika po jego wzbudzeniu, np. 15 μ M dla DMHBI i *p*-NHBI a dla DMABI 1 μ M.



Rys. II. 28 Porównanie właściwości spektralnych analogów dinukleotydowych TMGpppG z różnymi analogami fluorofozu GFP przyłączonych w pozycji 2'-O-guanozyny w różnych układach DMSO-H₂O (legenda-% DMSO)

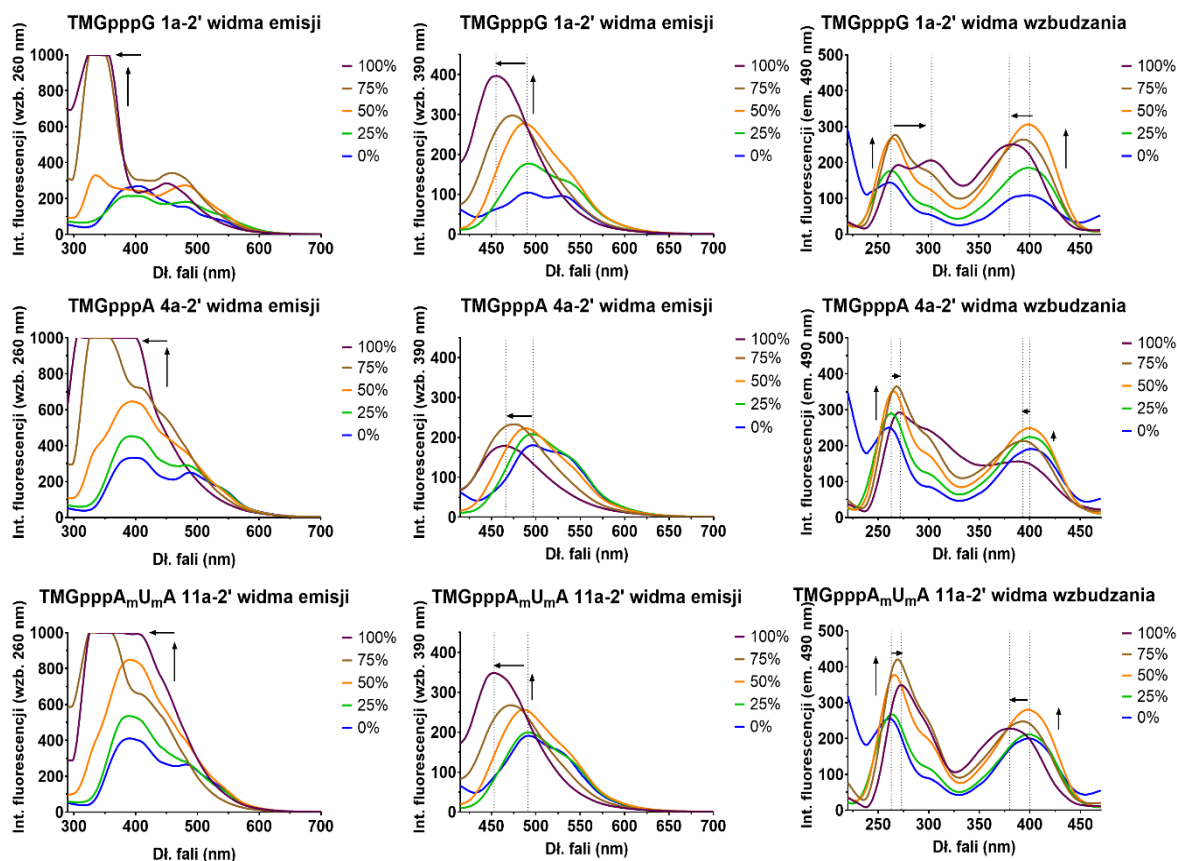
Przy wzbudzaniu długością fali 260 nm (odpowiadającą wzbudzeniu części nukleotydowej) widać bardzo podobne tendencje dla każdego z tych koniugatów – wraz ze wzrostem zawartości DMSO rośnie intensywność fluorescencji od m⁷guanozyny, a w układach powyżej 50% DMSO następuje przesunięcie hipsochromowe emisji z 400 nm na ok. 345 nm, co może wskazywać na formy oddziaływań międzycząsteczkowych. W niższych układach DMSO (0-50%) obserwowalna jest emisja znacznika (490 nm dla DMHBI, 600 nm dla o-HBI i 615 dla p-NHBI), jednak powyżej 50% pojawiają się zupełnie inne pasma emisji przesunięte w kierunku fal krótszych. Jest to zgodne z tym co obserwuje przy wzbudzaniu znacznika FMR

(druga kolumna), co oznacza tyle, że część energii promieniowania 260 nm pochłaniania jest przez zasadę azotową nukleotydu a pozostała część przez znacznik.

Drugi rodzaj widm emisji stanowią widma wzbudzone długością fali charakterystyczną dla danego FMR. Dla koniugatów DMHBI zaobserwowałem wzrost intensywności fluorescencji oraz ponownie przesunięcie hipsochromowe z 490 nm na 455 nm, a ponadto można zaobserwować pasmo emisji 540 nm odpowiadające formie fenolanowej, jednak tylko w układach 0 i 25% DMSO. W wyższych zawartościach DMSO pasmo to zostaje przykryte przez dominujące pasmo odpowiadające formie fenolowej (455-490nm). Dla *o*-HBI emisja znacznika jest przesunięta w kierunku fal czerwonych - 600 nm, podobnie jak dla *p*-NHBI – 615 nm, jednak ich widma emisji zachowują się odmiennie przy wzroście zawartości DMSO. Dla *p*-NHBI emisja 615 nm w wodzie jest prawie nieobserwowalna a w czystym DMSO intensywność fluorescencji rośnie ponad 30-krotnie. Ponadto następuje efekt hipsochromowy z 600 nm na 535 nm. W przypadku *o*-HBI wzrost jest tylko ponad 2-krotny natomiast powyżej 50% DMSO pojawia się pasmo z maksimum 455 nm tak samo jak dla DMHBI. Wydaje się, że jest to emisja znacznika, gdyż wzbudzana jest długością 390 nm dla której część nukleotydowa nie absorbuje, jednak patrząc na układ 75% DMSO i znacznik *o*-HBI widać dwa pasma emisji – 455 nm i 600 nm a w 100% DMSO pasmo 600 nm zostaje przykryte. Może to sugerować powstawanie form międzycząsteczkowych tych związków. Jeśli potraktować to jako emisję znacznika to dla *o*-HBI jej intensywność rośnie 16-krotnie w 100% DMSO. Dla HEMABI i DMABI, odmiennie od pozostałych analogów fluoroforu GFP, intensywność fluorescencji maleje wraz ze wzrostem zawartości DMSO. W 100% DMSO intensywność fluorescencji dla obu tych koniugatów jest blisko 4-krotnie mniejsza i występuje efekt hipsochromowy (530 na ok. 500 nm).

Ostatni rodzaj widm stanowią widma wzbudzania dla emisji znacznika, odpowiednio 490, 600, 615 i 530 nm dla DMHBI, *o*-HBI, *p*-NHBI i HEMABI. Zaobserwowałem, że w dwóch przypadkach, tj. dla DMHBI i HEMABI, następują przesunięcia maksimum wzbudzania FMR w kierunku fal krótszych. Dla DMHBI przesunięcie hipsochromowe występuje dopiero powyżej 50% DMSO a dla HEMABI tendencja jest monotoniczna po pierwsze przesunięcia hipsochromowego a po drugie spadku intensywności fluorescencji. W tym drugim przypadku przesunięcie maksimum wzbudzania wynosi -25 nm, tyle samo co dla maksimum emisji, co oznacza że przesunięcie stokesowskie dla tego związku pozostaje takie samo w każdym z tych układów. Nie jest to jednak zachowane dla pozostałych FMR. Ponadto widma wzbudzania pokazują, że emisję znacznika można obrazować na różne sposoby, np. dla DMHBI i *o*-HBI w takim samym stopniu (rozumiejąc jako intensywności na widmie emisji) przez wzbudzanie 265 nm jak i 390 nm. W przypadku *p*-NHBI wzrost intensywności dla 400 nm jest większy niż dla 265 nm, niemniej zawsze korzystniejsze jest wzbudzanie dłuższą długością fali ze względu na wspomniane pochłanianie promieniowania 265 nm przez część nukleotydową.

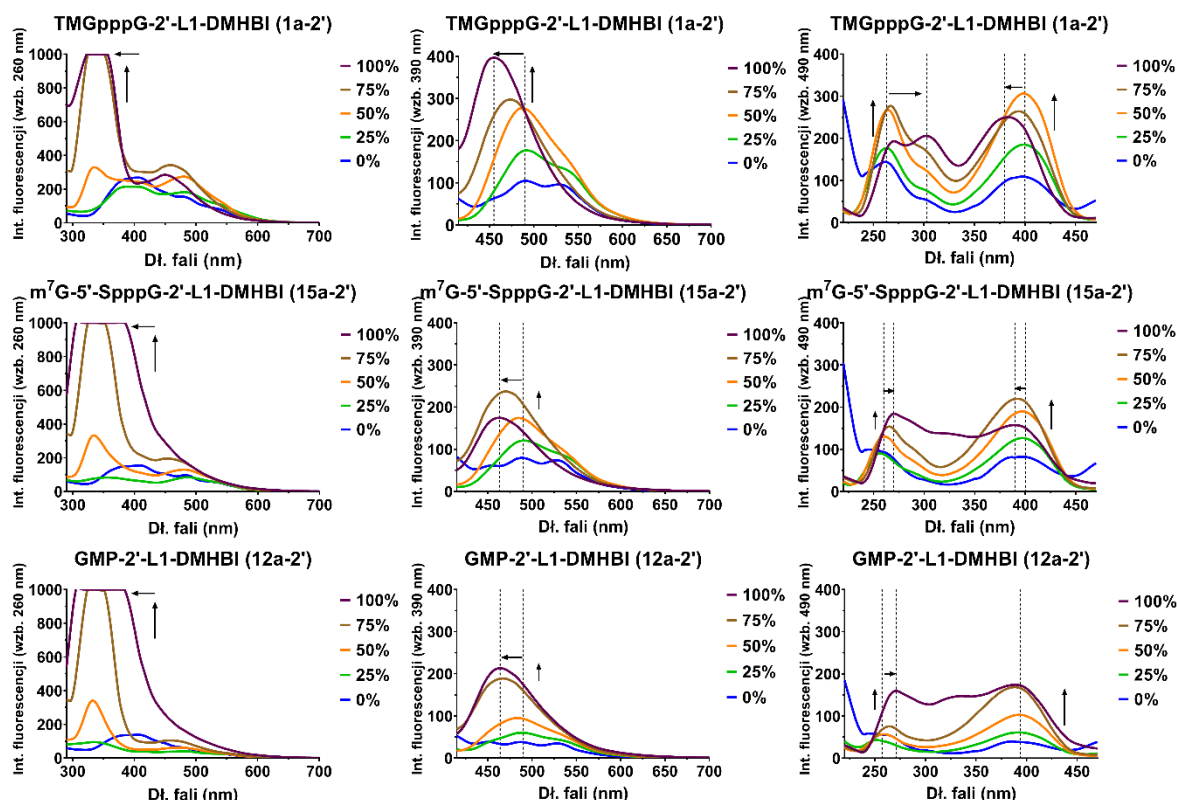
Dalej zbadałem różne nukleotydowe analogi z TMG kapem i tym samym znacznikiem – DMHBI (rys. II. 29) i oceniłem wpływ nukleotydu połączonego z FMR (G lub A) oraz wpływ oddalenia znacznika od struktury trimetyloguanozyny w analogu tetranukleotydowym (4-ta pozycja w sekwencji, TMGpppA_mU_mA-2'-O-DMHBI).



Rys. II. 29 Porównanie właściwości spektralnych różnych TMG kapowanych nukleotydowych analogów z DMHBI przyłączonym w pozycji 2'-O-rybozy guanozyny lub adenozyiny w różnych układach DMSO-H₂O (legenda-% DMSO)

Okazuje się, że pod wieloma względami związki te zachowują się podobnie, tj. przy wzroście zawartości DMSO rosną intensywności pasm emisji nukleotydu, znacznika oraz pasm ich wzbudzenia. Są też pewne różnice, tj. dla wzbudzenia 260 nm dla analogów z adenozyną intensywność emisji nukleotydu rośnie znacznie bardziej, a emisja znacznika (495 nm) wcale. Nie pojawia się pasmo 455 nm jak dla analogu z guanozyną. Zmiany intensywności są bardziej monotoniczne. Dla wzbudzenia 390 nm we wszystkich przypadkach obserwuje takie samo przesunięcie hipsochromowe, jednak zmiany intensywności fluorescencji są znacznie większe dla związku z guanozyną niż z adenozyną. Widma wzbudzenia wyglądają podobnie dla związków z modyfikowaną adenozyną, jednak ponownie intensywności fluorescencji dla 400 nm rosną w mniejszym stopniu niż dla nukleotydu (265 nm). Widać, że nie jest to jednak prawdą, bo część nukleotydowa przeważa na widmie emisji. Nie ma różnic na widmach między analogiem dinukleotydowym i tetranukleotydowym z adenozyną, co wskazuje na to, że oddalenie znacznika nie przyniosło korzyści w postaci wzrostu stosunku sygnału znacznika do sygnału od m⁷Guo. Dla związku z guanozyną w 100% DMSO pojawia się trzecie pasmo wzbudzenia znacznika dla ok. 300 nm (przesunięcie batochromowe), które w przypadku związków z adenozyną są przykryte przez pasmo 265 nm.

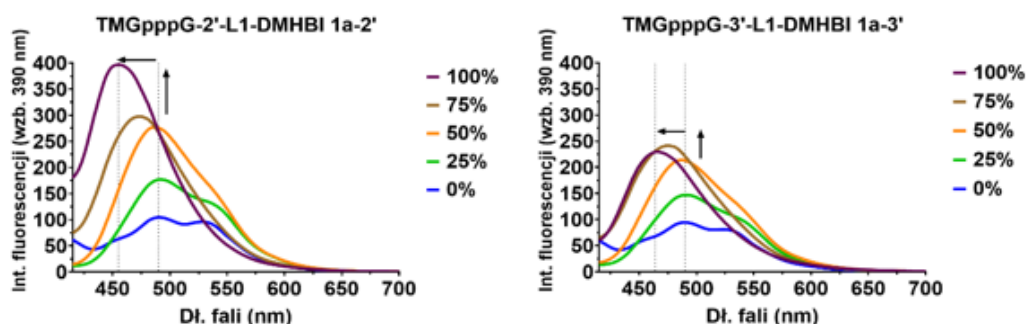
Porównałem nukleotydowe analogi z modyfikowaną guanozyną i DMHBI z TMG kapem, m⁷G kapem lub bez struktury kapu (rys. II. 30)



Rys. II. 30 Porównanie właściwości spektralnych nukleotydów z różnymi strukturami kapu (TMG, m^7G) oraz niekapowanego nukleotydu z DMHBI w różnych układach DMSO- H_2O (legenda-% DMSO)

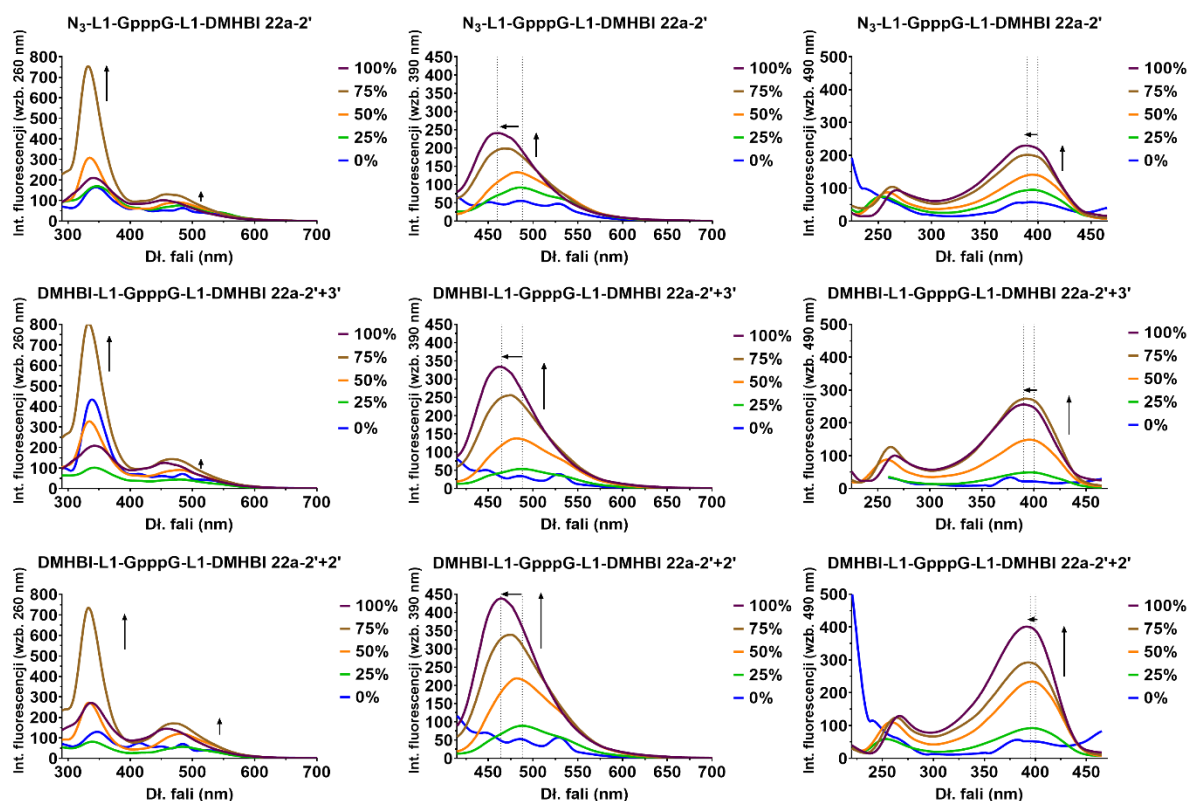
Dla widm emisji przy wzbudzaniu 260 nm obserwuje różne przyrosty intensywności emisji formy nukleotydowej i FMR. Najlepiej obrazują to widma w układzie 75% DMSO (brązowy) – dla TMG kapu widać dwa maksima, podobnie dla związku z m^7G kapem, chociaż tu drugie maksimum (od FMR) jest mniejsze, a w 100% DMSO całkowicie przykryte jest przez pierwsze (nukleotyd). Ten sam efekt widoczny jest dla widm wzbudzania 390 nm, gdzie obserwuje podobne przesunięcia hipsochromowe, jednak różne zmiany intensywności emisji znacznika (w celu lepszego porównania zastosowałem takie same skale osi Y). Sugeruje to, że związek z TMG kapem i guanozyną jest lepszym sensorem zmian polarności środowiska (solvatochromizm) zarówno pod kątem struktury kapu jak i rodzaju nukleotydu (G/A). Z kolei wśród różnych analogów fluoroforu GFP wygrywa *p*-NHBI (największe zmiany intensywności i przesunięć). Ponadto dla analogu GMP intensywności fluorescencji dla 345 nm są podobne w tych samych układach jak dla związków z m^7G i TMG kapem, co jednoznacznie wskazuje, że nie jest to fluorescencja m^7 guaniny, lecz jakichś form międzycząsteczkowych. Na widmie wzbudzania dla związku z TMG kapem następuje przesunięcie batochromowe z 265 nm na 300 nm i jednocześnie hipsochromowe dla znacznika z 400 nm na 380 nm, dla m^7G kapu te same przesunięcia wynoszą odpowiednio + i -10 nm a dla analogu GMP nie ma przesunięcia wzbudzania wraz ze wzrostem DMSO.

Porównałem również regioizomery (2' i 3'-O) dla TMG kapowanych związków z guanozyną i DMHBI lub o-HBI. W przypadku koniugatów o-HBI (**1b**) nie ma różnic na widmach emisji między regioizomerami, zaś dla DMHBI (**1a**) emisja znacznika rośnie bardziej dla izomeru 2' niż dla izomeru 3', zarówno przy wzbudzeniu 260 nm jak i 390 nm (rys. II. 31).



Rys. II. 31 Porównanie właściwości spektralnych regioizomerów koniugatów **1a-2'** i **1a-3'** w różnych układach DMSO-H₂O (legenda-% DMSO)

W ostatnim kroku porównałem widma dla dinukleotydów bez struktury kapu znakowanych DMHBI pojedynczo lub podwójnie na guanozynie (rys. II. 32). Zbadalem dwa koniugaty podwójnie znakowane DMHBI – **22a-2'+2'**, **22a-2'+3'** oraz jeden monopodstawiony **22a-2'**.

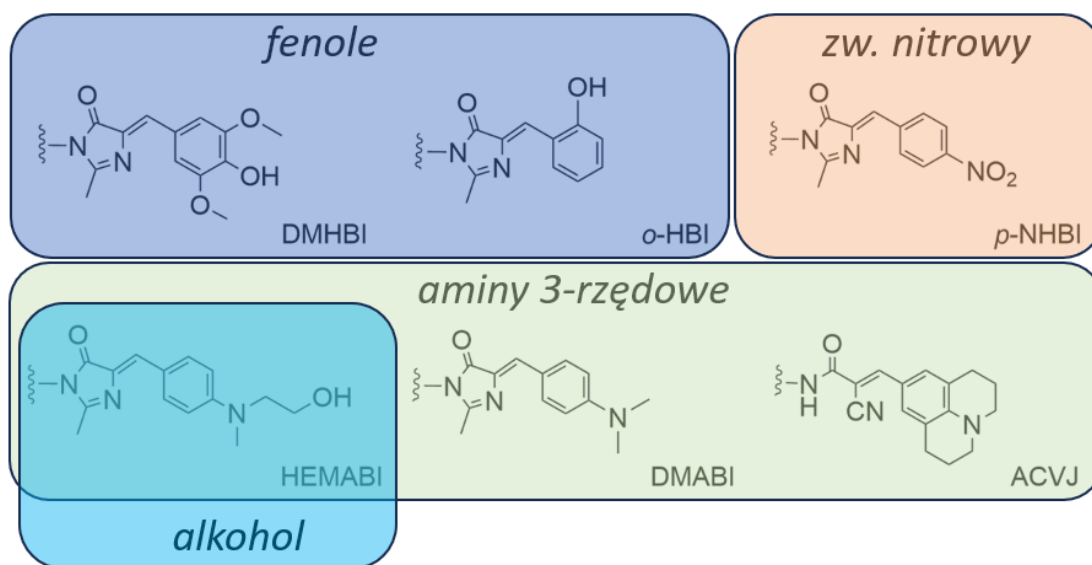


Rys. II. 32 Porównanie właściwości spektralnych analogu GpppG znakowanego DMHBI pojedynczo i podwójnie w różnych układach DMSO-H₂O (legenda-% DMSO)

Koniugaty podwójnie znakowane wykazywały większy wzrost intensywności fluorescencji przy rosnącym stężeniu DMSO niż znakowany pojedynczo (9 i 8-krotny wzrost w porównaniu do 4,5-krotnego dla monopodstawionego). Wskazuje to, że są lepszymi sensorami zmian polarności mikrośrodowiska.

II.5. Właściwości fizykochemiczne FMR i nukleotydowych koniugatów z FMR

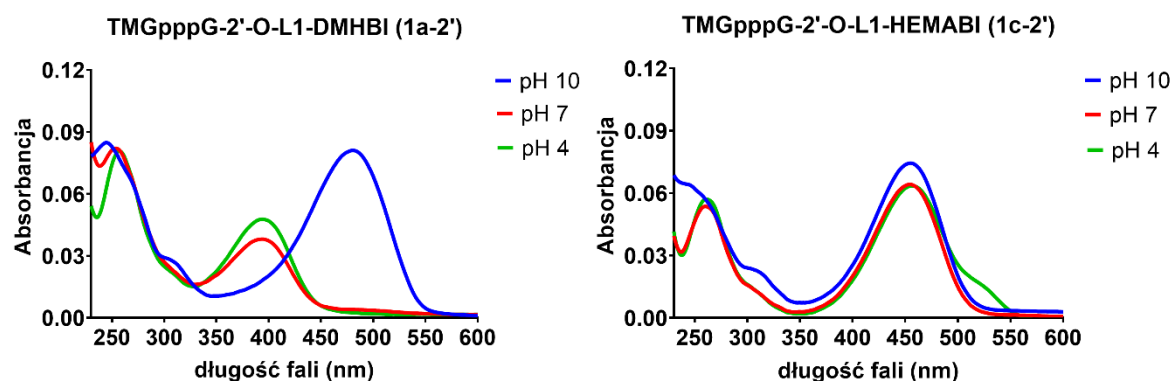
Badane przeze mnie FMR różnią się pod kątem chemicznym. Zbadałem koniugaty z pięcioma analogami fluoroforu GFP: DMHBI, *o*-HBI, *p*-NHBI, HEMABI, DMABI oraz dwoma analogami julolidyny: ACVJ oraz DMABN a także jednym analogiem DMAPh, zbliżonym strukturalnie do Tioflawiny T. Wśród tych wszystkich znalazły się fenole – DMHBI i *o*-HBI, związek z 1° alifatyczną grupą hydroksylową – HEMABI, z grupą nitrową – *p*-NHBI, z 3° grupą aminową – DMABI, DMABN, ACVJ. Dodatkowo ACVJ jest rozbudowanym sterycznie związkiem aromatycznym z grupą aminową, amidową i nitylową. Analogi fluoroforu GFP posiadają pierścień metyloimidazolinonu, którego brak w ACVJ i DMABN. DMHBI zawiera grupę hydroksylową w pozycji para oraz dwie metoksyłowe (-OCH₃) grupy w pozycjach meta, które zgodnie z równaniem Hammetta stanowią grupy wyciągające elektrony (EWG) i tym samym zwiększają kwasowość protonu grupy hydroksylowej. *o*-HBI w odróżnieniu od DMHBI posiada grupę hydroksylową w pozycji *orto* przez co emisja jest przesunięta w kierunku fal dłuższych i maksimum sygnału pojawia się ok. 605 nm. Ponadto wykazuje najbardziej wygaszaną fluorescencję w rozpuszczalnikach polarnych. Podobnie *p*-NHBI i jego koniugaty wykazują emisję w 615 nm i jest ona równie silnie wygaszana. Intensywności fluorescencji wolnych związków z FMR w rozp. polarnych układają się w szereg:



Rys. II. 32 Klasyfikacja chemiczna wykorzystanych w pracy fluorescencyjnych molekularnych rotorów ze względu na grupy funkcyjne

II.5.1 Zależności widm emisji i wzbudzania od pH

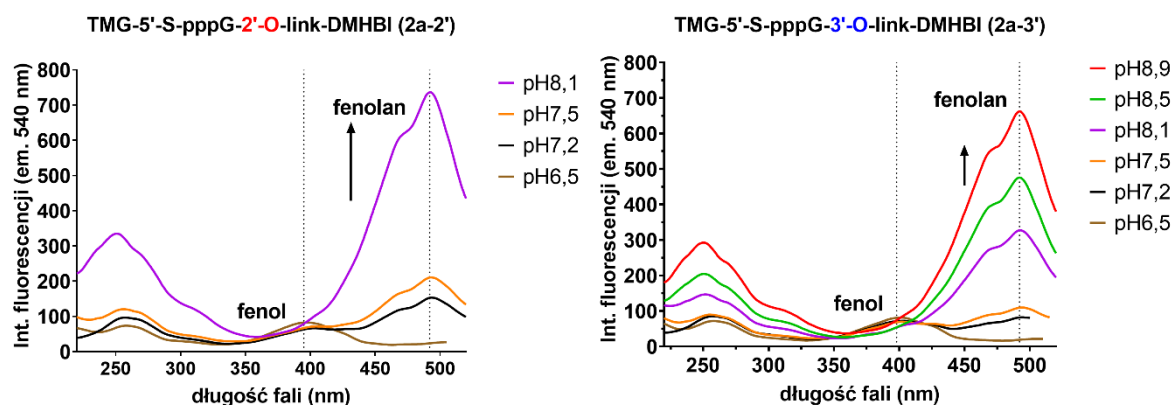
Zbadałem zależności intensywności fluorescencji wolnych (niezwiązanych) koniugatów z DMHBI (rys. II. 33) i o-HBI w buforach wodnych o różnych pH. Koniugaty te wykazują emisję formy fenolanowej zależną od pH środowiska i są tym samym sensorami zmian pH, w przeciwieństwie do pozostałych (**1c-2'**, rys. II. 33).



Rys. II. 33 Widma absorpcji dla koniugatów TMGpppG z DMHBI i HEMABI w pozycji 2'-O-guanozyny (**1a-2'**, **1c-2'**) w buforach o pH 4, 7 i 10

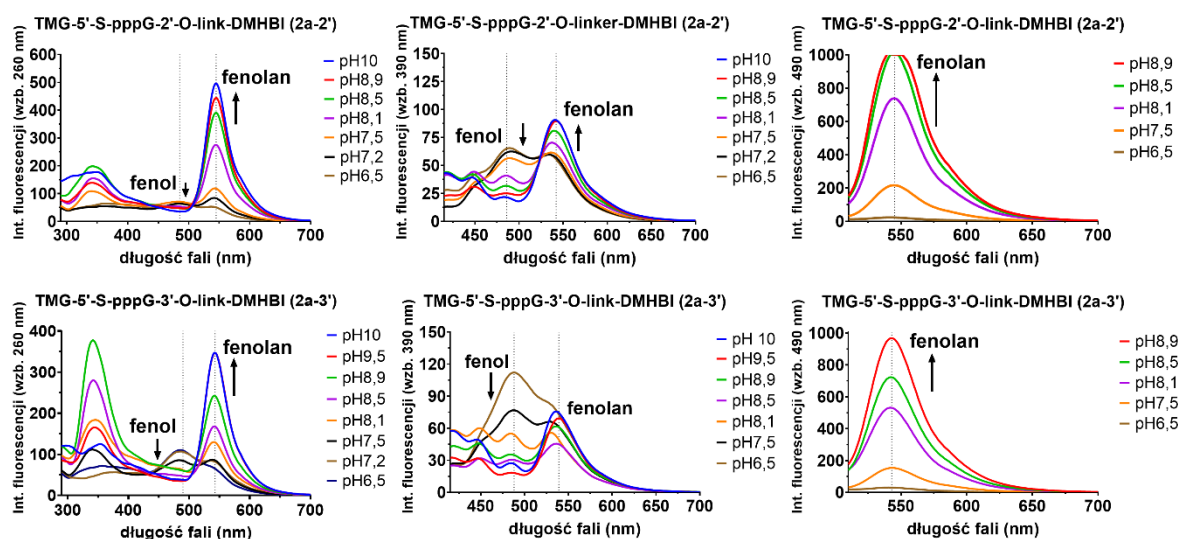
Wykorzystałem w badaniach roztwory buforowe o różnych pH: 6,5 ; 7,2 ; 7,5 ; 8,1 ; 8,5 ; 8,9 ; 9,5 ; 10,0 ; 10,4 ; 10,9 (patrz rozdz. III. 7. 6). Do badań wyselekcjonowałem 7 koniugatów z DMHBI: **1a-2'**, **2a-2'/3'**, **12a-2'/3'**, **15a-2'/3'** oraz 6 z o-HBI: **1b-2'/3'**, **12b-2'/3'**, **15b-2'/3'**, w taki sposób, aby uchwycić różnice między regioizomerami, których różne właściwości widoczne są również w badaniach ze snurportyną, wpływ niewielkich modyfikacji takich jak zamiana atomu tlenu na atom siarki oraz wpływ struktury kapu lub jego braku na właściwości fizykochemiczne. Eksperymenty wykonywałem dla sond z DMHBI w stężeniu 10 μ M i 15 μ M dla o-HBI. Dobranie takich warunków umożliwiło mi zmierzenie w dokładny sposób zmian intensywności fluorescencji w konkretnych pH.

Wykonałem widma wzbudzania w buforach o różnych pH dla koniugatów TMG kapu z guanozyną i DMHBI w pozycjach 2'-O i 3'-O guanozyny. Okazuje się, że w wyższych pH pojawia się dodatkowe pasmo wzbudzania w 490 nm odpowiadające formie fenolanowej (rys. II. 34).

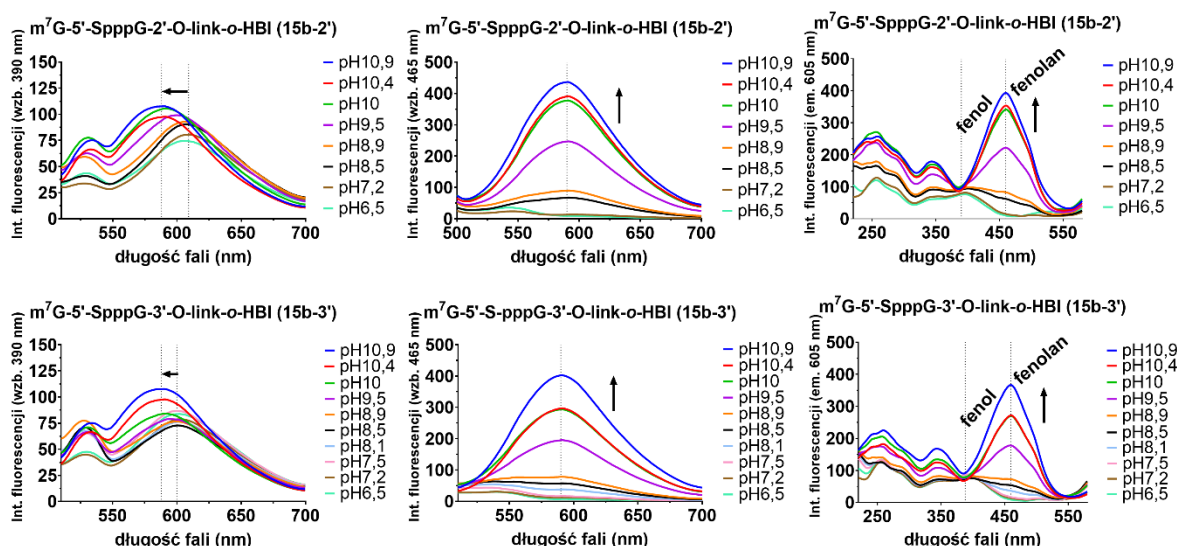


Rys. II. 34 Widma wzbudzenia (emisja 540 nm) dla koniugatów analogu TMGpppG z DMHBI pozycjach 2'-O- i 3'-O-guanozyny (**2a-2'**, **2a-3'**) w różnych pH

Pasmo to pojawia się dla regioizomerów w różnych pH, np. w buforze HEPES pH 7,2 (czarna linia) dla izomeru 2' widać wyraźnie silniejsze pasmo wzbudzenia 490 nm, podczas gdy dla izomeru 3' w tych samych warunkach jest ono znacznie mniej intensywne niż dla izomeru 2' i mniejsze od wzbudzenia 390 nm. Zaciekało mnie to i postanowiłem zbadać zależności widm emisji od pH (rys. II. 35-36).

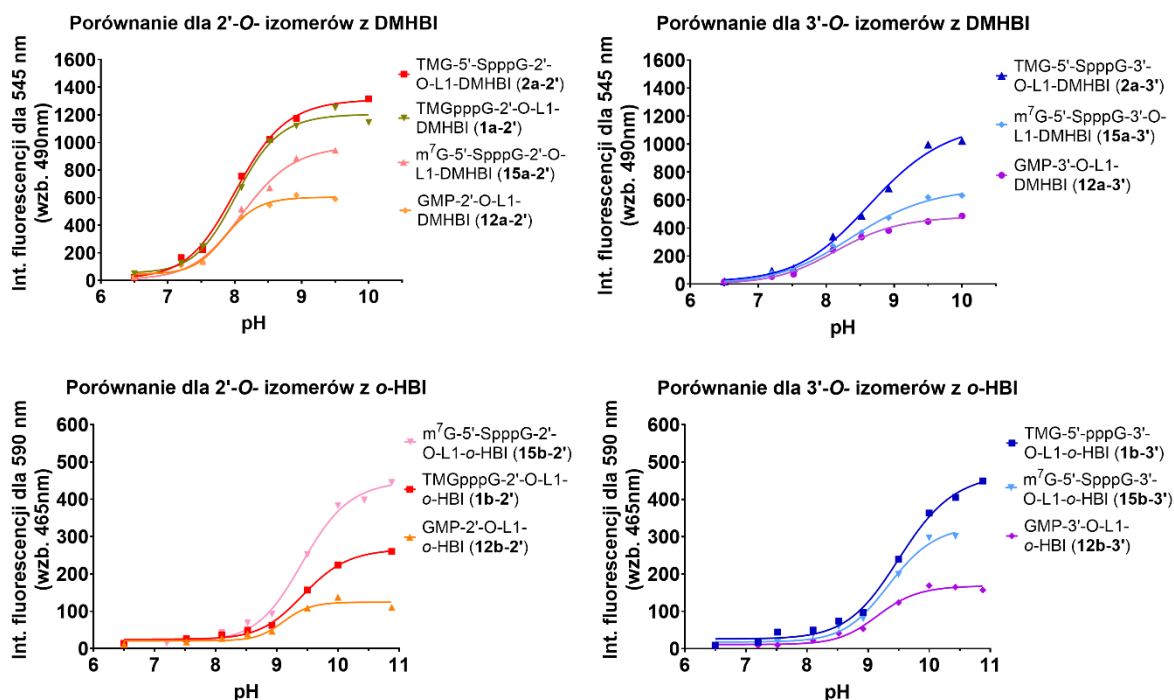


Rys. II. 35 Widma emisji wzbudzone 260 nm, 390 nm (fenol) i 490 nm (fenolan) dla koniugatów analogu TMGpppG z DMHBI pozycjach 2'-O (góra) i 3'-O (dół) guanozyny (**2a-2'**, **2a-3'**) w różnych pH



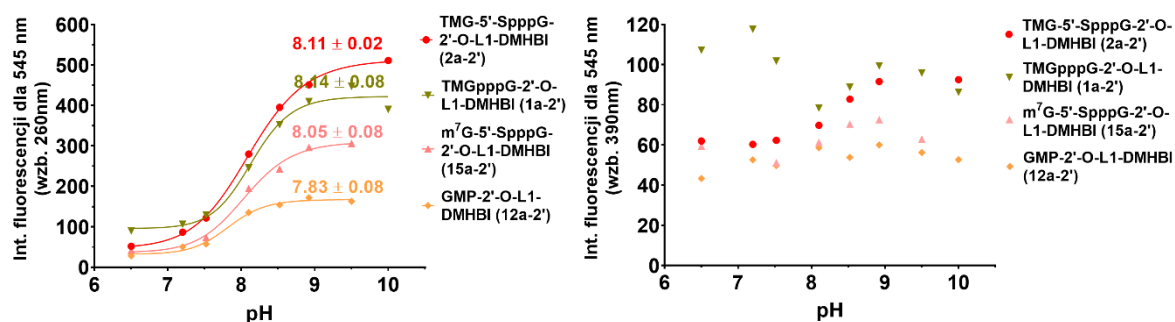
Rys. II. 36 Widma emisji wzbudzone 390 nm (fenol) i 465 nm (fenolan) oraz wzbudzenia (em. 605 nm) dla koniugatów analogu $m^7GSpppG$ z o -HBI pozycjach 2'-O (górną) i 3'-O (dół) guanozyny (**15b-2'**, **15b-3'**) w różnych pH

Z widm odczytałem wartości intensywności fluorescencji odpowiadające formie fenolanowej (emisja 545 lub 590 nm dla odpowiednio DMHBI i o -HBI). Do punktów pomiarowych (8 dla DMHBI lub 10 punktów dla o -HBI), dopasowałem krzywą (agonist vs response model, czteroparametrowy, rys. II. 37) i odczytałem wartość pK_a . Dobranie takiego modelu pozwala na najlepsze dopasowanie, mimo że dla DMHBI liczba stopni swobody wynosi 3-4 a dla o -HBI 6.



Rys. II. 37 Zależność intensywności fluorescencji dla długości fali odpowiadającej formie fenolanowej (w 545 nm dla DMHBI i 590 nm dla o -HBI) w maksimum jej wzbudzenia od pH oraz dopasowane krzywe

Wartości pK_a można również odczytać z widm wzbudzanych długością 260 nm, ponieważ tam też obserwujemy emisję znacznika, jednak nie jest to możliwe przy wzbudzaniu 390 nm (rys. II. 38) (forma fenolowa) – tam chociaż obserwuje emisję znacznika to intensywności fluorescencji się nie zmieniają lub zmieniają losowo (długość 390 nm jest poza wzbudaniem formy fenolanowej). Wartości pK_a dla związków (dla dwóch długości fal wzbudzenia) zostały zaprezentowane w tabeli 5.



Rys. II. 38 Przykłady zależności intensywności fluorescencji od pH dla wzbudzenia 260 nm (i dopasowane krzywe) i 390 nm dla 2'-O- izomerów z DMHBI

Tabela 5 Wartości pK_a wybranych koniugatów z DMHBI i o-HBI otrzymane dla różnych dł. wzbudzenia

Związek	pK_a (wzb. 260 nm)	pK_a (wzb. 490 ^a / 465 ^b nm)
TMGpppG-2'-O-link1-DMHBI (1a-2')	8,14 ± 0,08	8,04 ± 0,05
TMG-5'-S-pppG-2'-O-link1-DMHBI (2a-2')	8,11 ± 0,02	8,03 ± 0,05
TMG-5'-S-pppG-3'-O-link1-DMHBI (2a-3')	8,80 ± 0,10	8,69 ± 0,12
m ⁷ G-5'-S-pppG-2'-O-link1-DMHBI (15a-2')	8,05 ± 0,08	8,13 ± 0,10
m ⁷ G-5'-S-pppG-3'-O-link1-DMHBI (15a-3')	8,64 ± 0,16	8,43 ± 0,09
GMP-2'-O-link1-DMHBI (12a-2')	7,83 ± 0,08	7,87 ± 0,08
GMP-3'-O-link1-DMHBI (12a-3')	8,13 ± 0,02	8,17 ± 0,08
TMGpppG-2'-O-link1-o-HBI (1b-2')	nd	9,44 ± 0,06
TMGpppG-3'-O-link1-o-HBI (1b-3')	9,51 ± 0,05	9,54 ± 0,07
m ⁷ G-5'-S-pppG-2'-O-link1-o-HBI (15b-2')	9,31 ± 0,11	9,43 ± 0,06
m ⁷ G-5'-S-pppG-3'-O-link1-o-HBI (15b-3')	9,40 ± 0,09	9,36 ± 0,10
GMP-2'-O-link1-o-HBI (12b-2')	nd	9,11 ± 0,15
GMP-3'-O-link1-o-HBI (12b-3')	9,05 ± 0,18	9,17 ± 0,09

^a DMHBI, ^b o-HBI, nd = nie wyznaczono

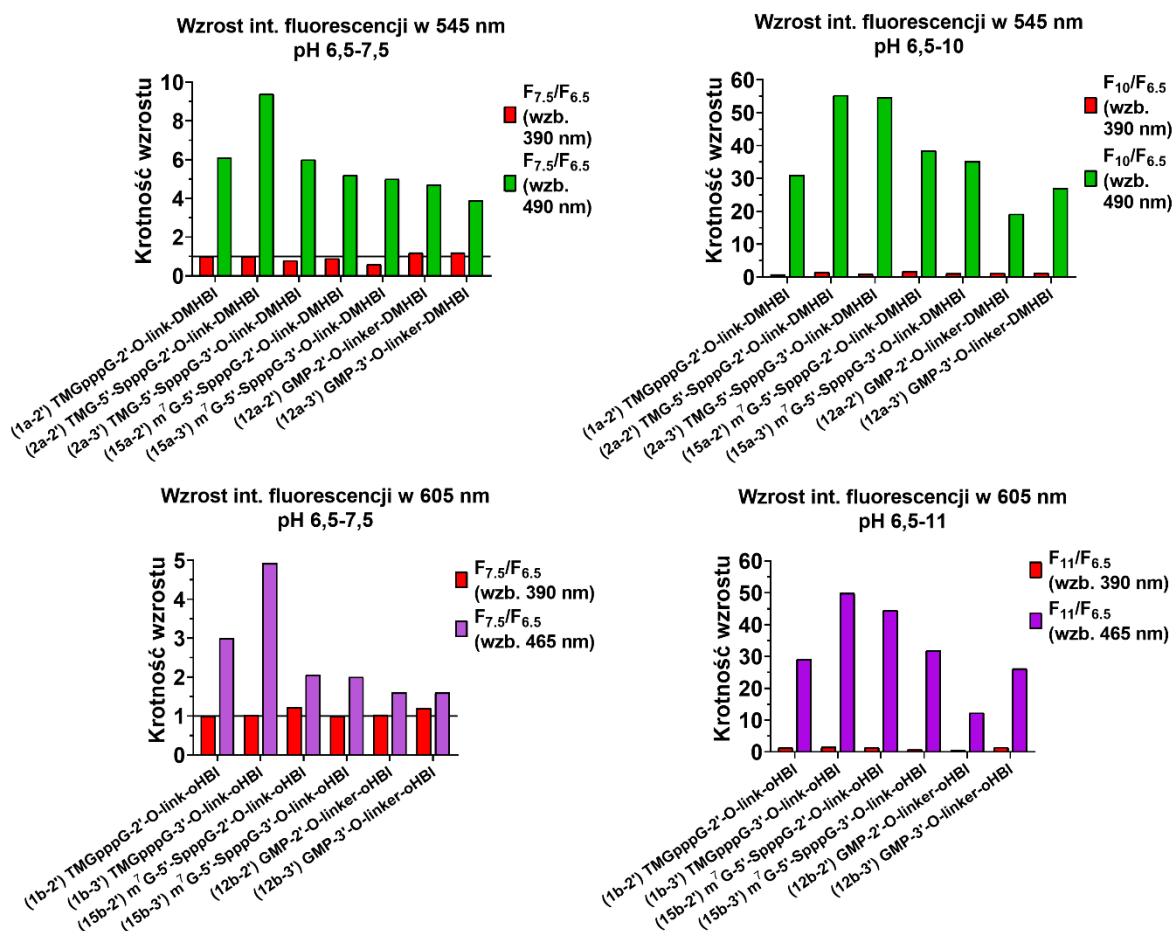
Zaobserwowałem dużą zgodność wyników, różnice są w granicach błędów pomiarowych. W przypadku związków z DMHBI izomery 2' wykazały mniejsze wartości pK_a , nawet o 0,3-0,7 jednostek w porównaniu do odpowiadających im izomerów 3'. Największe różnice zaobserwowałem między TMGpppG-2'-O-L1-DMHBI i jego 3' izomerem. Związki z o-HBI zachowują się odmiennie, tj. regioizomery posiadają zbliżone pK_a , co może tłumaczyć, dlaczego wykazują one takie same lub zbliżone odpowiedzi ze snurportyną (patrz rozdział II. 7). Niezależnie od badanego FMR, GMP mają niższe wartości pK_a niż związki z TMG kapem czy m⁷G kapem.

Porównując związki z kapem i bez (GMP) układają się one w szereg (wg malejących wartości pK_a):

TMG kapowane > m^7G kapowane > analogi GMP

Wykazałem, że obie metody wykorzystujące emisję znacznika dla dwóch długości fal wzbudzenia mogą służyć wyznaczaniu pK_a grupy fenolanowej.

Na uwagę zasługuje nie tylko przebieg krzywej w zależności od pH, ale też same zmiany intensywności fluorescencji, które są różne dla różnych struktur nukleotydowych. Obliczyłem krotności wzrostu intensywności fluorescencji i podzieliłem na dwa zakresy pH (rys. II. 38), biorąc cały zakres pH (prawo) lub zakres od 6,5 do 7,5 (lewo), co odpowiada w przybliżeniu zmianom w fizjologicznym pH.

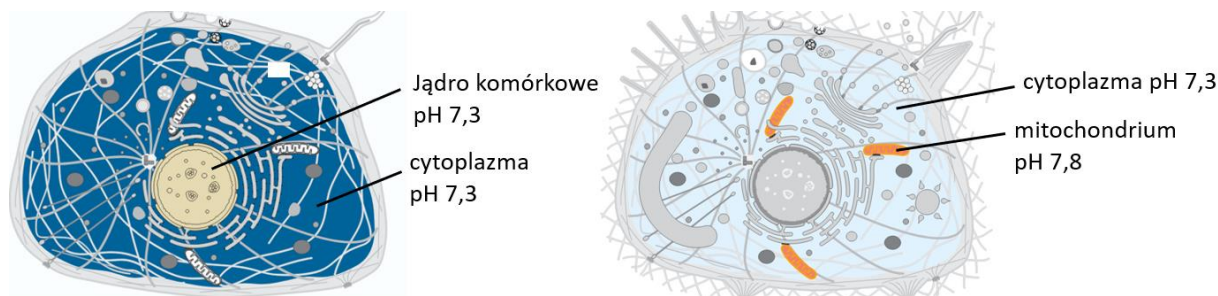


Rys. II. 39 Krotności wzmocnień dla badanych nukleotydowych koniugatów z FMR w różnych zakresach pH: 6,5-7,5 ; 6,5-10 oraz 6,5-11

Niezależnie od FMR i od zakresu pH emisja znacznika przy wzbudzeniu 390 nm nie ulega zmianom. Największe zmiany intensywności fluorescencji dla formy fenolanowej obserwujemy w maksimum jego wzbudzenia (490/465 nm) i ta metoda jest najczulsza. Okazuje się, że dla takich samych stężeń związków największy wzrost wykazały TMG kapowane sondy, potem w kolejności z m^7G kapem i GMP analogi.

Pojawia się pytanie czy takie pH-zależne fluorofory można rozpatrywać jako sondy molekularne białek w warunkach komórkowych. Odpowiadając na to pytanie, należy wiedzieć jakie

pH panuje w danych organellach komórkowych, czy jest stałe oraz która forma związku oddziałuje z białkiem (zjonizowana czy sprotonowana). Założyliśmy w projekcie, że chcemy obrazować procesy zachodzące w cytoplazmie i jądrze komórkowym, ściślej obserwować tworzenie kompleksu ze snurportyną i transport związku do jądra komórkowego. Zarówno w cytoplazmie jak i jądrze komórkowym pH wynosi 7,3 i jest stałe (rys. II. 39).



Rys. II. 40 Ilustracja organelli komórki zwierzęcej z zaznaczonymi pH panującymi w jądrze komórkowym, cytoplazmie i mitochondrium; https://www.swissbiopics.org/name/Animal_cell

Związki takie mogą służyć jako sondy molekularne w dowolnym pH o ile można rozróżnić formę związaną z białkiem i niezwiązaną, pamiętając o określeniu długości fali emisji w zależności od jonizacji FMR. Możliwie jak największe różnice w intensywnościach fluorescencji dają szansę na dokładne ilościowe określenie związanego białka. W przypadku białek oddziałujących z formą anionową, jak w przypadku snurportyny, im niższe pH, tym mniejsza szansa na zaobserwowanie odpowiedzi z białkami dla tych związków fenolowych (np. dla pH <5) związki te praktycznie nie występują w formie zjonizowanej i trudniej byłoby je badać.

II.6. Badanie powinowactwa ligandów do snurportyny oraz melf4E metodą miareczkowania z wygaszaniem fluorescencji tryptofanów (FQT) synchronizowanym w czasie

II.6.1 Kryteria akceptacji

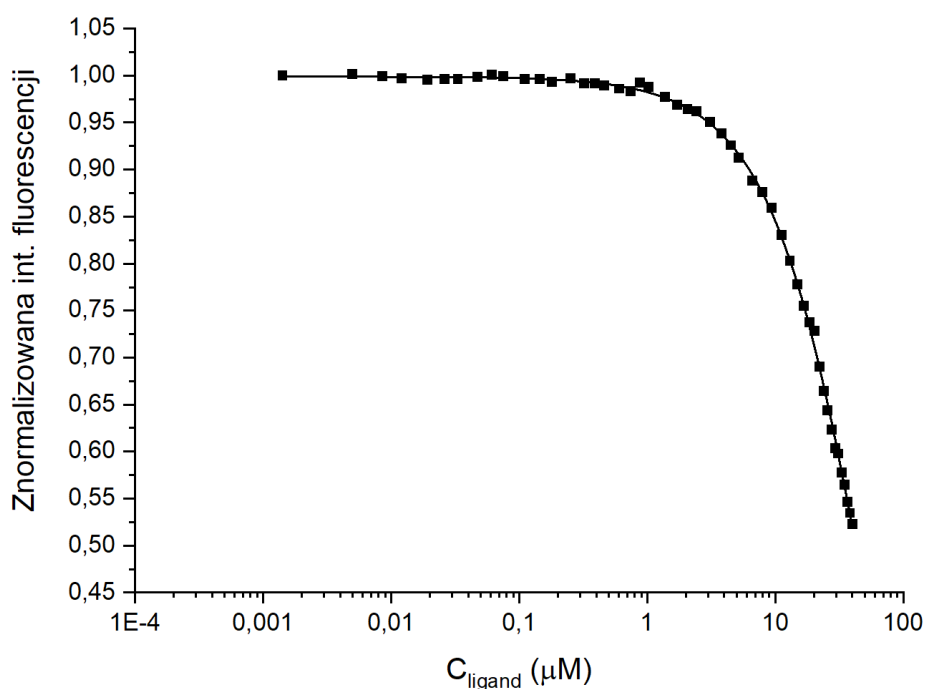
Do badań oddziaływania ligand-białko wykorzystałem dwie metody: miareczkowania z wygaszaniem fluorescencji tryptofanów synchronizowane w czasie (ang. FQT) oraz miareczkowania liganda białkiem (wysycanie białkiem). Przeprowadziłem wiele eksperymentów stąd musiałem przyjąć pewne kryteria akceptacji wyników. Na solidność metody składają się m.in. powtarzalność (zarówno co do próbki, analityka, dnia analizy) i dobroć dopasowania modelu. Przyjąłem pewne kryteria akceptacji takie jak stabilność białka (spadek int. fluorescencji nie większy niż 10% w przeciągu 15 minut), czystość ligandów >95%, $\chi^2 < 150$ dopasowanego modelu, powtarzalność na poziomie RSD < 10 % (odchylenie względne od średniej). Niespełnienie któregośkolwiek z kryteriów skutkowało odrzuceniem wyniku

II.6.2 Aspekty techniczne

II.6.2.1 Efekt filtra wewnętrznego

W przypadku niektórych związków będących słabymi ligandami nie udało mi się osiągnąć plateau i satysfakcjonującej krzywej ze względu na bardzo duże stężenia liganda i efekt filtra wewnętrznego. Efekt filtra wewnętrznego to efekt zmniejszanej intensywności fluorescencji

niewynikający z wiązania przez tryptofany, lecz ze zbyt stężonych roztworów ($\sim 100 \mu\text{M}$) dla których wiązka wzbudzenia jest osłabiana przez próbkę, w taki sposób, że tylko powierzchnia skierowana w stronę wiązki jest wzbudzana. Powoduje to, że intensywność fluorescencji cały czas spada, krzywa wydaje się niekompletna (rys. II. 40) a wyznaczone błędy pomiarowe są często takie jak sama wielkość mierzona. W takich przypadkach, jak ten niżej, odczytane stałe K_D traktowałem jako niedokładne wartości (bez błędów pom.) sugerujące słabą siłę wiązania, i podawałem jako większe niż, np. $K_D > 100,000 \text{ nM}$ (np. dla niektórych związków kontrolnych). Wynik choć jest niedokładny to jak najbardziej jest informatywny.



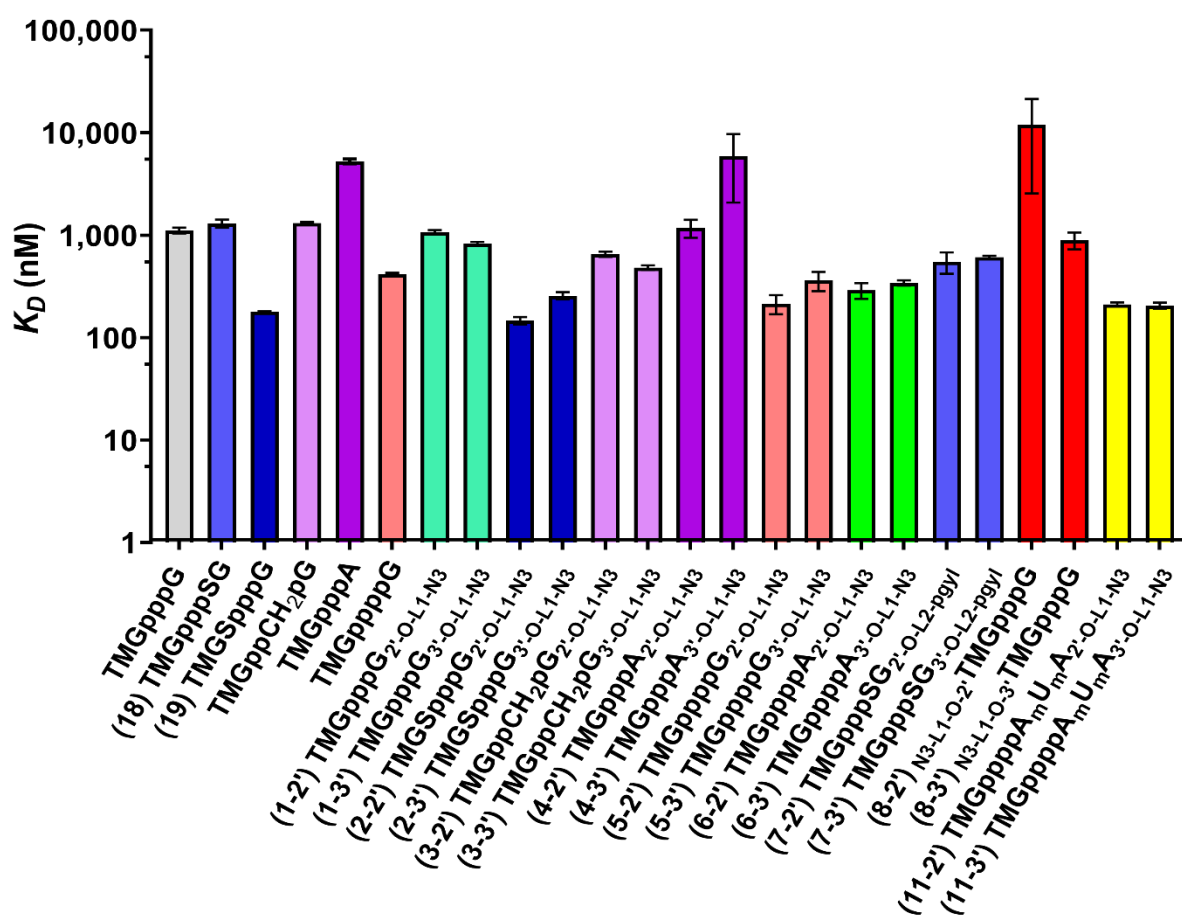
Rys. II. 41 Przykład krzywej miareczkowania i efektu filtra wewnętrznego dla $\text{GMP}^{3'\text{-O-L2-0-HBI}}$ (**12b-3'**)

II.6.2.2 Wady i zalety metody, FQT versus miareczkowanie z czytnikiem płytek

Metoda FQT jest bardzo dokładną metodą, w każdym pomiarze rejestrowałem pomiędzy 35 a 45 punktów pom. z różnych stężeń. RSD nie przekraczało 10% nawet w pomiarach odległych o miesiące. Metoda ta jest czuła, umożliwia wyznaczenie stałych K_D rzędu pikomolowego (pM). Miareczkowanie synchronizowane w czasie umożliwia zebranie znacznej liczby punktów pomiarowych (>30) z bardzo różnego zakresu stężeń liganda oraz reakcję analityka w stosunku do wielkości spadków intensywności fluorescencji w czasie rzeczywistym. Mimo to, FQT jest stosunkowo wolną metodą analityczną. Pomiar jednego związku trwa ~ 60 minut, a wynik końcowy jest uśredniany z 3-7 pomiarów, dlatego wysoce pożądane byłoby opracowanie krótszej i wysokoprzepustowej metody analitycznej. Należy tu jednak zaznaczyć, że metoda płytki wielodołkowej w czytniku fluorescencji jest nieprzystosowana do tego typu pomiarów, po prostu nie obserwuję odpowiedniego wygaszania fluorescencji. Może być za to przydatna jako metoda skринingowa w miareczkowaniach różnych ligandów z FMR białkiem, gdzie monitorujemy emisję od FMR, natomiast dokładność wyniku będzie mniejsza niż przy FQT i uzależniona głównie od liczby zebranych punktów pomiarowych. Metoda FQT ma też swoje ograniczenia, m. in. efekt filtra wewnętrznego nie pozwala na dokładne wyznaczenie stałej asocjacji/ dysocjacji dla słabych ligandów.

II.6.3 Charakterystyka oddziaływania analogów TMG kapu nie-zawierających FMR ze snurportyną

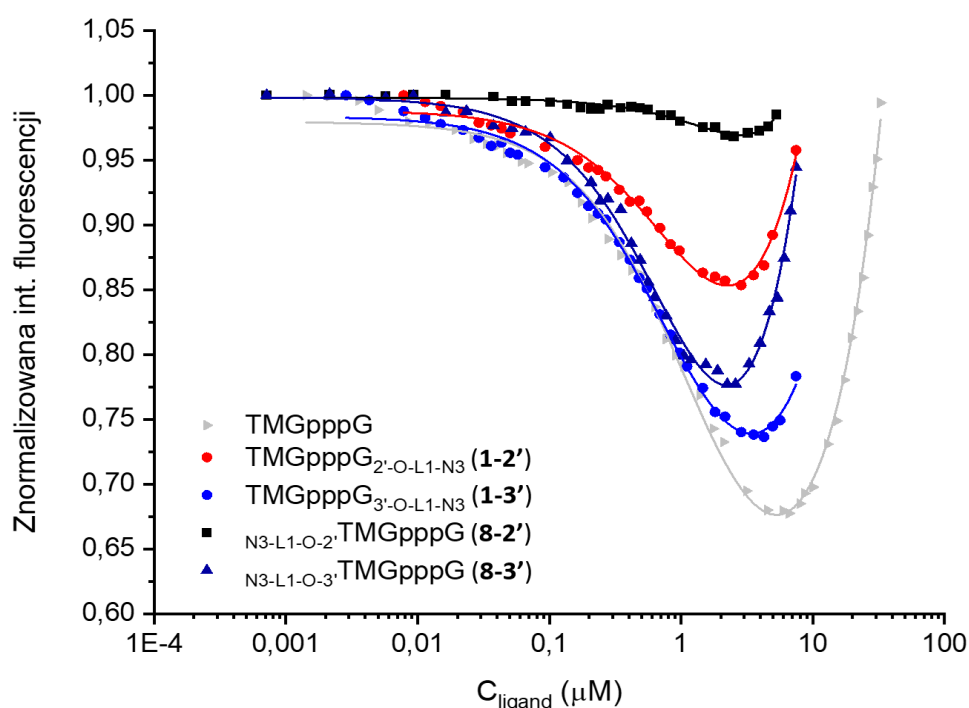
Przeprowadziłem miareczkowania z wygaszaniem fluorescencji tryptofanów synchronizowane w czasie (ang. FQT) dla różnych analogów TMG kapu bez i z ugrupowaniem azydkowym lub propargilowym. Eksperymenty te umożliwiają wyznaczenie stałych dysocjacji (K_D , rys. II. 41) kompleksów ligand-snurportyna w oparciu o krzywe miareczkowania wynikające z wewnętrznego wygaszania emisji fluorescencji białka po związaniu ligandu w kieszeni wiążącej. Badania rozpocząłem od określenia powinowactwa znanych związków, takich jak TMGpppG czy TMGpppA i uzyskałem wyniki zgodne z danymi lit (rozdz. I.2.2), następnie przeprowadziłem eksperymenty na 2 modyfikowanych siarką w pozycjach 5' (TMGuo/Guo) dinukleotydach bez linkera i 18 różnych dinukleotydach z linkerem (rys. II. 41).



Rys. II. 42 Stałe dysocjacji (K_D) dla kompleksów snurportyny i różnych di- i tetranukleotydowych analogów TMG kapu bez oraz z ugrupowaniem azydkowym lub propargilowym

Na podstawie tych eksperymentów można wysnuć kilka interesujących wniosków. Po pierwsze, analizując powinowactwo związków niosących klikalne linkery w różnych pozycjach, wprowadzenie linkera w układ rybozy drugiego nukleotydu TMG kapu nie zakłóca interakcji ze snurportyną. Wśród analogów funkcjonalizowanych w obrębie rybozy G lub A, wszystkie miały powinowactwo porównywalne lub wyższe (niższe K_D), niż niemodyfikowany TMGpppG/A. W tej serii związków analogi **2-2'** ($K_D=148$ nM), **5-2'** ($K_D=154$ nM) i **6-2'** ($K_D=155$ nM) mają najwyższe powinowactwo do snurportyny, które jest nawet 7,5x wyższe w porównaniu z TMGpppG/A.

Co ciekawe, odpowiadające im izomery 3' wykazują powinowactwo porównywalne do TMGpppG. Wpływ modyfikacji w mostku fosforanowym nie był znaczący, chociaż warto zauważyć, że wydłużenie trifosforanu do tetrafosforanu (**5**, **6**) czy wprowadzenie siarki do pozycji 5' trimetyloguanozyny (**2**) nieznacznie zwiększyło powinowactwo. Wpływ zasady azotowej drugiego nukleotydu na powinowactwo jest zgodny z wcześniejszymi obserwacjami dla związków kontrolnych, tj. analogi guanozyny oddziałują z większym powinowactwem niż analogi adenozyne. Z drugiej jednak strony wykazałem, że tetrafosforanowe analogi guanozyny i adenozyne wiążą się równie silnie oraz brak jest istotnych różnic między parami regioizomerów 2' i 3', co sugeruje, że fragment tetrafosforanowy może globalnie wpływać na rozpoznawanie analogu TMG kapu przez snurportynę. W przeciwieństwie do związków modyfikowanych na rybozie drugiego nukleotydu w strukturze TMGpppN, dla związków z linkerem na zasadzie (pozycja N1, **9**) lub w obrębie fragmentu trimetyloguanozyny (pozycja 2'-O; **8-2'**), nie zaobserwowałem praktycznie żadnego wiązania z białkiem, podczas gdy związek **8-3'**, który posiada linker na pozycji 3'-O-trimetyloguanozyny, wiąże się ze snurportyną z powinowactwem porównywalnym do TMGpppG. Podejrzewam, że słabsze wiązanie **8-2'** ($K_D > 10,000$ nM) jest efektem zawady sterycznej blisko grup N2-metylowych trimetyloguanozyny, które są ważne do rozpoznania przez snurportynę (roz. I.2.2). Dodatkowo małe spadki intensywności fluorescencji w eksperymencie powodują trudności w dopasowaniu dobrej krzywej (rys. II. 42, czarny) i skutkują brakiem powtarzalności wyników. Brak wiązania związku **9** najprawdopodobniej wynika z faktu, że w natywnym kompleksie (PDB 1XK5) atom azotu N1 tworzy wiązanie wodorowe z Ser105 oraz jest ściśle otoczone innymi aminokwasami, więc wprowadzenie tam modyfikacji może wymagać znacznego przegrupowania zasady azotowej do wiązania.



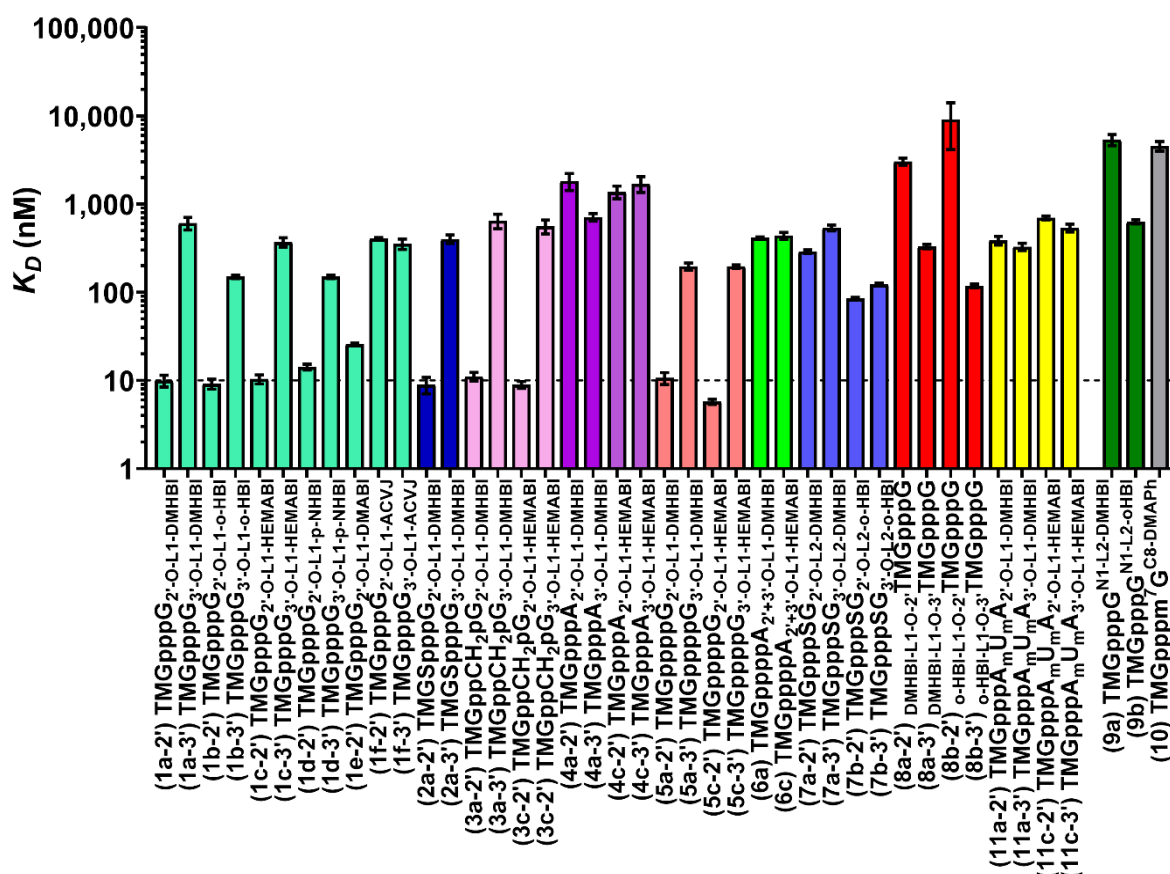
Rys. II. 43 Przykładowe krzywe miareczkowań dla TMG kapów z linkerem od strony Guo lub TMGuo

Zamiana atomu tlenu na siarkę w poz. 5' od strony trimetyloguanozyny zwiększa powinowactwo 6-krotnie i jest najmniejszą modyfikacją mającą tak znaczący wpływ dla snurportyny. Odpowiadające analogi siarkowe z linkerami (**2**) wiążą się do 8x silniej niż standard TMGpppG a 2' izomer jest nieznacznie uprzywilejowany. Analogi tetranukleotydowe z modyfikowaną

linkerem adenozyną (**11**) wykazał takie samo powinowactwo co analog bez linkera¹⁴⁹. Te rezultaty dały mi podstawy do dalszych modyfikacji nukleotydów znacznikami FMR i badań ich oddziaływań ze snurportyną.

II.6.4 Charakterystyka oddziaływania nukleotydowych koniugatów z TMG kapem i FMR ze snurportyną

W ten sam sposób przeprowadziłem miareczkowania dla różnych TMG kapowanych koniugatów zawierających znacznik FMR. Wyniki przedstawiłem na rys. II. 43. Przetestowałem koniugaty analogu TMGpppG (**1**) z sześcioma różnymi FMR: DMHBI (**a**), o-HBI (**b**), HEMABI (**c**), *p*-NHBI (**d**), DMABI (**e**), ACVJ (**f**). Zbadałem następujące pozycje modyfikacji: N1–guaniny, 2'-O i 3'-O-guanozyny lub adenozyiny oraz 2'-O i 3'-O-trimetyloguanozyny. Związki powiązałem kolorystycznie ze strukturami wyjściowymi z linkerami (rys. II. 41), aby móc łatwiej ocenić wpływ FMR na powinowactwo do snurportyny.



Rys. II. 44 Stałe dysocjacji (K_D) dla kompleksów snurportyny i różnych di- i tetranukleotydowych koniugatów z TMG kapem i FMR

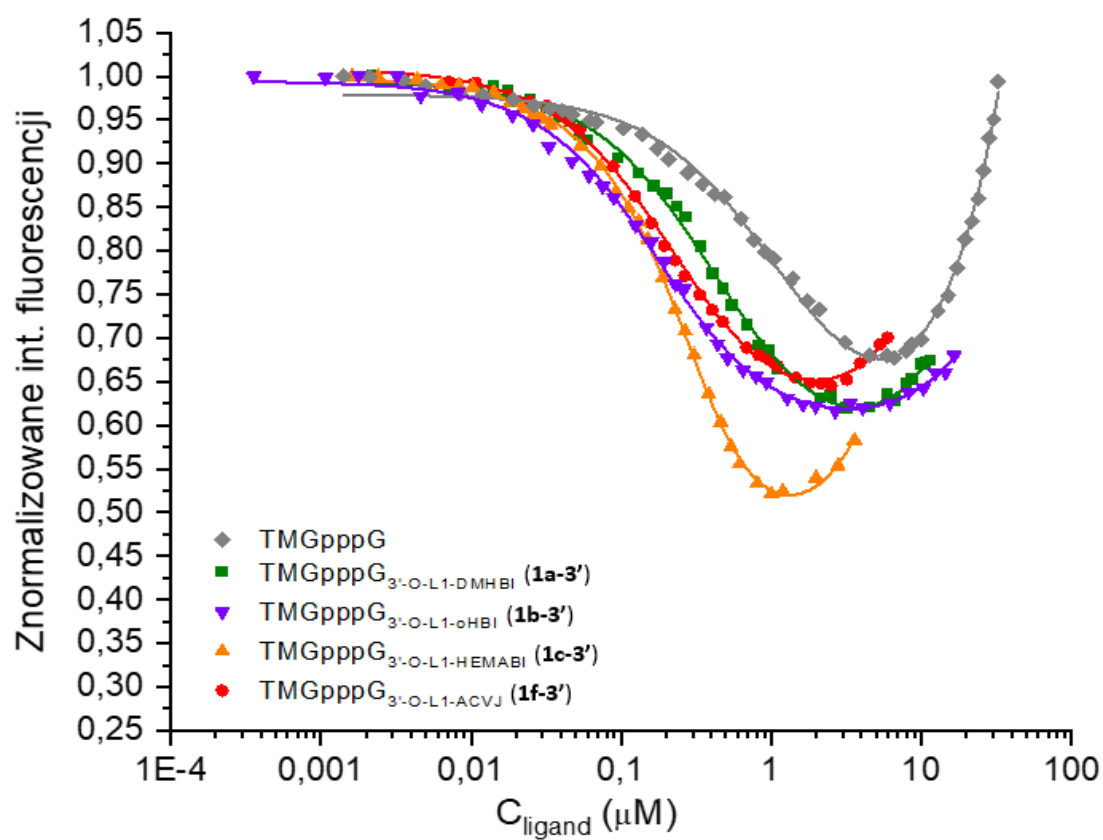
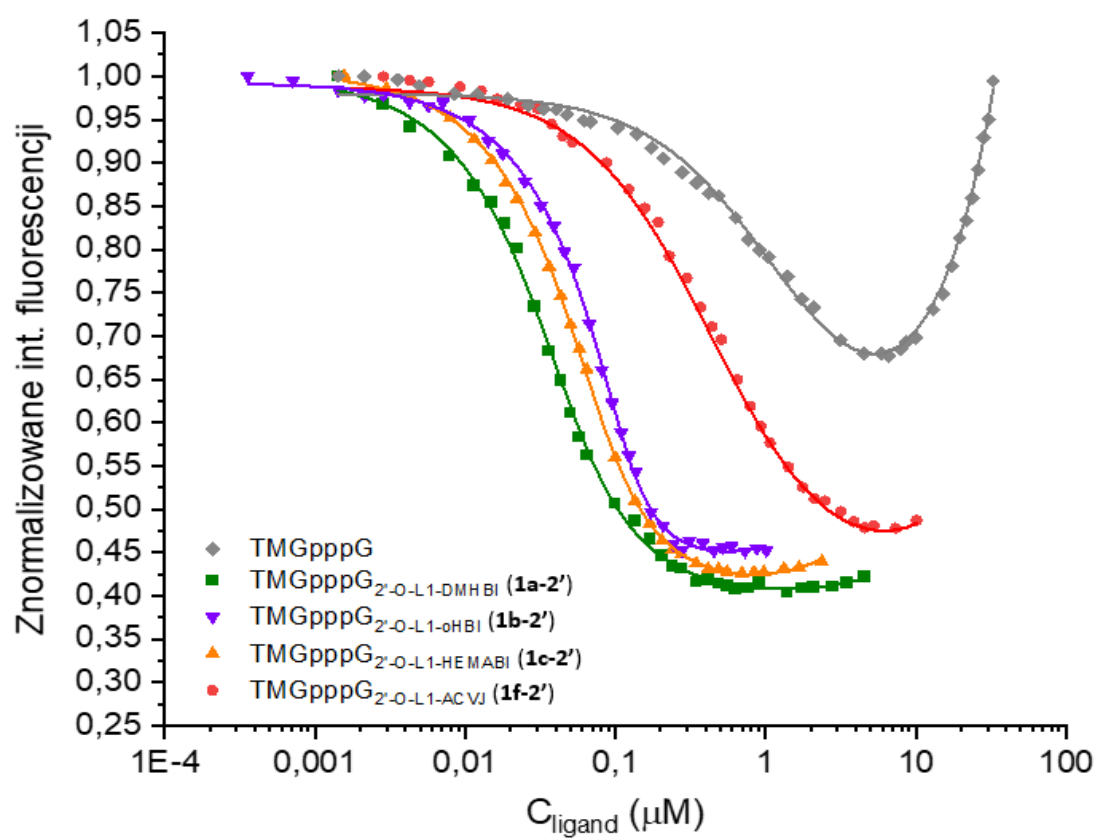
Zaobserwowałem zwiększone powinowactwo, gdy GFP-podobne FMR zostały przyłączone w pozycji 2'-O-guanozyny (**1–3–2'** oraz **5–2'**). Takie analogi TMG kapu wiążą się ze snurportyną z nieznanym dotąd w literaturze powinowactwem – są 100 razy silniejszymi niż ligandami snurportyny niż TMGpppG i 50 razy silniejszymi niż odpowiadające im izomery 3' (tab. 10). Zbadane stałe dysocjacji dla tych związków i snurportyny są rzędu 10 nM. To silne wiązanie występuje tylko dla analogów fluoroforu GFP, a dla analogów julolidyny (**f**), chociaż powinowactwo okazało się większe niż dla TMGpppG to jest 50 razy słabsze niż dla

pozostałych FMR. Ponadto rodzaj i miejsce położenia grupy funkcyjnej w GFP-podobnych znacznikach **a-e** wydaje się nie mieć wpływu lub posiadać niewielki wpływ na powinowactwo do snurportyny. Wyższe K_D dla analogu **1e-2'** (DMABI) jest związane z obecnością zanieczyszczenia 3' izomerem (związek izomeryzuje). W przypadku kapów z modyfikowaną adenozyną (**4a,c**) z tymi samymi FMR nie obserwowałem wspomnianego efektu zwiększonego powinowactwa. Prawdopodobnie adenozyzna uniemożliwia przyjęcie pewnego ułożenia w kieszeni wiążącej snurportyny. Gdy znacznik FMR znajduje się od strony trimetyloguanozyny (**8a,b**) zaobserwowałem zmniejszone powinowactwo (wyższe K_D) dla izomeru 2', z kolei dla izomeru 3' oddziaływanie jest podobne jak dla niemodyfikowanego TMGpppG. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi dla analogów azydkowych TMG(-O-linker-N₃)pppG (**8**).

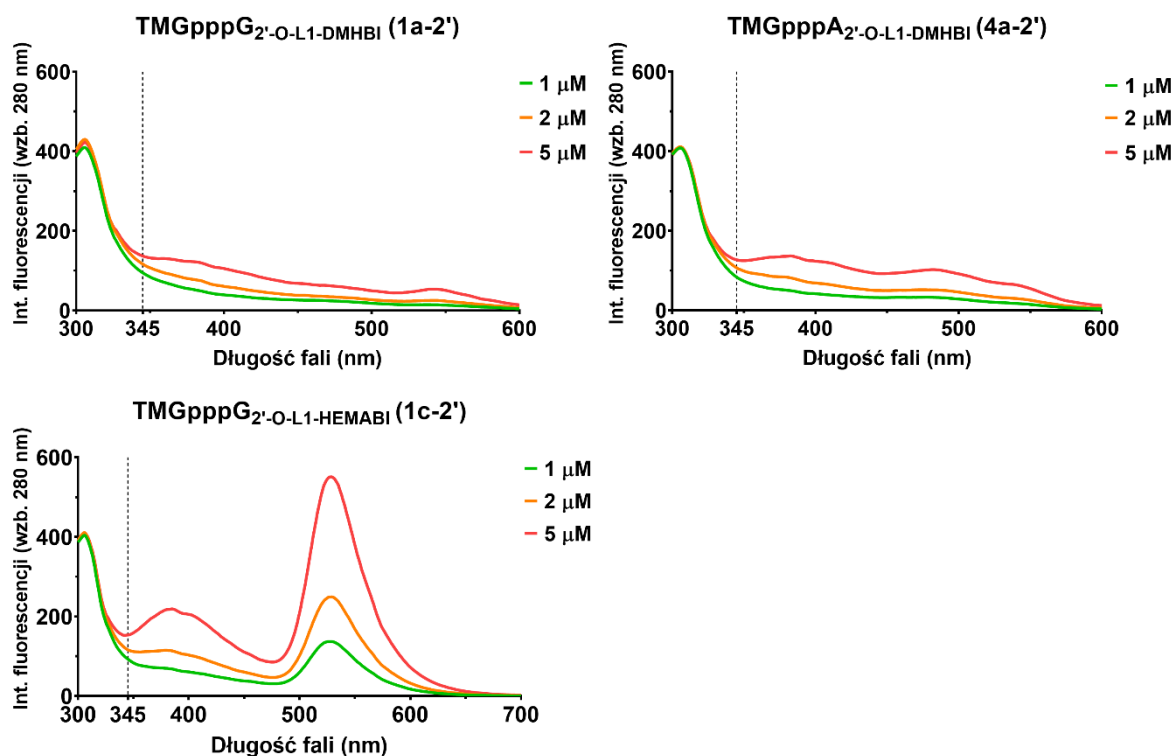
Modyfikacje w obszarze mostka fosforanowego w postaci grupy metylenowej (**3a,c**) lub funkcji 5'-O-tioestrowej (**2a,c**) nie zmieniają powinowactwa do snurportyny. Jest to w pewnym kontraście z wynikami dla linkerów, gdzie modyfikacje te nieznacznie zwiększały powinowactwo, dlatego wnioskuję, że efekt stabilizujący uzyskany z wprowadzenia znaczników FMR znacznie przewyższył ten z modyfikacji w obszarze mostka fosforanowego. Analogi tetrafosforanowe z guanozyną (**5a,c**) wykazały tak samo silne wiązanie lub nawet nieznacznie lepsze niż trifosforanowe z tymi samymi znacznikami. Podobnie analogi tetrafosforanowe z adenozyną (**6a,c**) w porównaniu do trifosforanowych z adenozyną okazały się lepsze. Przyłączenie FMR poprzez linker triazol-1owy (L2, niebieski) w **7a** i **7b-2'** znacząco zmniejsza ten korzystny efekt (odpowiednio 30- i 12-krotnie mniejsze powinowactwo niż dla **1a-2'** i **1b-2'** z linkerem L1, czerwony). Tetranukleotydowe koniugaty z FMR na adenozyne (4-ta pozycja w sekwencji) (**11a,c**) są jedynym przykładem dla których wprowadzenie FMR spowodowało pogorszenie oddziaływania ze snurportyną. Koniugaty wykazały 2-3 wyższe K_D niż związki z linkerami i grupą azydkową. Najsilniejszym ligandem snurportyny okazał się tetrafosforanowy analog z HEMABI w pozycji 2'-O-guanozyny (**5c-2'**) ($K_D = 5$ nM, tab. 10)

Zbadałem trzy analogi modyfikowane na zasadzie azotowej. Związki modyfikowane FMR w pozycji N1-guaniny (**9a,b**) oddziałują ze snurportyną z podobnym lub gorszym powinowactwem jak TMGpppG, pomimo że związek bez FMR i z propargilem (**9**) w tej samej pozycji nie oddziałuje ze snurportyną. Związek zawierający podstawnik DMAPh w pozycji C8 m⁷guaniny (**10**) oddziałuje słabiej niż TMGpppG, sugerując destabilizację.

Na rys. II. 44 zobrazowałem jak różne regioizomery wiążą się ze snurportyną w miareczkowaniach FQT. W tym miejscu zaznaczę, dlaczego krzywe miareczkowań, przynajmniej dla izomerów 2', nie rosną po przekroczeniu punktu końcowego miareczkowania, kiedy obserwuję emisję wolnego liganda. Wykonałem widma emisji różnych koniugatów znakowanych w pozycji 2'-O- z DMHBI lub HEMABI w stężeniach 1-5 μ M w buf. HEPES pH 7,2 i wzbudzałem je długością fali 280 nm (rys. II. 45). Okazuje się, że związki te posiadają inne właściwości spektralne niż TMGpppG, a przyrost int. fluorescencji 345 nm od wolnego liganda w tej metodzie nie jest tak znaczący dla tych w przypadku niemodyfikowanych koniugatów TMGpppG. Dla nieznakowanych analogów z m⁷guanozyną, emisja 345 nm znajduje się blisko emisji 370 nm od TMGuo, jednak ta w koniugatach jest mniejsza. Związane to jest z tym, że część energii jest absorbowana również przez znacznik FMR. Największy przyrost int. fluorescencji przy długości 345 nm wykazują koniugaty z HEMABI oraz z ACVJ, co również widać na krzywych miareczkowań FQT. Dla tych z DMHBI i o-HBI, nawet duże (100x) nadmiary wolnych kapów (~10 μ M) nie powodowały istotnego wzrostu intensywności.

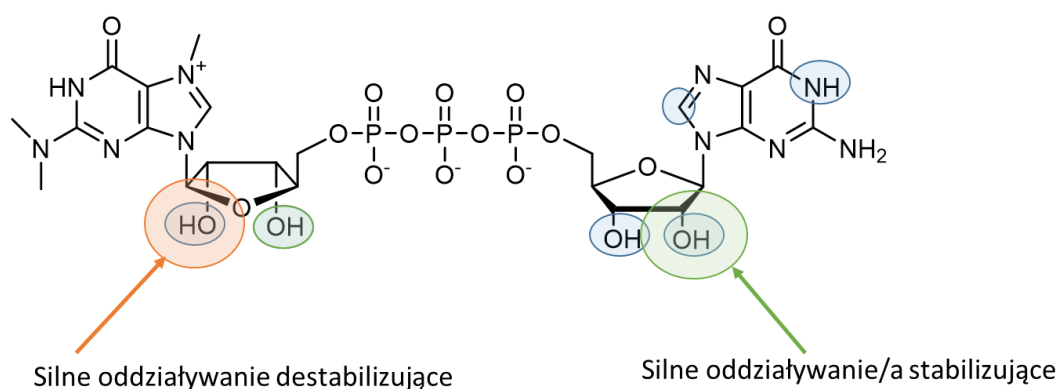


Rys. II. 45 Przykładowe krzywe miareczkowań FQT dla kompleksów snurportyny i 2'-O- i 3'-O- podstawionych różnymi FMR koniugatów TMGpppG



Rys. II. 46 Porównanie widm emisji różnych TMG kapowanych koniugatów z FMR dla różnych stężeń wzbudzanych długością 280 nm (jak w metodzie FQT)

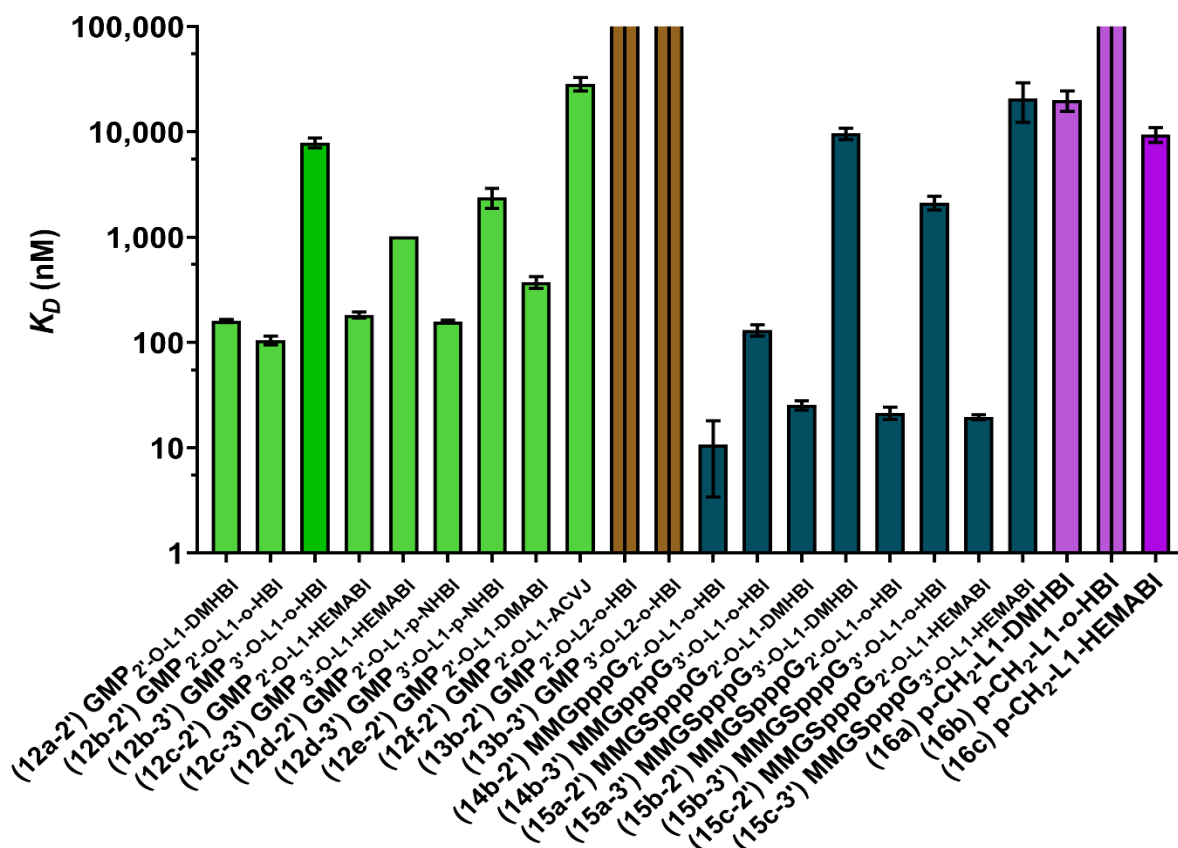
Na podstawie badań FQT udało mi się ustalić, które miejsca modyfikacji w postaci FMR są dobrze tolerowane przez snurportynę (rys. II. 46, niebieski), które destabilizują kompleks (czerwone), a które silnie go stabilizują (zielony). Modyfikacje w obszarze zasady azotowej guanozyny (C8, N1) obniżają powinowactwo do snurportyny. Modyfikacje w obszarze rybozy dały różnorodne ligandy od bardzo silnych (2'-O-Guo-podstawione) po bardzo słabe (2'-O-TMGuo-podstawione). Pozycja 3'-O-TMGuo okazała się być nieznacznie stabilizująca. Należy tu zaznaczyć, że nie tylko miejsce modyfikacji ma znaczenie, ale też jej rodzaj, tj. silny efekt stabilizujący uzyskałem jedynie w przypadku GFP-podobnych FMR (**a-e**). Powinowactwa porównywałem względem związków TMGpppG lub TMGpppA.



Rys. II. 47 Wpływ miejsca modyfikacji FMR w TMGpppG na powinowactwo do snurportyny

II.6.5 Charakterystyka oddziaływania nukleotydowych koniugatów i FMR niezawierających TMG kapu ze snurportyną

Efekt zwiększonego powinowactwa 2' izomerów z GFP-podobnymi FMR zainteresował nas na tyle, że postanowiliśmy zbadać najprostsze analogi nukleotydowe z FMR w postaci koniugatów FMR i monofosforanu guanozyny. Wyzaczyłem stałe dysocjacji kompleksów snurportyny i różnych nukleotydowych i nienukleotydowych koniugatów FMR niezawierających TMG kapu (rys. II. 49).

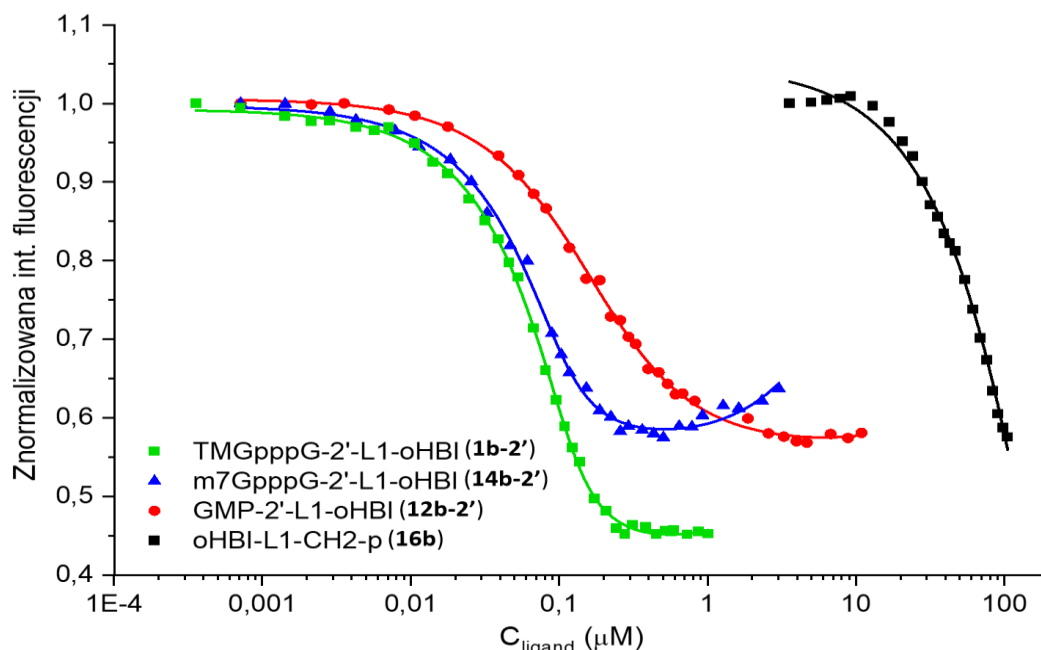


Rys. II. 48 Stałe dysocjacji (K_D) dla kompleksów snurportyny i różnych koniugatów z FMR niezawierających TMG kapu, na = nieaplikowalne, bd = brak danych

2'-O-podstawione analogami fluoroforu GFP monofosforany guanozyny (GMP) wykazały 6- do 10-krotnie silniejsze powinowactwo od TMGpppG. Snurportyna nie wiąże naturalnie GMP, jednak wprowadzenie znacznika FMR zmienia specyficzność substratową. W przypadku analogu z ACVJ, wiązanie to było słabsze, co jest zgodne z wynikami dla TMG kapowanych koniugatów, ale nadal bliskie TMGpppG. GMP z tym samym FMR, ale zmienionym linkerem prawie nie oddziaływały ze snurportyną a efekt filtra wewnętrznego uniemożliwił dokładne wyznaczenie stałych dysocjacji. Mimo to, mogę wnioskować, że zmiana typu linkera jest ważna dla rozpoznania przez snurportynę i wpływa na oddziaływanie. Analogi m⁷G kapu z GFP-podobnymi FMR w pozycji 2'-O-guanozyny okazały się silnymi ligandami ze stałymi dysocjacji jedynie ok. 2-krotnie większymi od TMG kapowanych analogów (tab. 10)

Aby wykluczyć niespecyficzne oddziaływania FMR i snurportyny zbadałem również nienukleotydowe koniugaty FMR zawierające triazol i grupę fosforanową. Jak wcześniej

pokazałem, związki takie rozpuszczają się w buforach wodnych i wykazują charakterystyczną dla nich emisję znacznika. Dla niektórych znaczników zaobserwowałem słabe wiązanie ze snurportyną z siłą podobną do izomerów 3' analogów GMP i m⁷G kapu, chociaż dla o-HBI ponownie nie mogłem w dokładny sposób wyznaczyć stałej (niedomiareczkowana krzywa i efekt filtra wewnętrznego, rys. II. 50). GMP modyfikowane w pozycji 3' nie wykazują preferencyjnego wiązania w stosunku do samych znaczników, co pozwala mi wnioskować, że sama struktura nukleotydu nie ma znaczenia do momentu wprowadzenia znacznika w pozycję 2'-O rybozy, a konkretniej guanozyny. Dopiero takie połączenie zapewnia dodatkowe oddziaływanie ze snurportyną.



Rys. II. 49 Przykładowe krzywe miareczkowań FQT dla kompleksów snurportyny i różnych nukleotydowych i nienukleotydowych koniugatów z o-HBI

Zestawiając te wyniki dla koniugatów FMR bez TMG kapu i z TMG kapem (tab. 8) uzyskałem kilka wniosków:

- GMP modyfikowane o-HBI w pozycji 2' i z linkerem typu -CH₂-1-triazol-CH₂CH₂- (**13a-2'**) wiążą się bardzo słabo ze snurportyną i wiązanie to nie ma znaczenia biologicznego
- TMG kapowane dinukleotydy z tymi samymi FMR i tym samym linkerem wykazują 10-krotnie większe wartości K_D od tych z linkerem typu -CH₂CH₂-4-triazol-CH₂- niezależnie od badanego izomeru, co oznacza tyle, że zmiana linkera spowodowała utratę oddziaływania ze snurportyną, które różnicowało izomery
- Zwiększone powinowactwo do snurportyny jest wynikiem synergicznym co najmniej dwóch oddziaływań stabilizujących. Jedno z nich jest znanym w literaturze oddziaływaniem nakładania (ang. stacking) trimetyloguanozyny z resztami Trp107 i Trp276. Mimo, że zmiana linkera zmniejsza powinowactwo do snurportyny, to nadal jest ono większe niż dla niemodyfikowanego TMGpppG, sugerując zachowane inne oddziaływanie stabilizujące
- Oddziaływanie dla 2'-podstawionych koniugatów z GFP-podobnymi FMR ma pierwszeństwo/ większy wpływ (jest bardziej uprzywilejowane) w stosunku do struktury

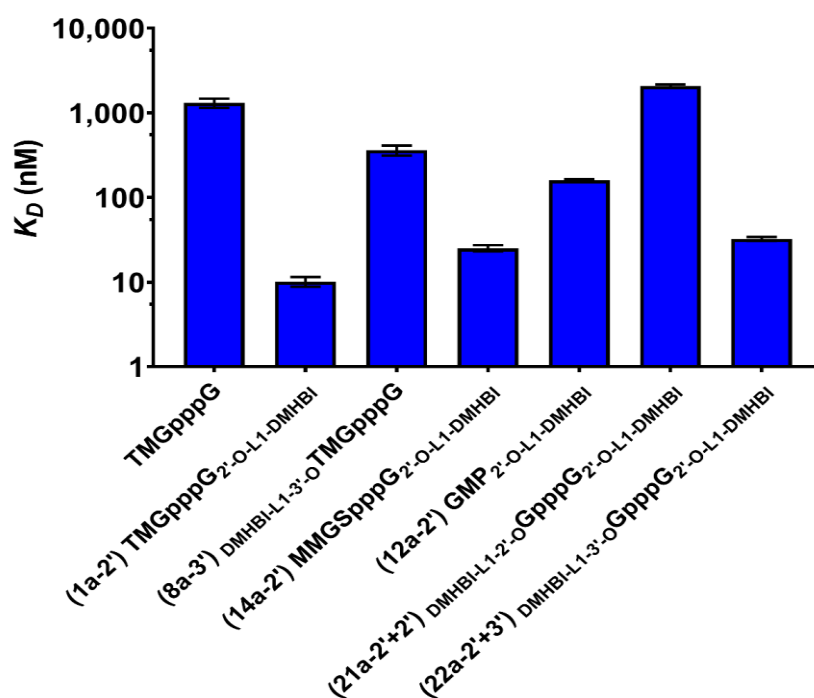
TMG kapu (niemodyfikowany TMGpppG), która do tej pory była jedynym znanym motywem nukleotydowym wiązany przez snurportynę

- Wiązanie dla modyfikowanych GMP-2'-O- jest słabsze o 1 rząd wielkości od tych z TMG kapem i tym samym FMR (tab. 6)

Tabela 6 Porównanie stałych dysocjacji dla kompleksów snurportyny i koniugatów z o-HBI z dwoma różnymi typami linkerów

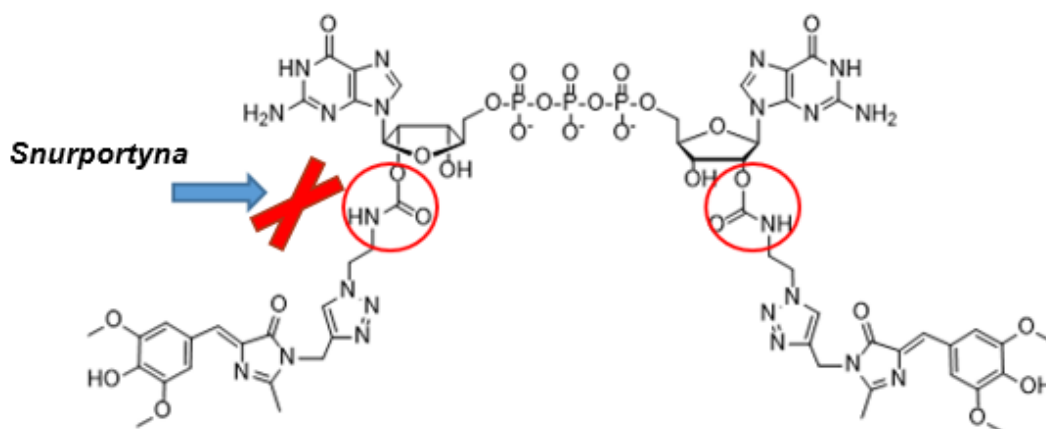
Związek	K _D (nM)
GMP_{2'-O-L1-o-HBI} (12b-2')	105,0 ± 10,04
GMP_{3'-O-L1-o-HBI} (12b-3')	7874 ± 868
GMP_{2'-O-L2-o-HBI} (13b-2')	>10000
GMP_{3'-O-L2-o-HBI} (13b-3')	>10000
TMGpppSG_{2'-O-L2-o-HBI} (7b-2')	84,88 ± 7,35
TMGpppSG_{2'-O-L2-o-HBI} (7b-3')	121,20 ± 4,60
TMGpppG_{2'-O-L1-o-HBI} (1b-2')	9,2 ± 1,2
TMGpppG_{3'-O-L1-o-HBI} (1b-3')	149,3 ± 6,5

Postanowiłem poszerzyć dalej badania o analogi podwójnie podstawione FMR. Podejrzałem, że podstawienie w pozycjach 2'-Guo i 3'-TMGuo może przynieść dodatkową korzyść, jednak synteza takiego analogu TMGpppG jest wyzwaniem ze względu na możliwość izomeryzacji i występowanie konfiguracji aż 4 izomerów eluujących bardzo blisko siebie. Wiedząc, że struktura TMGuo nie jest konieczna do silniejszego powinowactwa, zsyntezowałem i przebadalem ze snurportyną dwa analogi GpppG posiadające dwa znaczniki DMHBI w swojej strukturze. Analog GpppG posiada dwie zalety: a) jest łatwiejszy w syntezie (łatwo dostępne reagenty, wydajna reakcji sprzęgania), b) jest symetryczny, zatem mam do czynienia z trzema możliwościami podstawienia: izomer 2'+2', 3+3' lub 2'+3', przy czym człon 2'+3' będzie w tym przypadku jednoznacznie definiować strukturę i oznacza podstawienie obu guanozyn w związku. Wyniki miareczkowań FQT przedstawia rys. II. 51



Rys. II. 50 Porównanie stałych dysocjacji różnie mono- i di-podstawionych koniugatów z DMHBI

Okazuje się, że konfiguracja 2'+3' podstawienia FMR co najmniej nie destabilizuje oddziaływania ze snurportyną. Wiąże się tak samo silnie jak monopodstawiony analog MMG-5'-SpppG **14a-2'**. Porównując wyniki dla GMP-2'-O-DMHBI (**12a-2'**) oraz GpppG-2'+2' z dwoma znacznikami DMHBI widać, wyraźnie, że efekt destabilizujący podstawienia pozycji 2'-O-Guo jest dominujący a efekt stabilizujący podstawienia drugiego nukleotydu w tej samej pozycji 2'-O-Guo nie był w stanie go zrekompensować (rys. II. 52). Analog GpppG z DMHBI izomer 2'+2' (**22a-2'+2'**) wiąże się z 5x niższą siłą niż **12a-2'**.



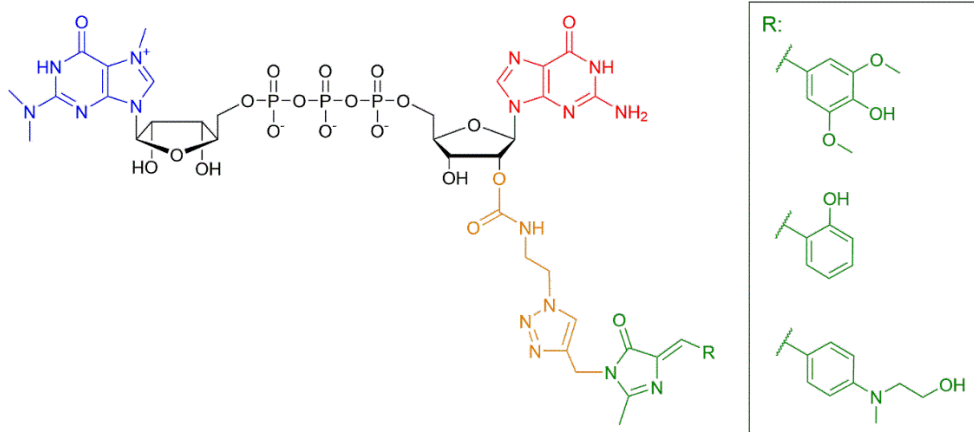
Rys. II. 51 Efekt destabilizujący podstawienia przeważa nad efektem stabilizującym w koniugacie GpppG z dwoma znacznikami DMHBI w konfiguracji 2'+2' (**22a-2'+2'**)

II.6.6 Badania zależności struktura-aktywność

II.6.6.1 Metoda miareczkowania FQT w badaniach zależności struktura-aktywność ligandów

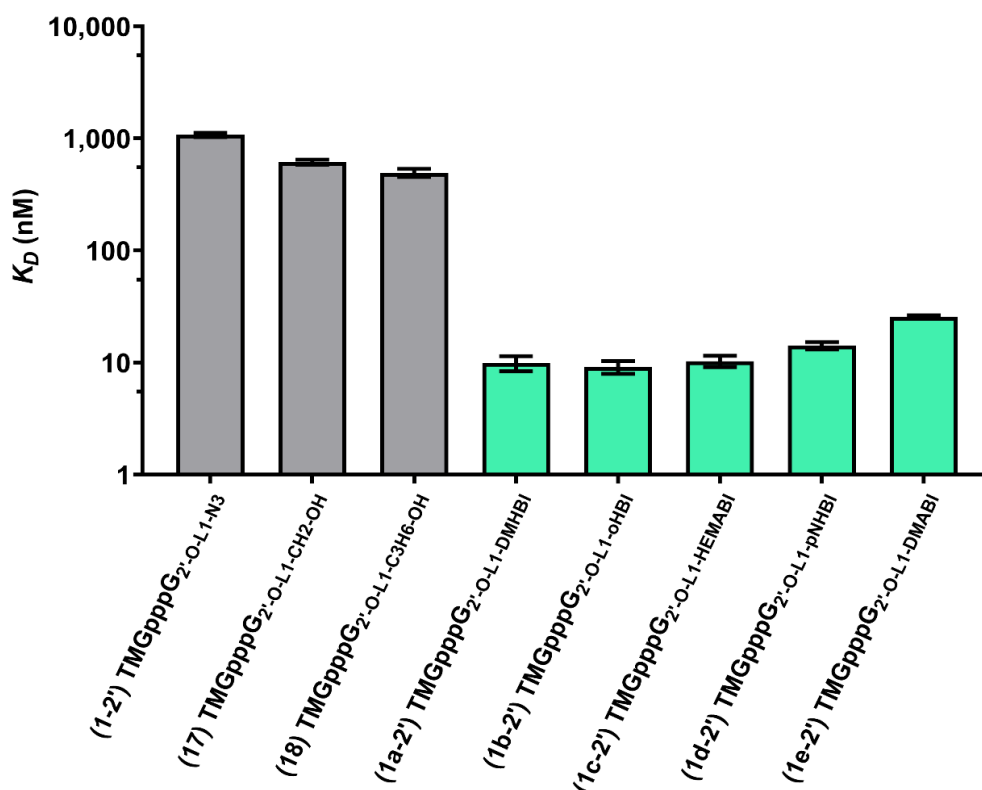
Badając oddziaływania białko-ligand dla kolejnych ligandów różniących się strukturalnie, postanowiłem określić, które motywy strukturalne czy też grupy funkcyjne są ważne dla oddziaływania ze snurportyną. Nie jest to badanie aktywności białka *per se*, jako że snurportyna nie jest enzymem, lecz określenie zależności strukturalnych silnych ligandów tego białka może być ważne w skryningu potencjalnych inhibitorów procesu transportu związanego ze snurportyną, w taki sam sposób jak powstały selektywne inhibitory eksportyn. Miareczkowanie FQT jest do tego celu bardzo przydatną metodą, ponieważ jest a) czułą metodą (K_D rzędu nanomolowego, gdzie wiele innych alternatywnych metod jest mniej czułych i nie-możliwe jest wyznaczenie tak niskich stałych), b) solidną (dobra powtarzalność i dokładność w stosunku do metod komplementarnych (np. Powierzchniowy Rezonans Plazmonowy (SPR)), c) niewymagającą w stosunku do ilości i przygotowania próbek, immobilizowania białka, itd., d) niewymagającą znakowania fluorescencyjnego próbki. Ostatnia cecha jest szczególną zaletą w porównaniu do wysycania liganda białkiem, gdzie konieczne jest znakowanie i gdzie obserwuję emisję znacznika FMR.

Przebywałem analogi TMGpppG z różnymi FMR z grupami hydroksylowymi (HEMABI), fenolowymi (DMHBI, o-HBI), aminowymi (DMABI, ACVJ), nitrowymi (*p*-NHBI) w pozycji 2'-O i 3'-O-guanozyny. Wyniki uzyskane z tych badań umożliwiły mi ustalenie pewnego farmakoforu – określonych ugrupowań i rozłożenia w przestrzeni motywów strukturalnych odpowiedzialnych za zwiększone powinowactwo do snurportyny (rys. II. 53). Są to kolejno: a) struktura trimetylokapu (TMGpppN) (niewymagana, ale pożądana dla specyficznego oddziaływania z białkiem); b) guanozyna jako drugi nukleotyd; c) analog fluoroforu GFP w pozycji 2'-O-guanozyny z odpowiednim linkerem. Pierwsze tak pozytywne wyniki uzyskałem dla analogów z DMHBI (**1a**) i HEMABI (**1c**), dlatego podejrzewałem, że grupa hydroksylowa odgrywa kluczowe znaczenie w oddziaływaniach stabilizujących. Badając kolejne koniugaty okazało się, że zamiana grup funkcyjnych w analogu fluoroforu GFP z hydroksylowej na inną nie spowodowała znaczących zmian w powinowactwie (rys. II. 54). Analogi z grupą nitrową (*p*-NHBI) czy aminową (DMABI) oddziałują prawie z taką samą siłą co te z grupą hydroksylową (DMHBI, o-HBI). Koniugat z DMABI wykazał nieco słabsze wiązanie, ale prawdopodobnie jest to związane z izomeryzacją produktu do mieszaniny 2'+3' (**1e-2'**) i który zawierał ok.10% izomeru 3'. FMR nie może być również zbyt duży, np. izomer 2' z ACVJ (**1f-2'**) nie wykazał zwiększonego powinowactwa względem 3'.



Rys. II. 52 Motywy strukturalne w związku TMGpppG-2'-O-L1-FMR odpowiedzialne ze silne oddziaływanie ze snurportyną

Postanowiłem sprawdzić jaki wpływ ma linker z triazolem i grupa hydroksylowa liganda dla powinowactwa oraz ustalić czy analog fluoroforu GFP jest konieczny do uzyskania efektu stabilizującego. W tym celu zsyntezowałem i zbadałem ze snurportyną koniugaty analogu TMGpppG niezawierające FMR, ale z analogicznym linkerem z triazolem oraz łańcuchem alifatycznym różnej długości i grupą hydroksylową w pozycji 2'-O-guanozyny (**17,18**). Do reakcji wykorzystałem alkohole alkilowe: propargilowy, 3-butynylowy, 4-pentynylowy i uzyskałem koniugaty z grupą hydroksylową oddaloną o C1 lub C3 wiązania od triazolu. Nie udało mi się uzyskać analogu z grupą oddaloną o dwa wiązania (brak konwersji substratu). Związki **17,18** przebadalem również metodą FQT (rys. II. 54). Warto podkreślić, że nie mogłbym ich zbadać odwróconym miareczkowaniem białkiem wykorzystując mechanizm TICT (brak FMR).

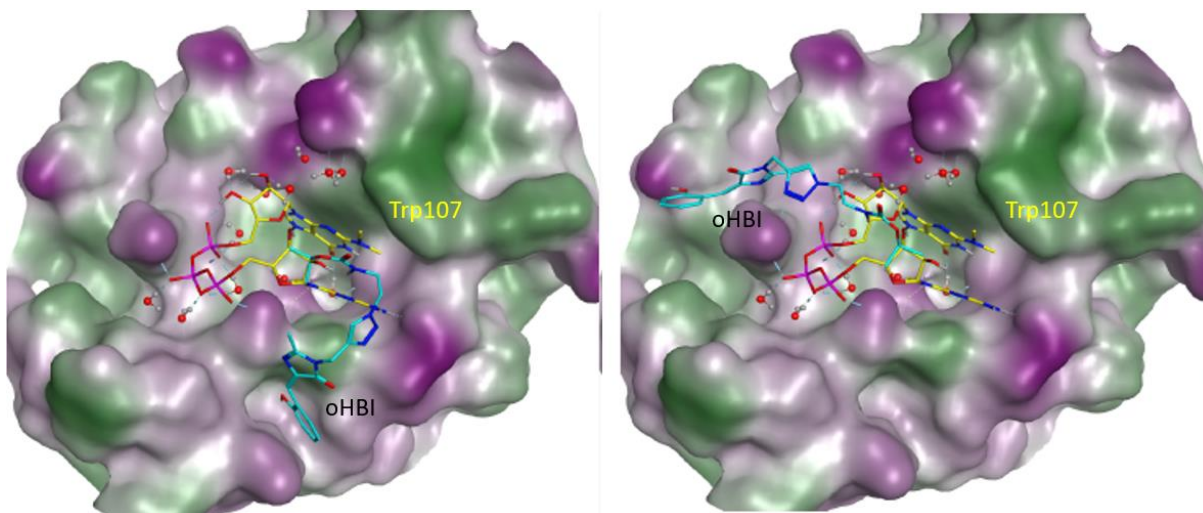


Rys. II. 53 Porównanie powinowactwa do snurportyny dla 2'-O-podstawionych koniugatów bez FMR i z grupą hydroksylową lub azydkową oraz z różnie sfunkcjonalizowanymi analogami fluoroforu GFP

Wyniki wskazują na niewielki dodatni wpływ linkera z alifatyczną grupą hydroksylową w poz. 2' na powinowactwo do snurportyny. Wyniki dla związków **17**, **18**, **1e-2'** pokazują, że grupa hydroksylowa może odgrywać pewną rolę w oddziaływaniach stabilizujących ze snurportyną, jednakże wyniki dla *p*-NHBI, DMABI i DMHBI jednoznacznie pokazują, że grupa hydroksylowa nie jest dominującym czynnikiem w oddziaływaniach stabilizujących dla tych ligandów i snurportyny. Wiązanie dla snurportyny i **18** jest 50-krotnie słabsze niż dla związków z analogami fluoroforu GFP i 2,5-krotnie silniejsze od TMGpppG. Związek z *p*-NHBI (**1e-2'**) wykazał nieznacznie słabsze wiązanie (1,5-krotnie) ze snurportyną niż DMHBI (**1a-2'**), chociaż w przypadku analogów GMP powinowactwo to było bardziej zbliżone w porównaniu tych dwóch FMR (rys. II. 48).

II.6.6.2 Dokowanie molekularne

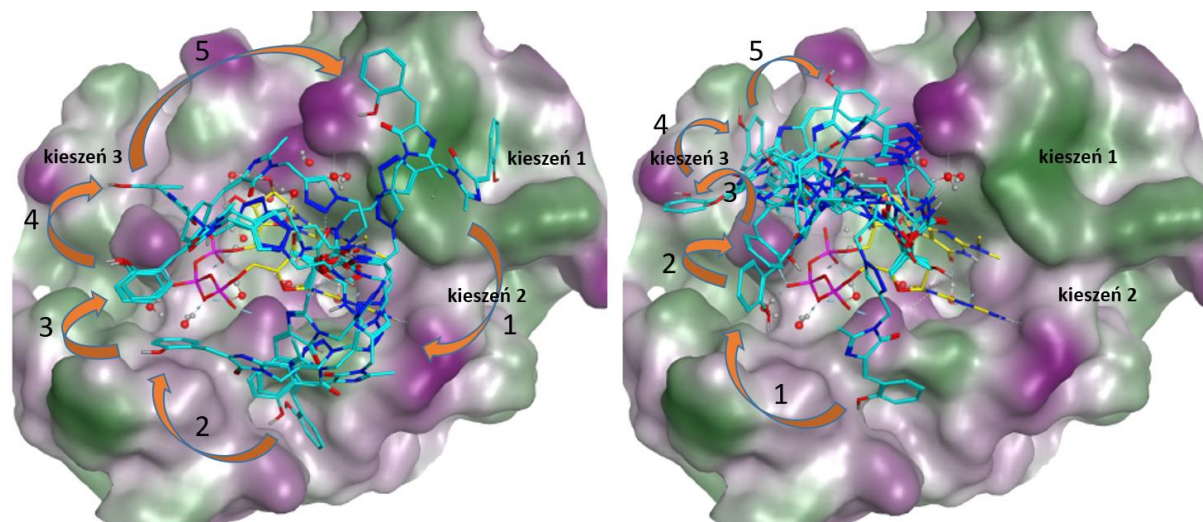
Dodatkowych informacji na temat struktur związanych z różnicami powinowactwa między koniugatami TMGpppG podstawionymi w pozycjach 2'-O i 3'-O guanozyny dostarczyły symulacje dokowania molekularnego wykonane przez dr hab. Joannę Panecką-Hofman. Badaniu poddała koniugaty TMGpppG z *o*-HBI w pozycjach 2' i 3'-O-rybozy (**1b-2'**, **1b-3'**). Założono, że fragment kapu TMGpppG jest zadokowany tak jak w strukturze krystalicznej (PDB 1XK5) i nie zmienia położenia. Zmianom w dokowaniu poddano tylko fragment oznaczony kolorem cyjanowym, tj. począwszy od ugrupowania karbaminianowego przy rybozie. Podczas gdy fragment FMR w **1b-2'** wiąże się preferencyjnie z hydrofobową kieszenią boczną 1 otoczoną przez Trp107 (rys. II. 55), fragment FMR w **1b-3'** najlepiej pasuje do kieszeni bocznej 2, ale nie sięga do niej tak głęboko jak 2'-O-*o*-HBI



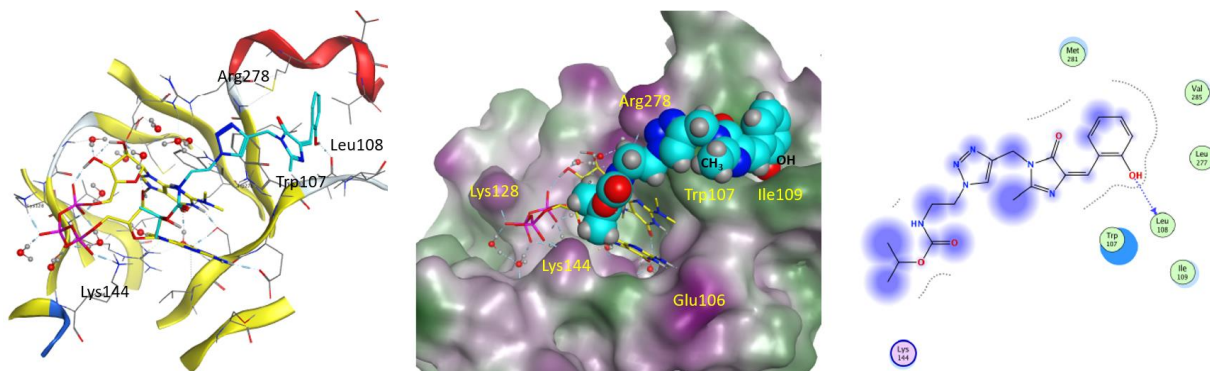
Rys. II. 54 Porównanie pozycji w domenie wiążącej snurportyny dla 2'-O-podstawionego o-HBI na guanozynie koniugatu (lewo, najniższa energetycznie) oraz 3'-O-podstawionego (prawo, niskoenergetyczna). Powierzchnie aminokwasów oznaczono wg lipofilowości (zielony = silnie lipofilowy, fioletowy = hydrofilowy)

Uprzywilejowana pozycja dla 2'-o-HBI wykazała znacząco niższą energię wiązania w porównaniu do innych pozycji oraz zaobserwowano oddziaływanie w hydrofobowej kieszeni oznaczonej nr 1 (Trp107). Najbardziej uprzywilejowana pozycja dla 3'-o-HBI oddziałuje z regionami hydrofilowymi, które zazwyczaj nie są faworyzowane energetycznie. W żadnym przypadku (pozycje 1-10) część znacznika o-HBI dla 3' izomeru nie znalazła się w kieszeni 1 czy 2, które są znacząco bardziej hydrofobowe (rys. II. 56).

Dokowanie molekularne pozwoliło zobrazować dodatkowe oddziaływanie hydrofobowe między Trp107 a metyloimidazolinonem oraz elektrostatyczne grupy hydroksylowej z resztą leucyny 108 (grupa karbonylowa C=O) (rys. II. 57). Oznaczyłem kluczowe grupy funkcyjne (gr. CH₃ w pierścieniu metyloimidazolinonu oraz OH) i oddziałujące z nimi aminokwasy: Trp107, Leu108, Ile109 będące aminokwasami hydrofobowymi.



Rys. II. 55 Nałożenie pozycji 1-10 znacznika o-HBI (cyjanowy) wraz z kierunkiem przesuwania się w domenie wiążącej snurportyny dla 2'-O-podstawionego koniugatu (lewo) oraz 3'-O-podstawionego (prawo)

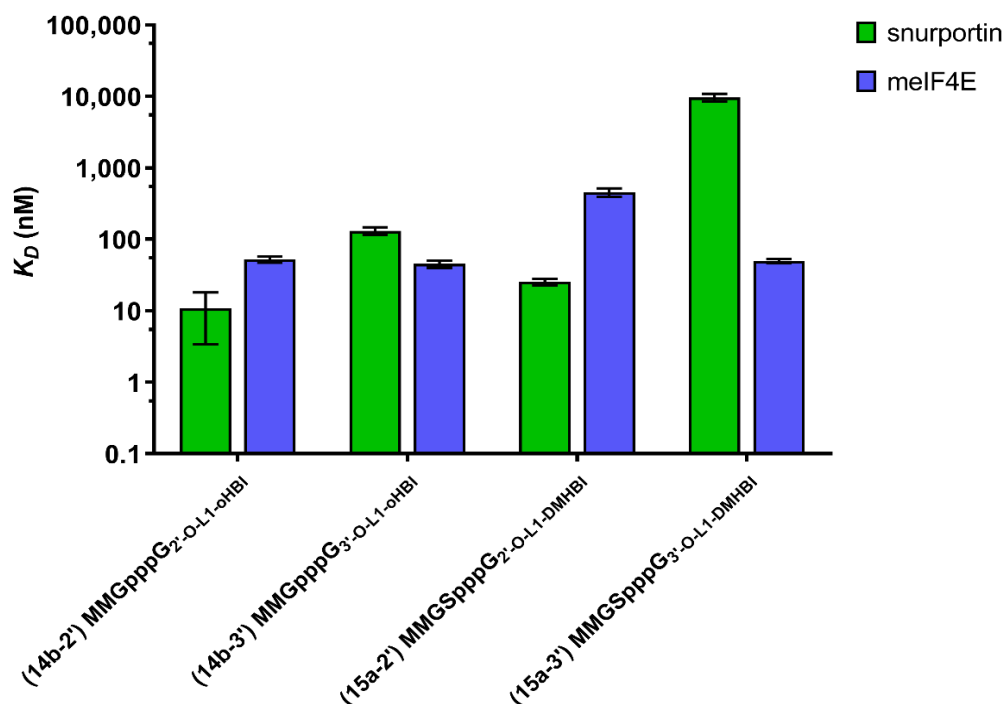


Rys. II. 56 Różne prezentacje oddziaływań stabilizujących dla TMGpppG2'-O-L1-O-HBI (pozycja 1) i snurportyny (kieszka 1)

W połączeniu z wynikami FQT stwierdzam, że: a) dla zwiększonego powinowactwa, wymagany jest znacznik w postaci analogu fluoroforu GFP w pozycji 2'-O-guanozyny, b) grupa funkcyjna w FMR nie ma znaczenia dla powinowactwa, c) pierścień imidazolinonu wydaje się odgrywać znaczącą rolę w oddziaływaniach stabilizujących poprzez oddziaływania z resztą Trp107 (oddziaływania hydrofobowe)

II.6.7 Charakterystyka oddziaływania analogów m⁷G kapu koniugatów z FMR z mysim eIF4E

Zbadałem 4 koniugaty z m⁷G kapem metodą FQT z mysim białkiem eIF4E (meIF4E), które wiąże naturalnie w cytoplazmie m⁷G kapowane mRNA, inicjując maszynę translacyjną i wiążąc się dalej z rybosomami. Wyznażyłem stałe dysocjacji (rys. II. 58) i porównałem z tymi dla snurportyny.



Rys. II. 57 Porównanie powinowactwa m⁷G kapowanych dinukleotydowych analogów do ludzkiej snurportyny i mysiego eIF4E

Monometylowane dinukleotydowe koniugaty modyfikowane w pozycji 2'-O-guanozyny wykazały silne powinowactwo do snurportyny, podobne do TMG kapów, jednak wiążą się również z eIF4E. Powinowactwo do snurportyny jest większe niż do eIF4E w przypadku koniugatów 2'-O-podstawionych, jednak różnica wynosi około 1 rząd wielkości co pozwala mi wnioskować, że oddziaływania z białkami są konkurencyjne. Oznacza to brak specyficzności ligandów. Dodatkowo nie ma zróżnicowania w powinowactwie do eIF4E między regioizomerami w przeciwieństwie do różnic w powinowactwie do snurportyny. Mimo, że 2'-O-podstawione koniugaty są silnymi ligandami snurportyny, nie mogą one służyć jako sondy molekularne celujące w to białko *in vivo*. Ponadto dowodzi to, że chociaż struktura TMG kapu nie jest wymagana do wiązania ze snurportyną, to jest pożądana (specyficzność).

II.6.8 Zestawienie właściwości fizykochemicznych i biofizycznych nukleotydowych koniugatów z DMHBI i o-HBI

Porównałem ze sobą wartości pK_a grupy fenolowej (rozdz. II. 5. 1), powinowactwo (K_D) do snurportyny oraz odpowiedzi ligandów po wysyceniu snurportyną (F_m/F_0) (tab. 7). Okazuje się, że właściwości biofizyczne obserwowane w badaniach ze snurportyną można powiązać z niektórymi właściwościami fizykochemicznymi.

Tabela 7 Zestawienie właściwości fizykochemicznych (pK_a) i biofizycznych (K_D , ligand-snurportyna oraz stosunki F_{max}/F_0 po wysyceniu snurportyną) dla wybranych koniugatów DMHBI i o-HBI

Związek	pK_a^a	K_D (nM)	F_{max}/F_0	F_{max}/F_0
			(wzb.390nm)	(wzb.490nm)
TMGpppG-2'-O-link-DMHBI (1a-2')	$8,04 \pm 0,05$	$10,15 \pm 1,34$	6,62	11,33
TMG-5'-SpppG-2'-O-link-DMHBI (2a-2')	$8,03 \pm 0,05$	$9,62 \pm 1,29$	10,33	12,39
TMG-5'-SpppG-3'-O-link-DMHBI (2a-3')	$8,69 \pm 0,12$	$536,8 \pm 67,0$	2,29	3,16
m ⁷ G-5'-SpppG-2'-O-link-DMHBI (15a-2')	$8,13 \pm 0,10$	$25,22 \pm 2,17$	9,53	11,32
m ⁷ G-5'-SpppG-3'-O-link-DMHBI (15a-3')	$8,43 \pm 0,09$	$9628,3 \pm 1189,4$	1,24	1,64
GMP-2'-O-link-DMHBI (12a-2')	$7,87 \pm 0,08$	$159,25 \pm 5,60$	23,10	10,37
GMP-3'-O-link-DMHBI (12a-3')	$8,17 \pm 0,08$	>10000	1,15	2,09
TMGpppG-2'-O-link-o-HBI (1b-2')	$9,46 \pm 0,04$	$9,14 \pm 1,21$	2,23	nd
TMGpppG-3'-O-link-o-HBI (1b-3')	$9,54 \pm 0,07$	$141,45 \pm 6,03$	1,96	nd
m ⁷ G-5'-SpppG-2'-O-link-o-HBI (15b-2')	$9,43 \pm 0,06$	$22,15 \pm 1,93$	2,84	nd
m ⁷ G-5'-SpppG-3'-O-link-o-HBI (15b-3')	$9,36 \pm 0,10$	$2127,7 \pm 316,9$	1,50	nd
GMP-2'-O-link-o-HBI (12b-2')	$9,15 \pm 0,16$	$105,0 \pm 10,5$	6,43	nd
GMP-3'-O-link-o-HBI (12b-3')	$9,17 \pm 0,09$	>10000	3,14	nd

^a otrzymane dla λ_{exc} =490 (DMHBI) lub 465 nm (o-HBI); nd – nie dotyczy

Wartości pK_a dla związków z o-HBI znajdują się w przedziale 9,1-9,6. Najniższą wartość pK_a otrzymałem dla **12b-2'** i dla niego zaobserwowałem też największą odpowiedź ze snurportyną (podobnie jak dla DMHBI). Związki z TMG kapem - zarówno 2' jak i 3' izomer - wykazały słabe odpowiedzi, co można wytłumaczyć wyższymi wartościami pK_a (o 0,4 jednostek w porównaniu z GMP). Słaba odpowiedź dla silnie wiązanego liganda **1b-2'** wskazuje,

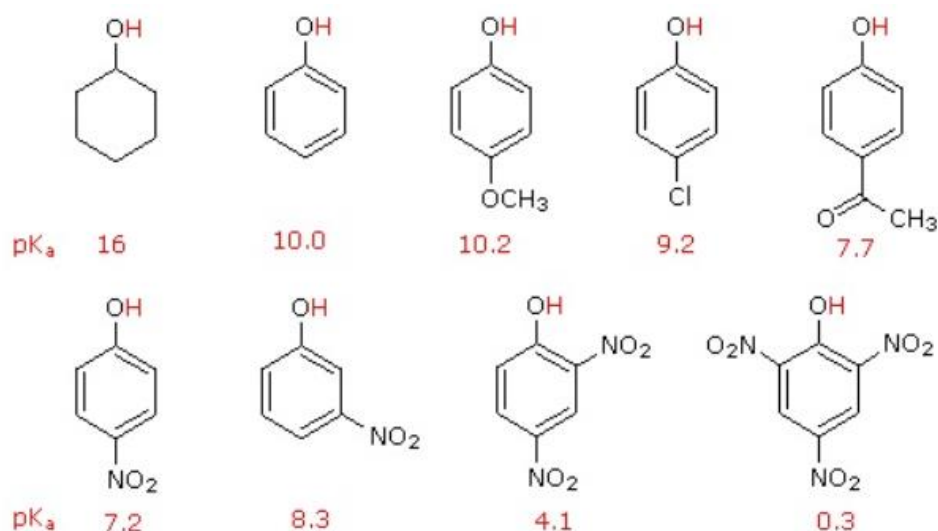
że silne powinowactwo nie jest wystarczające do uzyskania dobrych odpowiedzi w miareczkowaniach białkiem. Sugeruje to, że musi istnieć jeszcze inny czynnik wpływający na odpowiedź sondy.

Porównując związki z DMHBI zaobserwowałem najsilniejszą odpowiedź ponownie dla związku GMP modyfikowanego w pozycji 2'-O jak również dla niego uzyskałem najniższą wartość pK_a grupy fenolowej równą 7,9. Najwyższą wartość pK_a uzyskałem dla związku z TMG kapem z DMHBI w pozycji 3'-O (8,7), jednak wykazał nieco większe odpowiedzi niż odpowiednie 3' izomery dla GMP lub z MMG kapem, mimo, że te miały niższe pK_a (GMP aż o ok. 0,6 jednostek) pokazując, że powinowactwo do białka jest przynajmniej wymagane do uzyskania odpowiedzi. Szczególnie duża różnica w wartościach pK_a obserwowalna jest dla dwóch regioizomerów **2a-2'** i **3'** (0,7 jednostek w pK_a), co tłumaczy różnice w ich odpowiedziach. Różnice w powinowactwie tylko częściowo tłumaczą te rozbieżności, bowiem **12a-2'** ma powinowactwo tego samego rzędu co **2a-3'**, ale ma znacznie silniejsze odpowiedzi.

Odpowiedzi sond są silnie ujemnie skorelowane z wartościami pK_a – im niższe wartości pK_a , tym lepsze odpowiedzi ligandów. Nie jest to zaskoczeniem, zważywszy że na widmach emisji w miareczkowaniach ze snurportyną uwidacznia się głównie pasmo od formy fenolowej (emisja 540 nm), co oznacza że forma zjonizowana tych związków oddziałuje z domeną wiążącą snurportyny. Pasma od formy fenolowej zostaje prawie całkowicie przykryte (emisja 490 nm). Postuluje zatem, że efekt odpowiedzi sond DMHBI i o-HBI na wiązanie ze snurportyną jest wynikiem dwóch efektów:

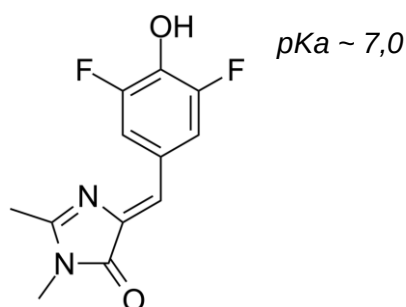
- a) Powinowactwa do snurportyny (w pierwszej kolejności wymagane, im większe tym większa odpowiedź)
- b) Kwasowości protonu grupy fenolowej (im mniejsze pK_a tym większy udział formy anionowej i tym większa odpowiedź)

Teorie te potwierdzają eksperymenty z GMP-L1-o-HBI i TMGpppG-L1-o-HBI. Analog GMP wykazał większą odpowiedź niż analog z TMG kapem, mimo mniejszego powinowactwa do snurportyny (tab. 10). Nawet 3' izomer analogu GMP wykazuje lepszą odpowiedź mimo znacznie gorszego powinowactwa (ponad 3 rzędy wielkości). Wykazałem, że w przeważającej mierze to grupa fenolanowa bierze udział w wiązaniu ze snurportyną i uwidacznia się w miareczkowaniu, a im większy jej udział tym większa odpowiedź. Konsekwencją tego jest to, że poszukując dobrej sondy dla snurportyny należałoby szukać FMR z dodatkowymi grupami EWG silniejszymi niż metoksyłowe (OCH_3) jak np. grupy trifluorometylenowe $-CF_3$ lub inne: Cl, F, CCl_3 , $C(O)R$, NO_2 (rys. II. 59).



Rys. II. 58 Przykłady pK_a protonu grupy hydroksylowej dla różnie podstawionych fenoli

Niskie pK_a protonu grupy fenolowej równe ok. 7 posiada również analog fluoroforu GFP-DFHBI (difluorohydroksybenzylideno metyloimidazolinonem) (rys. II. 60)²⁷⁵



Rys. II. 59 Struktura DFHBI i pK_a protonu grupy fenolowej

II.7. Odpowiedzi sond z FMR na wiązanie ze snurportyną i eiF4E

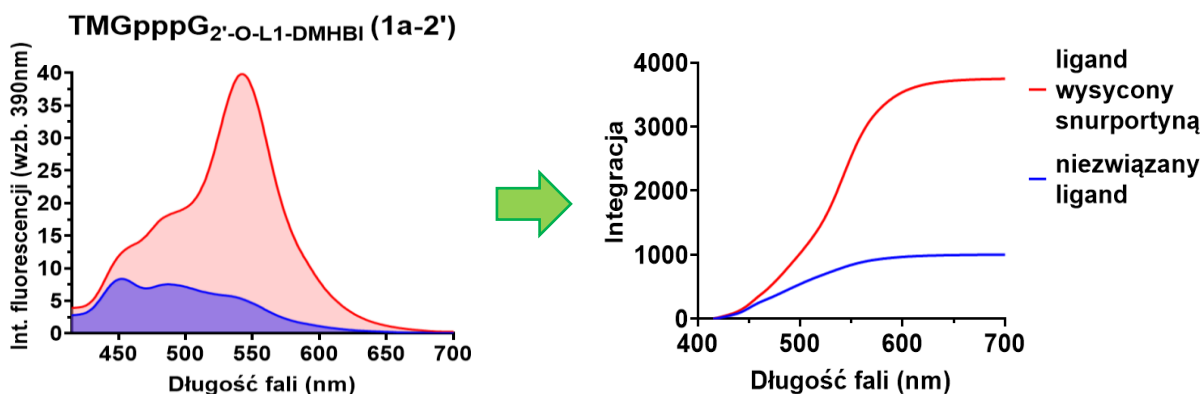
Mechanizm TICT dla Fluorescencyjnych Molekularnych Rotorów umożliwia wykorzystanie ich jako sondy molekularne dla konkretnych białek oraz zmierzenie czułości tych sond na wiązanie z białkami w myśl, że im większa mierzalna różnica intensywności fluorescencji między formą związaną i niezwiązaną, tym większa czułość sondy. Obliczyłem odpowiedzi 38 sond z FMR na wiązanie ze snurportyną (tab. 10) jako stosunek F_{max}/F_0 , gdzie F_{max} – fluorescencja wysyconego kompleksu białko-ligand, F_0 – fluorescencja wolnego liganda. Wartość ta oznacza krotność wzmocnienia intensywności fluorescencji po wysyceniu liganda białkiem i jest niezależna od ustawień aparatu czy stężenia białka, jest bowiem zależna jedynie od właściwości fluoroforu i powinowactwa do białka, w tym od wiązań stabilizujących kompleks białka z ligandem.

II.7.1 Odpowiedzi względne (F_{max}/F_0)

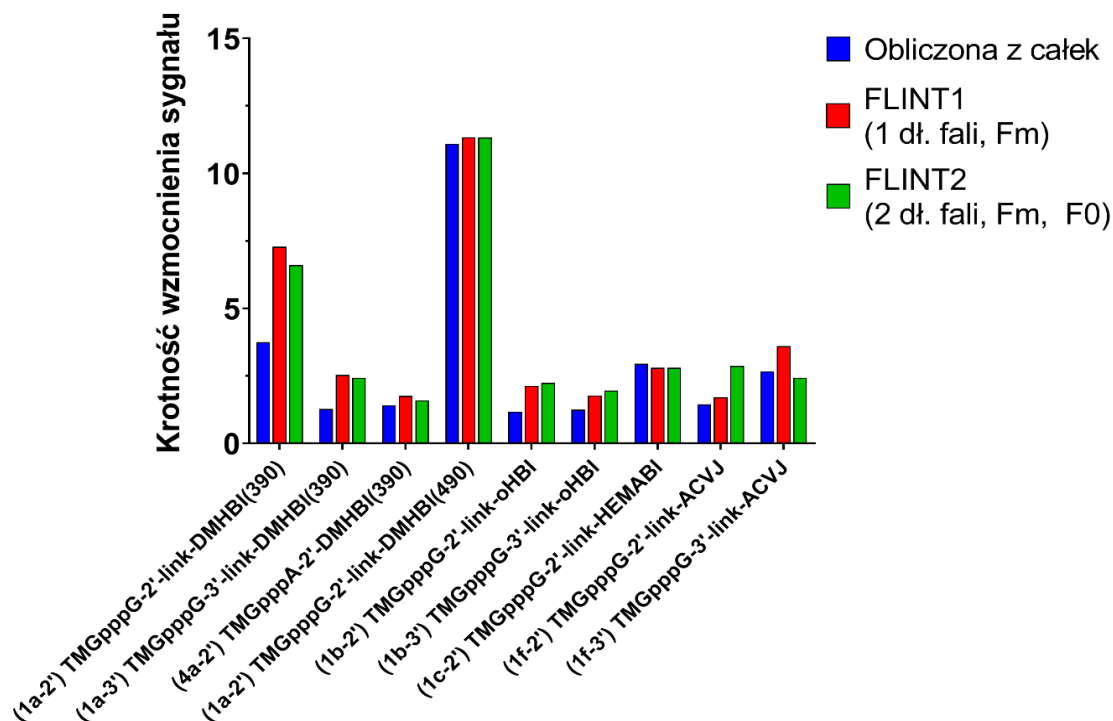
Odpowiedzi sond molekularnych można obliczyć na kilka sposobów: a) na podstawie długości fali odpowiadającej wysyconemu kompleksowi białko-ligand, b) na podstawie dwóch długości fal odpowiadających wolnemu ligandowi i wysyconemu kompleksowi białko-ligand,

c) na podstawie integracji widm emisji w wybranym zakresie długości fal dla wolnego liganda i wysyconego kompleksu białko-ligand. Pierwsza metoda zakłada jedną konkretną długość fali, co jest praktyczne dla metod obrazowania za pomocą np. konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego, natomiast dwie kolejne uwzględniają również efekt hipso- i batochromowy.

Metoda w której odpowiedzi liczone są na podstawie całek uwzględnia również udział tła, co może być wadą dla silnie wygaszanych fluoroforów takich jak DMHBI czy o-HBI, dla których często nie można jednoznacznie stwierdzić zakresu sygnału diagnostycznego lub sygnał ten pokrywa się z widmem emisji od matrycy (rys. II. 61 niebieski). Metodologie postępowania dla całek przedstawia rys. II. 61 a różnice wynikające z przyjętej metodyki rys. II. 62.



Rys. II. 60 Dwie wartości AUC dla wolnego TMG kapu z Gua-2'-O-DMHBI oraz wysyconego snurportyną. Ich wzajemny stosunek AUC(max)/AUC(0) jest w tym przypadku krotnością wzmocnienia sygnału fluorescencyjnego.



Rys. II. 61 Przykładowe różnice w odpowiedziach różnych TMG kapów z FMR na wiązanie ze snurportyną w zależności od wybranej metody

W koniugatach z HEMABI i DMHBI (wzb. 490 nm) wszystkie trzy metody dają zbieżne wyniki. Na widmach emisji DMHBI (wzb. 390 nm) i o-HBI występuje sygnał przy ~450 nm pochodzący od matrycy i jest on nałożony na pasmo emisji rotora. Dla tych widm FMR odpowiedzi liczone dla jednej długości fali i dwóch są zbieżne a liczone z całek znacząco mniejsze. W koniugatach z ACVJ z kolei odpowiedzi są nieznacznie różne co wynika z obserwowanego przesunięcia hipsochromowego. Do ostatecznych obliczeń (tab. 10) wybrałem metodę c) FLINT2 (zielony).

II.7.2 Odpowiedzi obliczone na podstawie regresji liniowej (parametr a)

Wszystkie trzy opisane wcześniej metody zakładają, że udało się uzyskać wysycenie liganda białkiem. W niektórych przypadkach, np. dla słabych ligandów, nawet 7-8 nadmiar stężenia białka nad liganda nie umożliwił jego wysycenie i niemożliwe jest bezpośrednie porównanie wartości F/F_0 . W takich przypadkach dokonałem regresji liniowej punktów pomiarowych $F(x)$, gdzie x – stężenie białka i odczytałem parametry a – współczynnik kierunkowy prostej i jest to tożsame ze zmianami intensywności fluorescencji koniugatu (znacznika) na jednostkę stężenia snurportyny, dF/dC (tab. 8)

Tabela 8 Porównanie parametrów dF/dC dla koniugatów TMG kapu (1-11), GMP (12-13) lub m^7G kapu (14-15) z różnymi FMR

Związek	dF/dC [a.u./ μM]		Związek	dF/dC [a.u./ μM]	Związek	dF/dC [a.u./ μM]
DMHBI	λ_{exc} 390 nm	λ_{exc} 490 nm	o-HBI	λ_{exc} 390 nm	HEMABI	λ_{exc} 450 nm
1a-2'	45	65	1b-2'	1,4	1c-2'	300
1a-3'	4,4	5,9	1b-3'	1,5	1c-3'	196
2a-2'	37	82	7b-2'	6,9	3c-2'	299
2a-3'	4,7	8,8	7b-3'	14	3c-3'	62
3a-2'	52	57	8b-2'	2,1	4c-2'	bd
3a-3'	8,8	11,5	8b-3'	0,21	4c-3'	10
4a-2'	9,6	3,7	9b	28	5c-2'	287
4a-3'	4,2	bd	12b-2'	6,3	5c-3'	51
5a-2'	31	58	12b-3'	2,4	6c	7
5a-3'	2,8	9,7	13b-2'	0,20	11c-2'	29
6a	9,6	7,7	13b-3'	0,25	11c-3'	20
7a-2'	8,2	bd	14b-2'	11	12c-2'	274
7a-3'	4,4	6,0	14b-3'	5	12c-3'	93
8a-2'	9,9	bd	15b-2'	13	15c-2'	242
8a-3'	4,0	6,8	15b-3'	1,4	15c-3'	2
9a	9,6	1,8			ACVJ	450 nm
11a-2'	0,7	0,6			1f-2'	93
11a-3'	0,7	0,7			1f-3'	463
12a-2'	66	29				
12a-3'	1,0	0,28				
15a-2'	92	1,6				
15a-3'	50	0,45				

Bd - niezbadano

Największe zmiany intensywności fluorescencji po związaniu ze snurportyną dF/dC wykazał koniugat ACVJ **1f-3'** (463 a.u./ μ M), podczas gdy izomer 2' tylko 93 a.u./ μ M przy jednakowym powinowactwie (K_D) do snurportyny. Silne zmiany (~ 300 a.u./ μ M) wykazały również 2' koniugaty z HEMABI: **1c-2'**, **3c-2'**, **5c-2'**, **12c-2'**, **15c-2'**. W przypadku tych koniugatów, 3' koniugaty wykazywały niższe zmiany, chociaż niektóre jak **1c-3'** również dały dobry rezultat, być może ze względu na zachodzącą w trakcie przechowywania izomeryzację. W pozostałych przypadkach (DMHBI, o-HBI) zmiany te były niskie (< 50 a.u./ μ M), często mimo wyższego powinowactwa od TMGpppG, np. **1b-2'**, **7b-2'**, **8b-3'**. Ponownie można zaobserwować korzystny efekt linkera typu drugiego (L2) na odpowiedzi sond z o-HBI, jednak tutaj wydaje się mieć on mniejsze znaczenie, np. największy wynik dla **9b** to jedynie 28 (znacząco mniej niż dla innych FMR), zatem największy wpływ ma po prostu rodzaj FMR. Co ciekawe adenozynowe (**4a-**, **6a-**, **11a-2'/3'**) analogi wykazywały znacznie niższe wartości dF/dC (0,6-8 a.u./ μ M) niż guanozynowe (60-80 a.u./ μ M) i chociaż ich wartości F_m/F_0 również były mniejsze, to bardziej zbliżone do guanozynowych, dzięki szerokiemu przedziałowi linowości odpowiedzi.

Porównałem ze sobą obie metody określania odpowiedzi sond, F_m/F_0 oraz dF/dC (tab. 9). Po pierwsze regresja liniowa dokonywana jest tylko w pewnym zakresie stężeń białka (dla którego $R^2 > 0,99$) i odpowiedniej liczby punktów pomiarowych (min. 5). Parametr dF/dC daje pewną informację o dynamice zmian int. fluorescencji i może mieć znaczenie dla mikroskopii konfokalnej, zaś wysoki parametr F_m/F_0 świadczy o dobrej odpowiedzi sondy i zadokowaniu znacznika FMR w kieszeni wiążącej białka. To z kolei daje szansę na zmiany czasów życia fluorescencji koniugatu w stanie związanym ze snurportyną.

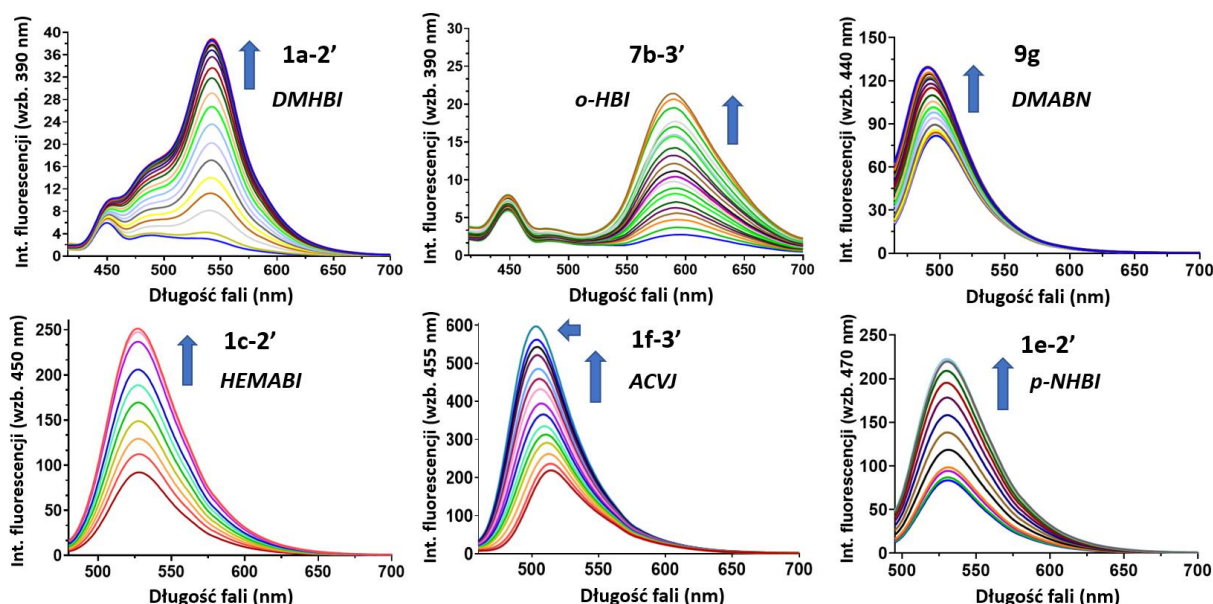
Tabela 9 Porównanie znaczenia i zastosowania parametrów F_{max}/F_0 i dF/dC opisujących odpowiedzi sondy na wiązanie z białkiem

Parametr F_{max}/F_0	Parametr dF/dC (wsp. a z regresji liniowej)
1) Jeśli to możliwe, należy określać odpowiedzi sond jako parametr F maksymalne/ F początkowe, 2) F_{max}/F_0 jest obiektywną miarą odpowiedzi sond na wiązanie z białkiem, 3) Nie zależy od stężenia białka użytego w doświadczeniu czy dobranej mocy detektora. Zależy jedynie od właściwości sondy, 4) Odzwierciedla zmiany względne int. fluorescencji, 5) Można porównywać koniugaty z różnymi FMR między sobą	1) Dobry parametr do porównań, jeśli nie udało się wysycić próbki liganda (np. słabe ligandy), 2) Parametr ten (wsp. a prostej) jest miarą odpowiedzi sondy i wyrażany jest w jednostkach a.u./ μM białka, czyli określa przyrost intensywności fluorescencji. Im większy, tym lepiej. Współczynnik b prostej jest miarą autofluorescencji i wyrażany jest w jednostkach a.u. Mówi o tym jaka jest jasność „świecenia” wolnego liganda. Im mniejszy, tym lepiej, 3) Analiza dokonywana na podstawie punktów pomiarowych z pewnego (subiektywnie ustalonego) zakresu stężeń białka, 4) Parametry a i b są zależne od mocy, napięcia detektora, dodatkowo parametr a jest zależny od stężeń (porcji) białka i znacząco od rodzaju FMR

- 5) Odzwierciedla zmiany bezwzględne int. fluorescencji ($F(x)-F_0$),
- 6) Nie zawsze musi korelować z F_m/F_0 , dobrym przykładem są tu sondy adenozynowe, które mają małe parametry a i większe parametry F_m/F_0 (duży zakres liniowości i wysokie C_{max} , ~6-8 μM snurportyny)

II.7.3 Miareczkowania liganda snurportyną

Obserwując widma emisyjne koniugatów FMR w trakcie miareczkowania snurportyną (rys. II. 63) otrzymałem kilka interesujących wniosków. Koniugaty DMHBI wykazują podwójną emisję jeśli wzbudzone są długością fali 390 nm, ale głównie to emisja formy fenolanowej uwidacznia się w oddziaływaniach ze snurportyną (em. 545 nm). Pasma od formy fenolowej (485 nm) zostaje częściowo przykryte emisją formy fenolanowej. Wzbudzenie 490 nm związków z DMHBI umożliwia obrazowanie jedynie oddziaływania fenolanu z białkiem (545 nm). Maksimum dla emisji koniugatów z *o*-HBI znajduje się przy ok. 600 nm, jednak jego zaobserwowanie zawsze wymagało zastosowania wyższych stężeń liganda (2 μM) i napięcia fotopowielacza, podobnie dla koniugatów z *p*-NHBI zastosowałem wyższe stężenie (5 μM) a mimo to nie zaobserwowałem żadnej odpowiedzi ze snurportyną. Pasma emisji dla HEMABI znajduje się przy 545 nm, dla DMABI przy 530 nm a dla ACVJ w zakresie 510-530 nm. W przypadku koniugatów **1f-2'**, **1f-3'** obserwowałem przesunięcia hipsochromowe w trakcie miareczkowania snurportyną, jednak nie obserwowałem go w przypadku analogów GMP z tym FMR (**12f-2'**, **12f-3'**).



Rys. II. 62 Przykładowe nałożone widma emisji TMG kapowanych koniugatów z FMR miareczkowane snurportyną

Wyniki z miareczkowań liganda snurportyną zestawilem ze stałymi dysocjacji snurportyna-ligand wyznaczonymi poprzednio z eksperymentów FQT (rys. II. 64-66). W każdym takim zestawach poszukiwałem związków charakteryzujących się największym powinowactwem –

jak najniższa wartość K_D (nM) i największą odpowiedzią na wiązanie z białkiem – jak największą wartość F_{max}/F_0 . Takie zestawienie umożliwiło mi znalezienie potencjalnych kandydatów do badań w warunkach komórkowych. Ze względu na liczebność wyników podzieliłem je na kilka zestawów według znaczników FMR w koniugatach. Zestawiłem wszystkie związki w kolejności: TMG kapowane dinukleotydy, GMP, MMG kapowane dinukleotydy i C-fosfoniany z FMR.

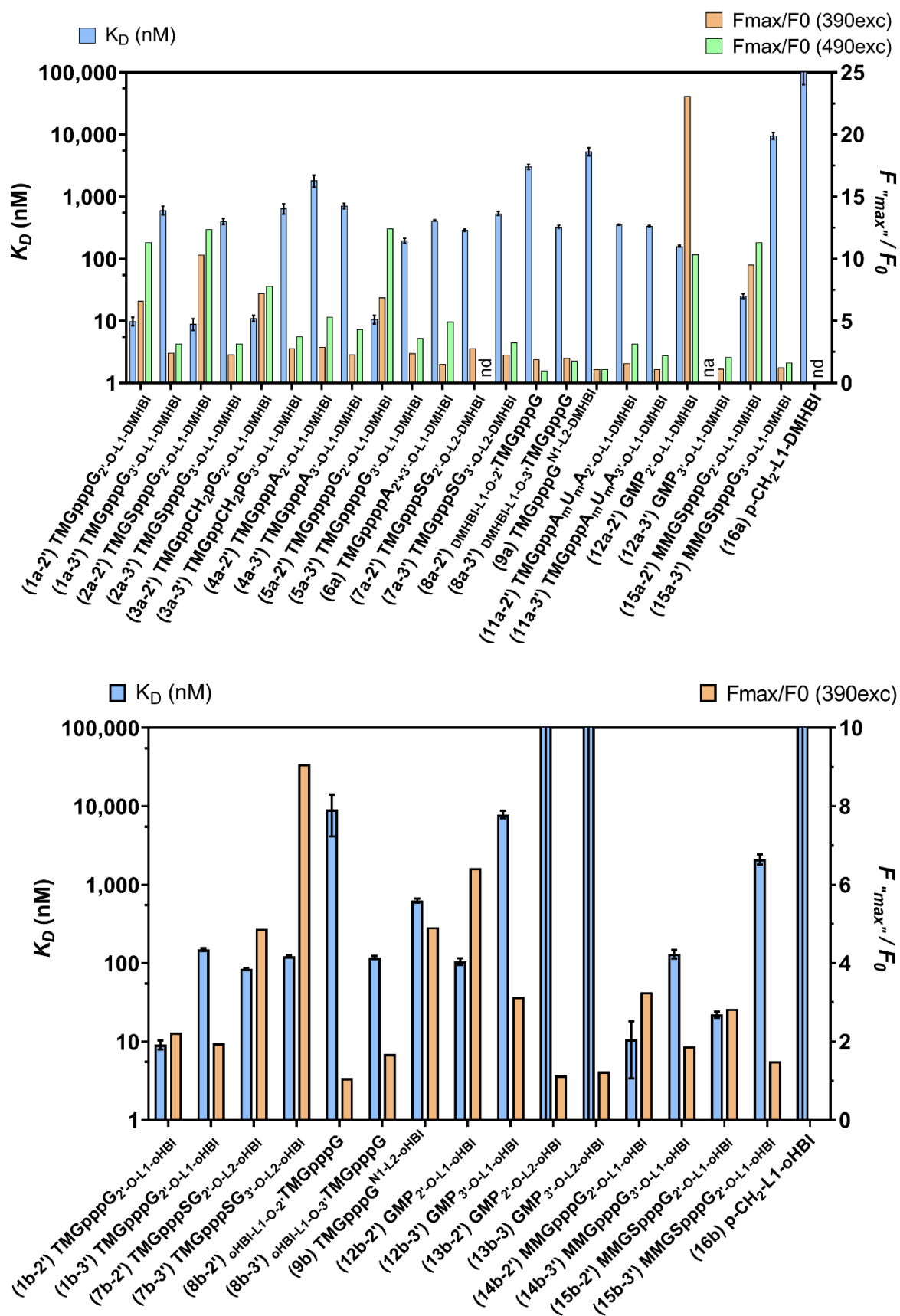
Na podstawie danych na rys. II. 63-65 można wyciągnąć kilka ogólnych wniosków:

- Wśród TMG koniugatów z DMHBI i HEMABI zaobserwowałem korelację powinowactwa i odpowiedzi sondy na tworzenie kompleksu snurportyna-ligand, tj. mniejsze K_D są skorelowane z większą odpowiedzią sondy molekularnej. Koniugaty z tymi FMR modyfikowane w pozycji 2' guanozyny wykazały znacząco lepsze odpowiedzi na wiązanie ze snurportyną niż 3' izomery czy dinukleotydy modyfikowane w innych pozycjach.
- GMP z **a-c** w pozycji 2' wykazały lepsze zmiany niż TMG lub MMG kapy modyfikowane w tych samych pozycjach.

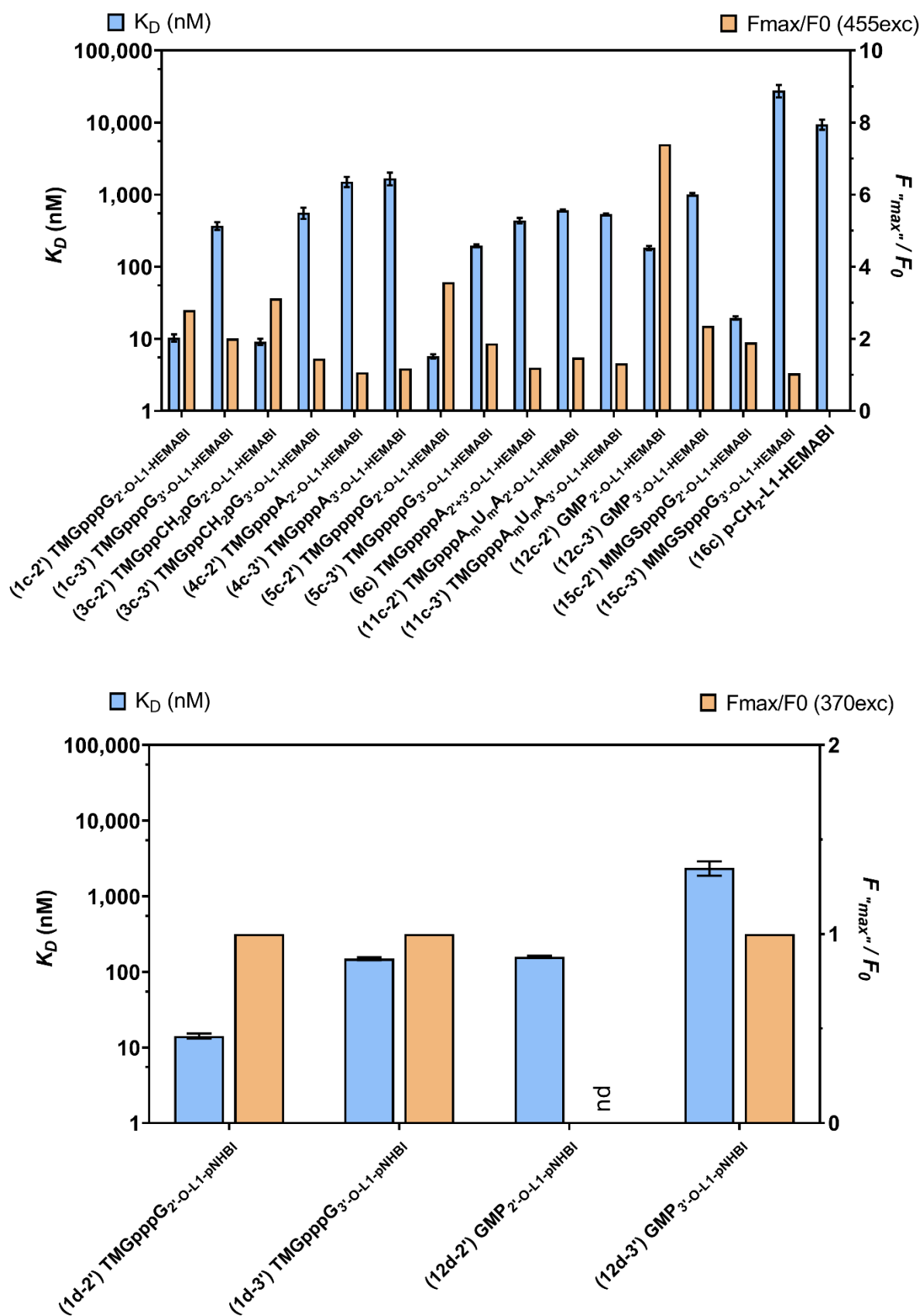
Więcej wniosków można jednak zaobserwować w obrębie danego znacznika FMR, stąd omówiłem je kolejno:

Koniugaty z DMHBI (**a**) były najliczniej przeze mnie badane (21 związków). Są one również najbardziej zróżnicowane pod kątem odpowiedzi ze snurportyną, niektóre związki wykazały ponad >10-krotny wzrost intensywności fluorescencji po wysyceniu, a inne mieściły się w przedziale 1-4. Koniugaty z DMHBI różnią się od innych znaczników tym, że mogą być wzbudzane dwoma długościami fal: 390 i 490 nm lub dla związków zawierających m^7 Guo (lub TMGuo) dodatkowo 260 nm, jednak wzbudzanie 260 nm jest nieprzydatne z punktu widzenia badań komórkowych, chociaż powoduje emisję zarówno od m^7 guanozyny jak i znacznika.

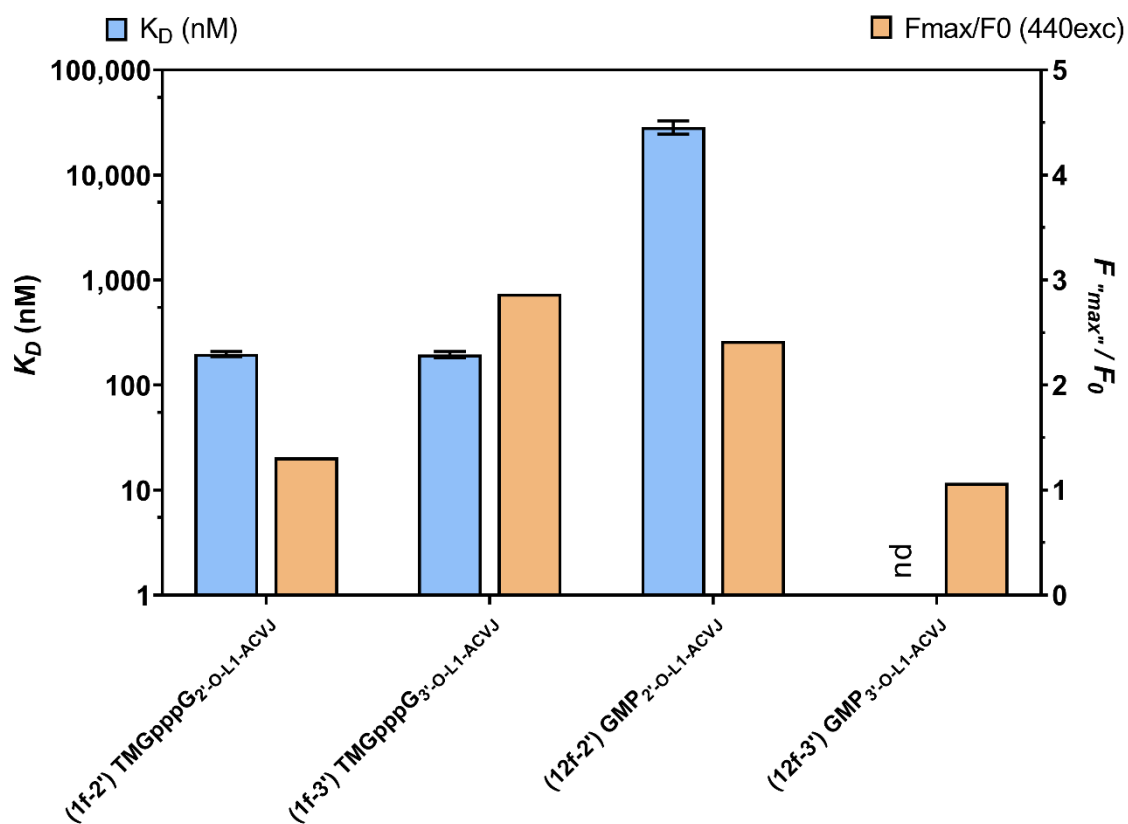
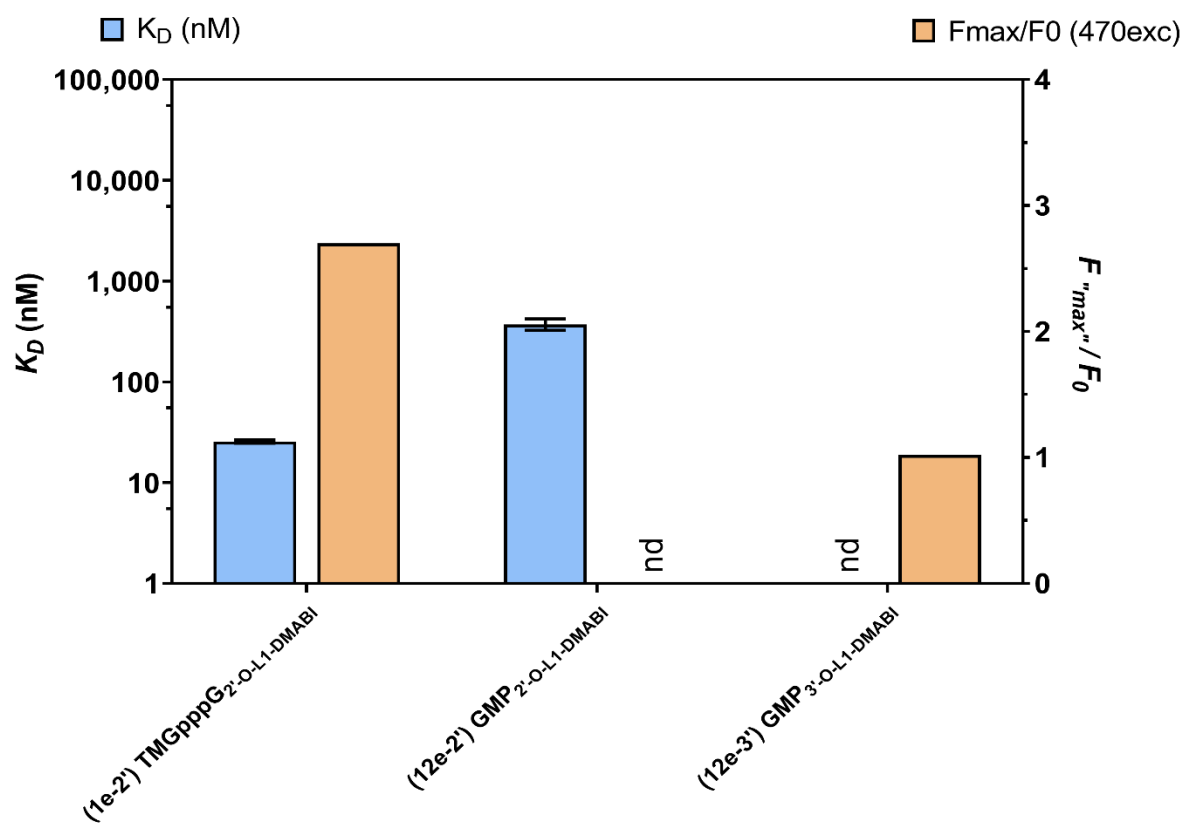
- W prawie każdym przypadku odpowiedzi uzyskane z wzbudzania 490 nm okazały się lepsze niż te dla długości fali wzbudzania 390 nm. Wyjątkiem są analogi z DMHBI od strony TMGuanozyny. Wzbudzanie 490 nm zapewnia większą czułość, większe odpowiedzi bezwzględne ($F_{max}-F_0$) i daje szansę na mniejszą autofluorescencję w obrazowaniu w żywych komórkach
- Izomery 3'-O-Guo bez TMG kapu praktycznie nie wykazywały żadnych odpowiedzi. Podobnie związek **9a** (N1-Guo), co koreluje z wynikami powinowactwa (FQT). Jedynie TMG kapowane związki modyfikowane na 3'-O-Guo wykazywały słabe odpowiedzi.
- Związki z modyfikowaną adenozyną (**4a-2'**, **4a-3'**, **6a**) mają bardziej zróżnicowane odpowiedzi i są również nieznacznie lepsze niż związki z FMR na 3'-O-Guo.
- Najlepszą odpowiedź przy wzbudzaniu 390 nm wykazał związek z 2'-O-GMP (**12a-2'**) (23-krotny wzrost po wysyceniu snurportyną). Związek ten różni się również od innych tym, że odpowiedź przy wzbudzaniu 390 nm jest znacznie wyższa od tej przy 490 nm. Prawdopodobnie związane jest to z liczbą ujemnych ładunków (grup fosforanowych) w związku.
- Najlepszą odpowiedź przy wzbudzaniu 490 nm (12,5x) wykazały analogi **2a-2'** oraz tetrafosforanowy **5a-2'** i jest to skorelowane z silnym powinowactwem do snurportyny.



Rys. II. 63 Właściwości biofizyczne koniugatów z DMHBI (góra) i o-HBI (dół): stałe dysocjacji kompleksów ze snurportyną (lewo), krotność wzrostu intensywności fluorescencji kompleksów ze snurportyną (prawo)



Rys. II. 64 Właściwości biofizyczne koniugatów z HEMABI (góra) i *p*-NHBI (dół): stałe dysocjacji kompleksów ze snurportyną (lewo), krotność wzrostu intensywności fluorescencji kompleksów ze snurportyną (prawo)



Rys. II. 65 Właściwości biofizyczne koniugatów z DMABI (góra) i ACVJ (dół): stałe dysocjacji kompleksów ze snurportyną (lewo), krotność wzrostu intensywności fluorescencji kompleksów ze snurportyną (prawo)

Koniugaty z *o*-HBI (**b**) wykazały na ogół słabe odpowiedzi, szczególnie z linkerem typu pierwszego (czerwony). Pomimo, że *o*-HBI jest również fluoroforem z możliwością podwójnego wzbudzenia (390 i 465 nm), to w pH 7,2 uwiadcza się tylko jedno z nich (390 nm), ponieważ prawie całość związku jest w formie niezjonizowanej (fenol). Odpowiedzi z białkiem przy wzbudzaniu 465 nm (fenolan) uwiadcniają się dopiero w pH > 8,5.

- Odpowiedzi dla analogów **1b-2'** i **1b-3'** są słabe i nie różnią się względem siebie, pomimo znaczących różnic w powinowactwie do snurportyny. Taki rezultat sugerować może niespecyficzne wiązanie, co wykluczyłem w eksperymencie z BSA, lub to, że dla dobrej odpowiedzi sondy musi istnieć kilka czynników, z czego jednym z nich jest wysokie powinowactwo do snurportyny i jest ono wymagane, lecz nie wystarczające.
- Linker typu drugiego (niebieski), w połączeniu z *o*-HBI zapewnia korzyść w postaci zwiększonej wrażliwości na wiązanie ze snurportyną. Związki modyfikowane w poz. N1-Guo i 2'/3'-O-Guo i z tym linkerem (**7b-2'**, **7b-3'**, **9b**) wykazały większe odpowiedzi niż przypuszczałem na podstawie powinowactwa. Efektu tego nie obserwowałem w przypadku pozostałych FMR.
- Najlepszą odpowiedź wykazał związek **7b-3'** (9-krotny wzrost) a zaraz po nim jest GMP-2' z linkerem typu pierwszego, **10b-2'** (6,4-krotny)

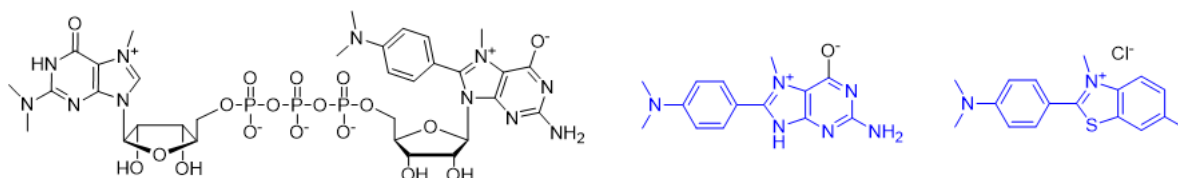
Koniugaty z HEMABI (**c**) wykazały umiarkowane odpowiedzi. Najlepszą odpowiedź wykazał związek GMP-2'-HEMABI (**12c-2'**) a z TMG kapowanych **5c-2'**, co jest skorelowane z powinowactwem. Izomery 3'-Guo wykazały ponownie gorsze odpowiedzi niż analogi modyfikowane na 2'-Guo, jednakże różnice są mniejsze niż dla innych FMR. Jest to związane z szybką izomeryzacją związku modyfikowanego w pozycjach 3' do mieszaniny izomerów 2' i 3'.

Koniugaty z *p*-NHBI (**d**) nie wykazały żadnych odpowiedzi ze snurportyną, mimo dużego zróżnicowania w powinowactwie (obserwowałem za każdym razem spadek int. fluorescencji).

Koniugat **1e-2'** z DMABI wykazał 2,6-krotny wzrost int. fluorescencji ze snurportyną.

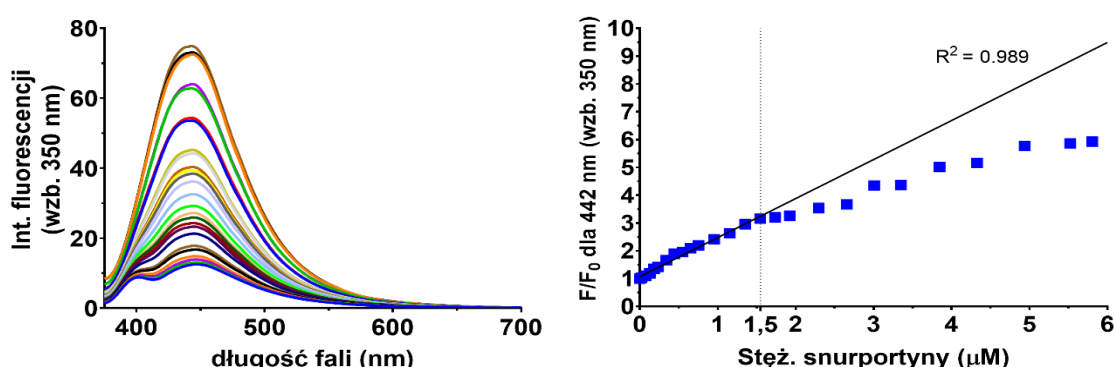
Względne odpowiedzi koniugatów ACVJ ($F_{\max}/F_0$) są słabe, chociaż wykazują one dobre odpowiedzi bezwzględne ($F_{\max}-F_0$). Słabe względne odpowiedzi wynikają z większej wydajności kwantowej w polarnych rozpuszczalnikach niż dla fluoroforów GFP (większe intensywności fluorescencji wolnego liganda F_0). Najlepszą odpowiedź wśród nich wykazał związek **1f-3'** (2,8x). Odpowiedzi dla regioizomerów **1f-2'** i **3'** są zróżnicowane pomimo braku odzwierciedlenia w powinowactwie. Analog GMP z ACVJ (**10f-2'**) w odróżnieniu od innych FMR wykazał słabą odpowiedź, jednak jest to spójne z wynikami powinowactwa (znacząco wyższe K_D).

Na szczególną uwagę zasługuje koniugat z podstawnikiem DMAPh (TMGpppm⁷G⁸DMAPh, **10**) w pozycji C8 guaniny. Grupa dimetyloaminofenyłowa (DMAPh) sama w sobie nie posiada właściwości fluorescencyjnego rotora molekularnego, zawiera bowiem donor elektronów (trzeciorzędowa grupa aminowa), ale wymaga jeszcze akceptora (np. N-metyloimidazol lub grupa nitrylowa (-CN) w DMABN). Dopiero wprowadzenie grupy DMAPh w pozycję C8 m⁷guaniny nadaje właściwości FMR i upodabnia ją strukturalnie do tioflawiny T (rys. II. 67).



Rys. II. 66 Struktura TMGpppm⁷G⁸-DMAph (**10**) oraz podobieństwo m⁷Guo⁸-DMAph do tioflawiny T

Nie posiada on również dodatkowego linkera w postaci łańcucha alkilowego i triazolu, co również może mieć wpływ na właściwości fluorescencyjne takiego związku. Pomimo, że taka modyfikacja nieznacznie destabilizuje oddziaływanie ze snurportyną (5x słabsze wiązanie od TMGpppG) to uzyskałem dobrą odpowiedź sondy na wiązanie ze snurportyną (ponad 3-krotny wzrost po wysyceniu, rys. II. 68) i jest to znacząco lepszy wynik niż np. dla TMG kapu modyfikowanego w pozycji N1 guaniny DMHBI o podobnym powinowactwie (**9a**, $F/F_0 = 1,2$).



Rys. II. 67 Odpowiedź związku TMGpppm⁷G⁸-DMAph (**10**) na wiązanie ze snurportyną

Porównałem trzy parametry dla koniugatów FMR i analogów TMG kapów z badań ze snurportyną: K_D , F_m/F_0 oraz dF/dC (tabela 10). Niskie wartości K_D (~10 nM) i wysokie F_m/F_0 (7 do 12,5) uzyskano dla analogów z DMHBI podstawionych w pozycji 2'-Guo: **1a-2'**, **2a-2'**, **3a-2'** i **5a-2'** i tym samym daje to szansę na wykorzystanie ich jako sond molekularnych snurportyny. Wszystkie te związki mają FMR przyłączony przez linker -C₂H₄--triaz-1-olo-CH₂- (L1, czerwony). Ich 3' odpowiedniki wykazały z kolei niskie powinowactwo (wysokie K_D) oraz niskie F_m/F_0 (~1-4). Istnieją jednak przykłady związków nie wykazujące korelacji cech powinowactwo-odpowiedź, szczególnie związki z o-HBI (**b**) i linkerem typu drugiego (L2, niebieski, które wykazują niskie powinowactwo i wysokie odpowiedzi (5-9x), np. **7b-3'**, **9b** oraz takie związki, które wykazują wysokie powinowactwo (~10 nM) i niskie odpowiedzi (**1b-2'**) lub brak (**1d-2'**) przyłączone linkerem typu L1. Różnice można by wyjaśnić z różnych pozycji zadokowania znacznika FMR względem całego liganda, tj. np. w obrębie kieszeni wiążącej, na skraju lub poza nią. Porównując odpowiedzi dla analogów TMGpppG z różnymi FMR, najlepszą zaobserwowałem dla związku **1a-2'** z DMHBI (ok. 7-krotny wzrost dla wzbudzenia 390 nm i 11-krotny dla 490 nm). Następny w kolejności jest analog z HEMABI **1c-2'** z jedynie 2,8-krotnym wzrostem. Największe zmiany F_m/F_0 w badaniach *in vitro* świadczą o „przełączalnych” właściwościach fluorescencyjnych sondy i dobrym zadokowaniu struktury FMR i stanowi to główne kryterium wyboru potencjalnej sondy do badań komórkowych. Z kolei zmiany bezwzględne dF/dC mogłyby służyć wyłonieniu sond do badań mikroskopem konfokalnym, jednak takie wykorzystanie nie było w obszarze mojego zainteresowania i ta cecha nie stanowiła kryterium wyboru, chociaż warto zaznaczyć że tu najlepszym kandydatem okazał się zupełnie inny związek, **1d-3'** (>450 a.u./μM), wykazujący umiarkowane powinowactwo do snurportyny.

Tabela 10 Wyznaczone K_D dla kompleksów TMG kap-FMR-snurportyna (FQT) oraz krotności wzrostu fluorescencji (F_m/F_0 , wysycanie liganda białkiem) z długościami fali emisji dla F_m (związany/wysycony)

Związek	K_D (nM)	F_m/F_0 (λ_{exc1})	λ_{em1} for F_m (nm)	dF/dc ** [a.u./ μ M]	F_m/F_0 (λ_{exc2})	λ_{em2} for F_m (nm)	dF/dc ** [a.u./ μ M]
TMGpppG	1111 $\pm$ 74	-	-	-	-	-	-
1a-2'	10,2 $\pm$ 1,3	5,70	542	45,2	11,33	545	65,3
1a-3'	536,8 $\pm$ 67,0	2,42*	533	4,4	3,16	542	5,9
1b-2'	9,1 $\pm$ 1,2	2,23*	591	1,3	-	-	-
1b-3'	141,5 $\pm$ 6,0	1,96*	578	1,4	-	-	-
1c-2'	10,3 $\pm$ 1,2	2,80	527	299,8	-	-	-
1c-3'	369 $\pm$ 45	2,01*	530	153,5	-	-	-
1d-2'	14,2 $\pm$ 1,1	1,00	615	0	-	-	-
1d-3'	149,3 $\pm$ 6,5	1,00	613	0	-	-	-
1e-2'	25,5 $\pm$ 0,9	2,66	529	148,6	-	-	-
1f-2'	404 $\pm$ 12	1,31*	504	92,6	-	-	-
1f-3'	353 $\pm$ 47	2,87*	502	463,3	-	-	-
2a-2'	9,6 $\pm$ 1,3	10,33	542	36,6	12,39	545	82,4
2a-3'	392 $\pm$ 43	2,29	533	4,7	3,16	542	8,8
3a-2'	13,7 $\pm$ 1,5	7,24	539	51,8	7,80	545	57,3
3a-3'	612 $\pm$ 95	2,79	529	8,8	3,76	544	11,5
3c-2'	9,11 $\pm$ 0,91	3,12	531	299,4	-	-	-
3c-3'	559 $\pm$ 100	1,45	523	61,6	-	-	-
4a-2'	1818 $\pm$ 397	2,89*	538	9,6	5,32	541	3,7
4a-3'	709 $\pm$ 70	2,30*	529	4,2	ND	ND	ND
4c-2'	1517 $\pm$ 247	1,07*	526	ND	-	-	-
4c-3'	1685 $\pm$ 336	1,18*	525	8,9	-	-	-
5a-2'	10,6 $\pm$ 1,7	6,88	543	30,7	12,45	545	
5a-3'	196 $\pm$ 18	2,39*	534	2,8	3,62	544	
5c-2'	5,72 $\pm$ 0,39	3,57	526	287,3	-	-	-
5c-3'	194,9 $\pm$ 8,6	1,87	529	50,9	-	-	-
6a	415,2 $\pm$ 8,8	1,54*	534	9,6	4,93	539	7,7
6c	437 $\pm$ 38	1,20*	526	5,8	-	-	-
7a-2'	292 $\pm$ 27	2,80	536	8,3	ND	ND	
7a-3'	543 $\pm$ 103	2,28	532	4,4	3,25	540	6,0
7b-2'	85,9 $\pm$ 7,4	4,87	590	6,9	-	-	-
7b-3'	121,2 $\pm$ 4,6	9,08	590	13,6	-	-	-
8a-2'	3030 $\pm$ 275	1,92*	532	4,0	1,00	541	6,8
8a-3'	362 $\pm$ 49	2,06*	535	9,9	1,82	543	ND
8b-2'	>10000	1,07*	593	2,1	-	-	-
8b-3'	122 $\pm$ 11	1,68*	592	0,2	-	-	-

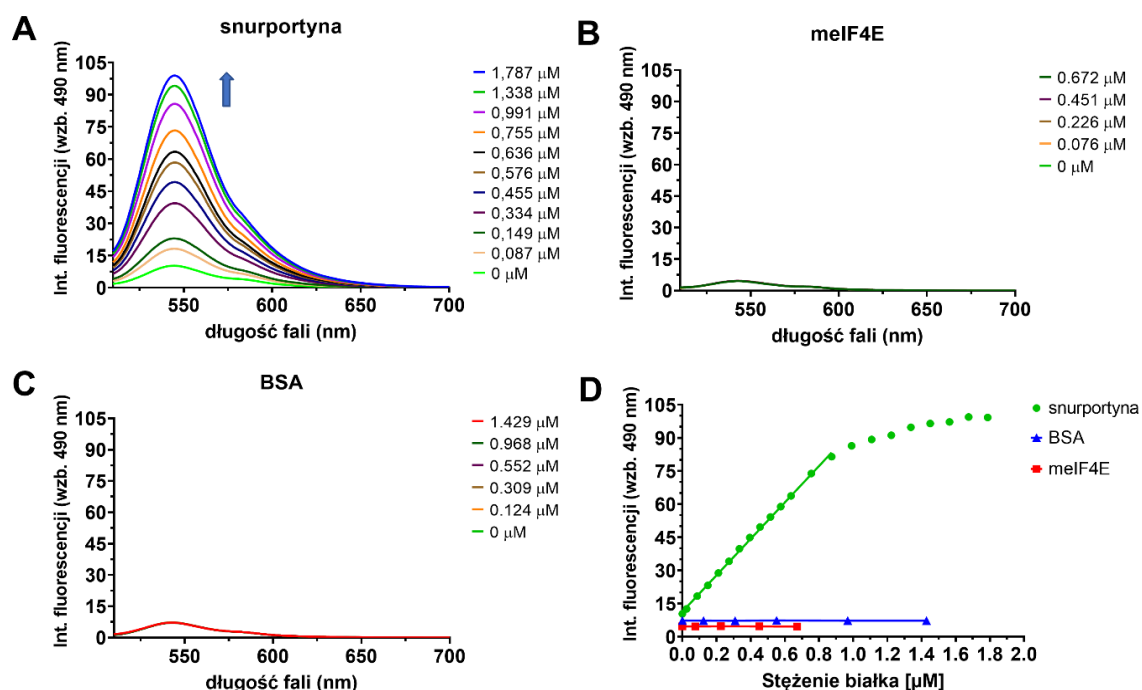
Tabela 10 Ciąg dalszy...

9a	4540 ± 579	1,11*	533	9,6	1,12	544	1,8
9b	620 ± 33	5,21*	588	27,7	-	-	-
9g	ND	1,60	492	ND	-	-	-
11a-2'	386 ± 43	1,38*	543	0,7	3,18*	545	0,6
11a-3'	327 ± 31	1,35*	542	0,7	3,20*	542	0,7
11c-2'	697 ± 36	1,48*	523	29,3	-	-	-
11c-3'	536 ± 54	1,33*	521	19,7	-	-	-

ND – nie zmierzono; * ligand nie został wysycony białkiem, podana wartość jest dla największego osiągniętego stężenia snurportyny; ** współczynnik a prostej z regresji liniowej

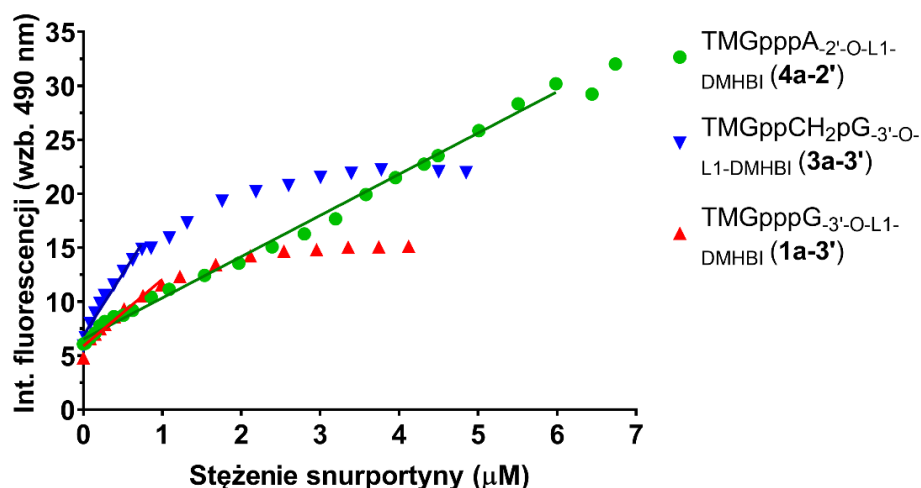
Wydłużenie mostka fosforanowego przyniosło korzyść zarówno w powinowactwie do snurportyny jak i odpowiedzi sondy na wiązanie ze snurportyną. Analog **5a-2'** dał 12-krotny wzrost sygnału przy wzbudzeniu 490 nm. Tetrafosforanowe analogi z FMR w pozycji 3'-O (**5a-3'**, **5c-3'**) z wykazywały słabe odpowiedzi lub wcale, mimo większego powinowactwa niż korespondujące analogi trifosforanowe **1a-3'**, **1c-3'** (tabela 10).

Wykonałem analogiczny eksperyment dla **2a-2'**, silnego liganda snurportyny, z dwoma innymi białkami: albuminą surowicy bydlęcej (BSA) oraz melf4E i wykazałem specyficzność odpowiedzi względem snurportyny. BSA jest białkiem niezwiązanym z metabolizmem RNA, lecz wykazuje duże spektrum wiązania związków (bio)organicznych. Podczas miareczkowania liganda **2a-2'** białkiem BSA lub melf4E nie obserwowałem przyrostu intensywności fluorescencji pochodzącej od FMR (rys. II. 71), co oznacza tyle, że białko nie związało się ze związkiem lub wiązanie jest zbyt słabe i nieznaczące, zaś w przypadku snurportyny obserwowałem aż 12,5-krotny wzrost intensywności fluorescencji po związaniu ze snurportyną.



Rys. II. 68 Nałożone widma emisji dla koniugatu TMGSpppG_{2'}-O-L1-DMHBI (**2a-2'**) miareczkowane ze A. snurportyną, B. mysim eIF4E, C. BSA oraz D. nałożone zależności int. fluorescencji od stężeń białka

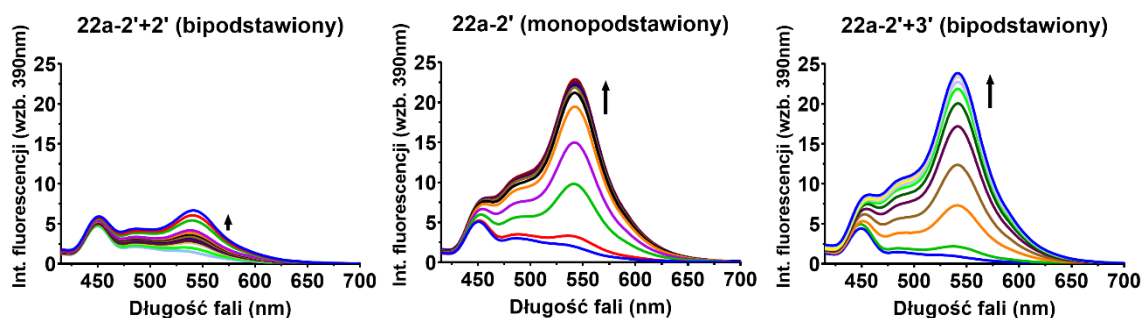
Zaobserwowałem również, że analogi z adenozyzną i DMHBI w pozycji 2' zachowują się początkowo słabiej niż analogi z guanozyzną i DMHBI w pozycji 3' (mniejszy współczynnik nachylenia, rys. II. 72), jednak mają zdecydowanie większy zakres liniowości (do ok. 8 μM). Ich odpowiedzi F_{max}/F_0 są zatem większe niż dla izomerów 3' z guanozyzną i są lepszymi sondami, choć nadal słabszymi pod tym kątem od izomerów 2' z guanozyzną.



Rys. II. 69 Porównanie odpowiedzi sond z adenozyzną i DMHBI w pozycji 2' oraz z guanozyzną i DMHBI w pozycji 3' na wiązanie ze snurportyną

II.7.3.1 Miareczkowania sond GpppG podwójnie znakowanych DMHBI lub HEMABI

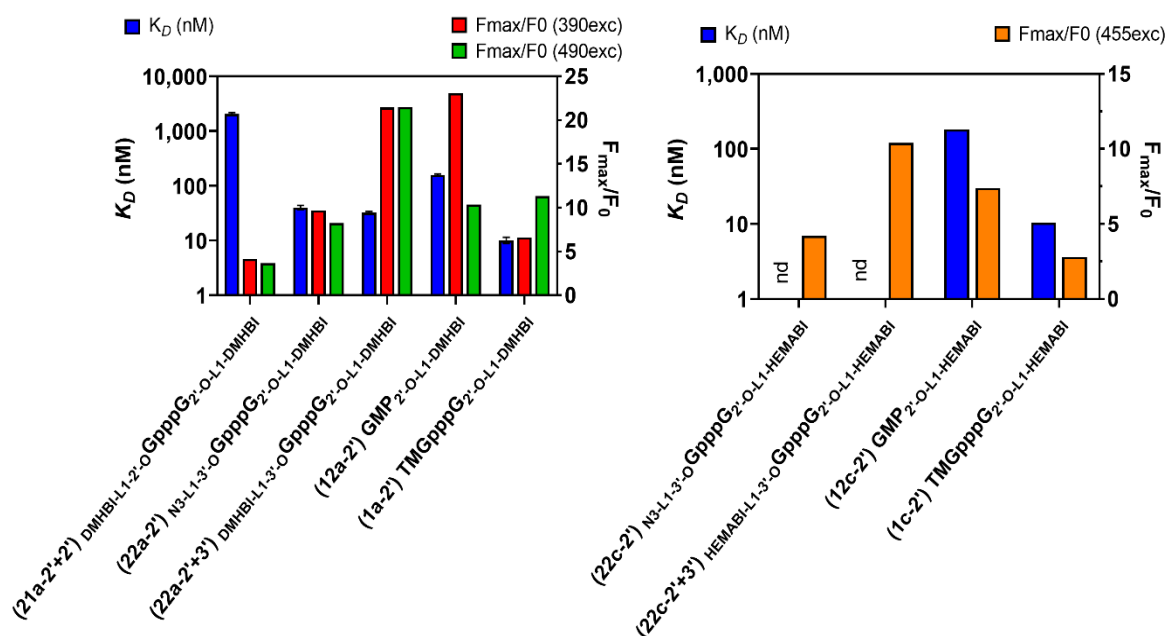
Zsyntezowałem również trzy analogi GpppG, które można rozważać jako analogi niekanonicznego kapu, z dwoma znacznikami FMR (**21a-2'+2'**, **22a-2'+3'**, **22c-2'+3'**) oraz dwa analogi z jednym takim znacznikiem (**22a-2'**, **22c-2'**) i zbadałem również ich odpowiedzi ze snurportyną (GpppG z DMHBI, rys. II. 73). Wyniki porównałem z analogami GMP- i TMGpppG-2'-O-L1-FMR, (rys. II. 74), by móc ocenić wymierną korzyść dla takich analogów. Zaobserwowałem znacznie wyższe odpowiedzi dla koniugatów podwójnie znakowanych z DMHBI czy HEMABI (z wyjątkiem konfiguracji 2'+2' dla którego odpowiedzi były bardzo słabe), zarówno względem pojedynczo znakowanego GpppG analogu, jak i względem **12a-2'/c-2'** dla których to odpowiedzi ze snurportyną były największe wśród pojedynczo znakowanych nukleotydów.



Rys. II. 70 Porównanie widm emisji ze snurportyną mono- i bipodstawionych analogów GpppG z DMHBI, wzbudzone 390 nm

Największym sukcesem jest związek GpppG z dwoma DMHBI w konfiguracji 2'+3' (**22a-2'+3'**), dla którego odpowiedź F_m/F_0 przy wzbudzaniu 490 nm wynosi ponad 21 i jest największa ze wszystkich badanych związków. Odpowiedź dla długości fali wzb. 390 nm jest na tym samym

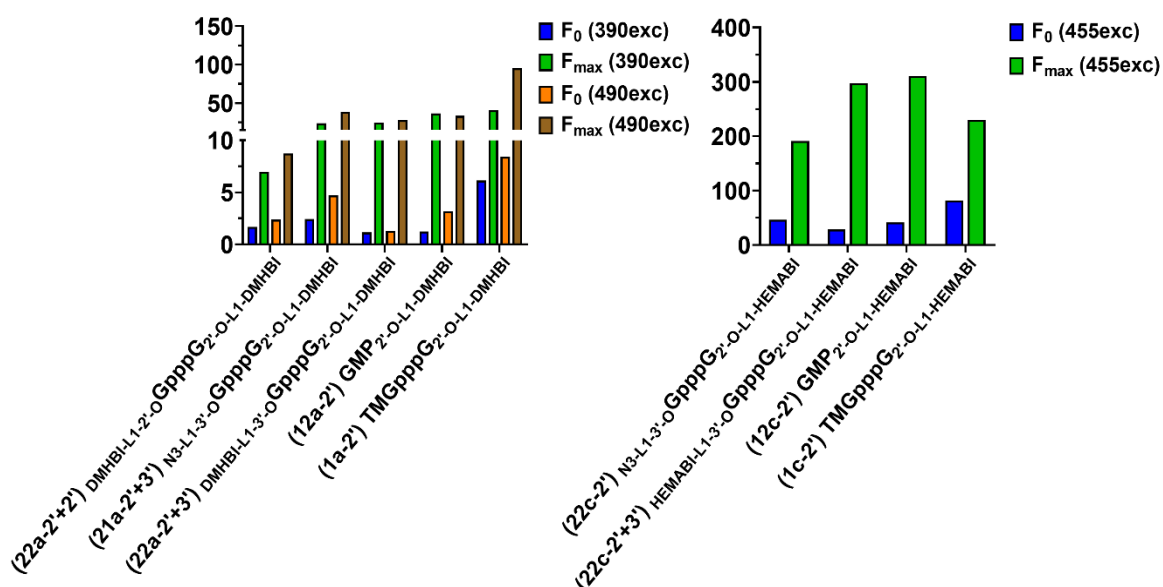
poziomie co dla analogu GMP z pojedynczym DMHBI. Dla porównania większość sond nawet wielokrotnie znakowanych opisywanych w literaturze wykazuje odpowiedzi na poziomie 2-4-krotnego wzrostu intensywności sygnału, np. 31-mer ssDNA zawierający 4 jednostki modyfikowanego z DMHBI lub DFHBI wykazuje 2-3-krotny wzrost z białkiem SSB²⁶⁰ (ang. Single Strand Binding protein), gdy są w stosunku 1 do 1, podczas gdy dla dinukleotydu **22a-2'+3'** ze snurportyną jest to wzrost 20-krotny w tych samych warunkach (1:1). W tej samej publikacji wykazano jedynie 2,5-krotny wzrost dla 50-meru dsDNA (dwuniciowego DNA) pex^{p53} zawierającego aż 11 jednostek C^{DFHBI} lub C^{DMHBI} (FMR w pozycji 5 cytozyny) z białkiem p53 (stosunek białko:ligand = 1:1). To porównanie podkreśla, że dinukleotydowe koniugaty GpppG znakowane DMHBI/HEMABI są silnymi sondami dla snurportyny.



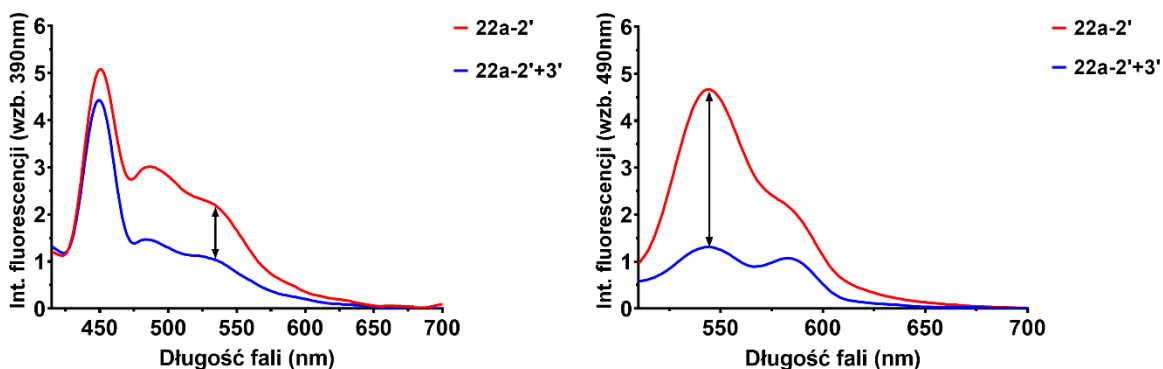
Rys. II. 71 Porównanie odpowiedzi podwójnie i pojedynczo znakowanych analogów GpppG z DMHBI (górze) i HEMABI (dół) z GMP_{2'}-O-L1-FMR i TMGpppG_{2'}-O-L1-FMR

Udowodniłem, że podwójne znakowanie przynosi korzyść w postaci większych mierzalnych różnic między formą związaną i niezwiązaną. Sugeruje to, że wprowadzenie kolejnego GFP-podobnego znacznika do analogu TMGpppG również powinno być korzystne, o ile ten FMR zostanie wprowadzony w pozycje 3'-O-TMGuo i 2'-O-Guo, które stabilizują oddziaływania ze snurportyną.

Przyjrzałem się również intensywnościom fluorescencji wolnych ligandów (F_0) i wysyconych snurportyną (F_{max}) (rys. II. 75). Okazuje się, że analogi TMGpppG mają znacznie większe wartości w stanie niezwiązanym, a podobne w stanie związanym ze snurportyną co niekapowane analogi. Wskazuje to, że wygaszanie fluorescencji przez m⁷guaninę nie jest czynnikiem odpowiedzialnym za gorsze odpowiedzi sond w analogach TMGpppG względem GMP czy GpppG (porównywany pojedynczo znakowany). Potwierdza się to również w zależnościach wolnych ligandów od pH (rozdz. II. 5. 1), gdzie wydajności kwantowe analogów TMGpppG również są większe od analogów GMP szczególnie w wyższych pH.



Rys. II. 72 Porównanie wartości intensywności fluorescencji dla wolnego liganda (F_0) i wysyconego snurportyną (F_{max})

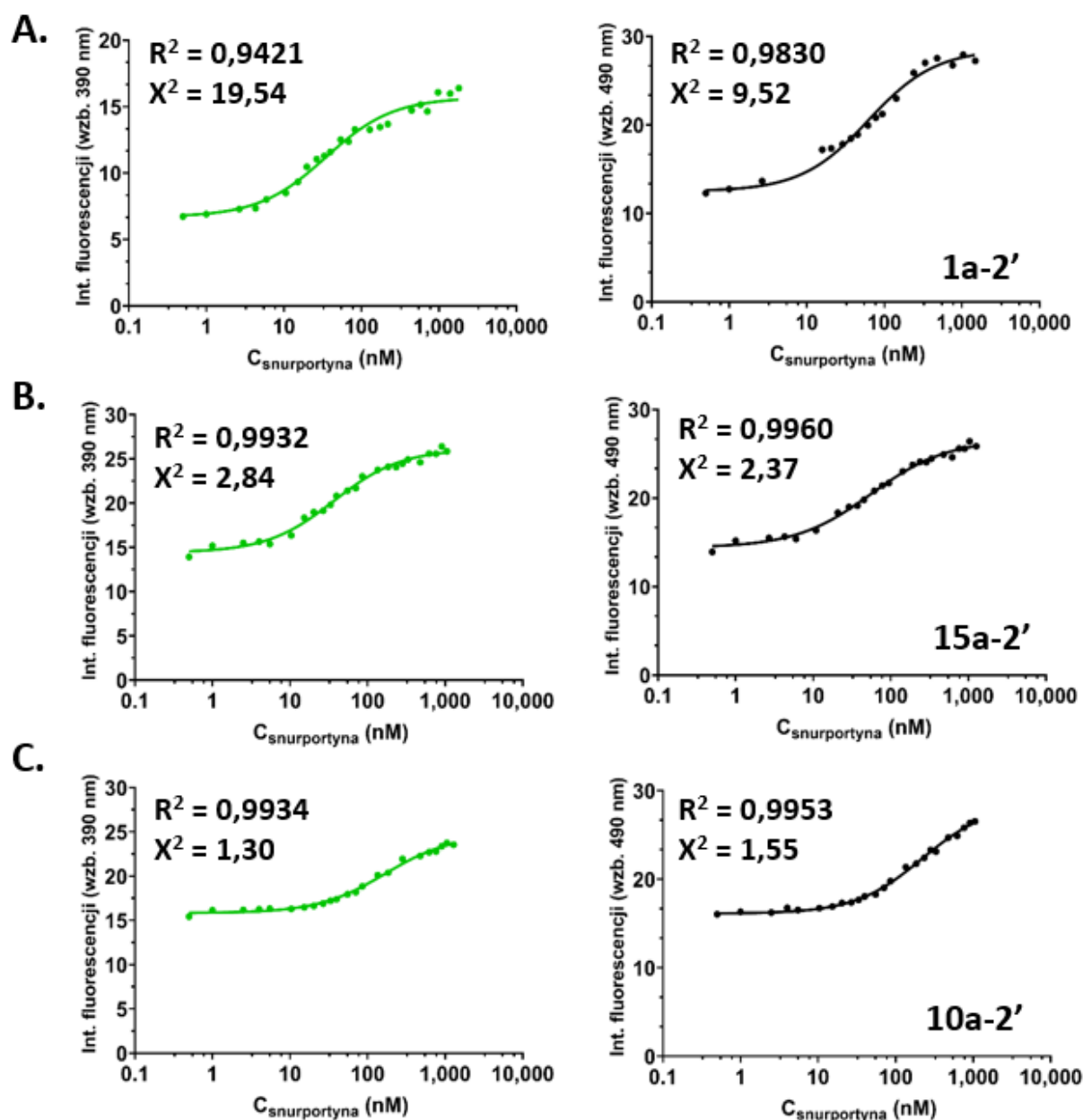


Rys. II. 73 Porównanie widm emisji niezwiązanych koniugatów analogu GpppG z DMHBI znakowanego podwójnie (22a-2'+3') i pojedynczo (22a-2') w tych samych warunkach

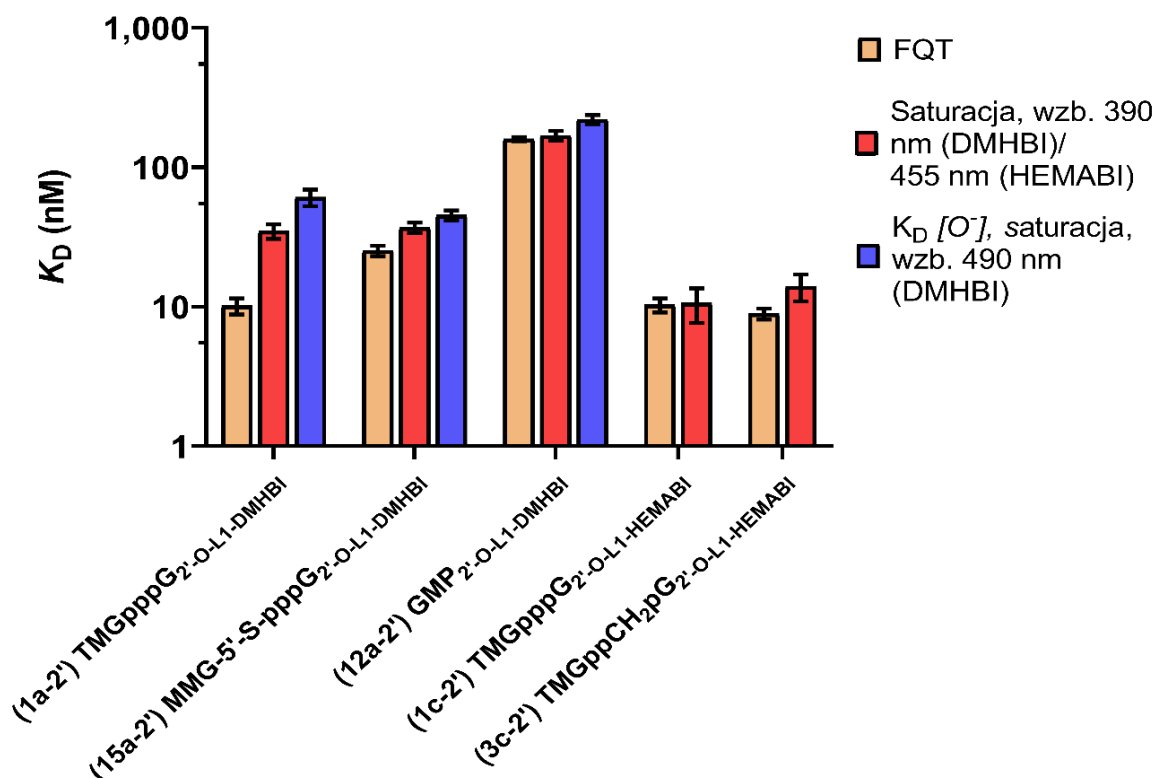
W tych samych warunkach i stężeniach sondy podwójnie znakowane w stanie niezwiązanym (F_0) wykazują dwukrotnie mniejsze intensywności fluorescencji (rys. II. 76). Intensywności fluorescencji w stanie wysyconym snurportyną są takie same lub bardzo zbliżone. Wynik ten pozwala mi przypuszczać, że w stanie niezwiązanym następuje dynamiczne wygaszanie fluorescencji poprzez zderzenia cząstek. W trakcie wiązania ze snurportyną, konformacja sondy się usztywnia blokując rotację i przywracając fluorescencję.

Dla wybranych silnych ligandów snurportyny (znakowanych w pozycji 2'-O-Guo) wykonałem analogiczne doświadczenia, tym razem dla znacznie mniejszych stężeń, poniżej oczekiwanego K_D (w idealnej sytuacji dla stężenia liganda 10x mniejszego od K_D). To odwrócone miareczkowanie odzwierciedla ten sam proces tworzenia kompleksu ligand-białko co w przypadku FQT. Do tych badań wykorzystałem sondy z DMHBI i HEMABI, jako że zmiany intensywności o-HBI w tak małych stężeniach uniemożliwiały uzyskanie satysfakcjonujących danych. Do punktów pomiarowych dopasowałem modelowe krzywe agonist vs response, four

parameters i podałem parametry R^2 i chi-kwadrat (rys. II. 78) oraz wyznaczyłem stałe K_D i porównałem je z wynikami z FQT (rys. II. 79). W przypadku sond DMHBI są to aż trzy możliwe metody (FQT, saturacja ze wzbudzaniem 390 nm oraz 490 nm).



Rys. II. 74 Przykładowe krzywe miareczkowań koniugatów z DMHBI snurportyną: A. 10 nM **1a-2'**, B. 20 nM **15a-2'** oraz C. 20 nM **12a-2'**



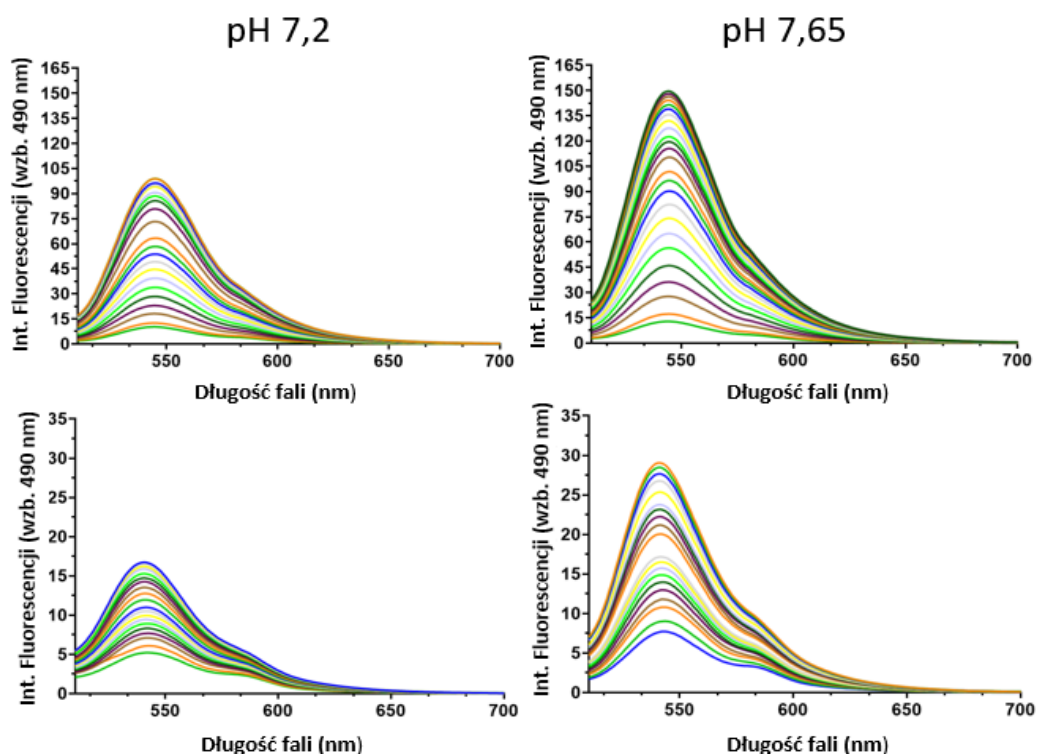
Rys. II. 75 Porównanie stałych dysocjacji uzyskanych z różnych metod miareczkowań: FQT i saturacji liganda snurportyną (w przypadku DMHBI wykorzystałem obie długości fali wzbudzenia: 390 i 490 nm)

Metoda 2 (saturacja ze wzb. 390/455 nm) dała wyniki o wysokiej zgodności z wynikami FQT, mimo, że w dwóch przypadkach dla związków z DMHBI otrzymałem większe błędy pomiarowe. Koniugaty z HEMABI wykazywały większe int. fluorescencji a krzywe były lepiej dopasowane. Metoda 3 (saturacja ze wzb. 490 nm) wykazała zbieżne K_D dla takich związków jak **12a-2'** czy **15a-2'**, chociaż w przypadku TMG kapowanych koniugatów uzyskałem rozbieżne wyniki. Warto tu zaznaczyć, że ta metoda wizualizuje jedynie emisję pochodzącą od fenolanu (zdeprotonowanej formy DMHBI) i wyznaczone $K_D [O^-]$ jest tylko cząstkowym, dla tej konkretnej formy FMR. Różnice mogą wynikać również z zastosowanego stężenia liganda, w przypadku GMP czy m^7G kapu są one mniejsze niż lub bliskie K_D (FQT), a w przypadku TMG kapu stężenie jest równe co do K_D (10 nM). Niemniej, wykazałem użyteczność miareczkowań z blokowaniem mechanizmu TICT (saturacja) i wykorzystaniem FMR jako metod komplementarnych do miareczkowania FQT. To podejście ma dodatkową korzyść związaną z ograniczeniami ze względu na ilość znakowanego analogu kapu – odwrotnie niż w metodzie FQT, w metodzie wysycania liganda białkiem to ilość białka jest ograniczająca, natomiast wymaga niewielkich ilości znakowanego związku, co może być szczególną zaletą dla fluorescencyjnie znakowanych, syntetycznych fragmentów mRNA.

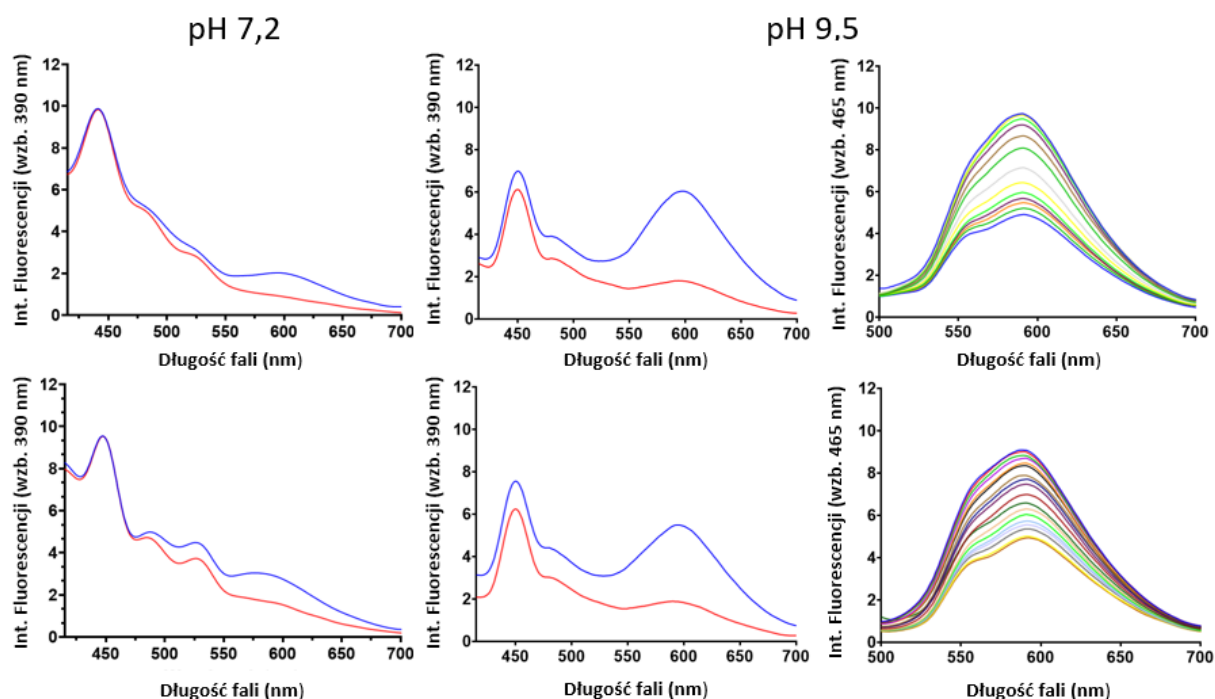
II.7.4 Zależności odpowiedzi sond w miareczkowaniu snurportyną od pH

Zbadałem wpływ pH na odpowiedzi sond z DMHBI i o-HBI w miareczkowaniu snurportyną. Miareczkowania przeprowadziłem analogicznie stosując bufor: a) HEPES pH 7,65, b) TrisHCl pH 8,9 i c) TrisHCl pH 9,5 (szczegóły część eksperymentalna). Miareczkowania przeprowadziłem dla 7 różnych ligandów z TMG kapem: **1a-2**, **2a-2'**, **2a-3'**, **3a-2'**, **4a-2'**, **1b-2'** i **1b-3'**. Dla

koniugatów z DMHBI wykonałem miareczkowania w buforach o pH 7,65 lub 8,9 (rys. II. 80), zaś dla o-HBI w buforze o pH 9,5 (rys. II. 82)



Rys. II. 76 Widma emisji TMG-5'-S-pppG-2'-O-L1-DMHBI (**2a-2'**, góra) oraz TMG-5'-S-pppG-3'-O-L1-DMHBI (**2a-3'**, dół) ze snurportyną w buforze HEPES pH7,2 (lewo) oraz 7,65 (prawo) wzbudzane długością 490 nm

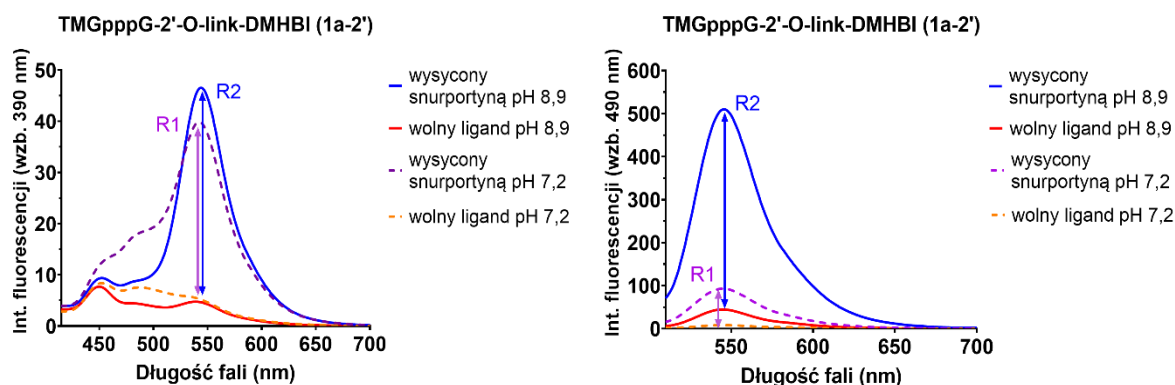


Rys. II. 77 Widma emisji TMGpppG-2'-O-L1-o-HBI (**1b-2'**, góra) oraz TMGpppG-3'-O-L1-o-HBI (**1b-3'**, dół) ze snurportyną w buforze HEPES pH 7,2 (lewo) oraz TrisHCl o pH 9,5 (prawo) wzbudzane dla 390 nm oraz widma emisji dla wzbudzania 465 nm

Eksperymenty te pokazały, że większe pH otoczenia prowadzi do uzyskania większych odpowiedzi ze snurportyną. Mimo, że intensywność fluorescencji rośnie dla wolnego liganda (F_0), to rośnie również dla kompleksu ze snurportyną i to w większym stopniu (przyrost dla $F_{\max}$ jest większy). Powoduje to, że odpowiedzi $F_{\max}/F_0$ również są większe.

Na podstawie eksperymentu z sondami z *o*-HBI zaobserwowałem, że a) pojawia się drugie pasmo wzbudzenia o długości 465 nm, które odpowiada absorpcji formy fenolanowej i które jest silniejsze w tym pH (większe intensywności fluorescencji ze względu na większy udział formy zjonizowanej), b) odpowiedź rozumiana jako krotność wzmocnienia sygnału dla wzbudzenia 390 nm jest większa niż dla wzbudzenia 465 nm, c) odpowiedź przy wzb. 390 nm wzrosła jedynie nieznacznie (3,2 dla pH 9,5 vs 2,2 dla pH 7,2) dla izomeru 2' mimo dużej różnicy pH. Odpowiedzi **1b-2'** i **1b-3'** w wyższym pH nadal są słabe, pomimo że izomer 2' jest znacznie silniejszym ligandem dla snurportyny. Pomimo, że nie ma to znaczenia biologicznego (niefizjologiczne pH) wykazałem, że snurportyna wiąże TMG kap *in vitro* również w pH 9,5 a dodatkowo uwidoczniło się nowe pasmo wzbudzenia dla koniugatów z *o*-HBI, które w pH 7,2 jest niewidoczne ze względu na występowanie związku w całości w formie sprotonowanej.

Zmiareczkowałem również ligand z DMHBI **1a-2'** ze snurportyną w pH 8,9 (rys. II. 83). Okazuje się, że odpowiedzi rosną tylko do pewnego progu, np. odpowiedzi przy wzbudzeniu 490 nm nie różnią się, mimo, że same intensywności fluorescencji różnią się znacząco. Z kolei odpowiedzi przy wzbudzeniu 390 nm różnią się i dla pH 8,9 są o 47% większe. Jedynie sonda z adenozyzną w pH 7,65 wykazała wysoką odpowiedź przy wzbudzeniu 490 nm, równą tym z guanozyzną, ale przy znacząco wyższych stężeniach snurportyny (8x)



Rys. II. 78 Widma emisji **1a-2'** bez i ze snurportyną w buforze HEPES pH 7,2 oraz TrisHCl o pH 8,9 wzbudzane przy 390 nm (lewo) oraz 490 nm (pravo); R1- odpowiedź dla pH 7,2, R2- 8,9

Porównałem zmiany krotności sygnału fluorescencyjnego w zależności od pH i zaobserwowałem, że wszystkie odpowiedzi sond są większe w większych pH a ich przyrost jest zależny od tego jaki to znacznik FMR oraz od tego jaką długością fali wzbudzałem kompleks (tab. 11). Obliczyłem procentowy przyrost w różnych pH zgodnie ze wzorem:

$$P [\%] = \frac{R_{pH2} - R_{pH1}}{R_{pH1}} * 100\%$$

Gdzie P – procentowy przyrost, R_{pH1} – odpowiedź sondy w niższym pH, R_{pH2} – odpowiedź sondy w wyższym pH

Przykładowo dla koniugatów z DMHBI i wzbudzenia 390 nm przyrost odpowiedzi jest większy niż dla wzbudzenia 490 nm (50% vs 25%, **2a-2'**, tab. 11). Dla sond z guanozyną przyrosty są podobne niezależnie od badanego izomeru, zaś sonda z adenozyzną wykazała większe przyrosty (100% i 50%), co może być raczej związane z tym, że w pH 7,20 nie osiągnęłam pełnego wysycenia związku snurportyną. Sondy z o-HBI wykazały wzrost o 50% w pH 9,5 względem odpowiedzi w pH 7,2 i zmiany są niezależne od izomeru. Podsumowując, w większych pH odpowiedzi ligandów z TMG kapem i DMHBI lub oHBI na wiązanie ze snurportyną są większe (do nawet 100% dla DMHBI).

Tabela 11 Przyrosty procentowe (P) odpowiedzi sond z DMHBI i o-HBI w wybranych pH

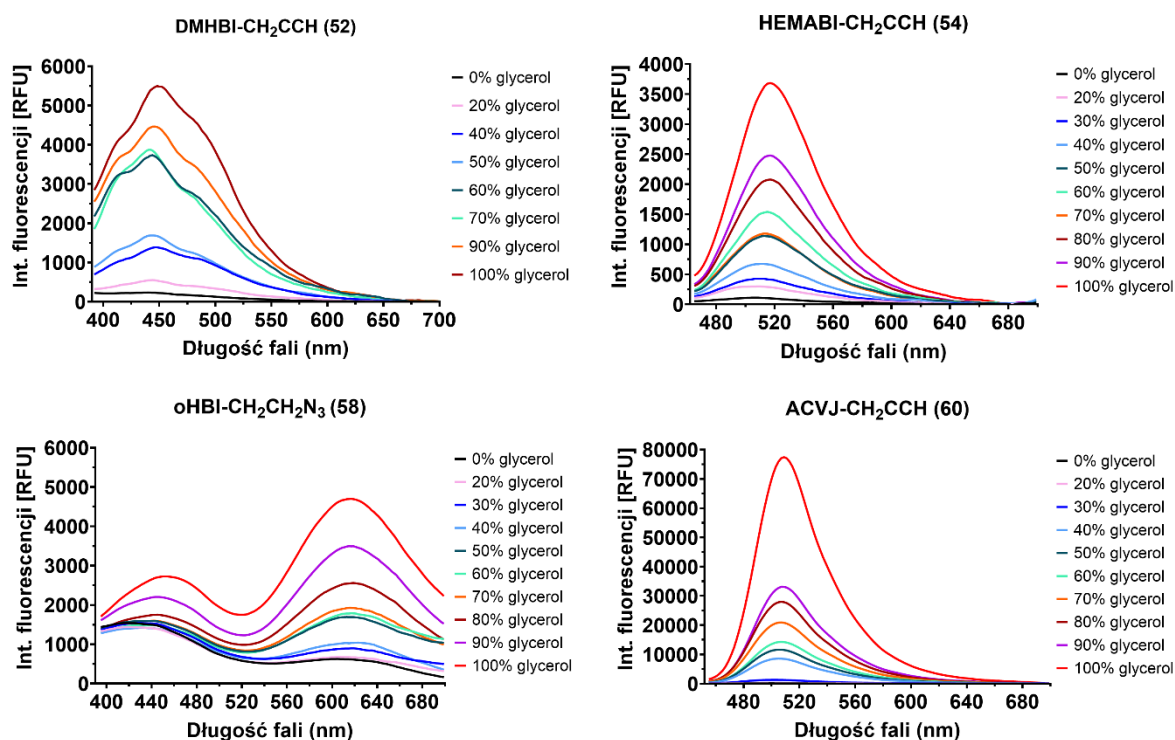
Związek		Przyrost % odpowiedzi w pH 8,90 ^a lub 7,65 względem pH 7,2		Przyrost % odpowiedzi w pH 9,5 względem pH 7,2
		Dla wzb. 390 nm	Dla wzb. 490 nm	Dla wzb. 390 nm
1.	TMGpppG-2'-O-L1-DMHBI (1a-2')	47% ^a	1% ^a	-
2.	TMGppCH ₂ pG-2'-O-L1-DMHBI (3a-2')	22%	16%	-
3.	TMG-5'-SpppG-2'-O-L1-DMHBI (2a-2')	54%	23%	-
4.	TMG-5'-SpppG-3'-O-L1-DMHBI (2a-3')	46%	18%	-
5.	TMGpppA-2'-O-L1-DMHBI (4a-2')	104%	46%	-
6.	TMGpppG-2'-O-L1-o-HBI (1b-2')	-	-	45%
7.	TMGpppG-3'-O-L1-o-HBI (1b-3')	-	-	47%

II.8. Inne właściwości nukleotydowych koniugatów FMR

FMR i ich koniugaty są reporterami zmian zachodzących w otoczeniu, które prowadzą w konsekwencji do restrykcji lub uwolnienia swobodnej rotacji segmentu donora elektronowego. Blokowanie rotacji może zachodzić na skutek zatłoczenia molekularnego, zwiększenia lepkości środowiska, w wyniku zmian patofizjologicznych tkanek (również zmiany nowotworowe), znaczącego spadku temperatury otoczenia (fizyczne unieruchomienie/ usztywnienie cząsteczki w rozpuszczalniku), zmian polarności otoczenia, w wyniku wiązania z inną makromolekułą (białka, DNA, lipidy), itp.

II.8.1 Wrażliwość na zmiany lepkości otoczenia

Zbadałam zależności emisji różnych pochodnych FMR od lepkości otoczenia. Do płytki 96-dółkowej odpipetowałam jednakowe objętości różnych układów glicerol-EtOH i jednakowe stężenia FMR, następnie z pomocą czytnika płytek wykonałam widma emisji w tych układach (rys. II. 85) a także odczytałam intensywności fluorescencji metodą Endpoint (skalując je względem dołka o największej spodziewanej intensywności). Na podstawie tych punktów (met. Endpoint) sporządziłam wykresy Förstera-Hoffmana (rys. II. 86) dla zależności odpowiednich logarytmów logF i logn. Dla Fluorescencyjnych Molekularnych Rotorów zależność ta powinna być liniowa, a współczynnik nachylenia świadczy o wrażliwości związku na zmiany lepkości otoczenia. Im większy współczynnik kierunkowy prostej, tym większa wrażliwość (lepszy sensor).



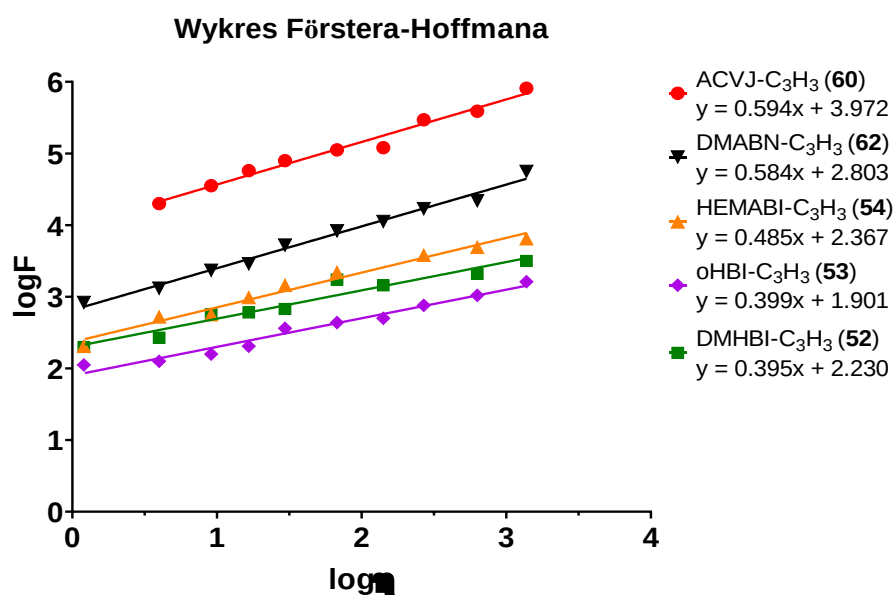
Rys. II. 79 Nałożone widma emisji pochodnych FMR w różnych układach glicerol-etanol

$$\text{Log}F = X \cdot \log \eta + B$$

X – wrażliwość na zmiany lepkości otoczenia,

B – jasność emisji wolnego FMR lub jego koniugatu

Wartość parametru X jest wewnętrzną cechą charakterystyczną dla danego FMR. Zgodnie z wiedzą teoretyczną, maksymalna jej wartość może wynosić 0,66, a dla znaczącej większości FMR mieści się w przedziale od 0,4 do 0,6²⁶⁴. Zebrane parametry przedstawiłem w tab. 12.



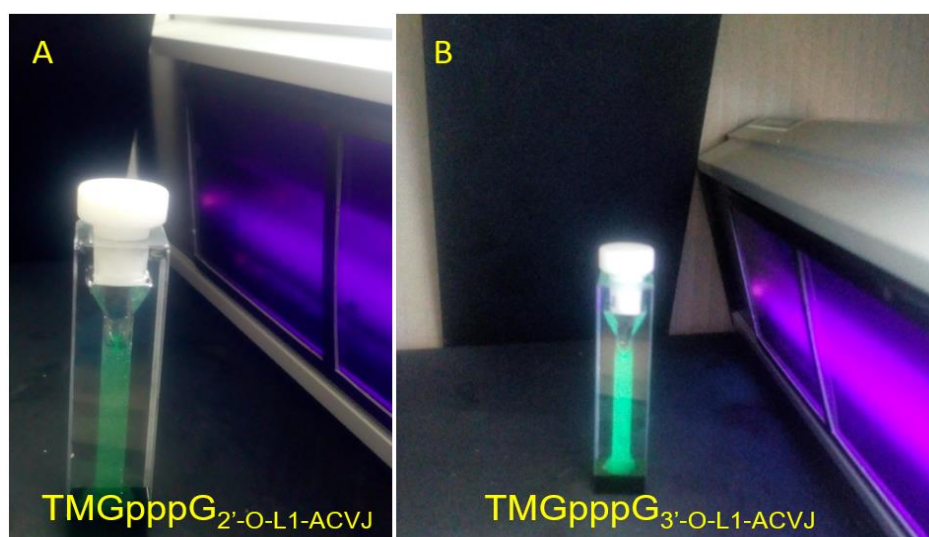
Rys. II. 80 Wykresy Förstera-Hoffmana dla propargilowych lub azydkowych pochodnych FMR

Tabela 12 Porównanie wrażliwości różnych FMR i TMG kap-FMR na zmiany lepkości środowiska oraz porównanie precyzji metody na podstawie danych literaturowych

Związek	Wyznaczona wrażliwość na zmiany lepkości, X (-)	Literaturowa wartość, niemodyfikowany FMR, X (-)	Jasność emisji FMR, B (-)
DMHBI-C ₃ H ₃ (52)	0,395	-	2,23
o-HBI-C ₃ H ₃ (53)	0,399	-	1,90
HEMABI-C ₃ H ₃ (54)	0,485	-	2,37
DMABN-CH ₂ CH ₂ N ₃ (62)	0,584 (pom1) 0,535 (pom2)	0,554 ²⁶¹ 0,535 ²⁶⁴	2,80
ACVJ-C ₃ H ₃ (60)	0,594 (pom1) 0,575 (pom2)	0,594 ²⁶¹ 0,543 ²⁶⁴	3,97
TMGpppG _{3'-O-L1} -ACVJ (1f-3')	0,517	-	3,41

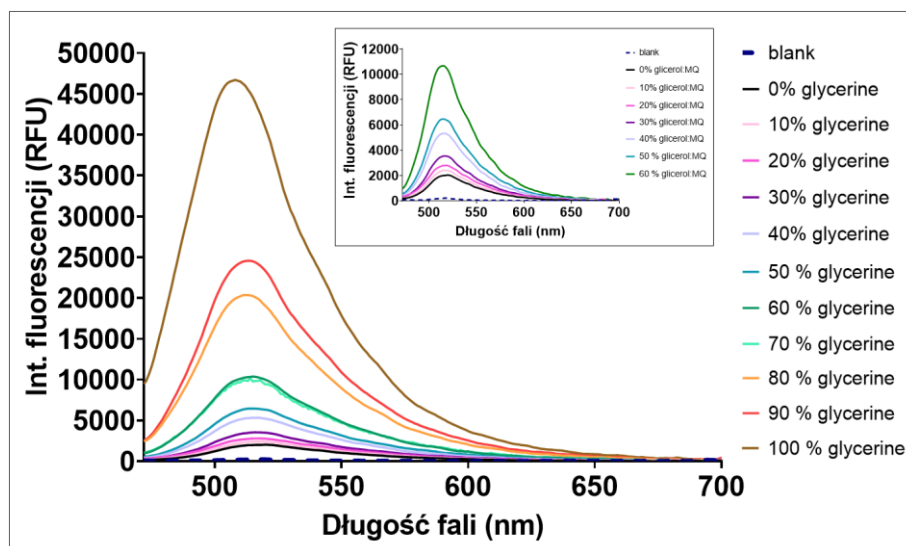
Najbardziej wrażliwym na zmiany lepkości układu jest pochodna julolidyny **60** (śr. wartość 0,584) i dimetyloaminobenzonitrylu **62** (średnia 0,560), a z tych dwóch, ACVJ **60** wykazuje większą jasność emisji (ang. brightness) w stanie wolnym, co jest korzystniejsze w badaniach komórkowych (większe odróżnienie od autofluorescencji komórek). DMHBI i o-HBI mają zbliżoną wrażliwość na zmiany lepkości środowiska i znacznie mniejszą od pozostałych (dolna granica).

Wzrost intensywności fluorescencji w lepkich układach można również zaobserwować gołym okiem, jeśli związek w glicerolu naświetli się falą z zakresu światła widzialnego (rys. II. 87). Wzbudziłem dwa koniugaty z ACVJ w poz. 2'- lub 3'-O-guanozyny (**1f-2'**, **1f-3'**), o jednakowych stężeniach, w 100% glicerolu i jak można zauważyć, lepszy efekt wizualny uzyskałem dla 3'-O-podstawionego związku, stąd postanowiłem go zbadać również ilościowo.



Rys. II. 81 Porównanie względne emisji światła widzialnego (ok. 530 nm) koniugatów z ACVJ: A. **1f-2'** oraz B. **1f-3'** w 100% glicerolu wzbudzanego światłem o długości 370 nm

Wykonałem analogiczny eksperyment na czytniku płytek dla **1f-3'** (rys. II. 88) i wyznaczyłem dla niego zależność $\log F = f(\log \eta)$ (rys. II. 86)



Rys. II. 82 Nałożone widma emisji dla TMGpppG_{3'}-O-L1-ACVJ (**1f-3'**) w różnych układach glicerol-woda

Okazuje się, że nukleotydowy koniugat **1f-3'** jest gorszym sensorem od wolnego ACVJ. Jego jasność emisji w czystym rozpuszczalniku jest również mniejsza. Udowodniłem na przykładzie analogu TMGpppG, że nukleotydowe koniugaty FMR wykazują liniową zależność logarytmów int. fluorescencji i lepkości i jest to główna cecha charakterystyczna dla tej klasy związków, w odróżnieniu od wzrostu int. fluorescencji w funkcji stężenia, które może być związane z różnymi zjawiskami np. z włączaniem/wyłączaniem FRET lub tworzenia się form ekscymerowych znacznika.

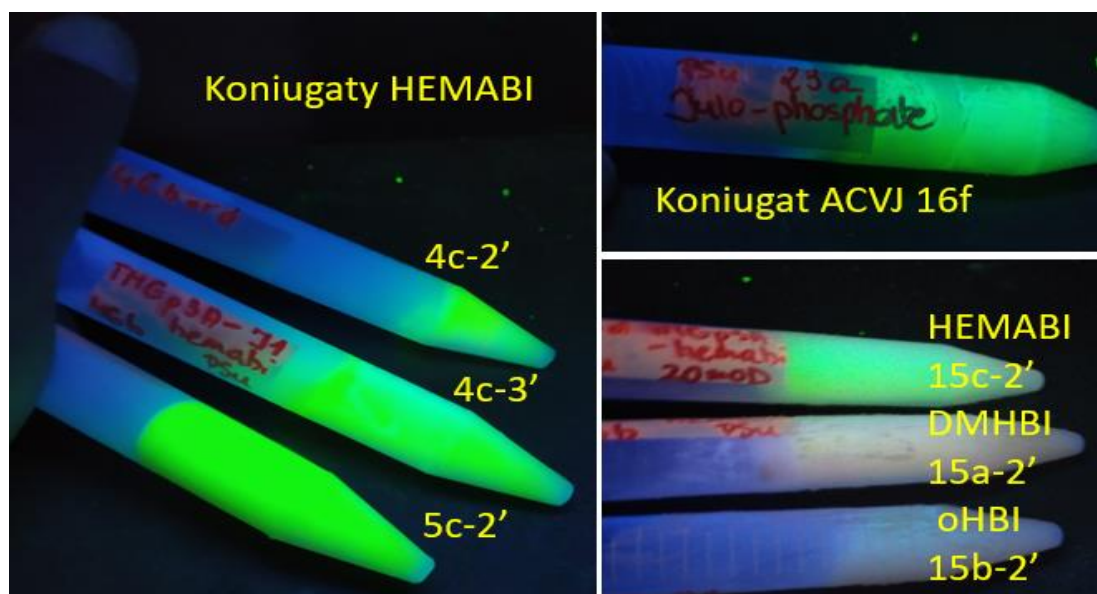
Zainteresowało mnie również, jakiemu przyrostowi intensywności w układach Gly-MQ odpowiada przyrost intensywności w eksperymentach ze snurportyną. Porównałem te dwie wielkości (tab. 13) i wyznaczyłem jakiemu układowi Gly-MQ odpowiada przyrost dla liganda wysyczonego snurportyną ($F_{\max}/F_0$). Okazuje się, że przyrost równy 5,8 dla miareczkowania snurportyną jest równoważny układowi pomiędzy 70 a 80% glicerolu w MQ (dla 70% przyrost intensywności wynosi 5, a dla 80% - 9,4). Wysoki przyrost z glicerolem jest oczekiwany, zważywszy, że ACVJ i CCVJ znane są w literaturze z zastosowania jako reportery zmian lepkości^{270, 276-278}, jednak duży przyrost ze snurportyną jest w pewien sposób zaskoczeniem, zważywszy, że **1f-3'** nie wykazuje zwiększonego powinowactwa do snurportyny (Tab. 13).

Tabela 13 Porównanie przyrostów w eksperymentach z glicerolem oraz ze snurportyną dla koniugatu TMGpppG_{3'}-O-L1-ACVJ (**1f-3'**)

	Glicerol	Snurportyna
Początkowa wartość int. fluorescencji	2191	40,4
Int. fluorescencji dla maksymalnego stężenia białka (wysycenie) lub maks. zawartości glicerolu (100%)	47132	232,2
Stosunek F_m/F_0	21,5	5,75

Niektóre koniugaty wykazały dodatkowo dużą wrażliwość na zmiany temperatury lub pH otoczenia (np. DMHBI, rozdz. II. 5. 1). Związki po zamrożeniu w ciekłym azocie przed etapem liofilizacji, naświetlałem lampą emitującą promieniowanie o długości fali 345 nm i wykonałem zdjęcia (rys. II. 90). Emisję można zaobserwować gołym okiem, tak jak to było w przypadku

zmian lepkości. Niektóre z FMR wykazywały większą obserwowalną fluorescencję i były to odpowiednio ACVJ, DMABI i HEMABI. Koniugaty DMHBI, *o*-HBI, *p*-NHBI nawet w bardzo niskich temperaturach i wysokich stężeniach nie wykazywały dobrze widzialnej fluorescencji w rozpuszczalnikach polarnych.

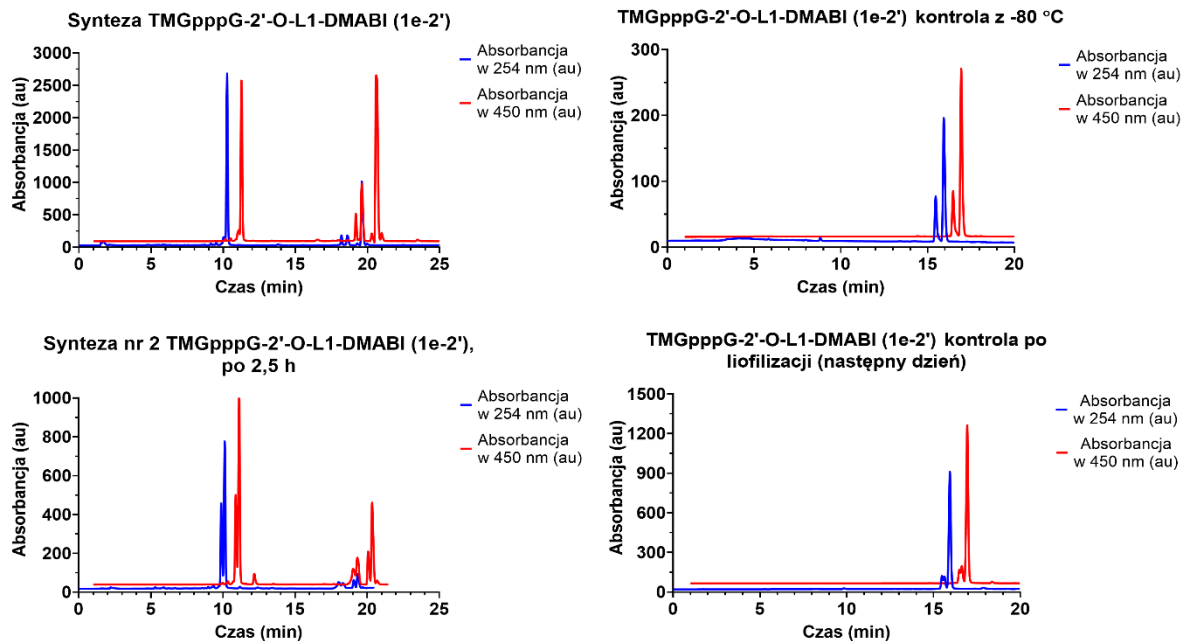


Rys. II. 83 Porównanie względnej emisji światła widzialnego dla różnych koniugatów FMR zamrożonych w wodzie MQ w temp. ciekłego azotu (-198 °C)

Przy wyższych stężeniach niekiedy emisja ta była słabsza co wiąże z efektem wygaszania stężeniowego (zbyt duże stężenie związku powoduje wygaszanie dynamiczne fluorescencji).

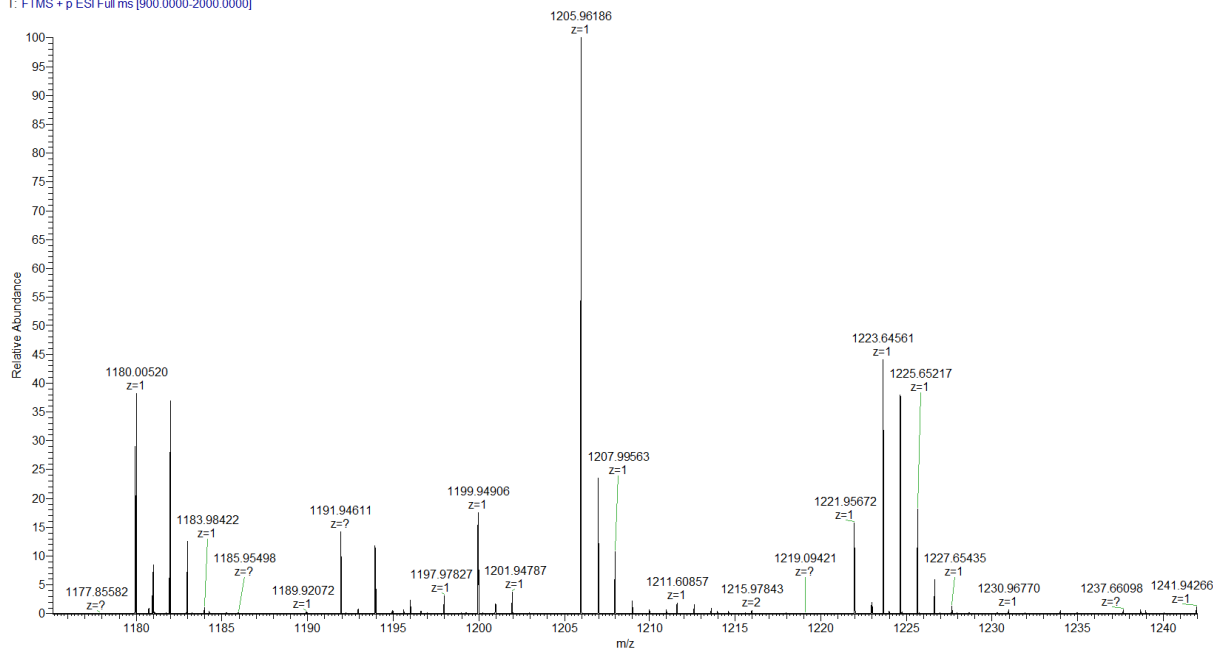
II.9. Stabilność koniugatów z FMR w wodzie MQ

Podczas analiz prowadzonych przez długi okres 4 lat odkryłem, że niektóre koniugaty FMR są niestabilne podczas przechowywania w temperaturze -20 °C lub -80 °C, a niektóre przekształcają się w mieszaninę regioizomerów 2' i 3' (rys. II. 91). Przed jakimikolwiek eksperymentami sprawdzano czystość próbek za pomocą RP-HPLC i stosowano wyłącznie związki o czystości >95%. Metoda ta wykazała, że wszystkie koniugaty *o*-HBI, *p*-NHBI i ACVJ ulegają degradacji w roztworach wodnych w ciągu pewnego czasu (rys. II. 92), wolniej w niższych temperaturach. Koniugaty DMHBI i 2'-HEMABI uznano za stabilne podczas przechowywania w roztworze wodnym nawet do 3 lat w temp. -80 °C, zaś wszystkie koniugaty 3'-O znakowane HEMABI oraz z DMABI (**1e-2'**) ulegają izomeryzacji (rys. II. 93) do mieszaniny w stosunkach odpowiednio ok. 60:40 (HEMABI) oraz 70:30 (DMABI) (izomer 3' do 2').



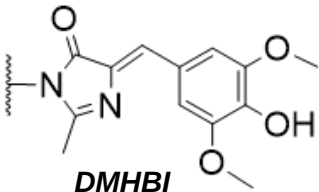
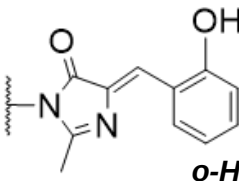
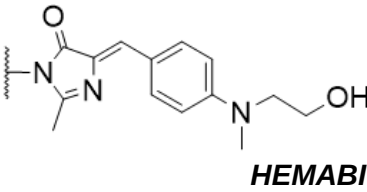
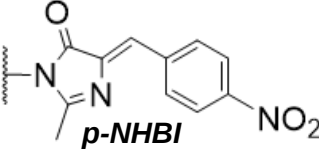
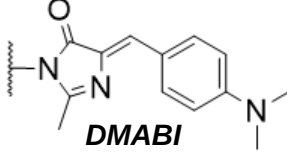
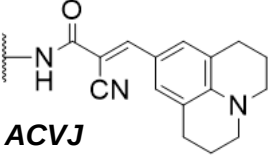
Rys. II. 84 Przykłady izomeryzacji produktu końcowego w trakcie reakcji lub przechowywania

220114_PSU_19 #368-589 RT: 3.22-5.16 AV: 222 NL: 4.44E3
T: FTMS + p ESI Full ms [900.0000-2000.0000]



Rys. II. 85 Wysokorozdzielcze widmo masowe (HRMS) dla oczyszczonego na HPLC związku TMGpppG-2'-O-L1-p-NHBI (1d-2') po tygodniu w zamrażarce (-20°C); szukana masa: 1210,2300, znalezione masy: 1205,9619 (100%), 1223,6456 (44%), 1180,0052 (38%)

Tabela 14 Podsumowanie właściwości biofizycznych ze snurportyną, spektralnych i stabilności nukleotydowych koniugatów z FMR w zależności od wprowadzonego FMR

 DMHBI	 o-HBI	 HEMABI
• Podwójna emisja (485, 540 nm), podwójne wzbudzenie (390, 490 nm), obie obserwowalne w pH 7,2 • Emisja zależna od pH • Bardzo stabilny w wodzie, do nawet 4 lat w -20°C i -80°C • Nie izomeryzuje • Szeroki zakres odpowiedzi oraz bardzo wysokie odpowiedzi ze snurportyną • Odpowiedzi silniejsze w układach o wyższych pH ($pK_a \sim 8,0-8,5$) • Niska jasność świecenia	• Podwójna emisja (590-605 nm), podwójne wzbudzenie (390, 465 nm), tylko jedna obserwowalna w pH 7,2 • Emisja zależna od pH • Niestabilny w wodzie, degraduje w przeciągu dni trzymany w -20°C; • Stabilny do 2 msc. w -80 °C • Większość odpowiedzi na podobnym poziomie • Bardzo silnie wygaszana fluorescencja w rozp. polarnych • Odpowiedzi nieznacznie silniejsze w układach o wyższych pH ($pK_a \sim 9,2$) • Odpowiedzi zależne od typu linkera przyłączonego do FMR	• Pojedyncza emisja • Niezależny od pH • Stabilny w wodzie (niezależnie od izomeryzacji produktu 3'-O-HEMABI) do 2 lat w -20°C i -80°C • Izomer 3' przechodzi szybko do mieszaniny 2'+3' ok. 50:50 lub 40:60 (dni/tygodnie) • Wykazuje umiarkowane/słabe odpowiedzi ze snurportyną • Umiarkowana jasność świecenia
 p-NHBI	 DMABI	 ACVJ
• Pojedyncza emisja • Niezależny od pH • Wysoce niestabilny w wodzie • Nie wykazuje żadnej odpowiedzi ze snurportyną • Najsilniej wygaszana fluorescencja w rozp. polarnych • Dobry sensor zmian polarności • Niska jasność świecenia	• Pojedyncza emisja • Niezależny od pH • Stabilny w wodzie do min. 3 msc w -20°C • Izomer 2' przechodzi szybko do mieszaniny 2'+3' o nieznanym składzie • Wykazuje umiarkowaną odpowiedź ze snurportyną • Dobry sensor zmian lepkości układu	• Pojedyncza emisja • Niezależny od pH • Wysoce niestabilny w wodzie • Wykazuje dobre odpowiedzi ze snurportyną • Dobry sensor zmian lepkości układu • Dobra jasność świecenia

II.10. Badania enzymatyczne koniugatów FMR i TMG kapowych dinukleotydów z enzymem hNudt16

Motywacja do badań

Ilość metod, które można wykorzystać do określenia siły oddziaływania ligand-enzym jest ograniczona. Przykładowo, dla ludzkiego enzymu Nudt16 nie można zastosować miareczkowania z wygaszaniem naturalnej fluorescencji tryptofanów, bo po prostu ich nie ma w kieszeni wiążącej. Porównując ze snurportyną, hNudt16 (3MGM w bazie PDB) jest małym białkiem o masie ok 22 kDa (snurportyna 41,6 kDa) i z 200 aa jedynie jeden to tryptofan. Podobnie ludzki enzym DcpS (50SYW w PDB) z 301 aa posiada tylko 2 tryptofany (0,7%). Co więcej, produkty degradacji wpływałyby na taką fluorescencję, zatem niemożliwe jest wyznaczenie K_D dla substratów enzymu.

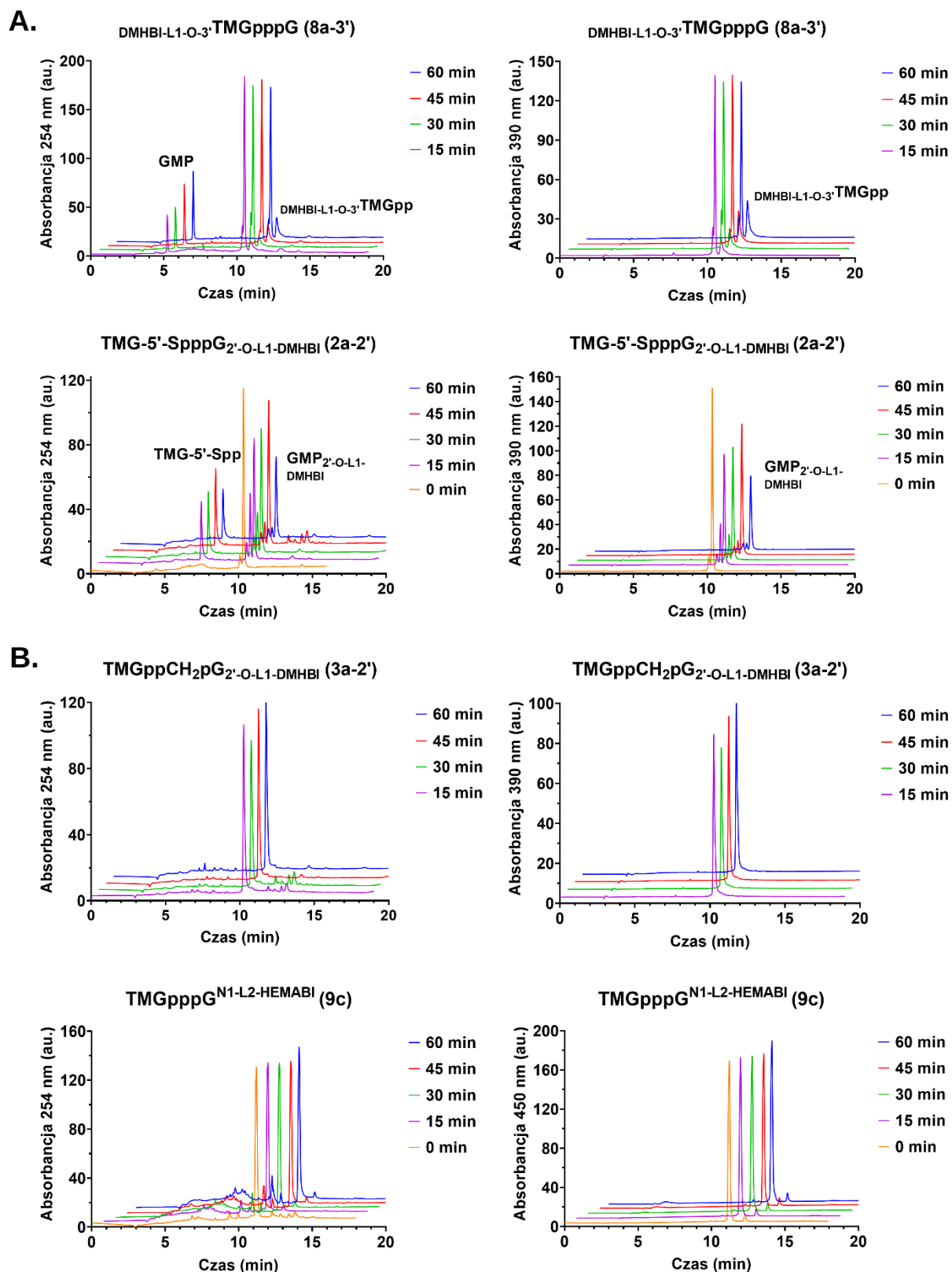
Badania z enzymem miały podwójny cel: a) określenie podatności na hydrolizę znakowanych fluorescencyjnie analogów TMG kapu, które mogłyby służyć jako sondy molekularne dla snurportyny *in vivo* oraz b) próby wyznaczenia stałych dysocjacji kompleksów z hNudt16 metodą saturacji liganda enzymem. Do oceny podatności na degradację wykorzystałem technikę RP-HPLC, zaś do próby określenia ilościowego tego wiązania wykorzystałem spektrofлуorymetrię i emisję znaczników FMR.

Odporność na degradację enzymatyczną to również jedno z głównych kryteriów użyteczności związków jako sondy molekularne w badaniach komórkowych. Po określeniu podatności syntetycznych dinukleotydowych analogów TMG kapu na degradację enzymem hNudt16, dla niehydrolizowanych przystąpiłem do próby selekcji potencjalnych inhibitorów z użyciem technik spektrofлуorymetrycznych, gdzie mierzyłem zmiany intensywności fluorescencji koniugatów analogu TMG kapu i znacznika fluorescencyjnego w trakcie miareczkowania enzymem. W przypadku hydrolizowanych związków podjąłem się wyznaczenia kinetyki reakcji (k_{degrad})

II.10.1 Podatność na hydrolizę enzymem hNudt16

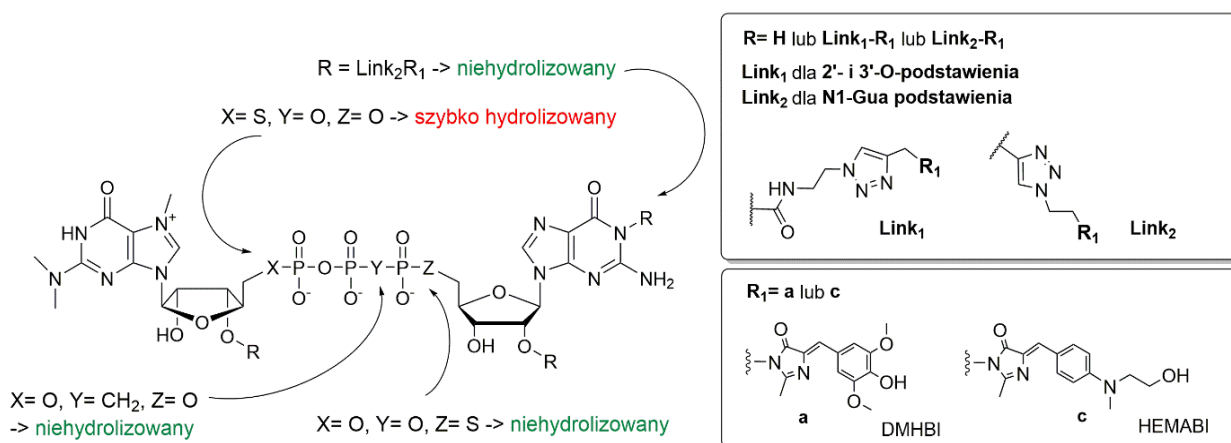
Do badań enzymatycznych wybrałem 12 związków zróżnicowanych strukturalnie pod kątem rodzaju modyfikacji oraz miejsca modyfikacji: TMGpppG (kontrola), TMGSpppG, TMGpppSG, **1a-2'**, **1a-3'**, **2a-2'**, **3a-2'**, **3c-2'**, **4a-3'**, **5c-2'**, **8a-3'**, **9c**. Do badań wybrałem głównie koniugaty z FMR w pozycji 2' guanozyny, gdyż te najsilniej wiązały się ze snurportyną. Jednym z celów eksperymentu było również uchwycenie różnic w szybkości degradacji regioizomerów 2' i 3' koniugatu FMR (**1a-2'**, **1a-3'**).

Reakcje prowadziłem stosując 10 μM roztwór liganda i 200 nM enzymu. Sprawdziłem również, że przy takich warunkach TMGpppG (kontrola) jest hydrolizowany w ok. 55% w 60 minut. Reakcje prowadziłem w 37 °C i pobierałem roztwór co 15 min. do 1 godz. po czym zakończyłem ją przez degradację termiczną enzymu w 90 °C. Następnie wykonałem analizy RP-HPLC stosując bufor fosforanowy i gradient metanolu 0-50%. Nałożone chromatogramy przedstawiłem na rys. II. 94A (hydrolizowalne) i B (niehydrolizowalne). Zastosowałem podwójną detekcję: przy długości fali 256 nm oraz drugiej długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji FMR (390/450 nm).



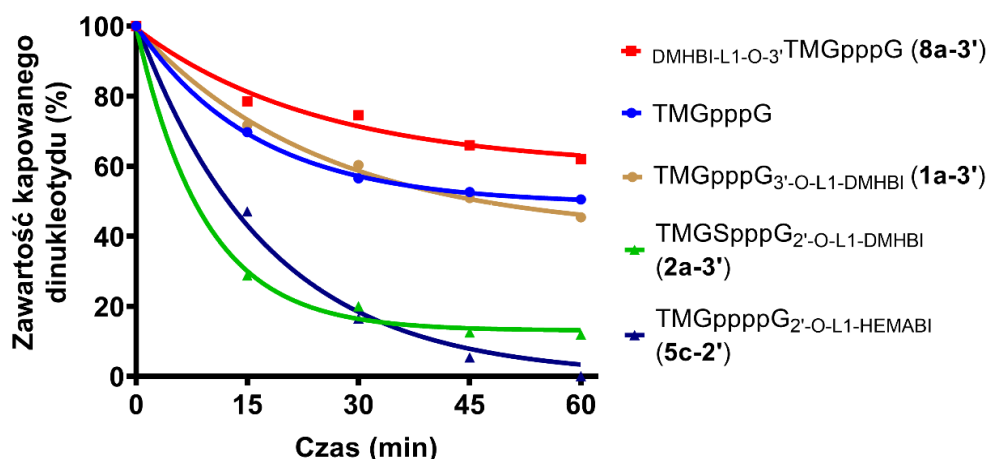
Rys. II. 86 Przykładowe chromatogramy RP-HPLC z reakcji z hNudt16 dla A. hydrolizowalnych oraz B. niehydrolizowalnych koniugatów analogu TMG kapu

Na rys. II. 93 przedstawiłem podsumowanie wpływów miejsca i rodzaju modyfikacji na podatność na degradację tym enzymem.



Rys. II. 87 Podsumowanie wpływu modyfikacji chemicznych na podatność na degradację ludzkim enzymem Nudt16

Obliczyłem na podstawie chromatogramów i % pola powierzchni pod pikiem, jaki stanowił procentowy udział nieprzereagowanego analogu TMG kapu (substratu, rys. II. 95).



Rys. II. 88 Zawartość nieprzereagowanego kapowanego dinukleotydu dla reakcji hydrolizy TMG kapowanych koniugatów z FMR

Gdzie zawartość nieprzereagowanego kapu [%] = 100 – stopień przereagowania substratu. Dopasowałem w programie GraphPad Prism krzywą One phase Decay (rozpad pierwszego stopnia), którego równanie przedstawione jest poniżej:

$$Y = (Y_0 - Plateau) \cdot e^{(-Kx)} + Plateau$$

Y_0 – wartość Y dla zerowego czasu ($x=0$),

Plateau – wartość fluorescencji dla nieskończonych czasów wyrażone w tej samej jednostce co wartości Y,

k – stała szybkości reakcji degradacji wyrażona w jednostkach odwrotnych od wartości x (min^{-1})

Odczytałem stałą szybkości reakcji enzymatycznej oraz czasy półtrwania rozumiane jako czas wymagany do przejścia od $Y_{\max}$ do połowy minimalnej zawartości kapowanego dinukleotydu i zestawilem w tabelce 18. Stężenie analogów **4c-2'+3'** było niewystarczające do analizy ilościowej z uwagi na podział izomerów w związku **4c-3'** (izomeryzacja).

Tabela 15 Porównanie szybkości degradacji enzymatycznej oraz czasów półtrwania różnych hydrolizowanych koniugatów FMR i analogów TMG kapu

Związek	$k_{\text{degrad}} (\text{min}^{-1})$	Czas półtrwania (min)
TMG-5'-S-pppG ^{2'-O-L1} -DMHBI (7a-2')	$0,109 \pm 0,014$	6,37
TMGpppG ^{2'-O-L1} -DMHBI (1a-2')	$0,085 \pm 0,005$	8,12
TMGpppG	$0,062 \pm 0,003$	11,23
TMGppppG ^{2'-O-L1} -HEMABI (5c-2')	$0,057 \pm 0,009$	12,20
DMHBI-L1-3'-O-TMGpppG (8a-3')	$0,040 \pm 0,015$	17,13
TMGpppG ^{3'-O-L1} -DMHBI (1a-3')	$0,039 \pm 0,005$	17,58

↑
Wzrost szybkości reakcji
↓
Wzrost biologicznego czasu półtrwania

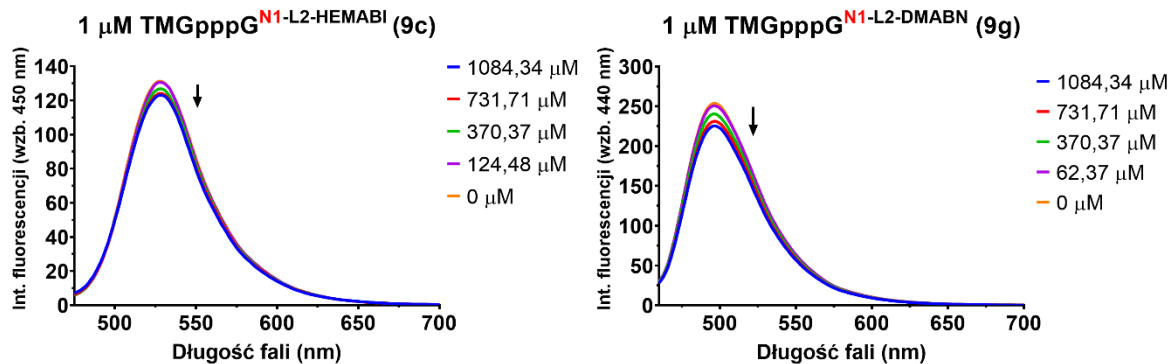
Podsumowując, modyfikacja metylenowa (-CH₂-) w obszarze mostka trifosforanowego między fosforem α i β zapewnia stabilność na degradację enzymem hNudt16, podobnie jak wprowadzenie FMR w pozycji N1-guaniny. Modyfikacja w postaci atomu siarki przy C5' od strony guanozyny również zapewnia stabilność przed degradacją. Wprowadzenie atomu siarki przy w pozycji C5' od strony trimetyloguanozyny nie tyle nie zapewnia stabilności enzymatycznej, co powoduje szybszą degradację substratu. W przypadku analogu TMGSpmpG (**19**) 100% substratu uległo reakcji w ciągu 15 min. W przypadku koniugatu z tą modyfikacją **2a-2'** degradacja zachodziła nieco wolniej (72% w 15 min). Dla porównania kap TMGpppG wykazał 30 % przereagowania w tych samych warunkach i czasie.

Dla związków, które okazały się substratem dopasowałem krzywą rozpadu pierwszego stopnia i wyznaczyłem stałe szybkości (tab. 15). Izomer 2' z DMHBI (**1a-2'**) jest szybciej degradowany niż izomer 3' (**1a-3'**), co może być nieco niekorzystne z punktu widzenia badań tych związków w warunkach komórkowych. Analog **8a-3'** (modyfikowany od TMGuo strony) jest degradowany tak samo szybko jak **1a-3'** (modyfikowany od Guo strony).

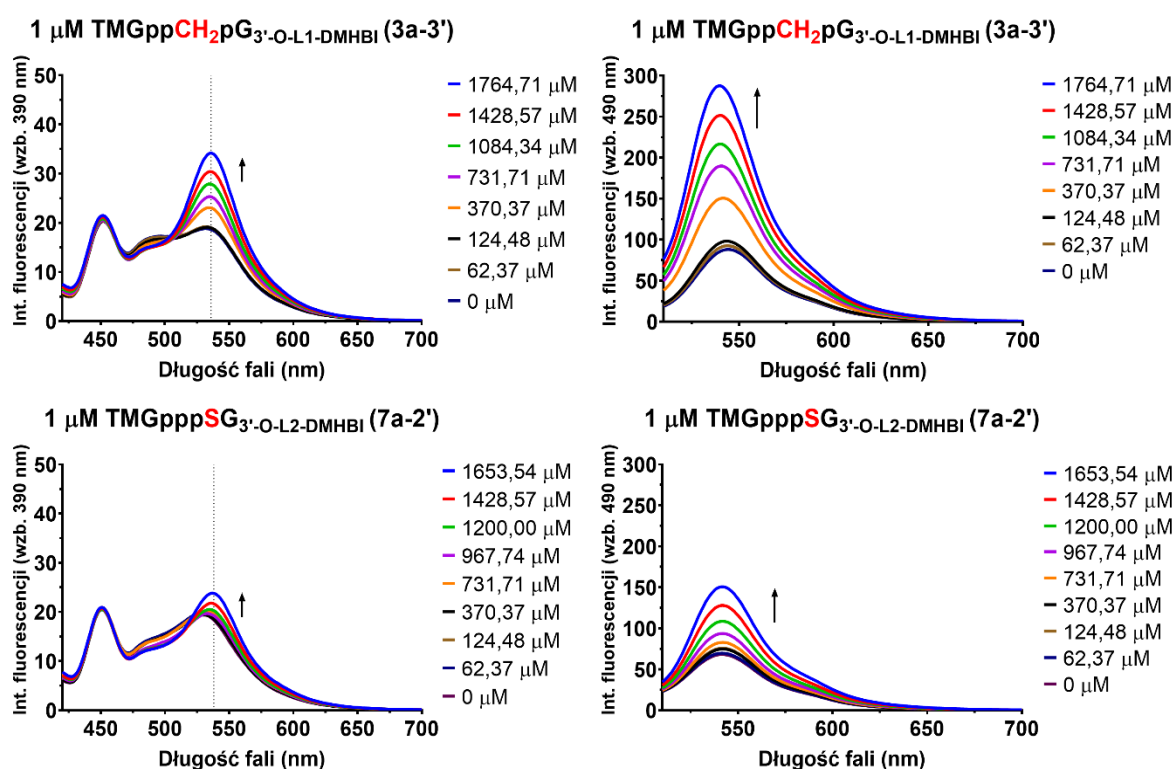
II.10.2 Próby ilościowego określenia siły oddziaływania ligand-hNudt16

Podjąłem się próby ilościowego określenia siły oddziaływania niehydrolizowanych przez enzym hNudt16 koniugatów analogów TMG kapu i FMR z tym enzymem. W tym celu miareczkowałem ligandy enzymem w analogiczny sposób jak robiłem to ze snurportyną i mierzyłem wzrost intensywności fluorescencji utożsamiany z wiązaniem enzymu i liganda. Do badań wykorzystałem tylko niehydrolizowane związki (na podstawie badań HPLC). Związki te mogą być inhibitorami tego enzymu i wiązać się z nim lub mogą w ogóle nie być rozpoznawane i się nie wiązać. Pierwsze miareczkowania wykonałem dla stężeń liganda 1-2 μM, by jednoznacznie pokazać wiązanie lub jego brak.

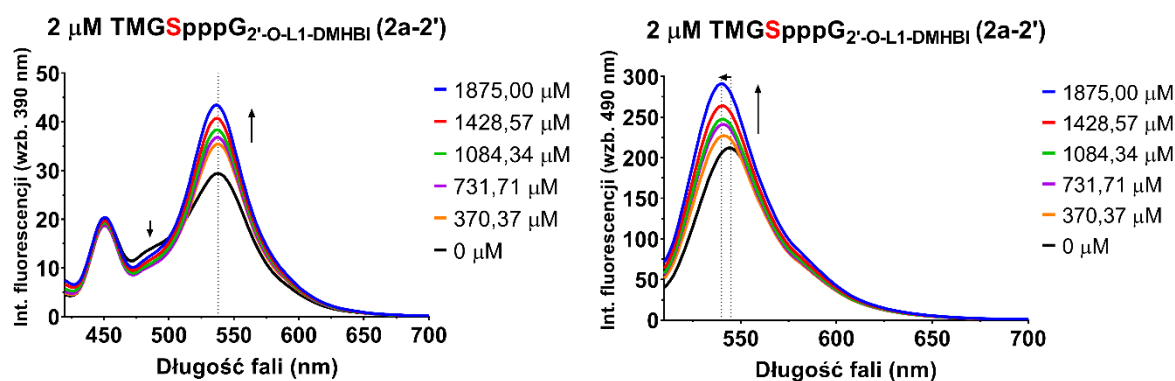
Badania z użyciem HPLC pozwoliły mi odróżnić substraty od niehydrolizowanych związków, co jednak nie daje odpowiedzi, który może być inhibitorem (enzym może nie wiązać go), z kolei badania spektrofлуorymetryczne (rys. II. 96-99) z zastosowaniem mechanizmu TICT na odróżnienie inhibitorów oraz substratów (wzrost int.) od związków nierozpoznawanych przez enzym (brak zmian int.). Wykorzystanie obu tych metod daje jednoznaczną odpowiedź na temat wiązania związków do enzymu a ponadto w przypadku potencjalnych inhibitorów tego enzymu miareczkowania z blokowaniem mechanizmu TICT dają możliwość wyznaczenia siły oddziaływania z enzymami (tu konkretnie hNudt16, ale dotyczy wszystkich enzymów).



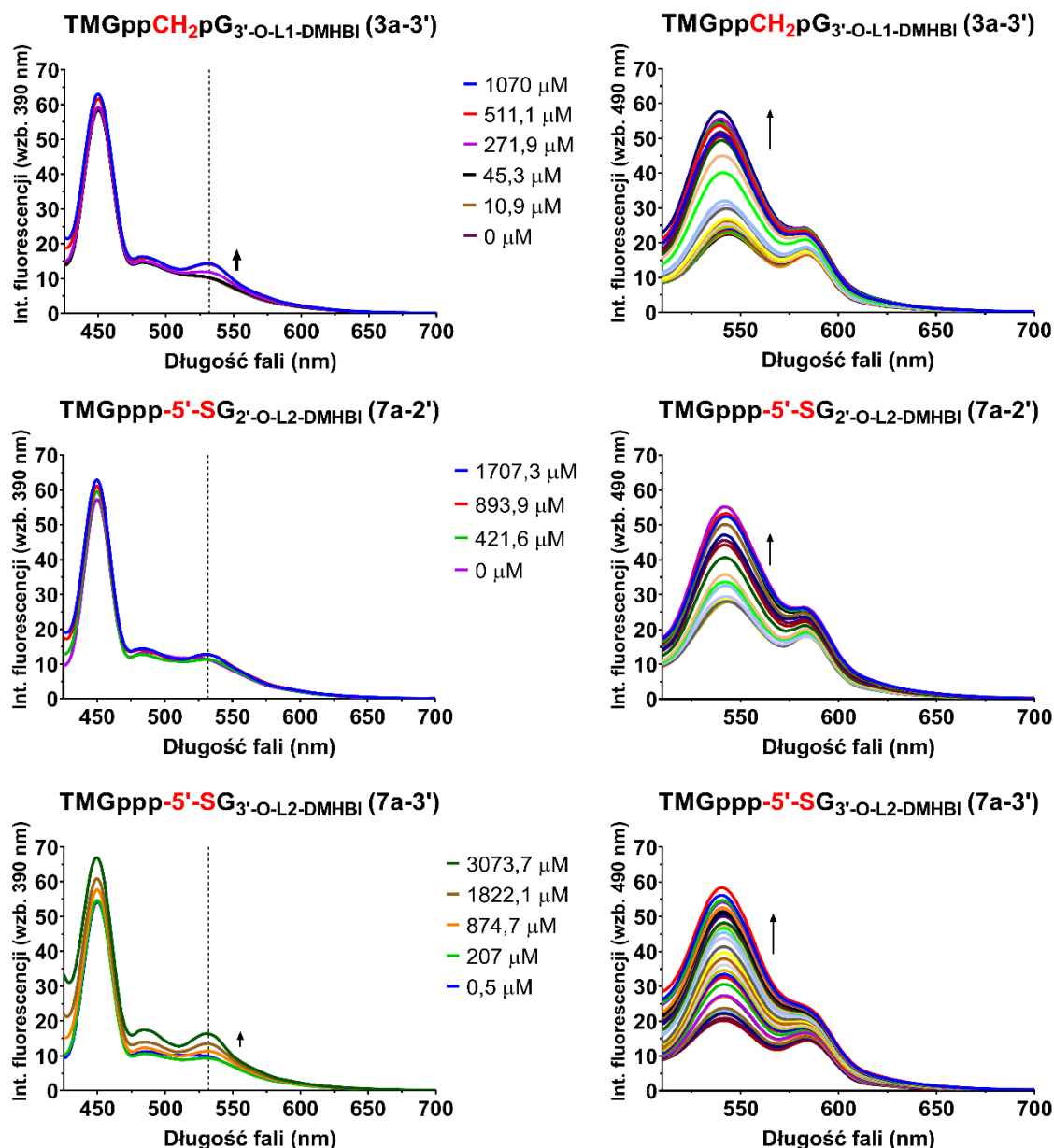
Rys. II. 89 Przykłady widm emisji z miareczkowań dla nierozpoznawanych przez enzym analogów TMG kapu modyfikowanych w pozycji N1 (9c, 9g)



Rys. II. 90 Przykłady widm emisji z miareczkowań inhibitorów enzymu hNudt16



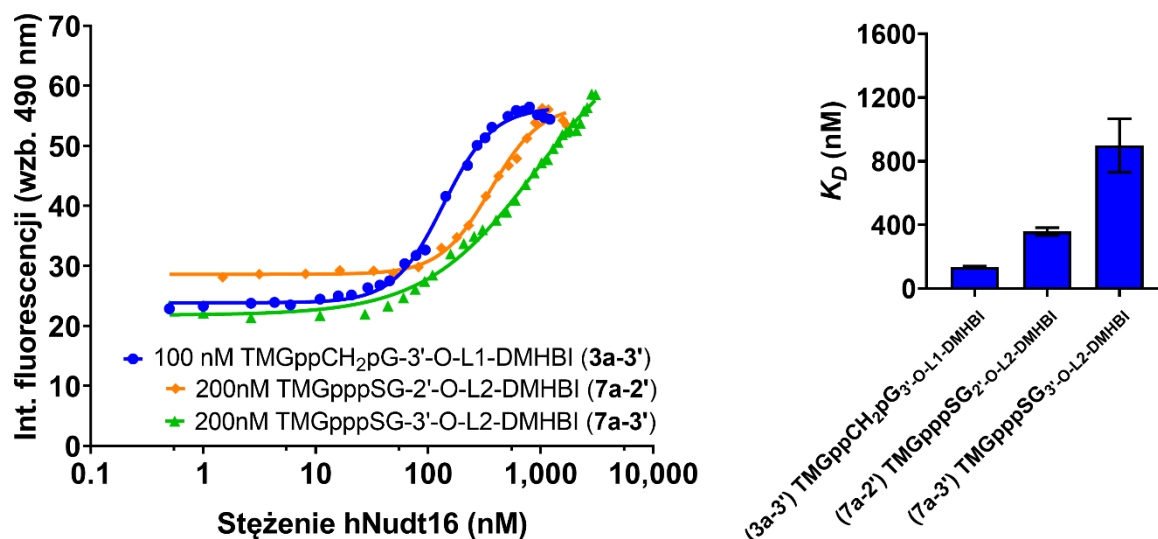
Rys. II. 91 Przykład widm emisji z miareczkowania substratu enzymu hNudt16



Rys. II. 92 Porównanie odpowiedzi (widm emisji) dla niehydrolizowanych koniugatów TMG kapu z DMHBI wzbudzanych 390 oraz 490 nm

Porównałem odpowiedzi przy wzbudzaniach 390 i 490 nm (rys. II. 100) dla koniugatów z DMHBI. Dla wzbudzania 390 nm przyrosty intensywności są bardzo niewielkie i w przypadku słabszych inhibitorów łatwo można uznać, że związek ten się nie wiąże, jednak nie jest to prawdą. Wzbudzanie tą długością fali po prostu w tych warunkach nie umożliwia śledzenia powstawania kompleksu. Wzbudzając związek długością fali 490 nm widać wiązanie z enzymem znacznie bardziej. Wzbudzanie 490 nm ma kilka znaczących zalet: a) mniejszy wpływ matrycy (opisane dalej), b) większa czułość metody związana z większym udziałem formy fenolanowej w tym pH (7,6), c) lepiej dopasowane krzywe i możliwość wyznaczenia stałych dysocjacji. Dla analogów DMHBI niemożliwe jest dopasowanie dobrej krzywej dla danych ze wzbudzania 390 nm i wyznaczenie K_D . Dla analogów z o-HBI nie ma tego problemu, bo emisja FMR jest przesunięta w kierunku fal czerwonych (590 nm), a zmiany intensywności fluorescencji w miareczkowaniu są wystarczające do dopasowania odpowiedniej krzywej.

Zaobserwować można, że w wiązaniu uwidacznia się prawie jedynie forma fenolanowa, (dla hNudt16 intensywności przy 495 nm odpowiadające formie fenolowej maleją). Dzięki temu, że enzym wiąże tylko formę zdeprotonowaną (fenolan) oraz większej int. emisji DMHBI w wyższych pH, udało się dopasować krzywe miareczkowania (rys. II. 100). Większe pH (>7,2) zwiększa czułość metody.



Rys. II. 93 Porównanie krzywych miareczkowań oraz wyznaczonych stałych dysocjacji dla kompleksów inhibitor-hNudt16

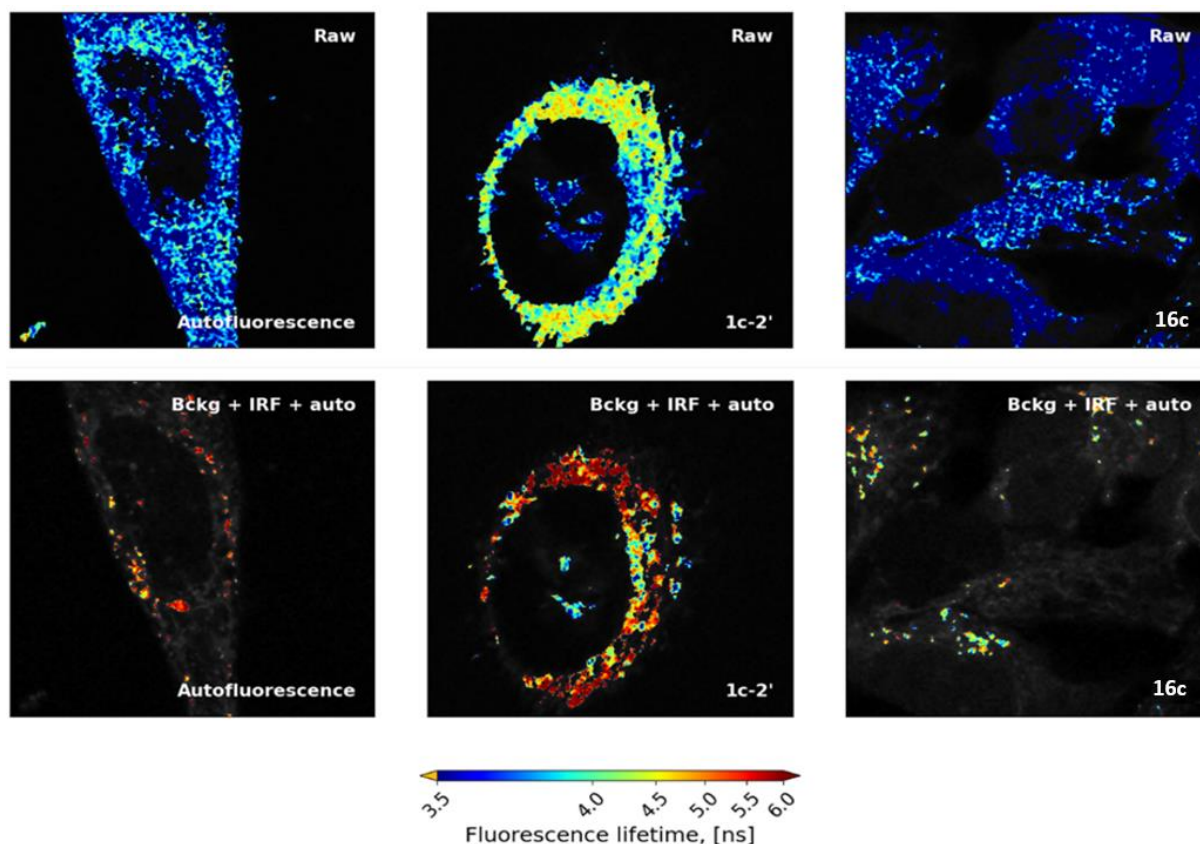
W dwóch przypadkach (analogi siarkowe) nie udało mi się uzyskać satysfakcjonującego plateau, jednakże byłem ograniczony ilością białka, a dalsze dodatki bardzo rozcieńczałyby związek ($V_{\text{dod}} > 200 \mu\text{L} \Rightarrow 15\%$) i należałoby zatężyć białko dla osiągnięcia satysfakcjonujących krzywych. Mimo że metoda nie jest zoptymalizowana to, wykazałem, że metodę blokowania mechanizmu TICT można wykorzystać do monitorowania oddziaływania zarówno do białek nie-enzymatycznych jak i enzymów, o ile związki nie są substratami dla enzymu. Analog z grupą metylenową **3a-3'** jest lepszym inhibitorem enzymu i dał również największy przyrost po wysyceniu ($F_m/F_0 = 2,7$). Dla **7a-3'**, najslabiej wiązanego związku dobroć dopasowania jest najslabsza a niepewność pomiaru największa. Badanie miało na celu wykazanie użyteczności metody do badania enzymów.

II.11. Obrazowanie czasów życia fluorescencji w komórkach

Badania czasów życia fluorescencji, czasów dyfuzji (FCS) oraz obrazowanie FLIM w komórkach HeLa wykonali dr inż. Karina Kwapiszewska, dr Tomasz Kalwarczyk oraz prof. dr. hab. Robert Hołyst (zespół Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk).

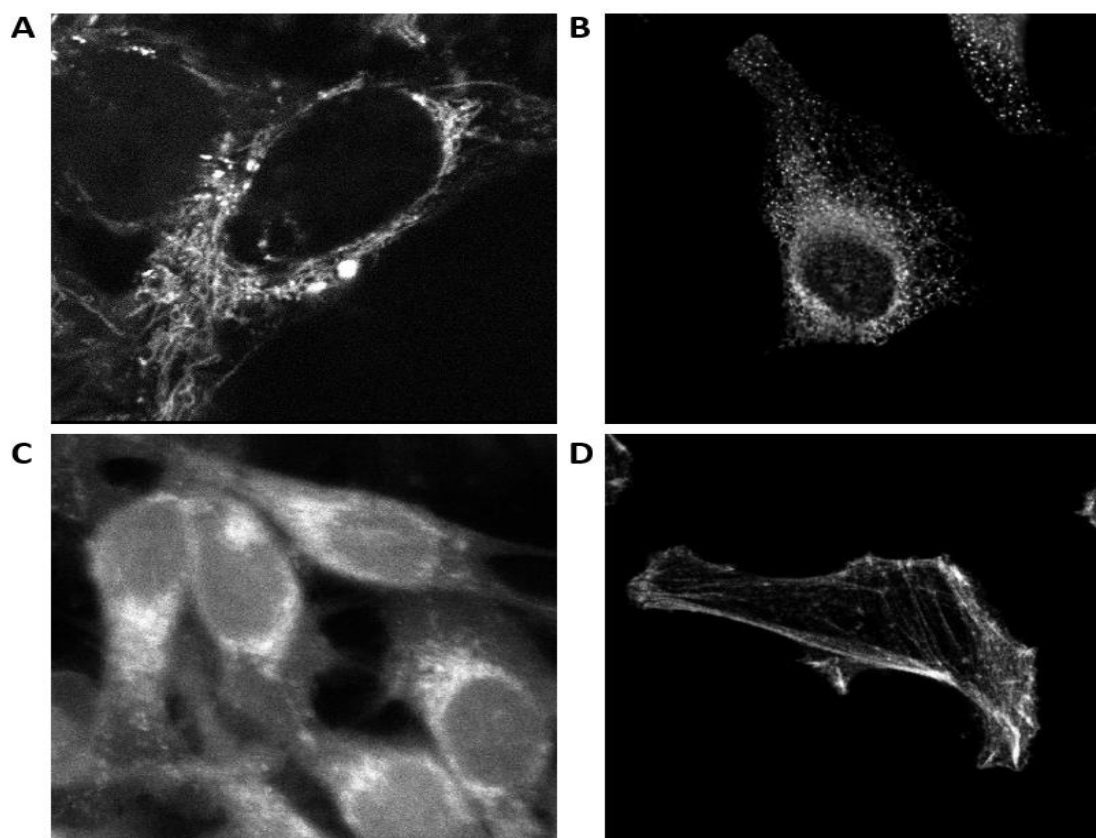
Do badań w komórkach wyselekcjonowałem koniugaty analogu TMGpppG z DMHBI i HEMABI, **1a-2'** i **1c-2'** ze względu na wysokie powinowactwo i dobre odpowiedzi sond oraz koniugat z ACVJ w pozycji 3' (**1f-3'**) ze względu na to, że wykazywał lepszą odpowiedź od izomeru 2' oraz koniugaty fosfonianowe tych znaczników (**16a**, **16c**, **16f**) jako związki kontrolne. Fosfoniany-FMR są dobrze rozpuszczalne w wodzie i są bardzo słabo wiązane przez snurportynę *in vitro*. Badania czasów życia i obrazów metodą FLIM stanowią analizę

jakościową w celu odróżnienia fluorescencji związku badanego (**1a-2'**, **1c-2'**, **1d-3'**) od autofluorescencji komórki (rys. II. 103).



Rys. II. 94 Obrazowanie czasu życia fluorescencji (FLIM) koniugatów HEMABI, z TMG kapem (**1c-2'**) i fosfonian **16c** (kontrola negatywna) w komórkach HeLa. Kolory przedstawiają czas życia fluorescencji zgodnie ze skalą podaną na dole. Surowe dane (Raw) są przedstawione w górnym panelu, a dane bez tła (Bckg), funkcji odpowiedzi instrumentu (IRF) i autofluorescencji (auto) są przedstawione w dolnym panelu.

Komórki HeLa inkubowano ze związkami (uptake) jak również poddano procedurze Cell-IN (wprowadzenie molekuł do komórek z wykorzystaniem szoku osmotycznego). Zbadano czasy życia fluorescencji koniugatów w komórce przy spontanicznym przenikaniu do komórek, jednak w większości przypadków nie zaobserwowano dłuższych czasów życia fluorescencji niż autofluorescencja komórek (3,5 ns). Związek kontrolny **16c** jest nieodróżnialny od autofluorescencji, natomiast koniugat **1c-2'** wykazuje widoczną zmianę w kierunku dłuższych czasów życia, co sugeruje wiązanie z białkiem. Uzyskane dla nich obrazy struktur komórkowych są bardzo zbliżone do siebie. Porównano je z różnymi strukturami błonowymi w komórkach (rys. II. 104) i stwierdzono największe podobieństwo względem struktury retikulum endoplazmatycznego (B), chociaż obrazy nie są identyczne, co może wynikać ze zmienności populacyjnej komórek.

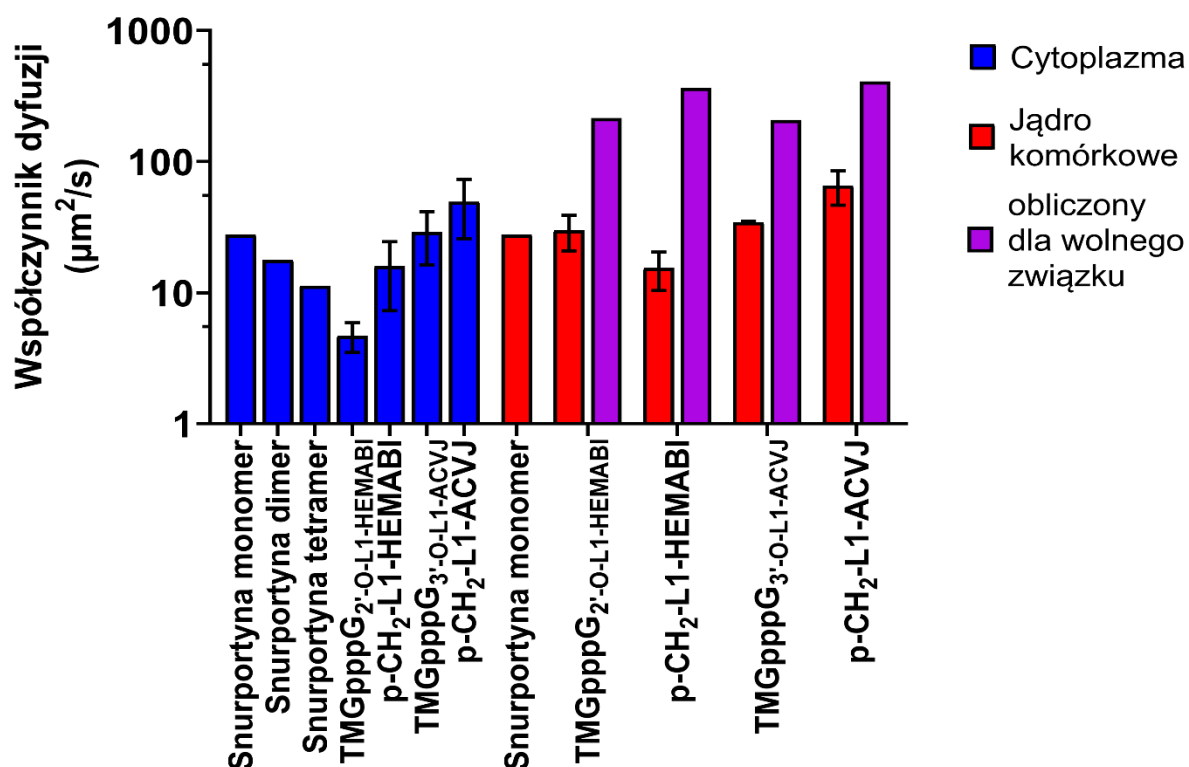


Rys. II. 95 Porównanie obrazów dla A. TMGpppG_{2'}-O-L1-DMHBI (**1a-2'**) oraz różnych struktur błonowych w komórkach HeLa: B. retikulum endoplazmatyczne, C. tubulina (cytoszkielet), D. aktyna (cytoszkielet)

II.12. Badania współczynników dyfuzji w komórkach HeLa

W przypadku koniugatów DMHBI (**1a-2'**, **16a**), zarówno dla wolnych związków, jak i dla związków z dodatkiem snurportyny, miarodajne krzywe FCS niezbędne do wyznaczenia współczynników dyfuzji były niemożliwe do zarejestrowania. Dla koniugatów z HEMABI oraz ACVJ otrzymano krzywe, które poddano analizie i wyznaczono średnie współczynniki dyfuzji w cytoplazmie i w jądrze komórkowym (rys. II. 105).

Pomiary FCS poprzedzono kalibracją, wyznaczono wielkość ogniska konfokalnego $\omega_0 = 210$ nm, oraz współczynnik proporcji $\kappa = 6,2$. Na podstawie danych z kalibracji oraz modelu lepkości zależnej od skali w cytoplazmie²⁷⁹ oraz jądrze komórek HeLa^{279, 280}, obliczono przewidywane współczynniki dyfuzji dla wolnych koniugatów oraz dla snurportyny (i jej form oligomerycznych w przyp. cytoplazmy) oraz zmierzono współczynniki dyfuzji dla wybranych koniugatów (rys. II. 105).



Rys. II. 96 Współczynniki dyfuzji w komórkach HeLa dla wybranych koniugatów z HEMABI i ACVJ w cytoplazmie i wewnątrz jądra komórkowego

Nie wykryto wolnych koniugatów w cytoplazmie ani jądrze komórkowym (rys. II. 105). Widoczne były jedynie cząsteczki, które związały się ze składnikami wewnątrzkomórkowymi. Fosfoniany tych znaczników również związały się z pewnymi makromolekułami, przy czym ten z HEMABI do większych struktur niż z ACVJ dla którego nie można wykluczyć wiązania ze snurportyną, chociaż wyniki są niejednoznaczne. Średni współczynnik dyfuzji dla dwóch TMG kapowanych nukleotydów z FMR wykazały, że zostały związane zarówno w cytoplazmie jak i jądrze komórkowym oraz że w obu przypadkach wiązanie w jądrze komórkowym można utożsamić z wiązaniem ze snurportyną (rys. II. 105). W przypadku **1f-3'** podobny wsp. dyfuzji zaobserwowano też w cytoplazmie, natomiast dla koniugatu HEMABI (**1c-2'**) stwierdzono w cytoplazmie znacząco większy wsp. dyfuzji, co oznacza jedynie tyle, że utworzył większy kompleks niż ze snurportyną. Należy zauważyć, że wyższe wsp. dyfuzji nie muszą oznaczać braku wiązania ze snurportyną, może to być kompleks wielobiałkowy.

III Część eksperymentalna

III.1. Rozpuszczalniki i reagenty wykorzystywane w syntezie

Jeżeli nie zaznaczono inaczej, do syntez używałem komercyjnie dostępne rozpuszczalniki i pozostałe reagenty zostały zakupione w Sigma Aldrich. Guanozyna, adenozyne, urydyna, sól sodowa 5'-O-monofosforanu guanozyny zostały zakupione w Sigma Aldrich. 5'-O-monofosforan 7-metyloguanozyny (m^7GMP) i $N^2,2,7$ -trimetyloguanozyny (TMGMP) zostały otrzymane zgodnie z metodami opisanymi w literaturze²⁶³

Korzystałem z następujących rozpuszczalników: MQ = woda dejonizowana, DMF = N,N-dimetyloformamid, DMSO = sulfotlenek dimetylu, ACN = acetonitryl. DMF, DMSO i ACN osuszałem nad sitami molekularnymi o średnicy odpowiednio 4 Å, 4 Å i 3 Å. MQ otrzymywałem poprzez oczyszczanie wody w systemie TKA Pacific wykorzystującym odwrótną osmozę i następczą dejonizację. Bezwodną trietyloaminę (TEA) oraz aceton otrzymywałem stosując destylację prostą odpowiednio z KOH i P_2O_5 . $POCl_3$ destylowano na krótko przed użyciem do reakcji. Bufory do HPLC sporządzałem z odczynników czystości HPLC firmy J.T. Baker.

III.2. Techniki chromatograficzne

III.2.1 Analityczna wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

Do analitycznej chromatografii HPLC wykorzystywałem aparat HPLC Agilent Technologies 1200 Series z detektorem UV (pomiar wykonywano przy 260 nm) i fluorescencyjnym umożliwiającym wykrycie związków zawierających 7-metyloguanozynę (wzbudzenie 260 nm, emisja 370 nm). Pomiar wykonywałem na kolumnie Supelcosil LC-18-T lub Gemini NX-C-18 HPLC (5 μm , 4,6 $\times$ 250 mm, przepływ 1,3 mL/min) pracujące w układzie faz odwróconych (RP). Jako eluenty stosowałem następujące bufor o czystości HPLC: **Bufor A** – 0,05 M roztwór wodny octanu amonu, pH = 5,9; **Bufor B** - mieszanina buforu A i metanolu w stosunku objętościowym 1:1. Elucję wykonywałem za pomocą liniowego gradientu buforu B (0 – 50 %) w buforze A w czasie: a) 30 min. (standardowy), b) 15 min (mocny) lub c) 7.5 min (supermocny).

III.2.2 Półpreparatywna i preparatywna wysokosprawna chromatografia cieczowa (semi-prep/prepHPLC)

Do preparatywnego rozdzielania niewielkich ilości związków, w tym regioizomerów, stosowałem aparat HPLC Agilent Technologies 1200 Series z detektorem UV (pomiar wykonywano przy 260 nm) i fluorescencyjnym umożliwiającym wykrycie związków zawierających 7-metyloguanozynę (wzbudzenie 260 nm, emisja 370 nm) z kolumną Discovery® RP Amide C-16 (25 cm $\times$ 21,2 mm, 5 μm , przepływ 5.0 mL/min). Do elucji używano następujących bufor o czystości HPLC: **Bufor A** - 0.05 M roztwór wodny octanu amonu, pH = 5,9; **Bufor B** - mieszanina buforu A i ACN w stosunku objętościowym 7:3.

III.2.3 Chromatografia jonowymienna

III.2.3.1 Izolacja produktów reakcji

Produkty reakcji izolowano za pomocą chromatografii jonowymiennej na anionicie DEAE-Sephadex A-25, w formie HCO_3^- . Po naniesieniu związku kolumnę przemywano wodą w celu wypłukania kationów metali i kompleksów EDTA. Elucję przeprowadzano stosując liniowy gradient buforu TEAB. Bufor TEAB otrzymywano poprzez nasycenie gazowym CO_2 mieszaniny 585 cm^3 destylowanej trietyloaminy i $2,415 \text{ dm}^3$ do osiągnięcia $\text{pH} = 7,8$ (4°C , 48 h). Otrzymany w ten sposób bufor o stężeniu 1,2 M przechowywano w 4°C . Do chromatografii używano rozcieńczony bufor o odpowiednim stężeniu w zależności do wypadkowego ładunku anionu oddziałującego ze złożem (orientacyjnie: monofosforany – 0.7 M TEAB, difosforany 1 M TEAB, trifosforany – 1.2 M TEAB, tetrafosforany 1,2 M TEAB). Bufor o pożądanym stężeniu otrzymywano przez rozcieńczenie wyjściowego buforu 1,2 M wodą MQ.

Fracje zebrane w wyniku chromatografii analizowano spektrofotometrycznie przy 260 nm, a następnie wybrane analizowano metodą HPLC. Połączone frakcje zawierające pożądaný produkt odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem kilkakrotnie dodając 50 ml porcję 96 % etanolu lub bezwodnego etanolu w celu rozłożenia buforu TEAB. Otrzymane w ten sposób sole TEA nukleotydów suszyłem w eksykatorze próżniowym nad P_2O_5 .

Ilości otrzymanych związków oznaczyłem przy pomocy pomiarów milijednostek optycznych (mOD) w 260 nm obliczanych jako iloczyn wartości absorbancji i objętości próbki. Pomiarów dla mononukleotydów zawierających N7-metyloguanozynę wykonywałem w 0,1 M buforze fosforanowym o $\text{pH} = 6$ przyjmując współczynnik ekstynkcji $\epsilon_{260} = 11\,400 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. W pozostałych przypadkach pomiary wykonywałem w buforze fosforanowym o $\text{pH} = 7$. Zastosowałem następujące współczynniki ekstynkcji: dla mononukleotydów guanozyny, dimetyloguanozyny i trimetyloguanozyny: $\epsilon_{260} = 12\,080 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, dla pochodnych m⁷GpppG $\epsilon_{260} = 22\,600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, dla pochodnych TMGpppA: $\epsilon_{260} = 28\,900 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Wypijewska i wsp. 2010, FEBS)²⁸¹ oraz TMGpppG: $\epsilon_{260} = 26\,100 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Wypijewska i wsp. 2010, FEBS)²⁸¹. Dla pochodnych TMGpppAUA zastosowałem obliczony narzędziem webowym: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html> (Kibbe WA. 'OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator', (2007) *Nucleic Acids Res*, **35** (webserver issue: May 25) wsp. ekstynkcji $\epsilon_{260} = 46\,000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Dla innych związków współczynnik ekstynkcji podany został przy opisie syntezy związku. W przypadku niektórych koniugatów z FMR wyznaczyłem również molowe współczynniki ekstynkcji (tab. 16, 17).

III.2.3.2 Molowe współczynniki ekstynkcji wybranych koniugatów FMR

Ze względu na to, że niektóre znaczniki absorbują również przy długości fali 256 nm, co odpowiada maksimum absorpcji formy nukleotydowej, należy uwzględnić ich wpływ na całkowitą absorpcję koniugatu. Wkład ten jest bardzo mały w przypadku koniugatów z o-HBI i DMHBI, jednak dla pozostałych FMR jest on znaczący. Wyznaczyłem molowe współczynniki ekstynkcji dla wybranych koniugatów FMR (nukleotydowych i fosfonianowych) zgodnie z poniższą procedurą. Do badań wybrałem jedynie kilka związków, w ilości od 0,2 do 2 mg czystego, 3-krotnie liofilizowanego związku. Współczynniki ekstynkcji wyznaczyłem metodą regresji liniowej (współczynnik nachylenia prostej) oraz jako średnią arytmetyczną i zostały podsumowane w tabeli 19.

Procedura wyznaczania:

Czystość badanych związków została potwierdzona metodą HPLC (>95%). Związki do pomiarów molowych współczynników ekstynkcji trzykrotnie liofilizowałem z wody MQ, odważałem na wadze analitycznej ($d = 0,1$ mg) i rozpuszczałem w wodzie MQ. Przygotowywałem różne rozcieńczenia próbki, aby uzyskać co najmniej trzy punkty pomiarowe w zakresie absorbancji około 0,1-1 au. Molowe współczynniki ekstynkcji wyznaczyłem w 100 mM buforze KH_2PO_4 pH 7,0. Wykreśliłem zależność absorbancji od stężenia analitu i dopasowałem zależność liniową. Dla każdego związku wykonałem 2-3 serie pomiarowe i wyniki uśredniłem.

Tabela 16 Molowe współczynniki ekstynkcji ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) dla wybranych nukleotydowych koniugatów z FMR

Związek	Regresja liniowa			Średnia arytmetyczna		
	ϵ_{255}	ϵ_{390}	ϵ_{455}	ϵ_{255}	ϵ_{390}	ϵ_{455}
GpppG	17 300	-	-	21 870	-	-
GMP-2'-O-L1-DMHBI (12a-2')	14 300	16 900	-	13 100	15 450	-
GMP-3'-O-L1-DMHBI (12a-3')	16 100	16 400	-	16 400	16 300	-
GMP-2'-O-L1-HEMABI (12c-2')	14 600	-	29 700	13 900	-	28 100
GMP-3'-O-L1-HEMABI (12c-3')	16 100	-	29 800	15 800	-	26 500
TMGpppG-3'-O-L1-DMHBI (1a-3')	25 200	15 900	-	26 100	15 000	-
TMGpppG-2'-O-L1-HEMABI (1c-2')	28 600	-	29 600	27 300	-	27 450
TMGpppG-3'-O-L1-HEMABI (1c-3')	30 100	-	28 700	28 000	-	26 200

Tabela 17 Molowe współczynniki ekstynkcji ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) dla fosfonianów FMR

Związek	Regresja liniowa			Średnia arytmetyczna		
	ϵ_{255}	ϵ_{445}	ϵ_{450}	ϵ_{255}	ϵ_{445}	ϵ_{450}
DMABI-L1-CH ₂ -p (16e)	4 600	20 100	-	4 500	22 200	-
ACVJ-L1-CH ₂ -p (16f)	8 300	-	38 700	8 100	-	37 100

Zaobserwowałem, że izomery 2' z FMR miały niższe współczynniki ekstynkcji przy 256 nm niż izomery 3', mimo że wartości dla długości fali charakterystycznej dla FMR były do siebie zbliżone. Współczynniki ekstynkcji przy 390 nm oraz 455 nm były natomiast porównywalne z wartościami obserwowanymi dla analogów GMP i TMGpppG. Fosfoniany ACVJ i DMABI również wykazują absorpcję przy długości fali 256 nm. Fosfonianowa pochodna DMABI (**16e**) wykazuje maksimum absorpcji przy $\lambda = 445$ nm, natomiast koniugat **1e-2'** z tym rotorem absorbuje przy $\lambda = 460$ nm. Fosfonian (**16e**) charakteryzuje się molowym współczynnikiem ekstynkcji wynoszącym $20,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Z kolei koniugat TMGpppG z DMABI (**1e-2'**) przy maksimum 460 nm wykazuje równie intensywne pasmo jak przy $\lambda = 256$ nm, z $\epsilon_{460} \sim 28,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Na podstawie tych badań, w szczególności analizy absorbancji różnych znaczników (fosfonianów FMR: **16a-16f**) przy długości fali 255 nm, odpowiadającej maksimum absorpcji nukleotydów, mogłem ustalić poprawione współczynniki molowe ϵ_{255} dla koniugatów nukleotyd-FMR, uwzględniając również absorpcję znacznika. Poprawione współczynniki (bez rozróżnienia ze względu na izomerię) są następujące:

- Koniugaty DMHBI, *p*-NHBI i *o*-HBI – bez zmian (marginalny wpływ znacznika),
- TMGpppG-HEMABI: 27 500 M⁻¹ cm⁻¹,
- TMGpppA-HEMABI: 29 500 M⁻¹ cm⁻¹,
- m7GpppG-HEMABI: 24 000 M⁻¹ cm⁻¹,
- GMP-HEMABI: 14 500 M⁻¹ cm⁻¹,
- GpppG-2xHEMABI: 24 500 M⁻¹ cm⁻¹,
- TMGpppG-ACVJ: 31 500 M⁻¹ cm⁻¹,
- GMP-ACVJ: 21 500 M⁻¹ cm⁻¹,
- TMGpppG-DMABI: 28 600 M⁻¹ cm⁻¹

Te wartości odzwierciedlają wpływ obecności znacznika na absorpcję koniugatów, co jest kluczowe dla precyzyjnych pomiarów ich stężeń w badaniach analitycznych.

III.2.3.3 Wymiana soli

Jeżeli nie zaznaczono inaczej, sole trietyloamoniowe związków dostępnych handlowo w postaci soli sodowych otrzymywałem przepuszczając roztwór wodny związku przez kolumnę wypełnioną kationitem Dowex Wx8, Mesh 50-100 w postaci soli TEAH⁺. Zebrany eluat odparowywałem pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce obrotowej i suszyłem w eksykatorze nad P₄O₁₀.

III.3. Jądrowy rezonans magnetyczny (NMR)

Widma ¹H NMR i ³¹P NMR zarejestrowano w 25 °C przy pomocy aparatu Varian UNITY-plus przy 399.94 MHz (¹H NMR) i 161.90 MHz (³¹P NMR). Dla widm ¹H NMR jako wzorca wewnętrznego używano 2,2,3,3-tetradeutero-3-(trimetylosililo)propionianu sodu (TSP), a dla widm ³¹P NMR stosowano wzorzec zewnętrzny 85% roztwór H₃PO₄ w D₂O. Przesunięcia chemiczne podano w ppm, stałe sprzężenia w Hz. Próbkki zostały przygotowane przez rozpuszczenie 2-10 mg związku w 0,65 ml D₂O lub DMSO-d₆. Do analizy widm używano programu MestreNova 12.02 (Mestrelab Research). W opisie podano: przesunięcie chemiczne (δ ppm), multipletowość (s = singlet, bs = szeroki singlet, d = dublet, t = tryplet, q = kwartet, p = kwintet, dd = dublet dubletów, ddd = dublet dubletów dubletów, m = multiplet), stałe sprzężenia (Hz) i integrację sygnałów. Dla większej przejrzystości w zapisie przesunięć chemicznych i stałych sprzężenia oddzielano części dziesiętne za pomocą kropki, a nie przecinka.

III.4. Spektrometria mas (MS)

Widma masowe (MS) o niskiej rozdzielczości zarejestrowano na aparatach Micromass QToF 1 MS i AB Sciex API 3200 z jonizacją typu elektrosprej w trybie jonów ujemnych dla pochodnych nukleotydowych i koniugatów oraz w trybie jonów dodatnich dla pochodnych

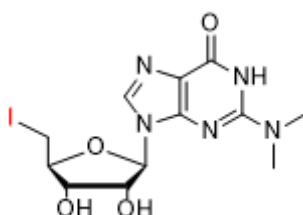
FMR. Wysokorozdzielcze widma masowe (HRMS) zarejestrowano przy pomocy spektrometru LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific).

III.5. Zastosowanie mikrofal w syntezie

Reakcje wspomagane mikrofalowo przeprowadziłem z użyciem jednomodowego aparatu CEM Discover Microwave Synthesizer z generatorem mikrofal o częstotliwości 2,45 GHz. Reagenty oraz magnetyczny element mieszający umieszczano wewnątrz fiołki wykonanej z grubego szkła z membraną. Reakcje z CDI przeprowadzałem przy następujących parametrach: program „dynamic power mode”- $P_{\max} = 5 \text{ W}$ i $T_{\max} = 50 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 20 \text{ min}$. Reakcje deprotekcji grup acetylowych z Ac₃DMGuo przeprowadzałem wg programu: $P_{\max} = 50 \text{ W}$ i $T_{\max} = 70 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 8 \text{ min}$. Temperatura, ciśnienie i moc panująca wewnątrz naczynia z reakcją były monitorowane za pomocą sensorów znajdujących się w wyposażeniu aparatury.

III.6. Syntezy chemiczne

III.6.1.1 5'-deoksy-5'-jodo-N²,N²-dimetyloguanozyna (38), 5'-I-DMGuo

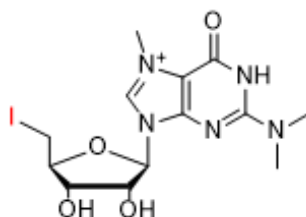


Do zawiesiny dimetyloguanozyny (**25**) (3 g, 9,64 mmol, 1 ekw.) w NMP (objętość równa stężeniu nukleozydu 0,25 mol/l) dodałem 7,34 g jodu (28,9 mmol, 3 ekw.) i mieszałem w t. pok. przez 5 min na mieszadle magnetycznym. Następnie dodałem 7,58 g (28,9 mmol, 3 ekw.) trifenylofosfiny oraz 1,97 g imidazolu (28,9 mmol, 3 ekw.). Postęp reakcji monitorowałem metodą RP-HPLC. Po 24 godz. uzyskałem pełną konwersję. Reakcję przenieśliśmy ilościowo do mieszaniny DCM/MQ (3:1, v/v), odparowałem i otrzymałem surowy produkt, który wykorzystałem do dalszych reakcji bez dodatkowego oczyszczania. Otrzymałem 3,5 g zanieczyszczonej imidazolem 5'-I-DMGuo (wyd. 86%). $R_t = 15,23 \text{ min}$

^1H NMR (500 MHz, D₂O) δ [ppm] 8.47 (s, 1H, H8), 6.02 (d, $J = 4.5 \text{ Hz}$, 1H, H1'), 5.05 (dd, $J = 5.3, 4.5 \text{ Hz}$, 1H, H2'), 4.49 (t, $J = 5.3 \text{ Hz}$, 1H, H3'), 4.15 (q, $J = 5.3 \text{ Hz}$, 1H, H4'), 3.64 (dd, $J = 11.2, 4.9 \text{ Hz}$, 1H, H5'), 3.56 (dd, $J = 11.2, 5.9 \text{ Hz}$, 1H, H5''), 3.20 (s, 6H, 2x N-CH₃)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 420,0174 dla C₁₂H₁₅IN₅O₄⁻ [M-H]⁻; zmierzone 420,0178

III.6.1.2 5'-deoksy-5'-jodo-N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyna (31), 5'-I-TMGUo

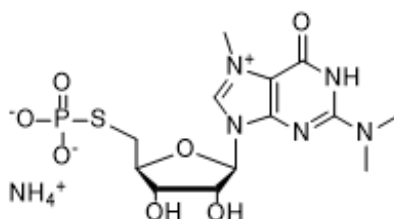


Do zawiesiny 5'-deoksy-5'-jodo-N²,N²-dimetyloguanozyny (**38**) (3 g, 7,12 mmol, 1 ekw.) w bezwodnym DMSO (50 ml) dodałem jodek metylu (8,09 mg, 56,9 mmol, 8 ekw.) i mieszałem na mieszadle magnetycznym w t. pok. Postęp reakcji monitorowałem metodą RP-HPLC. Po uzyskaniu pełnej konwersji nadmiar CH₃I odparowałem pod zmniejszonym ciśnieniem. Do szklistej pozostałości dodałem DCM (100 ml) i wytrącił się jasnożółty osad. Precypitat przefiltrowałem pod zmniejszonym ciśnieniem, przemyłem 3x DCM (3x 20 ml) i wysuszyłem nad P₄O₁₀. Otrzymałem 2,64 g surowego produktu (wyd. 85%), zanieczyszczzonego imidazolem, który wykorzystałem do dalszych reakcji bez dodatkowego oczyszczania. Rt = 13,43 min

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 9.08 (s, 1H, H₈), 6.07 (d, J = 3.8 Hz, 1H, H_{1'}), 5.03 (dd, J = 5.4, 3.8 Hz, 1H, H_{2'}), 4.46 (t, J = 5.4 Hz, 1H, H_{3'}), 4.19 (td, J = 5.8, 4.7 Hz, 1H, H_{4'}), 4.13 (s, 3H, m⁷), 3.66 (d, J = 7.0 Hz, 1H, H_{5'}), 3.57 (dd, J = 11.3, 5.9 Hz, 1H, H_{5''}), 3.23 (s, 6H, 2x N-CH₃)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 434,0331 dla C₁₃H₁₇N₅O₄⁻ [M-H]⁻; zmierzone 434,0334

III.6.1.3 5'-monotiofosforan N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyny (**32**), TMGMPS



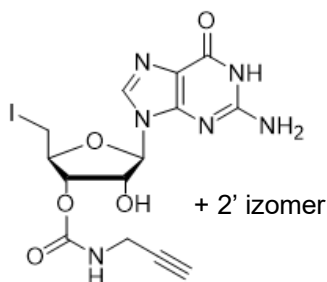
Do zawiesiny 5'-deoksy-5'-jodo-N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyny (0,5 g, 1,15 mmol, 1 ekw.) w bezwodnym schłodzonym DMF (20 ml) dodałem tiofosforan trisodu (578 mg, 1,38 mmol, 1,2 ekw.) i trietyloaminę (465 mg, 4,60 mmol, 4 ekw.). Reakcję prowadziłem w 5 °C przez 24 h mieszając na mieszadle magnetycznym. Następnie mieszaninę rozcieńczyłem 50 ml MQ i produkt oczyściłem stosując chromatografię jonowymienną na złożu DEAE-Sephadex. Bufor TEAB odparowałem, produkt trzykrotnie liofilizowałem z wody. Otrzymałem 0,150 g produktu **32** (4040 mOD, 0,354 mmol, wyd. 31%). Rt = 6,36 min

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] 9.37 (s, 1H, H₈), 5.81 (d, J = 4.7 Hz, 1H, H_{1'}), 4.65 (t, J = 4.7 Hz, 1H, H_{2'}), 4.23 (t, J = 4.7 Hz, 1H, H_{3'}), 4.14 – 4.10 (m, 1H, H_{4'}), 4.04 (s, 3H, m⁷), 3.05 (s, 6H, 2x N-CH₃), 2.10 (s, 2H, H_{5'}, H_{5''})

³¹P NMR (203 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] 12.86 (s, 1P)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 420,0748 dla C₁₃H₁₉N₅O₇PS⁻ [M-H]⁻; zmierzone 420,0752

III.6.1.4 2'/3'-O-(propargilokarbamoilo)-5'-deoksy-5'-jodoguanozyna (**44**), 5'-I-Guo-2'/3'-C(O)NH-CH₂CCH



Do zawiesiny 5'-I-Guanozyny (500 mg, 1,28 mmol) w DMSO (20 ml) dodałem 1,03 g CDI (6,38 mmol, 5 ekw.). Mieszaninę reakcyjną mieszałem na mieszadle magnetycznym w t. pok. przez 1 godz., następnie nadmiar CDI zhydrolizowałem dodatkiem wody (230 μL), mieszałem

15 minut, po czym dodałem 702 mg propargiloaminy (12,75 mmol, 10 ekw.). Całość mieszałem w t. pok. Postęp reakcji monitorowałem za pomocą RP-HPLC. Po 24 godz. Surowy produkt wytrąciłem dodając 200 ml mieszaniny CH₂Cl₂/H₂O. Biały precypitat przemyłem 3x CH₂Cl₂ i wysuszyłem pod próżnią znad P₄O₁₀. Otrzymałem 548 mg (1,15 mmol, wyd. 90%, mieszanina izomerów 2' i 3'). Rt = 15,58 min (izomer 3') i 16,45 min (izomer 2'). Do charakterystyki NMR, małe ilości produktów rozdzieliłem i oczyściłem stosując analityczne HPLC z odwróconym układem faz (g. mocny).

Izomer 2' (96 mOD, Rt = 16,45 min)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 7.91 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 6.27 (s, 1H), 5.15 (d, J = 14.9 Hz, 1H), 4.92 (dd, J = 5.6, 3.4 Hz, 1H), 4.79 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 4.11 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 3.78 – 3.74 (m, 2H)

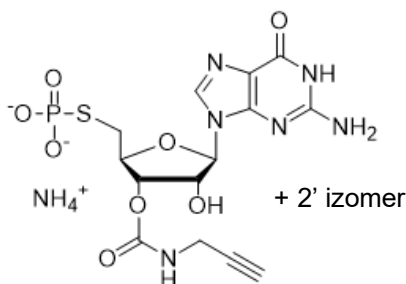
HRMS (ESI-) obliczone m/z 473,0076 dla C₁₄H₁₉IN₆O₅⁻ [M-H]⁻; zmierzone 473,0080

Izomer 3' (129 mOD, Rt = 15,58 min)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 7.93 (s, 1H), 5.70 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.12 (dd, J = 5.4, 2.1 Hz, 1H), 4.93 (dd, J = 7.5, 5.4 Hz, 1H), 4.11 (td, J = 6.7, 2.2 Hz, 1H), 3.76 (d, J = 5.6 Hz, 1H).

HRMS (ESI-) obliczone m/z 473,0076 dla C₁₄H₁₉IN₆O₅⁻ [M-H]⁻; zmierzone 473,0082

III.6.1.5 2'+3'-O-(propargilokarbamoilo)guanozyny 5'-monotiofosforan, **GMPS-2'+3'-C(O)NH-CH₂CCH**



Do zawiesiny 2'+3'-O-(N-(propargilokarbamoilo))-5'-jodoguanozyny (500 mg, 1,06 mmol) w schłodzonym DMF (10 ml) dodałem tiofosforan trisodu (530 mg, 1,27 mmol, 1,2 ekw.) i 730 µl trietyloaminy (430 mg, 4,23 mmol, 4 ekw.). Reakcję prowadziłem w 5 °C przez 6 h, mieszając na mieszadle magnetycznym. Następnie mieszaninę rozcieńczyłem 50 ml wody MQ i produkt oczyściłem stosując chromatografię jonowymienną na złożu DEAE-Sephadex. Bufor TEAB odparowałem, produkt trzykrotnie liofilizowałem z wody. Otrzymałem 234 mg (6186 mOD, 0,51 mmol, wyd. 64%). Rt = 6,44 min

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 7.99 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 5.91 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 5.81 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 5.68 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 5.63 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.48 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 5.35 (dd, J = 5.6, 3.7 Hz, 1H), 5.24 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 5.13 (dd, J = 5.4, 2.2 Hz, 1H), 5.03 (dd, J = 7.7, 5.0 Hz, 1H), 4.87 (dd, J = 7.6, 5.5 Hz, 1H), 4.75 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 4.40 (dd, J = 5.3, 3.6 Hz, 1H), 4.19 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 4.05 (td, J = 6.2, 2.1 Hz, 1H), 3.93 (td, J = 6.1, 3.6 Hz, 1H), 3.13 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 3.09 (d, J = 2.4 Hz, 1H)

³¹P NMR (203 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 12.09 (s, 1P), 11.72 (s, 1P)

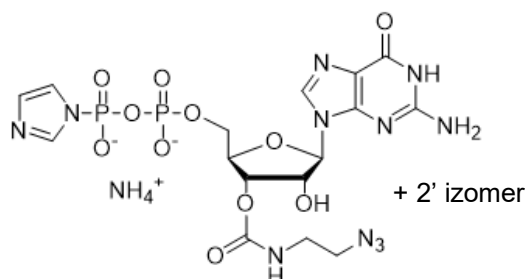
HRMS (ESI-) obliczone m/z 459,0493 dla C₁₄H₁₆N₆O₈PS⁻ [M-H]⁻; zmierzone 459,0500

III.6.2 Synteza azydkowych i propargilowych pochodnych mono- i dinukleotydów

III.6.2.1 Procedura ogólna C1 – synteza P-imidazolowych pochodnych nukleotydów z linkerem i grupą azydkową lub propargilową

P-imidazolowe pochodne nukleotydów (za wyjątkiem GMPS) zostały otrzymane wg procedury opisanej przez Warmiński i wsp. ²⁶⁶. Do roztworu odpowiedniego nukleotydu (ADP, GMP, GDP, GpCH₂p, TMGMP, 1 ekw.) w bezwodnym DMSO (suszone nad sitami molekul.) w 10 mL probówce do reakcji mikrofalowej dodałem karbonyldiimidazol (CDI) (6 lub 10 ekw.) oraz mieszadło magnetyczne. Reakcje prowadziłem wg programu dynamicznego z ustawieniami/parametrami: $P_{\max} = 5 \text{ W}$, $T_{\max} = 50 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min. Po zakończeniu reakcji i ochłodzeniu mieszaniny dodałem wodę MQ (6 lub 10 ekw.) w celu hydrolizy nadmiaru CDI, a po 15 min. dodałem DBU (1 ekw.) i 2-azydoetyloamine lub propargiloamine (6 lub 10 ekw.). Reakcje mieszałem w t. pok. przez 2 do 12 godzin. Reakcje z propargiloaminą zachodziły w ciągu 2-3 godz. Progres reakcji monitorowałem metodą RP-HPLC. Po uzyskaniu pełnej konwersji, pochodne imidazolowe wytrąciłem, stosując zimny aceton z dodatkiem NaClO₄ (6 lub 10 ekwiwalentów) lub, w przypadku pochodnych trimetyloguanozynowych, schłodzony acetonitryl z LiClO₄. Precypitat został odwirowany, zdekantowany i wysuszony pod próżnią przed dalszymi reakcjami sprzęgania.

III.6.2.2 2'+3'-O-(N-(2-azydoetylo)karbamoido)guanozyny 5'-difosforanu P-imidazolid (40), Im-GDP-2'+3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂N₃

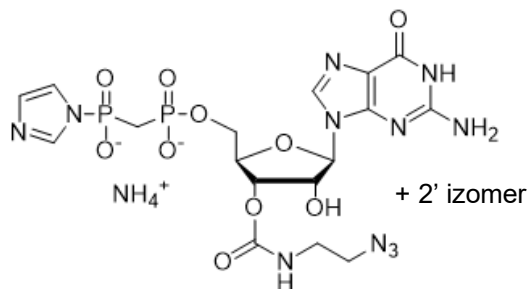


Związek otrzymałem zgodnie z procedurą ogólną C1.

Do roztworu GDP (sól TEA⁺, 98 mg, 0,100 mmol, 1 ekw.) w bezwodnym DMSO (2 ml) dodałem CDI (97 mg, 0,600 mmol, 6 ekw.). Mieszaninę poddałem reakcji z użyciem mikrofal jak opisano w procedurze C1. Następnie dodałem 22 μL wody i mieszałem w t. pok. przez 15 min. Po tym czasie dodałem 2-azydoetyloaminę (54 μL , 0,600 mmol, 6 ekw.) i DBU (15 μL , 0,100 mmol) i mieszałem w t. pok. Po 6 godz. uzyskałem pełną konwersję i produkt wytrąciłem w schłodzonym acetonie (40 ml) z NaClO₄ (73 mg, 0,600 mmol, 6 ekw.). Otrzymałem 26 mg (611 mOD, wyd. 51%) P-imidazolidu **40** (mieszanina izomerów 2' i 3', sól sodowa)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 604,0825 dla C₁₆H₂₀N₁₁O₁₁P₂⁻ [M-H]⁻; zmierzone 604,0831

III.6.2.3 2'+3'-O-(N-(2-azydoetylo)karbamoilo)guanozyny 5'-metylenodifosforanu P-imidazolid (41), Im-GpCH₂p-2'+3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂N₃

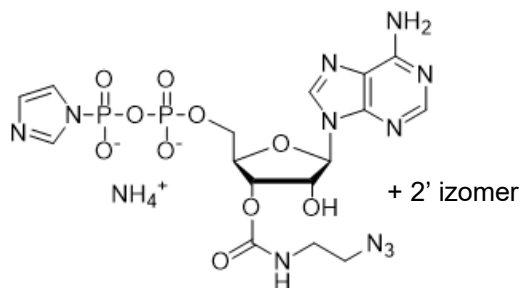


Związek otrzymałem zgodnie z procedurą ogólną C1.

Do roztworu GpCH₂p (sól TEA⁺, 98 mg, 0,100 mmol, 1 ekw.) w bezwodnym DMSO (2 ml) dodałem CDI (97 mg, 0,600 mmol, 6 ekw.). Mieszaninę poddałem reakcji z użyciem mikrofal jak opisano w procedurze C1. Następnie dodałem 22 µL wody i mieszałem w t. pok. przez 15 min. Po tym czasie dodałem 2-azydoetyloaminę (54 µL, 0,600 mmol, 6 ekw.) i DBU (15 µL, 0,100 mmol) i mieszałem w t. pok. Po 6 godz. uzyskałem pełną konwersję i produkt wytrąciłem w schłodzonym acetonie (40 ml) z NaClO₄ (73 mg, 0,600 mmol, 6 ekw.). Otrzymałem 40 mg (960 mOD, wyd. 80%) P-imidazolidu **41** (mieszanina izomerów 2' i 3', sól sodowa)

HRMS (ESI-) obliczone dla produktu hydrolizy P-Imidazolidu: m/z 552,0763 dla C₁₄H₂₀N₉O₁₁P₂⁻ [M-H]⁻; zmierzone 552,0769

III.6.2.4 2'+3'-O-(N-(2-azydoetylo)karbamoilo)adenozyny 5'-difosforanu P-imidazolid (42), Im-ADP-2'+3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂N₃

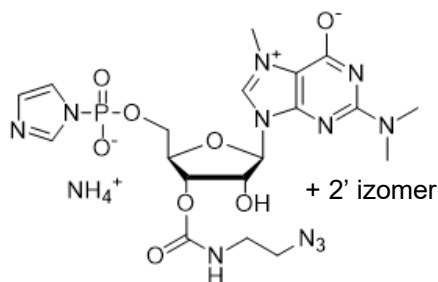


Związek otrzymałem zgodnie z procedurą ogólną C1.

Do roztworu ADP (sól TEA⁺, 200 mg, 0,274 mmol, 1 ekw.) w bezwodnym DMSO (5 ml) dodałem CDI (222 mg, 1,37 mmol, 5 ekw.). Mieszaninę poddałem reakcji z użyciem mikrofal jak opisano w procedurze C1. Następnie dodałem 49 µL wody i mieszałem w t. pok. przez 15 min. Po tym czasie dodałem 2-azydoetyloaminę (246 µL, 2,73 mmol, 10 ekw.) i DBU (41 µL, 0,274 mmol) i mieszałem w t. pok. Po 24 godz. uzyskałem pełną konwersję i produkt wytrąciłem w schłodzonym acetonie (50 ml) z NaClO₄ (335 mg, 2,73 mmol, 10 ekw.). Otrzymałem 91 mg P-imidazolidu **42** (0,137 mmol, wyd. 52%, mieszanina izomerów 2' i 3', sól sodowa).

HRMS (ESI-) obliczone m/z 588,0875 dla C₁₆H₂₀N₁₁O₁₀P₂⁻ [M-H]⁻; zmierzone 588,0881

III.6.2.5 2'+3'-O-(N-(2-azydoetylo)karbamoił)-N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyny 5'-mono-fosforanu P-imidazolid (43), Im-TMGMP-2'+3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂N₃

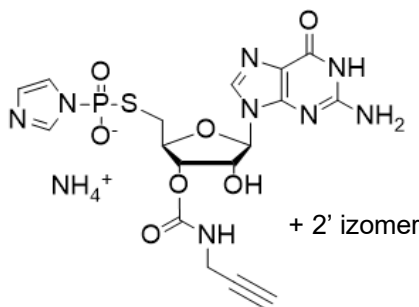


Związek otrzymałem zgodnie z procedurą ogólną C1.

Do roztworu TMGMP (sól TEA⁺, 25 mg, 0,052 mmol, 1 ekw.) w bezwodnym DMSO (1 ml) dodałem CDI (51 mg, 0,31 mmol, 6 ekw.). Mieszaninę poddałem reakcji z użyciem mikrofal jak opisano w procedurze C1. Następnie dodałem 14 μ L wody i mieszałem w t. pok. przez 15 min. Po tym czasie dodałem 2-azydoetyloaminę (20 μ L, 0,31 mmol, 6 ekw.) i DBU (20 μ L, 0,052 mmol, 1 ekw.) i mieszałem w t. pok. Po 6 godz. uzyskałem pełną konwersję i produkt wytrąciłem w schłodzonym acetonitrylu (40 ml) z LiClO₄ (33 mg, 0,31 mmol, 6 ekw.). Otrzymałem 19 mg (387 mOD, wyd. 62%) P-imidazolidu **43** (mieszanina izomerów 2' i 3', sól sodowa)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 566,1631 dla C₁₉H₂₅N₁₁O₈P⁻ [M-H]⁻; zmierzone 566,1633

III.6.2.6 2'+3'-O-(N-(propargilokarbamoilo)guanozyny 5'-monotiofosforanu P-imidazolid (37), Im-GMPS-2'+3'-O-C(O)NH-CH₂CCH



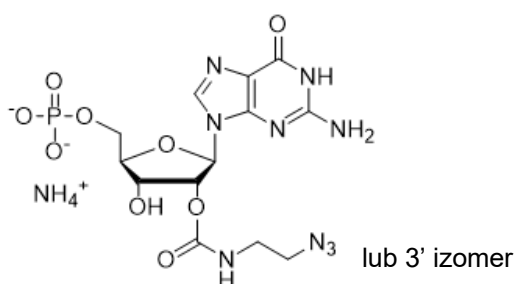
Związek otrzymałem wg procedury Mukaiyama-Hashimoto^{3, 4}. Do roztworu 2'+3'-O-(N-(propargilokarbamoilo)-guanozyny 5'-monofosforan (sól TEA⁺, 1 g, 1,51 mmol) w bezwodnym DMF (10 ml) dodałem 1,03 g imidazolu (15,09 mmol, 10 ekw.), 997,3 mg 2,2'-ditiopirydyny (DTDP) (4,53 mmol, 3 ekw.) i mieszałem na mieszadle magnetycznym. Po 15 min. dodałem 630 μ L trietyloaminy (4,53 mmol, 458 mg, 3 ekw.) i 1,19 g trifenylofosfiny (PPh₃) (4,53 mmol, 3 ekw.). Mieszaninę mieszałem 24 h w t. pok. Po tym czasie dodałem bezwodny NaClO₄ (1,84 g) i wytrąciłem produkt w za pomocą schłodzonego acetonu (100 ml). Osad zwirowałem, zdekan-towałem, wysuszyłem nad P₄O₁₀. Otrzymałem 914 mg produktu (wyd. 87%, sól sodowa, mieszanina izomerów 2' i 3'). Rt = 9,65 min (izomer 2') i 10,58 min (izomer 3')

HRMS (ESI-) obliczone m/z 509,0762 dla C₁₇H₁₈N₈O₇PS⁻ [M-H]⁻; zmierzone 509,0764

III.6.2.7 Procedura ogólna C2 – synteza pochodnych nukleotydów z linkerem i grupą azydkową lub propargilową

Aby uzyskać mononukleotydowe pochodne z wolną grupą 5'-hydroksylową, najpierw przygotowałem ich P-imidazolidy zgodnie z procedurą ogólną C1, następnie przeprowadziłem hydrolizę za pomocą HCl obniżając pH reakcji do pH 1 i mieszając przez 30 minut w t. pok. Produkt (sól trietyloamoniowa) oczyściłem na kolumnie DEAE-Sephadex. Następnie ponownie oczyściłem na semipreparatywnej kolumnie C18 otrzymując czysty produkt (lub izomer 2' lub 3' w przypadku modyfikacji na rybozie) w postaci soli amonowej. Związki te posłużyły jako substraty do reakcji cykloaddycji azydku do alkinu z różnymi fluoroformami FMR do badań ze snurportyną.

III.6.2.8 2'/3'-O-(N-(2-azydoetylo)karbamilo)guanozyny 5'-monofosforan (12-2'/3'), GMP-2'/3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂N₃



Związek **12-2'** i **12-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej C2.

Do roztworu GMP (sól TEA⁺, 500 mg, 0,88 mmol, 1 ekw.) w bezwodnym DMSO (3 ml) dodałem CDI (855 mg, 5,28 mmol, 6 ekw.). Mieszaninę poddałem reakcji z użyciem mikrofal jak opisano w procedurze C1. Następnie dodałem 240 μ L wody i mieszałem w t. pok. przez 15 min. Po tym czasie dodałem 2-azydoetyloaminę (790 μ L, 8,80 mmol, 10 ekw.) i DBU (130 μ L, 0,88 mmol) i mieszałem w t. pok. Reakcję kontrolowałem za pomocą RP-HPLC i po uzyskaniu pełnej konwersji do produktu, dodałem aq HCl do uzyskania pH 1,0 i dalej mieszałem w t. pok. przez 30 min. Roztwór zobojętniłem wodorowęglanem sodu do pH ~7, produkt oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej, a następnie izomery rozdzieliłem stosując semipreparatywne RP-HPLC. Otrzymałem 96,0 mg (0,202 mmol, wyd. 23%) związku **12-2'** oraz 210,1 mg (0,442 mmol, wyd. 50%) związku **12-3'** (sól amonowa).

Izomer 2' (2440 mOD, Rt = 8,78 min)

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ [ppm] 8.28 (s, 1H, H8), 6.12 (d, J = 5.2 Hz, 1H, H1'), 5.56 (t, J = 5.2 Hz, 1H, H2'), 4.68 (t, J = 5.2 Hz, 1H, H3'), 4.41 – 4.36 (m, 1H, H4'), 4.20 (ddd, J = 11.7, 4.8, 2.9 Hz, 1H, H5'), 4.14 (ddd, J = 11.7, 5.5, 3.6 Hz, 1H, H5''), 3.39 – 3.24 (m, 4H, CH₂CH₂N₃)

³¹P NMR (202 MHz, D₂O) δ [ppm] 0.31 – 0.16 (m, 1P)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 474,0892 dla C₁₃H₁₇N₉O₉P⁻ [M-H]⁻; zmierzone 474,0892

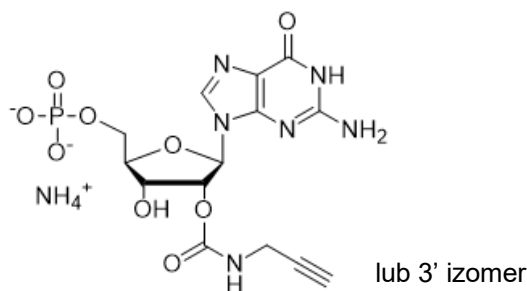
Izomer 3' (5343 mOD, Rt = 7,90 min)

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ [ppm] 8.29 (s, 1H, H8), 5.99 (d, J = 6.9 Hz, 1H, H1'), 5.32 (dd, J = 5.4, 2.6 Hz, 1H, H3'), 4.96 (dd, J = 6.9, 5.4 Hz, 1H, H2'), 4.52 – 4.49 (m, 1H, H4'), 4.14 (dd, J = 5.2, 3.0 Hz, 2H, H5', H5''), 3.49 – 3.43 (m, 2H, CH₂CH₂N₃), 3.42 – 3.37 (m, 2H, CH₂CH₂N₃)

³¹P NMR (202 MHz, D₂O) δ [ppm] 0.27 – 0.00 (m, 1P)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 474,0892 dla C₁₃H₁₇N₉O₉P⁻ [M-H]⁻; zmierzone 474,0892

III.6.2.9 2'/+3'-O-(N-propargilokarbamoilo)guanozyny 5'-monofosforan (13-2'/3'), GMP-2'/3'-O-C(O)NH-CH₂CCH



Związek **13-2'** i **13-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej C2.

Do roztworu GMP (sól TEA⁺, 500 mg, 0,88 mmol, 1 ekw.) w bezwodnym DMSO (3 ml) dodałem CDI (855 mg, 5,28 mmol, 6 ekw.). Mieszaninę poddałem reakcji z użyciem mikrofal jak opisano w procedurze C1. Następnie dodałem 240 µL wody i mieszałem w t. pok. przez 15 min. Po tym czasie dodałem propargiloaminę (500 µL, 8,80 mmol, 10 ekw.) i DBU (130 µl, 0,88 mmol) i mieszałem w t. pok. Po uzyskaniu pełnej konwersji, dodałem HCl do uzyskania pH 1,0 i dalej mieszałem w t. pok. przez 30 min po czym zobojętniłem (pH ~7) za pomocą NaHCO₃. Produkt oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej, a następnie izomery rozdzieliłem stosując semipreparatywne RP-HPLC. Otrzymałem 32,71 mg (0,073 mmol, wyd. 8%) związku **13-2'** oraz 82,55 mg (0,186 mmol, wyd. 21%) związku **13-3'** (sól amonowa).

Izomer 2' (890 mOD, Rt = 7,67 min)

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ [ppm] 8.21 (s, 1H, H8), 6.12 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H1'), 5.55 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, H2'), 4.70 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, H3'), 4.41 – 4.35 (m, 1H, H4'), 4.21 (ddd, *J* = 11.7, 4.8, 2.9 Hz, 1H, H5'), 4.15 (ddd, *J* = 11.7, 5.6, 3.7 Hz, 1H, H5''), 3.87 (t, *J* = 2.5 Hz, 2H, N-CH₂CCH), 2.58 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, N-CH₂CCH)

³¹P NMR (202 MHz, D₂O) δ [ppm] 0.25 (s, 1P)

HRMS (ESI-) obliczone *m/z* 443,0722 dla C₁₄H₁₆N₆O₉P⁻ [M-H]⁻; zmierzone 443,0727

Izomer 3' (2246 mOD, Rt = 8,00 min)

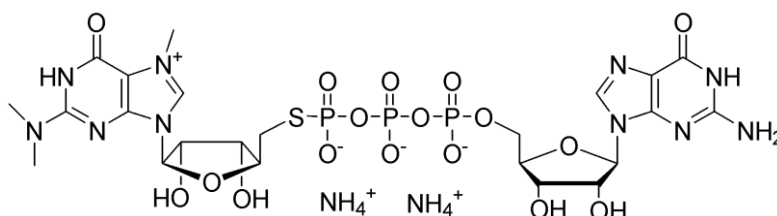
¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ [ppm] 8.24 (s, 1H, H8), 5.98 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H1'), 5.35 (dd, *J* = 5.6, 2.5 Hz, 1H, H3'), 4.97 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, H2'), 4.58 – 4.48 (m, 1H, H4'), 4.15 (dt, *J* = 5.4, 2.9 Hz, 2H, H5', H5''), 3.97 (s, 2H, N-CH₂CCH), 2.65 (s, 1H, N-CH₂CCH)

³¹P NMR (202 MHz, D₂O) δ [ppm] 0.15 (s, 1P)

HRMS (ESI-) obliczone *m/z* 443,0722 dla C₁₄H₁₆N₆O₉P⁻ [M-H]⁻; zmierzone 443,0727

III.6.3 Synteza dinukleotydowych modyfikowanych pochodnych TMG kapu bez grupy propargilowej lub azydkowej

III.6.3.1 P1-(5'-tio-N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(guanozyn-5'-ylo) trifosforan (19), **TMG-5'-SpppG**



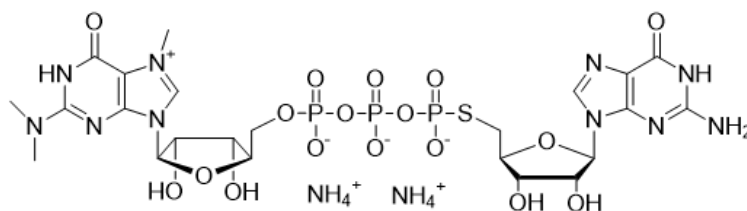
Do zawiesiny TMGMPS (**32**) (sól TEA⁺, 25 mg, 64 μmol, 1 ekw.) w bezwodnym DMF (1 ml) dodałem GDP-Im (**33**) (sól sodowa, 49,5 mg, 95 μmol, 1,5 ekw.) oraz bezwodny ZnCl₂ (86 mg, 640 μmol, 10 ekw.). Reakcję prowadziłem 24 godziny wytrząsając na vortexie. Po uzyskaniu całkowitej konwersji reakcję zakończyłem dodając Na₂EDTA (23,8 mg, 640 μmol, 10 ekw.) w celu zdysocjowania kompleksu nukleotyd-cynk. Produkt oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej, a następnie stosując semipreparatywne RP-HPLC. Po kilkukrotnej liofilizacji otrzymałem 12,51 mg związku **19** (386 mOD, 14,8 μmol, wyd. 53%, sól amonowa). Rt = 5,56 min

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ [ppm] 8.95 (s, 1H, H8_{TMG}), 8.03 (s, 1H, H8_G), 5.88 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, H1'_{TMG}), 5.76 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, H1'_G), 4.66 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H, H2'_{TMG}), 4.61 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H2'_G), 4.44 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H3'_G), 4.40 (q, *J* = 5.7 Hz, 1H, H4'_{TMG}), 4.38 – 4.32 (m, 3H, H3'_{TMG}, H4'_G, H5'_G), 4.25 (dt, *J* = 12.7, 6.5 Hz, 1H, H5''_G), 4.06 (s, 3H, m⁷G), 3.32 (dd, *J* = 12.2, 6.2 Hz, 2H, H5'_{TMG}, H5''_{TMG}), 3.16 (s, 6H, 2x N-CH₃)

³¹P NMR (203 MHz, D₂O) δ [ppm] 7.46 (d, *J* = 28.3 Hz, 1P, P_γ), -11.62 (d, *J* = 18.8 Hz, 1P, P_α), -23.95 (dd, *J* = 27.5, 18.8 Hz, 1P, P_β)

HRMS (ESI⁻) obliczone *m/z* 845,0886 dla C₂₃H₃₂N₁₀O₁₇P₃S⁻ [M-H]⁻; zmierzone 845,0903

III.6.3.2 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(5'-tioguanozyn-5'-ylo) trifosforan (20), **TMGppp-5'-SG**



Do zawiesiny GDPS (**39**) (sól TEA⁺, 31,8 mg, 41 μmol, 1 ekw.) w bezwodnym DMF (1 ml) dodałem TMGMp-Im (**29**) (sól sodowa, 20 mg, 41 μmol, 1 ekw.) oraz bezwodny ZnCl₂ (57 mg, 410 μmol, 10 ekw.). Reakcję prowadziłem 24 godziny wytrząsając na vortexie. Po uzyskaniu całkowitej konwersji reakcję zakończyłem dodając Na₂EDTA (15,3 mg, 410 μmol, 10 ekw.) w celu zdysocjowania kompleksu nukleotyd-cynk. Produkt oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej, a następnie stosując semipreparatywne RP-HPLC. Po kilkukrotnej liofilizacji

otrzymałem 6,39 mg związku **20** (197 mOD, 7,55 μ mol, wyd. 18%, sól amonowa). Rt = 6,35 min.

^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ [ppm] 9.06 (s, 1H, H8_{TMG}), 7.90 (s, 1H, H8_G), 5.93 (d, J = 3.4 Hz, 1H, H1'_{TMG}), 5.71 (d, J = 6.5 Hz, 1H, H1'_G), 4.66 (dd, J = 6.5, 5.1 Hz, 1H, H2'_G), 4.59 (dd, J = 4.8, 3.4 Hz, 1H, H2'_{TMG}), 4.46 – 4.41 (m, 2H, H3'_{TMG}, H4'_{TMG}, H3'_G), 4.40 (dd, J = 6.0, 2.9 Hz, 2H, H4'_G, H5'_{TMG}), 4.28 (ddd, J = 11.8, 6.0, 2.2 Hz, 1H, H5''_{TMG}), 4.08 (s, 3H, m⁷), 3.32 (ddd, J = 28.3, 13.8, 6.4 Hz, 2H, H5'_G, H5''_G), 3.17 (s, 6H, 2x N-CH₃)

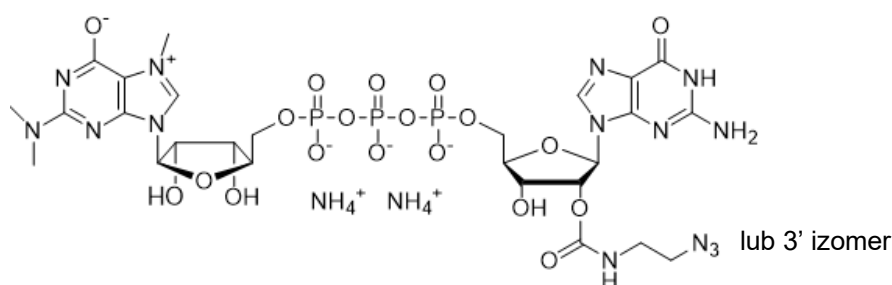
^{31}P NMR (203 MHz, D_2O) δ [ppm] 7.65 (d, J = 27.3 Hz, 1P, P _{α}), -11.62 (d, J = 19.5 Hz, 1P, P _{γ}), -23.84 (dd, J = 27.3, 19.5 Hz, 1P, P _{β}).

HRMS (ESI-) obliczone m/z 845,0886 dla C₂₃H₃₂N₁₀O₁₇P₃S⁻ [M-H]⁻; zmierzone 845,0896

III.6.3.3 Procedura ogólna D – synteza dinukleotydowych pochodnych TMG lub MMG kapu zawierających linker z grupą azydkową lub propargilową

P-imidazolidy (sól sodowa Im-GDP-linker-N₃ (**40**), Im-GpCH₂p-linker-N₃ (**41**), Im-ADP-linker-N₃ (**42**), Im-GMPS-linker-N₃ (**37**), Im-TMGMP-linker-N₃ (**29**), mieszanina izomerów 2' i 3', lub Im-TMGDP (**35**)) poddałem reakcji sprzęgania z odpowiednimi mono- lub difosforanami (sól trietyloamoniowa TMGMP (**27**), TMGDP (**30**), TMGMPS (**32**), m⁷GMP, m⁷GMPS lub GDP) w bezwodnym DMF (1 mL na 40 mg nukleotydu) w obecności suszonego ZnCl₂ (10 ekw.). Mieszaninę wytrząsałem energicznie za pomocą wytrząsarki typu Vortex aż do całkowitego rozpuszczenia substratów i w czasie reakcji, w t. pok. Postęp reakcji sprawdzałem metodą HPLC. Po całkowitym przereagowaniu imidazolowego substratu (24-48h), zakończyłem reakcję dodając Na₂EDTA (1 ekw.) oraz stały NaHCO₃ (1 ekw.), doprowadzając mieszaninę do pH 6. Produkt (sól trietyloamoniowa) oczyściłem na kolumnie jonowymiennej DEAE-Sephadex. Następnie ponownie oczyściłem na semipreparatywnej kolumnie C-16 otrzymując czysty produkt w postaci soli amonowej (izomer 2' lub 3' w przypadku modyfikacji na rybozie)

III.6.3.4 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'/3'-O-(N-(2-azydoetylo)karbamilo)ganozyn-5'-ylo) trifosforan (1-2'/3'), TMGpppG-2'/3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂N₃



Związki **1-2'** oraz **1-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej D.

Do zawiesiny zawierającej Im-GDP-linker-N₃ (**40**) (sól sodowa, 247,4 mg, 0,39 mmol, 1 ekw., mieszanina izomerów 2' i 3') oraz TMGMP (**27**) (sól TEA⁺, 200 mg, 0,33 mmol) w bezwodnym DMF dodałem suszony ZnCl₂ (532 mg, 3,9 mmol, 10 ekw.). Reakcje prowadziłem 24 h za pomocą wytrząsarki typu Vortex. Produkt oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej, a następnie izomery rozdzieliłem stosując semipreparatywne RP-HPLC. Otrzymałem 91,5 mg (0,097 mmol, wyd. 29%) związku **1-2'** oraz 95,1 mg (0,101 mmol, wyd. 31%) związku **1-3'** (sól amonowa).

Izomer 2' (2534 mOD; Rt = 9,11 min)

^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ [ppm] 8,96* (s, 1H, H8_{TMG}), 7,87 (s, 1H, H8_{G}), 5,91 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H, $\text{H1}'_{\text{TMG}}$), 5,86 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H, H1_{G}), 5,31 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H, $\text{H2}'_{\text{G}}$), 4,60 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H, $\text{H3}'_{\text{G}}$), 4,55 (t, $J = 4,0$ Hz, 1H, $\text{H2}'_{\text{TMG}}$), 4,44 – 4,32 (m, 5H, $\text{H3}'_{\text{TMG}}$, $\text{H4}'_{\text{TMG}}$, $\text{H5}'_{\text{TMG}}$, $\text{H4}'_{\text{G}}$, $\text{H5}'_{\text{G}}$), 4,26 (dd, $J = 10,9, 6,2$ Hz, 2H, $\text{H5}''_{\text{TMG}}$, $\text{H5}''_{\text{G}}$), 4,07 (s, 3H, m^7), 3,37 – 3,22 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3,16 (s, 6H, 2x N-CH_3) * - powolna wymiana w D_2O .

^{31}P NMR (203 MHz, D_2O , 25 °C, wz. zewn. H_3PO_4) δ [ppm] -11,40 – -11,79 (m, 2P, P_α , P_γ), -23,18 (t, $J = 19,3$ Hz, 1P, P_β).

HRMS (ESI-) obliczone m/z 941,1500 dla $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_{14}\text{O}_{19}\text{P}_3^-$ [M-H] $^-$; zmierzone 941,1509

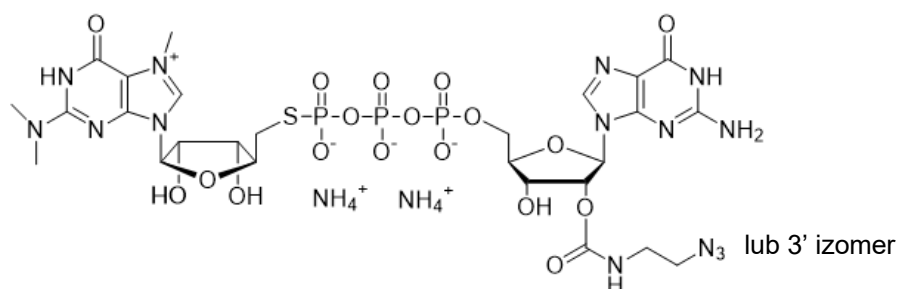
Izomer 3' (2632 mOD; Rt = 9,14 min)

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ [ppm] 7,95 (s, 1H, H8_{G}), 5,92 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H, $\text{H1}'_{\text{TMG}}$), 5,76 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H, $\text{H1}'_{\text{G}}$), 5,25 (t, $J = 3,6$ Hz, 1H, $\text{H3}'_{\text{G}}$), 4,75 (m, 1H, $\text{H2}'_{\text{G}}$, *nałożony z sygnałem od rozpuszczalnika*), 4,57-4,54 (m, 1H, $\text{H2}'_{\text{TMG}}$), 4,47 (m, 1H, $\text{H4}'_{\text{G}}$), 4,42-4,36 (m, 3H, $\text{H3}'_{\text{TMG}}$, $\text{H4}'_{\text{TMG}}$, $\text{H5}'_{\text{G}}$), 4,30-4,22 (m, 3H, $\text{H5}'_{\text{TMG}}$, $\text{H5}''_{\text{G}}$, $\text{H5}''_{\text{TMG}}$), 4,04 (s, 3H, m^7), 3,46-3,41 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3,39 – 3,34 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3,16 (s, 6H, 2x N-CH_3).

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , 25 °C, wz. zewn. H_3PO_4) δ [ppm] -11,54 (t, $J = 17,9$ Hz, 2P, P_α , P_γ), -23,13 (m, 1P, P_β).

HRMS (ESI-) obliczone m/z 941,1500 dla $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_{14}\text{O}_{19}\text{P}_3^-$ [M-H] $^-$; zmierzone 941,1507

III.6.3.5 P1-(5'-tio- $\text{N}^2, \text{N}^2, \text{N}^7$ -trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'/3'-O-(N-(2-azydoetylo)-karbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan (2-2'/3'), **TMG-5'-S-pppG-2'/3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂N₃**



Związki **2-2'** oraz **2-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej D.

Do zawiesiny zawierającej Im-GDP-linker- N_3 (**40**) (sól sodowa, 120,5 mg, 0,19 mmol, 1 ekw., mieszanina izomerów 2' i 3') oraz TMGMPS (**32**) (sól TEA $^+$, 100 mg, 0,16 mmol) w bezwodnym DMF dodałem suchy ZnCl_2 (259,0 mg, 1,9 mmol, 10 ekw.). Reakcje prowadziłem 24 h za pomocą wytrząsarki typu Vortex. Produkt oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej, a następnie izomery rozdzieliłem stosując semipreparatywne RP-HPLC. Otrzymałem 20,8 mg (0,022 mmol, wyd. 14%) związku **2-2'** oraz 24,2 mg (0,025 mmol, wyd. 16%) związku **2-3'** (sól amonowa).

Izomer 2' (567 mOD; Rt = 8,17 min)

^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ [ppm] 8,97 (s, 1H, H8_{TMG}), 8,11 (s, 1H, H8_{G}), 5,93 – 5,87 (m, 2H, $\text{H1}'_{\text{TMG}}$, $\text{H1}'_{\text{G}}$), 5,38 (t, $J = 4,9$ Hz, 1H, $\text{H2}'_{\text{G}}$), 4,67-4,60 (m, 2H, $\text{H2}'_{\text{TMG}}$, $\text{H3}'_{\text{G}}$), 4,47 – 4,33 (m, 5H, $\text{H3}'_{\text{TMG}}$, $\text{H4}'_{\text{TMG}}$, $\text{H4}'_{\text{G}}$, $\text{H5}'_{\text{G}}$), 4,28 (dt, $J = 12,3, 6,4$ Hz, 1H, $\text{H5}''_{\text{G}}$), 4,07 (s, 3H, m^7), 3,38 – 3,30 (m, 5H, $\text{H5}'_{\text{TMG}}$, $\text{H5}''_{\text{TMG}}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3,16 (s, 6H, 2x N-CH_3)

^{31}P NMR (203 MHz, D_2O , 25 °C, wz. zewn. H_3PO_4) δ [ppm] 7,46 (d, $J = 27,5$ Hz, 1P, P_γ), -11,65 (d, $J = 18,9$ Hz, 1P, P_α), -23,93 (dd, $J = 27,5, 18,9$ Hz, 1P, P_β)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 957,1271 dla $C_{26}H_{36}N_{14}O_{18}P_3S^-$ [M-H]⁻; zmierzone 957,1292

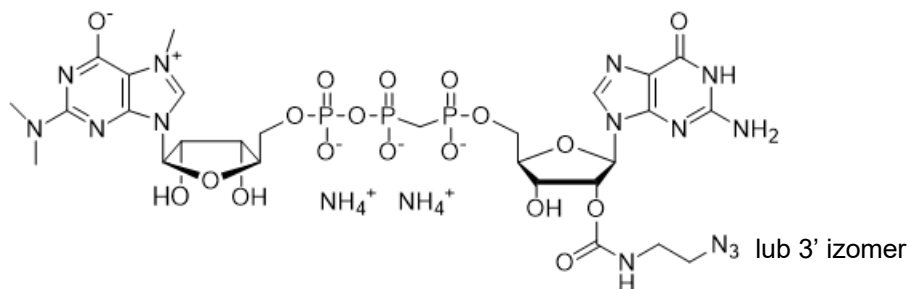
Izomer 3' (660 mOD; Rt = 8,19 min)

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ [ppm] 8.97 (s, 1H, H₈_{TMG}), 8.26 (s, 1H, H₈_G), 5.89 (d, J = 4.3 Hz, 1H, H_{1'}_{TMG}), 5.83 (d, J = 6.6 Hz, 1H, H_{1'}_G), 5.28 – 5.23 (m, 1H, H_{3'}_G), 4.83 (d, J = 6.1 Hz, 1H, H_{2'}_G, *nałożony z sygnałem od rozpuszczalnika*), 4.68 (t, J = 4.7 Hz, 1H, H_{2'}_{TMG}), 4.55 – 4.51 (m, 1H, H_{4'}_G), 4.40 (q, J = 5.8 Hz, 1H, H_{4'}_{TMG}), 4.36 (t, J = 7.6, 5.2 Hz, 2H, H_{3'}_{TMG}, H_{5'}_G), 4.27 (dt, J = 11.6, 5.8 Hz, 1H, H_{5'}_G), 4.07 (s, 3H, m⁷), 3.45 (t, J = 5.5 Hz, 2H, CH₂CH₂N₃), 3.38 (t, J = 5.5 Hz, 2H, CH₂CH₂N₃), 3.31 (dt, J = 12.0, 5.8 Hz, 2H, H_{5'}_{TMG}, H_{5''}_{TMG}), 3.16 (s, 6H, 2x N-CH₃).

³¹P NMR (203 MHz, D₂O, 25 °C, wz. zewn. H₃PO₄) δ [ppm] 7.49 (d, J = 27.2 Hz, 1P, P_γ), -11.68 (d, J = 18.7 Hz, 1P, P_α), -23.90 (dd, J = 27.2, 18.7 Hz, 1P, P_β)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 957,1271 dla $C_{26}H_{36}N_{14}O_{18}P_3S^-$ [M-H]⁻; zmierzone 957,1287

III.6.3.6 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'/3'-O-(N-(2-azydoetylo)-karbamoił)guanozyn-5'-ylo) 2,3-metylenotrifosforan (3-2'/3'), TMGppCH₂pG-2'/3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂N₃



Związki **3-2'** oraz **3-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej D.

Do zawiesiny zawierającej Im-GpCH₂p-linker-N₃ (**41**) (sól sodowa, 23,5 mg, 0,046 mmol, 1 ekw., mieszanina izomerów 2' i 3') oraz TMGMP (**27**) (sól TEA⁺, 26 mg, 0,041 mmol) w bezwodnym DMF dodałem suszony ZnCl₂ (62,7 mg, 0,46 mmol, 10 ekw.). Reakcje prowadziłem 24 h, wytrząsając za pomocą wytrząsarki typu Vortex. Produkt oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej, a następnie izomery rozdzieliłem stosując semipreparatywne RP-HPLC. Otrzymałem 1,87 mg (0,0020 mmol, wyd. 22%) związku **3-2'** oraz 2,31 mg (0,0025 mmol, wyd. 27%) związku **3-3'** (sól amonowa).

Izomer 2' (52 mOD, Rt = 9,35 min)

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm] 8.02 (s, 1H, H₈), 5.97 (d, J = 3.3 Hz, 1H, H_{1'}_{TMG}), 5.79 (d, J = 6.9 Hz, 1H, H_{1'}_G), 5.27-5.25 (m, 1H, H_{3'}_G), 4.86 (m, 1H, H_{2'}_G, *nałożony z sygnałem od rozpuszczalnika*), 4.60 (t, J = 4.0 Hz, 1H, H_{2'}_{TMG}), 4.47 (s, 1H, H_{4'}_G), 4.41 (t, J = 5.2 Hz, 1H, H_{3'}_{TMG}), 4.39-4.34 (m, 1H, H_{4'}_{TMG}), 4.29 – 4.15 (m, 4H, H_{5'}_{TMG}, H_{5'}_G, H_{5''}_{TMG}, H_{5''}_G), 4.06 (s, 3H, m⁷), 3.45 (d, J = 5.5 Hz, 2H, CH₂CH₂N₃), 3.39 (t, J = 5.5 Hz, 2H, CH₂CH₂N₃), 3.18 (s, 6H, 2x N-CH₃), 2.39 (dt, J = 20.2 Hz, 2H, P-CH₂-P)

³¹P NMR (202 MHz, D₂O) δ [ppm] 17.02 (d, J = 8.0 Hz, 1P, P_β), 7.76 – 7.26 (m, 1P, P_γ), -11.21 (d, J = 26.1 Hz, 1P, P_α).

HRMS (ESI-) obliczone m/z 939,1707 dla $C_{27}H_{38}N_{14}O_{18}P_3^-$ [M-H]⁻; zmierzone 939,1724

Izomer 3' (64 mOD, Rt = 9,37 min)

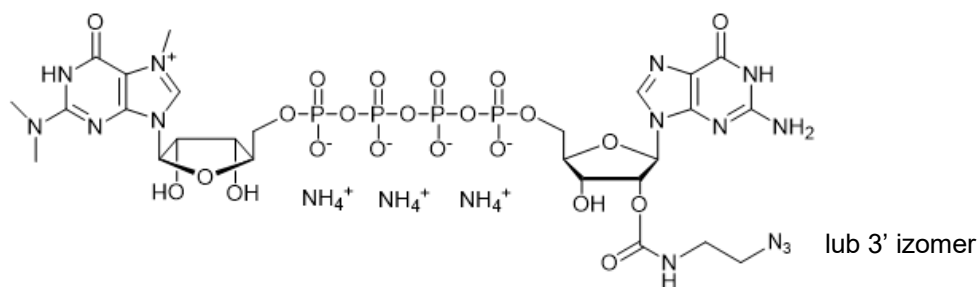
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm] 7.91 (s, 1H, H₈), 5.95 (d, J = 3.3 Hz, 1H, H_{1'}_{TMG}), 5.87 (d, J = 6.9 Hz, 1H, H_{1'}_G), 5.35-5.33 (t, J = 5.1 Hz, 1H, H_{3'}_G), 4.62 (m, 1H, H_{2'}_G), 4.60 (t, J = 3.8 Hz,

1H, H2' _{TMG}), 4.42-4.39 (m, 2H, H4' _G, H3' _{TMG}), 4.35-4.32 (m, 2H, H4' _{TMG}, H5' _{TMG}), 4.25-4.20 (m, 3H, H5' _G, H5'' _{TMG}, H5'' _G), 4.08 (s, 3H, m⁷), 3.34 (m, 2H, CH₂CH₂N₃), 3.32 (t, J = 5.5 Hz, 2H, CH₂CH₂N₃), 3.17 (s, 6H, 2x CH₃), 2.40 (t, 2H, J = 20.3 Hz, P-CH₂-P)

³¹P NMR (202 MHz, D₂O, H₃PO₄) δ [ppm] 17.10 (d, J = 8.8 Hz, 1P, P_β), 7.77 – 7.21 (m, 1P, P_γ), -11.18 (d, J = 26.0 Hz, 1P, P_α)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 939,1707 dla C₂₇H₃₈N₁₄O₁₈P₃⁻ [M-H]⁻; zmierzone 939,1720

III.6.3.7 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P4-(2'/3'-O-(N-(2-azydoetylo)karbamilo)guanozyn-5'-ylo) tetrafosforan (5-2'/3'), TMGppppG-2'/3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂N₃



Związki **5-2'** oraz **5-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej D.

Do zawiesiny zawierającej Im-GDP-linker-N₃ (**40**) (sól sodowa, 19,5 mg, 0,028 mmol, 1 ekw., mieszanina izomerów 2' i 3') oraz TMGDP (**30**) (sól TEA⁺, 24 mg, 0,031 mmol) w bezwodnym DMF dodałem suszony ZnCl₂ (38,2 mg, 0,28 mmol, 10 ekw.). Reakcje prowadziłem 24 h, za pomocą wytrząsarki typu Vortex. Produkt oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej, a następnie izomery rozdzieliłem stosując semipreparatywne RP-HPLC. Otrzymałem 2,04 mg (0,0020 mmol, wyd. 7%) związku **5-2'** oraz 2,90 mg (0,0028 mmol, wyd. 10%) związku **5-3'** (sól amonowa).

Izomer 2' (52 mOD, Rt = 8,22 min)

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ [ppm] 9.12 (s, 1H, H8_{TMG}), 7.95 (s, 1H, H8_G), 5.99 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H1' _{TMG}), 5.91 (d, J = 5.0 Hz, 1H, H1' _G), 5.36 (t, J = 5.0 Hz, 1H, H2' _G), 4.69-4.63 (m, 2H, H2' _{TMG}, H3' _G), 4.46 (t, J = 4.9 Hz, 1H, H4' _G), 4.44-4.38 (m, 2H, H3' _{TMG}, H5' _G), 4.38-4.29 (m, 4H, H4'' _{TMG}, H5' _{TMG}, H5'' _{TMG}, H5'' _G), 4.09 (s, 3H, m⁷), 3.37-3.25 (m, 4H, CH₂CH₂-N₃), 3.15 (s, 6H, 2x N-CH₃)

³¹P NMR (203 MHz, D₂O) δ [ppm] -11.41 (s, 2P, P_α, P_δ), -23.10 (s, 2P, P_β, P_γ)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 1021,1163 dla C₂₆H₃₇N₁₄O₂₂P₄⁻ [M-H]⁻; zmierzone 1021,1177

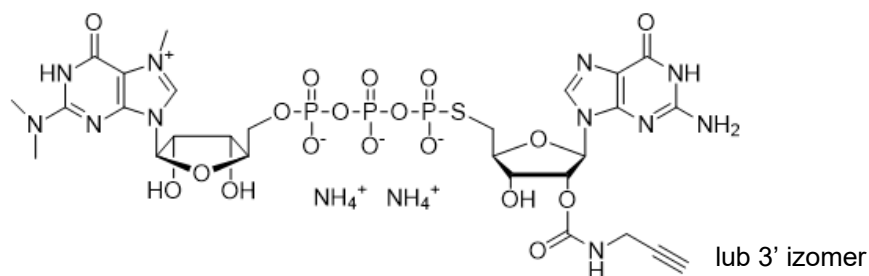
Izomer 3' (74 mOD, Rt = 8,03 min)

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ [ppm] 8.07 (s, 1H, H8_G), 5.97 (d, J = 3.9 Hz, 1H, H1' _{TMG}), 5.82 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H1' _G), 5.36 (t, J = 5.2 Hz, 1H, H3' _{TMG}), 5.30 (dd, J = 5.5, 2.2 Hz, 1H, H3' _G), 4.84-4.81 (m, 1H, H2' _G, *nałożony z sygnałem od rozpuszczalnika*), 4.62 (t, J = 3.9 Hz, 1H, H2' _{TMG}), 4.49 (s, 1H, H4' _G), 4.43 (t, J = 5.2 Hz, 1H, H4' _{TMG}), 4.39-4.35 (m, 1H, H5' _{TMG}), 4.31-4.24 (m, 3H, H5' _G, H5'' _G, H5'' _{TMG}), 4.07 (s, 3H, m⁷G), 3.52 – 3.42 (m, 2H, CH₂CH₂N₃), 3.41-3.30 (m, 2H, CH₂CH₂N₃), 3.08 (s, 6H, 2x N-CH₃)

³¹P NMR (203 MHz, D₂O) δ [ppm] -11.42 (s, 2P, P_α, P_δ) -22.08 (s, 2P, P_β, P_γ)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 1021,1163 dla C₂₆H₃₇N₁₄O₂₂P₄⁻ [M-H]⁻; zmierzone 1021,1174

III.6.3.8 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'/3'-O-(N-propargilokarbamoilo)-5'-tioguanozyn-5'-ylo) trifosforan (7-2'/3'), **TMGpppSG-2'/3'-O-C(O)NH-CH₂CCH**



Związki **7-2'** oraz **7-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej D.

Do zawiesiny zawierającej Im-GMPS-linker-N₃ (**37**) (sól sodowa, 90 mg, 0,169 mmol, 1 ekw.), mieszanina izomerów 2' i 3' oraz TMGMP (**27**) (sól TEA⁺, 133 mg, 0,169 mmol) w bezwodnym DMF dodałem suchy ZnCl₂ (230,3 mg, 1,69 mmol, 10 ekw.). Reakcje prowadziłem 24 h, wytrząsając za pomocą wytrząsarki typu Vortex. Produkt oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej, a następnie izomery rozdzieliłem stosując semipreparatywne RP-HPLC. Otrzymałem 14,49 mg (0,016 mmol, wyd. 9%) związku **7-2'** oraz 10,83 mg (0,012 mmol, wyd. 7%) związku **7-3'** (sól amonowa).

Izomer 2' (408 mOD, Rt = 8,55 min)

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ [ppm] 9.08 (s, 1H, H8_{TMG}), 7.86 (s, 1H, H8_G), 5.93 (d, J = 3.4 Hz, 1H, H1'_{TMG}), 5.84 (d, J = 5.1 Hz, 1H, H1'_G), 5.37 (t, J = 5.1 Hz, 1H, H2'_G), 4.62 (t, J = 5.1 Hz, 1H, H3'_G), 4.59 – 4.54 (m, 1H, H2'_{TMG}), 4.50 – 4.42 (m, 3H, H3'_{TMG}, H5'_{TMG}, H4'_G), 4.42 – 4.37 (m, 1H, H4'_{TMG}), 4.26 (ddd, J = 11.9, 5.9, 2.2 Hz, 1H, H5''_{TMG}), 4.09 (s, 3H, m⁷G), 3.87 – 3.75 (m, 2H, N-CH₂CCH), 3.42 – 3.25 (m, 2H, H5'_G, H5''_G), 3.14 (s, 6H, 2x N-CH₃), 2.55 (t, J = 2.4 Hz, 1H, N-CH₂CCH)

³¹P NMR (203 MHz, D₂O) δ [ppm] 7.54 (d, J = 27.1 Hz, 1P, P_α), -11.60 (d, J = 19.5 Hz, 1P, P_γ), -23.82 (dd, J = 27.1, 19.5 Hz, 1P, P_β)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 926,1101 dla C₂₇H₃₅N₁₁O₁₈P₃S⁻ [M-H]⁻; zmierzone 926,1122

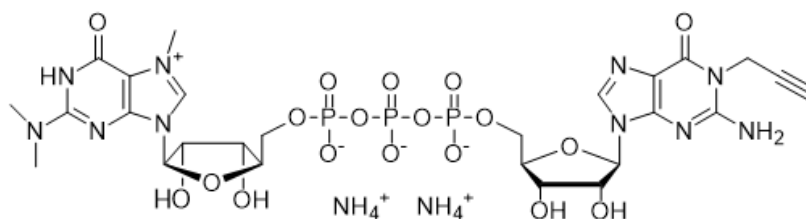
Izomer 3' (305 mOD, Rt = 8,13 min)

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ [ppm] 9.05 (s, 1H, H8_{TMG}), 7.87 (s, 1H, H8_G), 5.91 (d, J = 3.3 Hz, 1H, H1'_{TMG}), 5.71 (d, J = 6.8 Hz, 1H, H1'_G), 5.31 – 5.26 (m, 1H, H3'_G), 4.85 – 4.83 (m, 1H, H2'_G, *nałożony z sygnałem od rozpuszczalnika*), 4.58 – 4.51 (m, 2H, H2'_{TMG}, H4'_G), 4.45 (dd, J = 11.8, 3.9 Hz, 1H, H5'_{TMG}), 4.42 (t, J = 5.2 Hz, 1H, H3'_{TMG}), 4.39 (dt, J = 5.7, 2.4 Hz, 1H, H4'_{TMG}), 4.26 (ddd, J = 11.8, 6.0, 2.1 Hz, 1H, H5''_{TMG}), 4.07 (s, 3H, m⁷G), 3.95 (s, 2H, N-CH₂CCH), 3.38 – 3.28 (m, 2H, H5'_G, H5''_G), 3.16 (s, 6H, 2x N-CH₃), 2.63 (s, 1H, N-CH₂CCH)

³¹P NMR (203 MHz, D₂O) δ [ppm] 7.26 (d, J = 26.7 Hz, 1P, P_α), -11.65 (d, J = 19.5 Hz, 1P, P_γ), -23.81 (dd, J = 26.7, 19.5 Hz, 1P, P_β).

HRMS (ESI-) obliczone m/z 926,1101 dla C₂₇H₃₅N₁₁O₁₈P₃S⁻ [M-H]⁻; zmierzone 926,1121

III.6.3.9 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(N1-propargiloguanozyn-5'-ylo) trifosforan (9), TMGpppG-N1-CH₂CCH



Związek **9** otrzymałem wg procedury ogólnej D.

Do zawiesiny zawierającej Im-GMP-N1-propargil (**63**) (sól sodowa, 17 mg, 0,035 mmol, 1 ekw.) oraz TMGMP (**27**) (sól TEA⁺, 28,5 mg, 0,035 mmol, 1 ekw.) w bezwodnym DMF dodałem suchy ZnCl₂ (47,7 mg, 0,35 mmol, 10 ekw.). Reakcję prowadziłem 24 h, wytrząsając za pomocą wytrząsarki typu Vortex. Produkt oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej, a następnie ponownie stosując semipreparatywne RP-HPLC. Otrzymałem 8,25 mg (0,0095 mmol, wyd. 57%) związku **9** (sól amonowa).

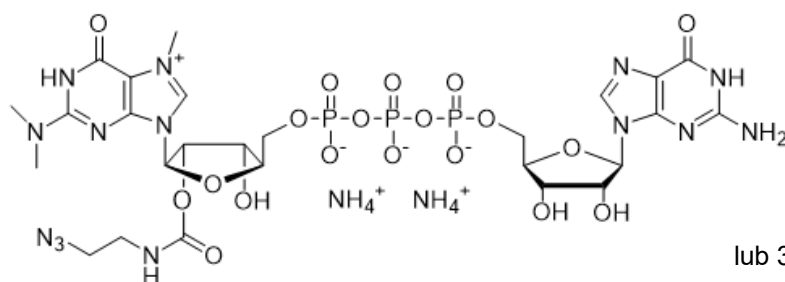
(248 mOD, Rt = 7,19 min)

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ [ppm] 8.98* (s, 1H, H8_{TMG}), 7.90 (s, 1H, H8_G), 5.94 (d, J = 3.8 Hz, 1H, H1'_{TMG}), 5.75 (d, J = 6.0 Hz, 1H, H1'_G), 4.88 (d, J = 2.5 Hz, 1H, N1-CH-), 4.81 (d, J = 2.5 Hz, 1H, N1-CH-, *nałożony z sygnałem od rozpuszczalnika*), 4.65 (t, J = 5.6 Hz, 1H, H2'_G), 4.56 (dd, J = 5.0, 3.8 Hz, 1H, H2'_{TMG}), 4.45 (dd, J = 5.3, 3.5 Hz, 1H, H3'_G), 4.42 (t, J = 5.0 Hz, 1H, H3'_{TMG}), 4.38 – 4.35 (m, 2H, H4'_{TMG}, H4'_G), 4.33-4.30 (m, 1H, H5'_{TMG}), 4.30-4.23 (m, 2H, H5'_G, H5''_{TMG}), 4.20 (ddd, J = 11.8, 7.5, 4.6 Hz, 1H, H5''_G), 4.04 (s, 3H, m⁷G), 3.16 (s, 6H, 2x N-CH₃), 2.78 (t, J = 2.5 Hz, 1H, N1-CH₂CCH); * powoli wymieniany z deuterem

³¹P NMR (203 MHz, D₂O) δ [ppm] -11.57 (dd, J = 19.6, 13.5 Hz, 2P, P_α, P_γ), -23.22 (t, J = 19.6 Hz, 1P, P_β)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 867,1271 dla C₂₆H₃₄N₁₀O₁₈P₃⁻ [M-H]⁻; zmierzone 867,1289

III.6.3.10 P1-(2'/3'-O-(N-(2-azydoetylo)karbamilo-N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3(guanozyn-5'-ylo) trifosforan (8-2'/3'), TMG(-2'/3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂N₃)pppG



lub 3' izomer

Związki **8-2'** oraz **8-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej D.

Do zawiesiny zawierającej Im-TMGMP-linker-N₃ (**43**) (sól litowa, 25 mg, 0,042 mmol, 1 ekw., mieszanina izomerów 2' i 3') oraz GDP (sól TEA⁺, 38 mg, 0,051 mmol) w bezwodnym DMF dodałem suchy ZnCl₂ (57,2 mg, 0,42 mmol, 10 ekw.). Reakcję prowadziłem 24 h, wytrząsając za pomocą wytrząsarki typu Vortex. Produkt oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej, a następnie izomery rozdzieliłem stosując semipreparatywne RP-

HPLC. Otrzymałem 1,77 mg (0,0019 mmol, wyd. 5%) związku **8-2'** oraz 2,38 mg (0,0025 mmol, wyd. 6%) związku **8-3'** (sól amonowa).

Izomer 2' (49 mOD, Rt = 9,29 min)

^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ [ppm] 8.97 (s, 1H, H8_{TMG}), 8.01 (t, $J = 3.9$ Hz, 1H, H8), 5.93 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, $\text{H1}'_{\text{TMG}}$), 5.77 – 5.70 (m, 1H, $\text{H1}'_{\text{G}}$), 5.46 (dd, $J = 5.3, 3.0$ Hz, 1H, $\text{H2}'_{\text{TMG}}$), 4.55 (dt, $J = 14.1, 5.3$ Hz, 2H, $\text{H2}'_{\text{G}}, \text{H3}'_{\text{TMG}}$), 4.46 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, $\text{H3}'_{\text{G}}$), 4.42 (dd, $J = 5.3, 3.8$ Hz, 1H, $\text{H4}'_{\text{TMG}}$), 4.40 – 4.35 (m, 1H, $\text{H4}'_{\text{G}}$), 4.34 – 4.18 (m, 4H, $\text{H5}'_{\text{TMG}}, \text{H5}''_{\text{TMG}}, \text{H5}'_{\text{G}}, \text{H5}''_{\text{G}}$), 4.07 (s, 3H, m^7), 3.48 – 3.25 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.15 (s, 6H, 2x N- CH_3)

^{31}P NMR (203 MHz, D_2O) δ [ppm] -11.61 (dd, $J = 36.0, 19.3$ Hz, 2P, $\text{P}_\alpha, \text{P}_\gamma$), -23.20 (t, $J = 19.3$ Hz, 1P, P_β)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 941,1500 dla $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_{14}\text{O}_{19}\text{P}_3^-$ [M-H] $^-$; zmierzone 941,1511

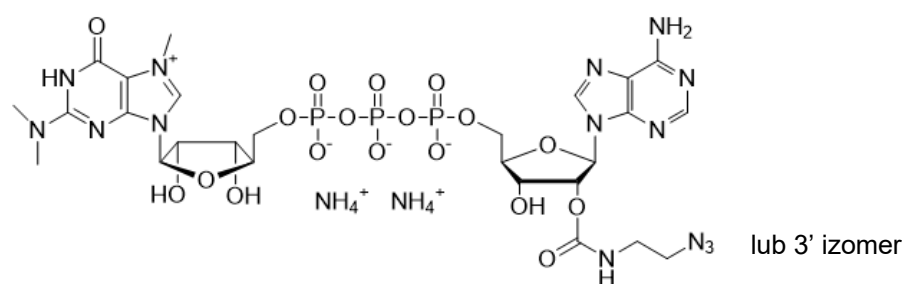
Izomer 3' (66 mOD, Rt = 8,90 min)

^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ [ppm] 9.07 (s, 1H, H8_{TMG}), 8.19 – 8.14 (m, 1H, H8_{G}), 5.96 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, $\text{H1}'_{\text{TMG}}$), 5.78 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, $\text{H1}'_{\text{G}}$), 5.21 (t, $J = 4.4$ Hz, 1H, $\text{H3}'_{\text{TMG}}$), 4.76 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, $\text{H2}'_{\text{TMG}}$, *nałożony z sygnałem od rozpuszczalnika*), 4.56 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, $\text{H4}'_{\text{TMG}}, \text{H2}'_{\text{G}}$), 4.42 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H, $\text{H5}'_{\text{TMG}}$), 4.38 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, $\text{H3}'_{\text{G}}$), 4.34 – 4.27 (m, 2H, $\text{H5}''_{\text{TMG}}, \text{H5}'_{\text{G}}$), 4.25 – 4.16 (m, 2H, $\text{H4}'_{\text{G}}, \text{H5}''_{\text{G}}$), 4.09 (s, 3H, m^7), 3.44 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.37 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.16 (s, 6H, 2x N- CH_3)

^{31}P NMR (203 MHz, D_2O) δ [ppm] -11.56 (dd, $J = 30.9, 19.3$ Hz, 2P, $\text{P}_\alpha, \text{P}_\gamma$), -23.18 (t, $J = 19.3$ Hz, 1P, P_β)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 941,1500 dla $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_{14}\text{O}_{19}\text{P}_3^-$ [M-H] $^-$; zmierzone 941,1511

III.6.3.11 P1-($\text{N}^2, \text{N}^2, \text{N}^7$ -trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'/3'-O-(N-(2-azydoetylo)-karbamilo)adenozyn-5'-ylo) trifosforan (4-2'/-3'), **TMGpppA-2'/3'-O-C(O)NH- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$**



Związki **4-2'** oraz **4-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej D.

Do zawiesiny zawierającej Im-ADP-linker- N_3 (**42**) (sól sodowa, 56,4 mg, 0,089 mmol, mieszanina izomerów 2' i 3') oraz TMGMP (**27**) (sól TEA $^+$, 30 mg, 0,074 mmol, 1 ekw.) w bezwodnym DMF dodałem suchy ZnCl_2 (121,3 mg, 0,89 mmol, 10 ekw.). Reakcje prowadziłem 24 h, wytrząsając za pomocą wytrząsarki typu Vortex. Produkt oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej, a następnie izomery rozdzieliłem stosując semipreparatywne RP-HPLC. Otrzymałem 20,89 mg (0,023 mmol, wyd. 31%) związku **4-2'** oraz 22,75 mg (0,025 mmol, wyd. 33%) związku **4-3'** (sól amonowa).

Izomer 2' (652 mOD, Rt = 9,15 min)

^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ [ppm] 8.97 (s, 1H, H8_{TMG}), 8.31 (s, 1H, H8_A), 8.18 (s, 1H, H2_A), 6.06 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, $\text{H1}'_\text{A}$), 5.88 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, $\text{H1}'_{\text{TMG}}$), 5.28 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, $\text{H2}'_\text{A}$),

4.59 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, H3'_A), 4.53 (t, $J = 3.8$ Hz, 1H, H2'_{TMG}), 4.43-4.37 (m, 5H, H3'_{TMG}, H4'_{TMG}, H5'_{TMG}, H4'_A, H5'_A), 4.30-4.26 (m, 2H, H5''_{TMG}, H5''_A), 4.06 (s, 3H, m⁷), 3.27-3.17 (m, 4H, CH₂CH₂N₃), 3.12 (s, 6H, N-CH₃ x2)

³¹P NMR (202 MHz, D₂O) δ [ppm] -11.53 (dt, $J = 19.1, 6.7$ Hz, 2P, P _{α} , P _{γ}), -23.12 (t, $J = 19.1$ Hz, 1P, P _{β})

HRMS (ESI-) obliczone m/z 925,1550 dla C₂₆H₃₆N₁₄O₁₈P₃⁻ [M-H]⁻; zmierzone 925,1553

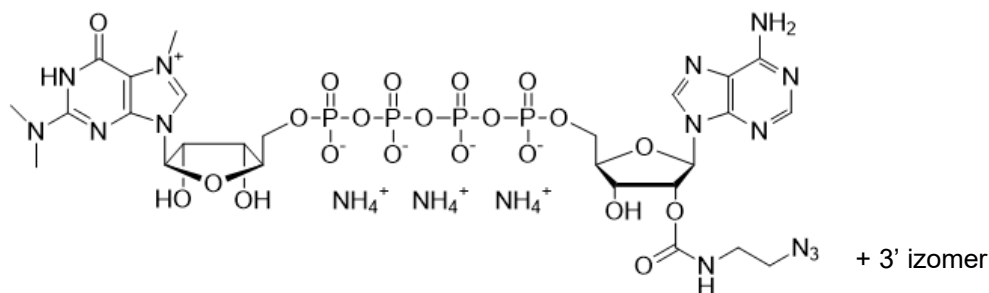
Izomer 3' (710 mOD, Rt = 9,69 min)

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ [ppm] 8.95 (s, 1H, H8_{TMG}), 8.42 (s, 1H, H8_A), 8.18 (s, 1H, H2_A), 5.99 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H1'_A), 5.91 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H1'_{TMG}), 5.28 (dd, $J = 5.2, 2.4$ Hz, 1H, H3'_A), 4.83-4.81 (m, 1H, H2'_A, *nałożony z sygnałem od rozpuszczalnika*), 4.56-4.52 (m, 2H, H2'_{TMG}, H4'_A), 4.42-4.36 (m, 3H, H3'_{TMG}, H4'_{TMG}, H5'_A), 4.31-4.25 (m, 3H, H5'_{TMG}, H5''_{TMG}, H5''_A), 4.02 (s, 3H, m⁷), 3.48-3.44 (m, 2H, CH₂CH₂N₃), 3.40-3.36 (m, 2H, CH₂CH₂N₃), 3.14 (s, 6H, N-CH₃ x2)

³¹P NMR (202 MHz, D₂O) δ [ppm] -11.48 – -11.70 (m, 2P, P _{α} , P _{γ}), -23.11 (t, $J = 19.3$ Hz, 1P, P _{β})

HRMS (ESI-) obliczone m/z 925,1550 dla C₂₆H₃₆N₁₄O₁₈P₃⁻ [M-H]⁻; zmierzone 925,1555

III.6.3.12 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P4-(2'+3'-O-(N-(2-azydoetylo)-karbamilo)adenozyn-5'-ylo) tetrafosforan (6), TMGppppA-2'+3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂N₃



Związek **6** otrzymałem wg procedury ogólnej D.

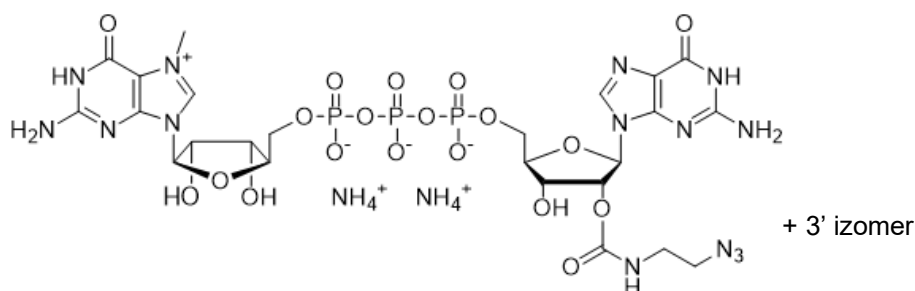
Do zawiesiny zawierającej Im-ADP-linker-N₃ (**42**) (sól sodowa, 20 mg, 0,028 mmol, mieszanina izomerów 2' i 3', 1 ekw.) oraz TMGDP (**30**) (sól TEA⁺, 24 mg, 0,031 mmol) w bezwodnym DMF dodałem suchy ZnCl₂ (38,2 mg, 0,28 mmol, 10 ekw.). Reakcję prowadziłem 24 h, wytrząsając za pomocą wytrząsarki typu Vortex. Produkt oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej, a następnie stosując semipreparatywne RP-HPLC. Otrzymałem 15,46 mg (0,015 mmol, wyd. 55%) związku **6** (mieszanina izomerów 2' i 3', sól amonowa).

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 9.11 (s, 1H, H8_{TMG-2'}), 9.07 (s, 1H, H8_{TMG-3'}), 8.49 (s, 1H, H8_{A-3'}), 8.40 (s, 1H, H8_{A-2'}), 8.24-8.21 (m, 3H), 6.10 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 6.02 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 5.96 (dd, $J = 5.4, 3.7$ Hz, 2H), 5.31 (m, 2H), 4.65 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H), 4.61 (t, $J = 4.3$ Hz, 3H), 4.46-4.43 (m, 3H), 4.42 – 4.36 (m, 5H), 4.34 - 4.22 (m, 5H), 4.09 (s, 3H, m^{7-3'}), 4.05 (s, 3H, m^{7-2'}), 3.46 (t, $J = 5.2$ Hz, 3H), 3.39 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.30-3.25 (m, 3H), 3.15 (s, 6H, 2xN-CH_{3-3'}), 3.12 (s, 6H, 2xN-CH_{3-2'})

³¹P NMR (202 MHz, D₂O) δ -11.43 (s, 2P, P _{α} , P _{δ}), -23.16 (s, 2P, P _{β} , P _{γ})

HRMS (ESI-) obliczone m/z 1005,1214 dla C₂₆H₃₇N₁₄O₂₁P₄⁻ [M-H]⁻; zmierzone 1005,1232

III.6.3.13 P1-(N⁷-monometyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'+3'-O-(N-(2-azydoetylo)-karbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan (13-2'/3'), MMGpppG-2'+3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂N₃



Związki **13-2'** oraz **13-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej D.

Do zawiesiny zawierającej Im-GDP-linker-N₃ (**40**) (sól sodowa, 172 mg, 0,334 mmol, mieszanina izomerów 2' i 3') oraz m⁷GMP (sól TEA⁺, 200 mg, 0,303 mmol, 1 ekw.) w bezwodnym DMF dodałem suchy ZnCl₂ (413,0 mg, 3,03 mmol, 10 ekw.). Reakcje prowadziłem 24 h, wytrząsając za pomocą wytrząsarki typu Vortex. Produkt oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej, a następnie stosując semipreparatywne RP-HPLC. Otrzymałem 47,10 mg (0,053 mmol, wyd. 18%) związku **13-2'** oraz 82,06 mg (0,093 mmol, wyd. 31%) związku **13-3'** (sól amonowa).

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm] 9.04 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 5.94 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 5.91 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 5.89 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 5.82 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 5.39 (dt, J = 5.0, 1.0 Hz, 1H), 5.34 – 5.29 (m, 1H), 4.91 (t, J = 6.4, 6.0 Hz, 1H), 4.68 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.56 (q, J = 5.0, 4.5, 2.5 Hz, 2H), 4.52 – 4.47 (m, 1H), 4.47 – 4.42 (m, 2H), 4.43 – 4.32 (m, 5H), 4.31 – 4.21 (m, 5H), 4.07 (s, 2H), 4.04 (s, 3H), 3.94 (s, 2H), 3.85 (s, 1H)

³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ [ppm] -11.68 (d, J = 19.3 Hz, 2P, P_α, P_γ), -23.22 (t, J = 19.3 Hz, 1P, P_β)

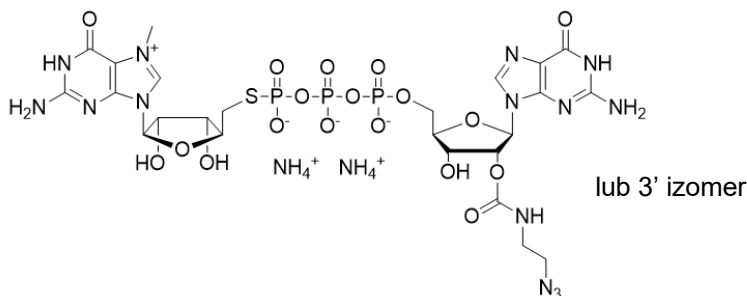
Izomer 2' (1205 mOD, Rt = 6,27 min)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 882,1016 dla C₂₅H₃₁N₁₁O₁₉P₃⁻ [M-H]⁻; zmierzone 882,1034

Izomer 3' (2100 mOD, Rt = 6,13 min)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 882,1016 dla C₂₅H₃₁N₁₁O₁₉P₃⁻ [M-H]⁻; zmierzone 882,1036

III.6.3.14 P1-(5'-tio-N⁷-monometyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'/3'-O-(N-(2-azydoetylo)-karbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan (14-2'/3'), MMG-5'-S-pppG-2'/3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂N₃



Związek **14-2'** oraz **14-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej D.

Do zawiesiny zawierającej Im-GDP-linker-N₃ (**40**) (sól sodowa, 126,2 mg, 0,201 mmol, mieszanina izomerów 2' i 3', 1 ekw.) oraz m⁷GMPS (sól TEA⁺, 100 mg, 0,168 mmol, 1 ekw.) w bezwodnym DMF dodałem suchy ZnCl₂ (229,0 mg, 1,68 mmol, 10 ekw.). Reakcję prowadziłem 24 h, wytrząsając za pomocą wytrząsarki typu Vortex. Produkt oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej, a następnie stosując semipreparatywne RP-HPLC. Otrzymałem 24,57 mg (0,026 mmol, wyd. 16%) związku **14-2'** oraz 32,51 mg (0,035 mmol, wyd. 21%) związku **14-3'** (sól amonowa).

Izomer 2' (597 mOD, Rt = 6,98 min)

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ [ppm] 8.98* (s, 1H, H8_{m7G}), 7.93 (s, 1H, H8_G), 5.92 (d, J = 4.8 Hz, 1H, H1'_{m7G}), 5.85 (d, J = 4.6 Hz, 1H, H1'_G), 5.45 (t, J = 5.3 Hz, 1H, H2'_{m7G}), 4.70-4.65 (m, 2H, H3'_{m7G}, H2'_G), 4.45 – 4.35 (m, 3H, H4'_{m7G}, H3'_G, H4'_G, H5'_G), 4.31 (dt, J = 12.1, 6.1 Hz, 1H, H5''_G), 4.07 (s, 3H, m⁷G), 3.40 – 3.20 (m, 6H, H5'_{m7G}, H5''_{m7G}, CH₂CH₂N₃); *powoli wymieniany z deuterem

³¹P NMR (202 MHz, D₂O) δ [ppm] 7.58 (d, J = 27.5 Hz, 1P, P_γ), -11.65 (d, J = 19.4 Hz, 1P, P_α), -23.52 – -24.14 (m, 1P, P_β)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 929,0958 dla C₂₄H₃₂N₁₄O₁₈P₃S⁻ [M-H]⁻; zmierzone 929,0975

Izomer 3' (790 mOD, Rt = 7,10 min)

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ [ppm] 8.02 (s, 1H, H8_G), 5.84 (d, J = 4.5 Hz, 1H, H1'_{m7G}), 5.82 (d, J = 7.1 Hz, 1H, H1'_G), 5.30 (dd, J = 5.2, 2.5 Hz, 1H, H3'_G), 4.91 (t, J = 6.3 Hz, 1H, H2'_G), 4.68 (t, J = 4.5 Hz, 1H, H2'_{m7G}), 4.53 – 4.49 (m, 1H, H4'_G), 4.41 – 4.37 (m, 2H, H3'_{m7G}, H4'_{m7G}), 4.37 – 4.25 (m, 2H, H5'_G, H5''_G), 4.07 (s, 3H, m⁷G), 3.46 (t, J = 5.8 Hz, 2H, CH₂CH₂N₃), 3.39 (t, J = 5.8 Hz, 2H, CH₂CH₂N₃), 3.37 – 3.27 (m, 2H, H5'_{m7G}, H5''_{m7G})

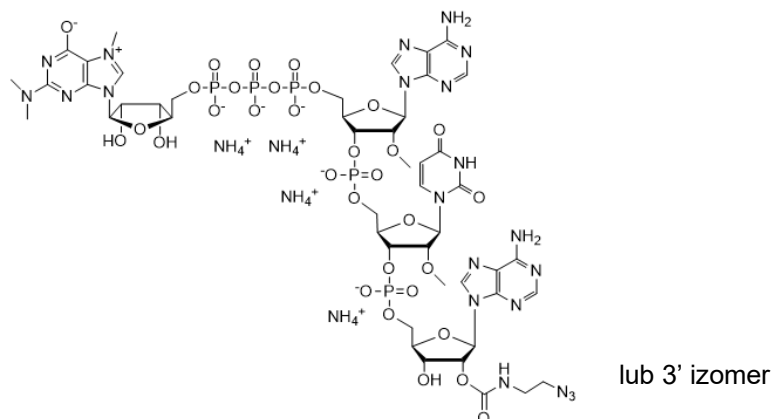
³¹P NMR (202 MHz, D₂O) δ [ppm] 7.65 (d, J = 27.1 Hz, 1P, P_γ), -11.66 (d, J = 19.2 Hz, 1P, P_α), -23.45 – -24.30 (m, 1P, P_β)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 929,0958 dla C₂₄H₃₂N₁₄O₁₈P₃S⁻ [M-H]⁻; zmierzone 929,0984

III.6.3.15 Synteza tetranukleotydowych pochodnych TMG kapu zawierających grupę propargilowej lub azydkową

Syntezy tetranukleotydów **11-2'** i **11-3'** zakończonych TMG kapem zawierających funkcję azydkową przeprowadził dr inż. Błażej Wojtczak wg protokołu Warminski i wsp.²⁸²

III.6.3.16 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-((2'-O-(N-azydoetylokarbamoilo)-adenozyno-3',5'-fosforano-2'-O-metylourydno-3',5'-fosforano-2'-O-metylo-adenozy-5'-ylo) trifosforan (11-2'/3'), TMGpppA_mU_mA-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂N₃



Izomer 2' (Rt = 10,12 min, g. mocny)

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 9.09 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.82 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.26 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 6.07 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 5.96 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 5.90 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 5.85 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 5.56 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 4.98 – 4.94 (m, 1H), 4.75 – 4.69 (m, 3H), 4.62 (t, J = 4.3 Hz, 1H), 4.60 – 4.58 (m, 1H), 4.50 – 4.44 (m, 2H), 4.42 – 4.30 (m, 5H), 4.28 – 4.17 (m, 4H), 4.11 – 4.04 (m, 6H), 3.46 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 3.36 – 3.32 (m, 2H), 3.13 (s, 6H).

³¹P NMR (203 MHz, D₂O) δ [ppm] -1.13 (s, 2P), -11.51 (s, 2P), -22.84 (s, 1P)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 1588,2642 dla C₄₇H₆₃N₂₁O₃₂P₅⁻ [M-H]⁻; zmierzone 1588,2643

Izomer 3' (Rt = 10,20 min, g. mocny)

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 9.07 (s, 1H), 8.53 (d, J = 3.4 Hz, 2H), 8.38 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.82 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.12 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 6.05 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 5.95 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 5.90 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.84 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 5.34 (dd, J = 5.5, 3.3 Hz, 1H), 5.00 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 4.97 – 4.93 (m, 1H), 4.62 (t, J = 4.3 Hz, 1H), 4.58 (s, 1H), 4.53 (s, 1H), 4.49 – 4.44 (m, 2H), 4.39 – 4.22 (m, 7H), 4.21 – 4.16 (m, 2H), 4.09 – 4.04 (m, 6H), 3.45 – 3.42 (m, 8H), 3.40 – 3.37 (m, 1H), 3.13 (s, 6H).

³¹P NMR (203 MHz, D₂O) δ -1.13 (s, 2P), -11.50 (s, 2P), -22.82 (s, 1P).

HRMS (ESI-) obliczone m/z 1588,2642 dla C₄₇H₆₃N₂₁O₃₂P₅⁻ [M-H]⁻; zmierzone 1588,2638

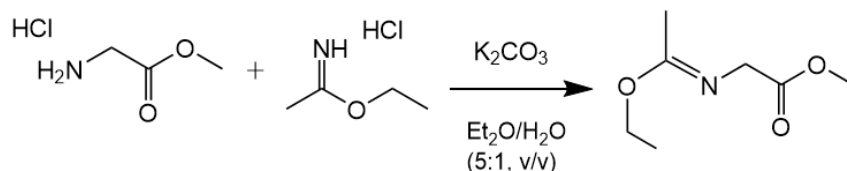
III.6.4 Synteza azydkowych i propargilowych pochodnych FMR

Syntezę i charakterystykę pochodnych azydkowych i propargilowych FMR wykonał dr inż. Błażej Wojtczak.

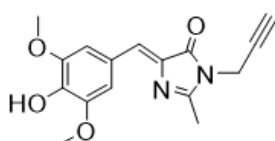
III.6.4.1 Procedura ogólna E – synteza pochodnych FMR będących analogami fluoroformu białka zielonej fluorescencji (GFP)

Syntezę pochodnych fluoroformu GFP przeprowadzono w reakcji odpowiedniego imidanianu z aromatyczną zasadą Schiffa w absolutnym etanolu. W skrócie, zasadę Schiffa otrzymano w reakcji aromatycznego aldehydu z azydoetyloaminą lub propargiloaminą; 1 ekw. w absolutnym etanolu. Reakcję pozostawiono z mieszaniem w temperaturze pokojowej przez 24 godziny.

Surowy produkt wyizolowano przez filtrację i przemyto trzykrotnie etanolem, otrzymując czysty produkt. Imidanian otrzymano w sposób opisany przez Kowalika i in.¹⁸³ w reakcji glicynianu metylu, węglanu potasu i chlorowodoru acetoimidanian etylu w EtOH/ H₂O (5:1, v/v), wg ogólnego schematu reakcji poniżej:



III.6.4.2 3,5-dimetoksy-4-hydroksybenzylideno-2-metylo-5-okso-4,5-dihydro-1H-imidazolu propargil; DMHBI-C₃H₃ (52)

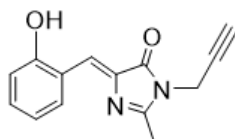


Zasadę Schiffa otrzymano wg procedury ogólnej E, wychodząc z 3,5-dimetoksy-4-hydroksybenzaldehydu (**50**) (1,0 g, 5,49 mmol) i propargiloaminy (302,3 mg, 5,49 mmol). Surowy produkt otrzymano ilościowo (1,2 g, 5,49 mmol) i poddano reakcji bez dalszego oczyszczania z imidanianem (871,4 mg, 5,49 mmol). Żółty produkt wyizolowano przez filtrację. Wydajność 1,1 g (65%). Rt = 20,09 min (mocny)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] 9.21 (bs, 1H), 7.64 (s, 2H), 6.97 (s, 1H), 4.45 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.37 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.42 (s, 3H)

HRMS (ESI⁺): obliczone *m/z* 301,1183 dla C₁₆H₁₇N₂O₄⁺ [M+H]⁺, zmierzone 301,1183

III.6.4.3 *orto*-hydroksybenzylideno-2-metylo-5-okso-4,5-dihydro-1H-imidazolu propargil; *o*-HBI-C₃H₃ (53)

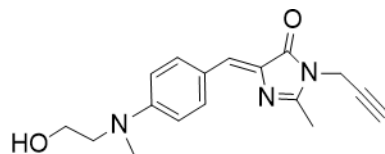


Zasadę Schiffa otrzymano wg procedury ogólnej E, wychodząc z *o*-hydroksy-benzaldehydu (**51**) (1,75 g, 14,33 mmol) i propargiloaminy (868 mg, 15,7 mmol). Surowy produkt otrzymano ilościowo (2,38 g, 14,95 mmol) i poddano reakcji bez dalszego oczyszczania z imidanianem (2,62 g, 16,45 mmol). Jasnożółty produkt wyizolowano przez filtrację i przemyto EtOH i Et₂O. Wydajność 1,67 g (47%). Rt = 24,15 min (supermocny)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] 11.29 (bs, 1H), 8.32 (dd, *J* = 7.9, 1.8 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.28 (ddd, *J* = 8.7, 7.3, 1.8 Hz, 1H), 6.91 – 6.85 (m, 2H), 4.48 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 3.39 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 2.45 (s, 3H)

HRMS (ESI⁺): obliczone *m/z* 241,09715 dla C₁₄H₁₃N₂O₂⁺ [M+H]⁺, zmierzone 241,0968

III.6.4.4 *N*-hydroksyetylo,*N*-metylo-4-aminobenzylideno-2-metylo-5-okso-4,5-dihydro-1H-imidazolu propargil; **HEMABI-C₃H₃** (54)

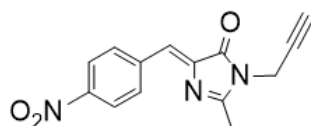


Zasadę Schiffa otrzymano wg procedury ogólnej E, wychodząc z *N*-hydroksy-etylo-*N*-metylo-4-aminobenzaldehydu (**47**) (1000 mg, 5,58 mmol) i propargiloaminy (345 mg, 6,14 mmol). Surowy produkt (494 mg, 2,28 mmol) poddano reakcji bez dalszego oczyszczania z imidanianem (400 mg, 2,51 mmol). Czerwony osad przemyto EtOH i Et₂O. Wydajność 1,51 g (59%). Rt = 21,96 min (g. mocny).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] 8.05 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.92 (s, 1H), 6.75 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 4.74 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.44 – 4.42 (m, 2H), 3.71 – 3.66 (m, 2H), 3.57 (q, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.49 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.39 (s, 3H)

HRMS (ESI⁺): obliczone *m/z* 298,1550 dla C₁₇H₂₀N₃O₂⁺ [*M*+H]⁺, zmierzone 298,1549

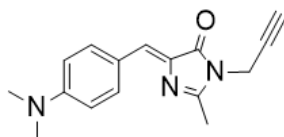
III.6.4.5 *para*-nitrobenzylideno-2-metylo-5-okso-4,5-dihydro-1H-imidazolu propargil; ***p*-NHBI-C₃H₃** (55)



Zasadę Schiffa otrzymano wg procedury ogólnej E, wychodząc z 4-nitrobenzaldehydu (**48**) (689 mg, 4,56 mmol) i propargiloaminy (280 mg, 5,01 mmol). Surowy produkt (429 mg, 2,28 mmol) i przereagowano bez dalszego oczyszczania z imidanianem (399,5 mg, 2,51 mmol). Produkt wyizolowano przez filtrację i przemyto EtOH i Et₂O. Wydajność 114 mg (19%). Produkt **55** oczyszczano kilkakrotnie, lecz nie otrzymałem frakcji o zadowalającej czystości NMR lub ulega rozpadowi podczas oczyszczania (możliwa fotowrażliwość produktu). Jednakże, reagent wykorzystałem z sukcesem w reakcjach CuAAC otrzymując pożądane produkty (**1d**, **12d**). Rt = 20,02 min (g. supermocny).

HRMS (ESI⁺) obliczone *m/z* 270,0873 dla C₁₄H₁₂N₃O₃⁺ [*M*+H]⁺, zmierzone 270,0873

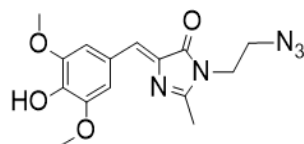
III.6.4.6 Dimetyloaminobenzylideno-2-metylo-5-okso-4,5-dihydro-1H-imidazolu propargil; **DMABI-C₃H₃** (56)



Zasadę Schiffa otrzymano wg procedury ogólnej E, wychodząc z 4-dimetyloaminobenzaldehydu (**49**) (343 mg, 2,3 mmol) i propargiloaminy (147 mg, 2,77 mmol). Surowy produkt otrzymano ilościowo (427 mg, 2,3 mmol) i poddano reakcji bez dalszego oczyszczania z imidanianem (400 mg, 2,52 mmol). Produkt wyizolowano przez filtrację i przemyto EtOH i Et₂O. Wydajność 510 mg (1,90 mmol, 82%). Rt = 26,6 min (g. mocny)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] 8.08 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.77 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.44 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 3.37 (t, J = 2.5 Hz, 1H), 3.02 (s, 6H), 2.41 (s, 3H).
HRMS (ESI+) obliczone m/z 268,1444 dla $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, zmierzone 268,1442

III.6.4.7 3,5-dimetoksy-4-hydroksybenzylideno-1-azydoetylo-2-metylo-5-okso-4,5-dihydro-1H-imidazol ; DMHBI- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ (57)

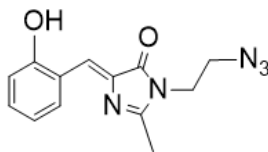


Zasadę Schiffa otrzymano wg procedury ogólnej E, wychodząc z 3,5-dimetoksy-4-hydroksybenzaldehydu (**45**) (1,0 g, 5,49 mmol) i 2-azydoetyloaminy (472 mg, 5,49 mmol). Surowy produkt otrzymano ilościowo (1,37 g, 5,49 mmol) i poddano reakcji bez dalszego oczyszczania z imidanianem (871,4 mg, 5,49 mmol). Jasnożółty produkt wyizolowano przez filtrację. Wydajność 0,76 g (42%). R_t = 14,66 (supermocny)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] 8.09 (s, 1H), 7.65 (s, 2H), 6.94 (s, 1H), 3.81 (s, 6H), 3.78 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.59 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 2.40 (s, 3H)

HRMS (ESI+): obliczone m/z 332,1353 dla $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_4^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, zmierzone 332,1351

III.6.4.8 Orto-hydroksybenzylideno-1-azydoetylo-2-metylo-5-okso-4,5-dihydro-1H-imidazol; o-HBI- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ (58)



Zasadę Schiffa otrzymano wg procedury ogólnej E, wychodząc z *o*-hydroksy-benzaldehydu (**46**) (850 mg, 6,96 mmol) i 2-azydoetyloaminy (660 mg, 7,66 mmol). Surowy produkt otrzymano ilościowo (1,30 g, 6,85 mmol) i poddano reakcji bez dalszego oczyszczania z imidanianem (1,20 g, 7,54 mmol). Jasnożółty produkt wyizolowano przez filtrację. Wydajność 0,90 g (51%). R_t = 29,33 min (supermocny)

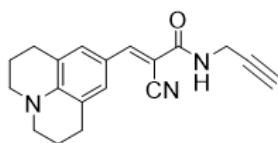
^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] 11.52 (bs, 1H), 8.25 (dd, J = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 7.31-7.25 (m, 2H), 6.90-6.85 (s, 2H), 3.80 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.60 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 2.42 (s, 3H)

HRMS (ESI+): obliczone m/z 272,1142 dla $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, zmierzone 272,1142

III.6.4.9 Synteza FMR będących pochodnymi julolidyny

Propargilową pochodną cyjanowinylojulolidyny (ACVJ) lub dimetyloaminobenzonitrylu (DMABN) otrzymano w reakcji odpowiedniego aldehydu z cyanoacetamidem.

III.6.4.10 9-(2-Amido-2-cyjanowinylo)julolidyny propargil ; ACVJ- C_3H_3 (60)

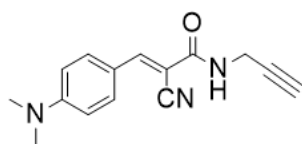


Roztwór julolidynokarboksyaldehydu (**59**) (250 mg, 1,24 mmol), 2-cyjanoacetamidu (227 mg, 1,86 mmol) i piperydyny w metanolu (10 ml) mieszano w temp. pokojowej przez noc. Po dodaniu równoważnej objętości wody/metanolu (1:1, v/v, 10 ml) osad zebrano przez filtrację i przemyto mieszaniną woda/metanol. Wydajność 151 mg (39%). Rt = 36,2 min (g. supermocny).

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] 8.42 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.44 (s, 2H), 3.94 (dd, J = 5.6, 2.5 Hz, 2H), 3.33 – 3.29 (m, 4H), 3.10 (t, J = 2.5 Hz, 1H), 2.68 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 1.87 (p, J = 6.0 Hz, 4H)

HRMS (ESI+): obliczone m/z 306,1601 dla $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, zmierzone 306,1599

III.6.4.11 (2-Amido-2-cyjano)dimetyloaminobenzylidenu propargil; **DMABN- C_3H_3** (**62**)



Roztwór 4-dimetyloaminobenzaldehydu (**61**) (500 mg, 3,35 mmol), N-propargilocyjanoacetamidu (514 mg, 4,02 mmol) i piperydyny w metanolu (10 ml) mieszano w temp. pokojowej przez noc. Po dodaniu równoważnej objętości wody/metanolu (1:1, v/v, 10 ml) osad zebrano przez filtrację i przemyto mieszaniną woda/metanol. Wydajność 650 mg (2,55 mmol, 76%). Rt = 23.19 min (g. supermocny)

HRMS (ESI+) obliczone m/z 254,1288 dla $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, zmierzone 254,1286

III.6.5 Synteza koniugatów FMR i nukleotydów

III.6.5.1 Procedura ogólna F – CuAAC między nukleotydami (lub C-fosfonianem) z ugrupowaniem azydkowym i FMR z ugrupowaniem propargilowym

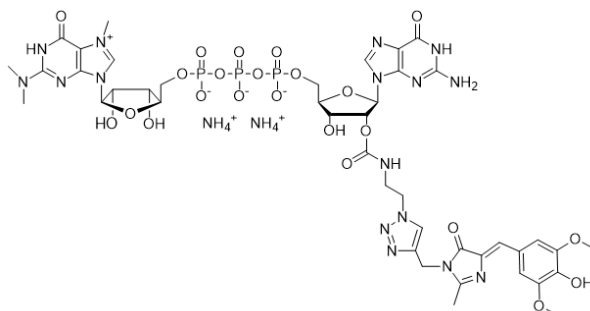
Modyfikowane azydkiem mono- lub dinukleotydy (1 ekw.) lub fosfonian- CH_2 -azydek (2 ekw.) rozpuściłem w MQ i dodałem odpowiednie propargilowane pochodne FMR (1-3 ekw.) rozpuszczone w DMSO. Dodałem DMSO w celu uzyskania mieszaniny $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 1:1 (dla DMHBI i HEMABI) lub 1:2; v/v (dla o-HBI, ACVJ). Następnie dodałem kompleks $\text{CuSO}_4\text{-THPTA}$ (1:2, v/v) w $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (55% DMSO) lub $\text{CuSO}_4\text{-TBTA}$ (1:2, v/v) w H_2O (0,2-0,4 ekw.) i 50 mM askorbinianu sodu (0,4-1 ekw.). Roztwór mieszałem w 30 °C od 1 godziny do 24 godzin. Do badań biologicznych produkty oczyściłem na analitycznym RP-HPLC (wypełnienie kolumny C8 lub C18) i wyizolowałem w postaci soli amonowej.

III.6.5.2 Procedura ogólna G – CuAAC między nukleotydami z ugrupowaniem propargilowym i FMR z ugrupowaniem azydkowym

Modyfikowane grupą propargilową mono- lub dinukleotydy (1 ekw.) rozpuściłem w MQ i dodałem odpowiednie pochodne FMR z grupą azydkową (1,5 ekw.) rozpuszczone w DMSO. Dodałem DMSO w celu uzyskania mieszaniny $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 1:1 (dla DMHBI) lub 1:2; v/v (dla o-HBI). Następnie dodałem kompleks $\text{CuSO}_4\text{-THPTA}$ (1:2, v/v) w $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (55% DMSO) (0,2-0,4 ekw.) i 50 mM askorbinianu sodu (0,4-1 ekw.). Roztwór mieszałem w 30°C od 1 godziny do 24 godzin. Do badań biologicznych produkty oczyściłem na analitycznym RP-HPLC (wypełnienie kolumny C8 lub C18) i wyizolowałem w postaci soli amonowej.

III.6.6 Synteza koniugatów FMR i dinukleotydowych analogów TMG kapów z guanozyną

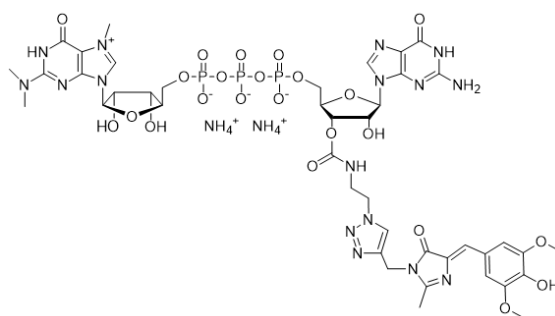
III.6.6.1 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan (1a-2'), **TMGpppG-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI**



Związek **1a-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 52 μL 11 mM roztworu MQ soli amonowej **1-2'** (0,58 μmol , 0,54 mg, 15 mOD) i 13,3 μL 50 mM roztworu DMSO **52** (1,2 ekw., 0,23 mg, 0,66 μmol), dodając 8,7 μL 10 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-TBTA (0,15 ekw., 0,05 mg, 0,09 μmol , 1:1, v/v) i 11,5 μL 10 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,2 ekw., 0,02 mg, 0,12 μmol) i rozcieńczając 30 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 8,7 μL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,15 ekw., 0,04 mg, 0,09 μmol) i dodając 50 μL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,39 mg **1a-2'** soli amonowej (0,32 μmol , 8,3 mOD, wyd. 55%); Rt = 14,30 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z dla C₄₂H₅₂N₁₆O₂₃P₃⁻ [M-H]⁻ 1241,2610, zmierzone 1241,2656

III.6.6.2 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(3'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan (1a-3'), **TMGpppG-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI**

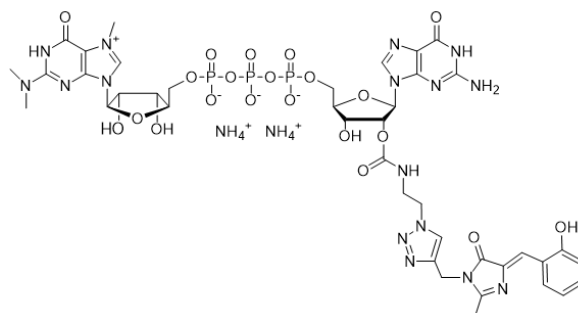


Związek **1a-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 43 μL 13 mM roztworu MQ soli amonowej **1-3'** (0,58 μmol , 0,54 mg, 15 mOD) i 13,3 μL 50 mM roztworu DMSO **52** (1,2 ekw., 0,23 mg, 0,66 μmol), dodając 8,7 μL 10 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-TBTA (0,15 ekw., 0,05 mg, 0,09 μmol , 1:1, v/v) i 11,5 μL 10 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,2 ekw., 0,02 mg, 0,12 μmol) i rozcieńczając 30 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 8,7 μL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,15 ekw., 0,04 mg, 0,09 μmol) i dodając 50 μL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz

(gradient mocny). Otrzymałem 0,53 mg **1a-3'** soli amonowej (0,43 μmol , 11,1 mOD, wyd. 74%); $R_t = 14,01$ min

HRMS (ESI-): obliczone m/z dla $\text{C}_{42}\text{H}_{52}\text{N}_{16}\text{O}_{23}\text{P}_3^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 1241,2610, zmierzone 1241,2625

III.6.6.3 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'/3'-O-(o-HBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan (1b-2'**, **1b-3'**), TMGpppG-2'/3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-o-HBI**



lub 3' izomer

Związki **1b-2'** i **1b-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 40 mg soli amonowej **1-2'+3'** (43 μmol , 1113 mOD) i 172 μL 500 mM roztworu DMSO **54** (2 ekw., 20 mg, 86 μmol) dodając 120 μL 500 mM roztworu H₂O MQ CuSO₄-THPTA (1,5 ekw, 35,7 mg, 60 μmol , 1:1, v/v) i 15,3 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianmu sodu (1,5 ekw, 11,9 mg, 60 μmol) i rozcieńczając 200 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 23,32 mg Na₂EDTA (0,4 ekw, 60 μmol). Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 11,06 mg **1b-2'** soli amonowej (245 mOD, wyd. 22%) oraz 18,59 mg **1b-3'** soli amonowej (415 mOD, wyd. 37%)

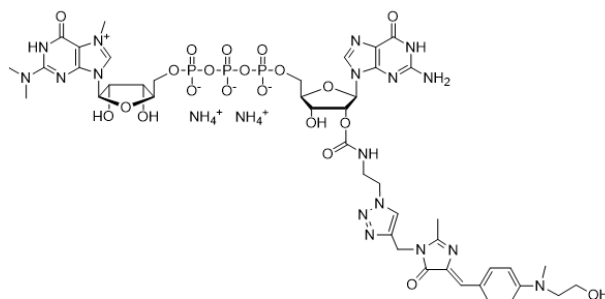
Izomer 2' (245 mOD, $R_t = 15,27$ min)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 1181,2398 dla $\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{N}_{16}\text{O}_{21}\text{P}_3^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$; zmierzone 1181,2412

Izomer 3' (415 mOD, $R_t = 14,96$ min)

HRMS (ESI-) obliczone m/z 1181,2398 dla $\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{N}_{16}\text{O}_{21}\text{P}_3^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$; zmierzone 1181,2414

III.6.6.4 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan (1c-2'**), TMGpppG-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-HEMABI**

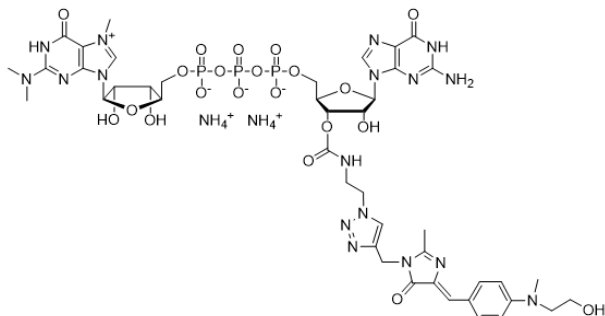


Związek **1c-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 70 μL 11 mM roztworu MQ soli amonowej **1-2'** (0,72 mg, 0,77 μmol , 20 mOD) i 18,4 μL 50 mM roztworu DMSO **54** (1,2 ekw., 0,22 mg, 0,92 μmol) dodając 3,1 μL 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-TBTA (0,4 ekw, 0,18 mg, 0,31 μmol , 1:1, v/v) i 15,3 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianmu sodu (1 ekw,

0,15 mg, 0,77 μmol) i rozcieńczając 70 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 31 μL 10 mM roztworu Na_2EDTA w MQ (0,4 ekw, 0,11 mg, 0,31 μmol) i dodając 50 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,87 mg **1c-2'** soli amonowej (0,57 μmol , 15,8 mOD, wyd. 61%); R_t = 14,26 min.

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1238,2977 dla $\text{C}_{43}\text{H}_{55}\text{N}_{17}\text{O}_{21}\text{P}_3^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, zmierzone 1238,2998

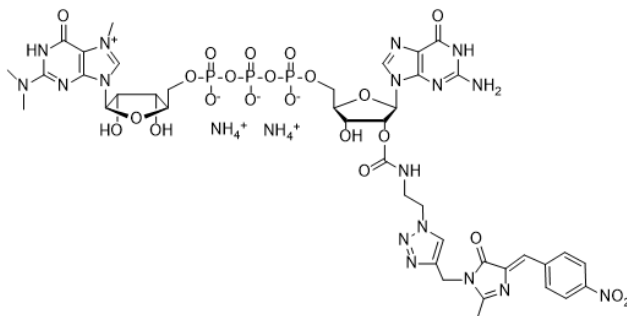
III.6.6.5 P1-($\text{N}^2, \text{N}^2, \text{N}^7$ -trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(3'-O-(HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan (**1c-3'**), **TMGpppG-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-HEMABI**



Związek **1c-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 88 μL 13 mM roztworu MQ soli amonowej **1-3'** (1,08 mg, 1,15 μmol , 30 mOD) i 27,6 μL 50 mM roztworu DMSO **54** (1,2 ekw., 0,33 mg, 1,38 μmol), dodając 4,6 μL 100 mM roztworu $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ CuSO_4 -TBTA (0,4 ekw, 0,27 mg, 0,46 μmol , 1:1, v/v) i 23 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (1 ekw, 0,23 mg, 1,15 μmol) i rozcieńczając 90 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 46 μL 10 mM roztworu Na_2EDTA w MQ (0,4 ekw, 0,17 mg, 0,46 μmol) i dodając 50 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,87 mg **1c-2'** soli amonowej (70 μmol , 19,3 mOD, wyd. 61%); R_t = 14,26 min.

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1238,2977 dla $\text{C}_{43}\text{H}_{55}\text{N}_{17}\text{O}_{21}\text{P}_3^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, zmierzone 1238,2998

III.6.6.6 P1-($\text{N}^2, \text{N}^2, \text{N}^7$ -trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(*p*-NHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan, **TMGpppG-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-*p*-NHBI** (**1d-2'**)

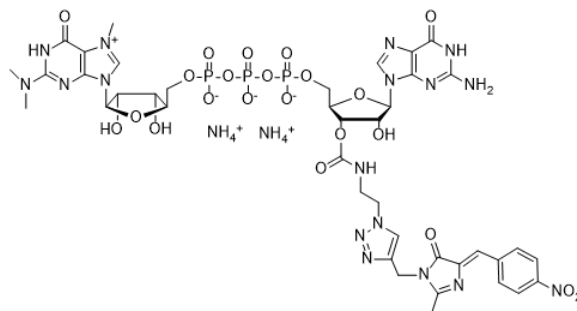


Związek **1d-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 75 μL 3,3 mM roztworu MQ soli amonowej **1-2'** (0,23 mg, 0,25 μmol , 6,5 mOD) i 4,5 μL 100 mM roztworu DMSO **55** (1,8 ekw., 0,12 mg, 0,45 μmol), dodając 2 μL 50 mM roztworu $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ CuSO_4 -THPTA (0,4 ekw., 0,06 mg, 0,10 μmol , 1:1, v/v) i 5 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (1 ekw., 0,05

mg, 0,25 μmol) i rozcieńczając 80 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 10 μL 10 mM roztworu Na_2EDTA w MQ (0,4 ekw., 0,04 mg, 0,10 μmol) i dodając 70 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,24 mg **1d-2'** soli amonowej (0,20 μmol , 5,2 mOD, wyd. 80%); $R_t = 17,10$ min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1210,2300 dla $\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_{17}\text{O}_{22}\text{P}_3^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, zmierzone 1210,2305

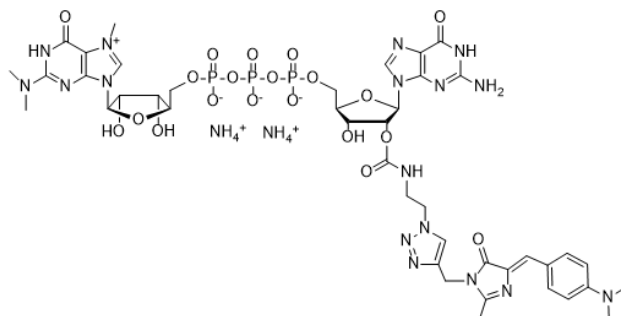
III.6.6.7 P1-($\text{N}^2, \text{N}^2, \text{N}^7$ -trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(3'-O-(*p*-NHBI metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan, **TMGpppG-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-*p*-NHBI (1d-3')**



Związek **1d-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 75 μL 3,3 mM roztworu MQ soli amonowej **1-3'** (0,23 mg, 0,25 μmol , 6,5 mOD) i 4,5 μL 100 mM roztworu DMSO **55** (1,8 ekw., 0,12 mg, 0,45 μmol), dodając 2 μL 50 mM roztworu $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ CuSO_4 -TBTA (0,4 ekw., 0,06 mg, 0,10 μmol , 1:1, v/v) i 5 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (1 ekw., 0,05 mg, 0,25 μmol) i rozcieńczając 80 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 10 μL 10 mM roztworu Na_2EDTA w MQ (0,4 ekw., 0,04 mg, 0,10 μmol) i dodając 70 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,28 mg **1d-3'** soli amonowej (0,23 μmol , 6,1 mOD, wyd. 94%); $R_t = 17,20$ min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1210,2300 dla $\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_{17}\text{O}_{22}\text{P}_3^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, zmierzone 1210,2304

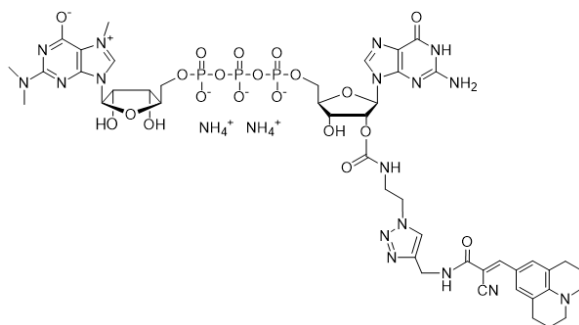
III.6.6.8 P1-($\text{N}^2, \text{N}^2, \text{N}^7$ -trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(DMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan (**1e-2'**), **TMGpppG-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMABI**



Związek **1e-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 50 μL 9 mM roztworu MQ soli amonowej **1-2'** (0,43 mg, 0,46 μmol , 12 mOD) i 18 μL 50 mM roztworu DMSO **56** (2 ekw., 0,24 mg, 0,09 μmol), dodając 2,3 μL 100 mM roztworu $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ CuSO_4 -TBTA (0,5 ekw., 0,14 mg, 0,02 μmol , 1:1, v/v) i 9,2 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (1 ekw., 0,09

mg, 0,05 μmol) i rozcieńczając 100 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 23 μL 10 mM roztworu Na_2EDTA w MQ (0,5 ekw., 0,08 mg, 0,02 μmol) i dodając 70 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,28 mg **1e-2'** soli amonowej (0,24 μmol , wyd. 51%); $R_t = 18,45$ min
HRMS (ESI-): obliczone m/z 1208,2871 dla $\text{C}_{42}\text{H}_{53}\text{N}_{17}\text{O}_{20}\text{P}_3^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, zmierzone 1208,2873

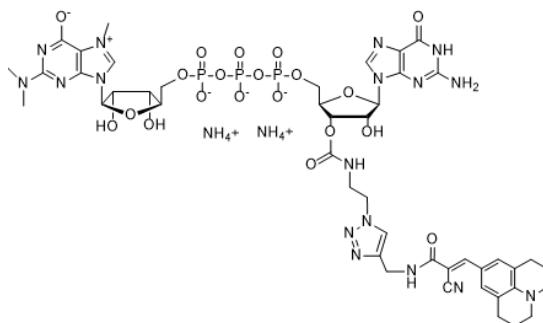
III.6.6.9 P1-($\text{N}^2, \text{N}^2, \text{N}^7$ -trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(ACVJ-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoi)ganozyn-5'-ylo) trifosforan (**1f-2'**), **TMGpppG-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-ACVJ**



Związek **1f-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 70 μL 11 mM roztworu MQ soli amonowej **1-2'** (0,72 mg, 0,77 μmol , 20 mOD) i 17,6 μL 50 mM roztworu DMSO **60** (1,2 ekw., 0,27 mg, 0,88 μmol), dodając 11,5 μL 10 mM roztworu $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ CuSO_4 -TBTA (0,15 ekw, 0,05 mg, 0,11 μmol , 1:1, v/v) i 15,3 μL 10 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,2 ekw., 0,02 mg, 0,15 μmol) i rozcieńczając 70 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 15 μL 10 mM roztworu Na_2EDTA w MQ (0,2 ekw., 0,06 mg, 0,15 μmol) i dodając 70 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient supermocny). Otrzymałem 0,76 mg **1f-2'** soli amonowej (0,61 μmol , 19,1 mOD, wyd. 79%); $R_t = 16,80$ min.

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1246,3028 dla $\text{C}_{45}\text{H}_{55}\text{N}_{17}\text{O}_{20}\text{P}_3^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, zmierzone 1246,3061

III.6.6.10 P1-($\text{N}^2, \text{N}^2, \text{N}^7$ -trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(ACVJ-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoi)ganozyn-5'-ylo) trifosforan (**1f-3'**), **TMGpppG-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-ACVJ**

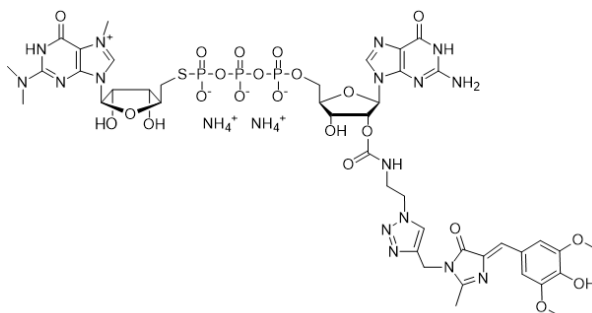


Związek **1f-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 43 μL 13 mM roztworu MQ soli amonowej **1-3'** (0,54 mg, 0,58 μmol , 15 mOD) i 13,3 μL 50 mM roztworu DMSO **60** (1,2 ekw., 0,20 mg, 0,66 μmol), dodając 8,7 μL 10 mM roztworu $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ CuSO_4 -TBTA (0,15 ekw, 0,05 mg, 0,09 μmol , 1:1, v/v) i 11,5 μL 10 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,2 ekw, 0,02 mg, 0,12 μmol) i rozcieńczając 70 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 9 μL 10 mM

roztworu Na₂EDTA w MQ (0,2 ekw., 0,04 mg, 0,09 µmol) i dodając 70 µL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient supermocny). Otrzymałem 0,61 mg **1f-3'** soli amonowej (0,49 µmol, 15,4 mOD, wyd. 85%); Rt = 16,07 min.

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1246,3028 dla C₄₅H₅₅N₁₇O₂₀P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1246,3039

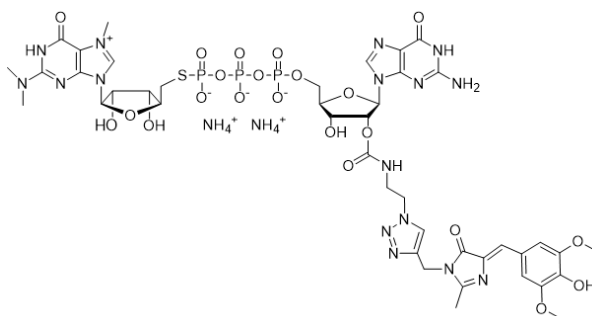
III.6.6.11 P1-(5'-tio-N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan, TMG-5'-S-pppG-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI (2a-2')



Związek **2a-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 49 µL 11 mM roztworu MQ soli amonowej **2-2'** (0,52 mg, 0,54 µmol, 14,1 mOD) i 5,4 µL 100 mM roztworu DMSO **52** (0,16 mg, 0,54 µmol, 1 ekw.), dodając 1,1 µL 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,2 ekw, 0,06 mg, 0,11 µmol, 1:2, v/v) i 4,3 µL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,4 ekw., 0,04 mg, 0,22 µmol) i rozcieńczając 25 µL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 11 µL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,2 ekw., 0,04 mg, 0,11 µmol) i dodając 50 µL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,59 mg **2a-2'** soli amonowej (0,47 µmol, 12,4 mOD, wyd. 88%); Rt = 14,02 min.

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1257,2381 dla C₄₂H₅₂N₁₆O₂₂P₃S⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1257,2392

III.6.6.12 P1-(5'-tio-N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(3'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan, TMG-5'-S-pppG-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI (2a-3')

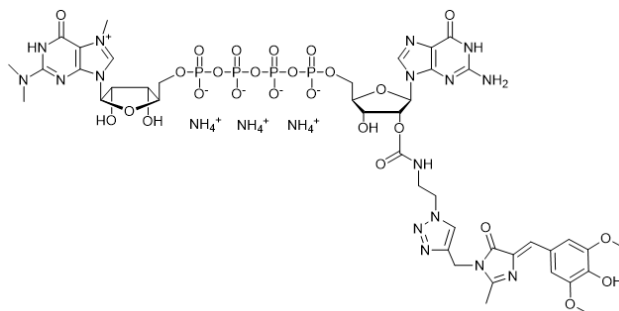


Związek **2a-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 32 µL 17 mM roztworu MQ soli amonowej **2-3'** (0,52 mg, 0,54 µmol, 14,2 mOD) i 5,4 µL 100 mM roztworu DMSO **52** (0,16 mg, 0,54 µmol, 1 ekw.), dodając 1,1 µL 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,2 ekw. 0,06 mg, 0,11 µmol, 1:2, v/v) i 4,3 µL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,4 ekw., 0,04 mg, 0,22 µmol) i rozcieńczając 25 µL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 11 µL 10 mM

roztworu Na₂EDTA w MQ (0,2 ekw., 0,04 mg, 0,11 µmol) i dodając 50 µL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,53 mg **2a-3'** soli amonowej (0,42 µmol, 11,1 mOD, wyd. 78%); Rt = 12,96 min.

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1257,2381 dla C₄₂H₅₂N₁₆O₂₂P₃S⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1257,2398

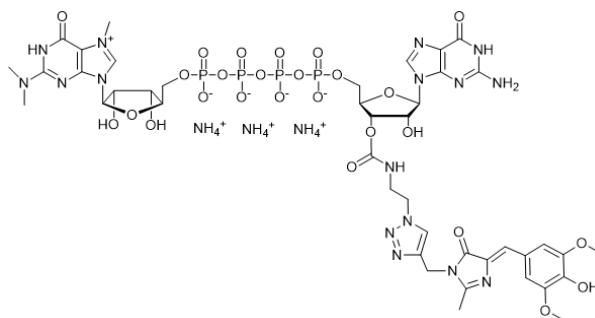
III.6.6.13 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P4-(2'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoi)ganozyn-5'-ylo) tetrafosforan, TMGppppG-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI (5a-2')



Związek **5a-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 16 µL 38 mM roztworu MQ soli amonowej **5-2'** (0,63 mg, 0,61 µmol, 15,9 mOD) i 24,4 µL 50 mM roztworu DMSO **52** (0,37 mg, 1,20 µmol, 2 ekw.), dodając 6,1 µL 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,4 ekw., 0,14 mg, 0,24 µmol, 1:2, v/v) i 12,2 µL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (1 ekw, 0,12 mg, 0,61 µmol) i rozcieńczając 25 µL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 24 µL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,4 ekw., 0,09 mg, 0,24 µmol) i dodając 50 µL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,18 mg **5a-2'** soli amonowej (0,13 µmol, 3,50 mOD, wyd. 22%); Rt = 13,07 min.

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1321,2273 dla C₄₂H₅₃N₁₆O₂₆P₄⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1321,2271

III.6.6.14 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P4-(3'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoi)ganozyn-5'-ylo) tetrafosforan, TMGppppG-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI (5a-3')

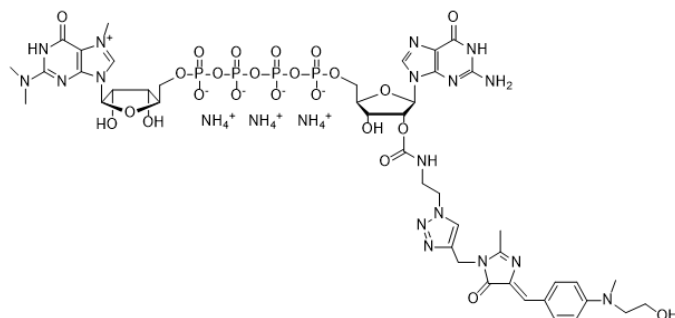


Związek **5a-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 25 µL 38 mM roztworu MQ soli amonowej **5-3'** (0,98 mg, 0,95 µmol, 24,8 mOD) i 38 µL 50 mM roztworu DMSO **52** (0,57 mg, 1,90 µmol, 2 ekw.), dodając 9,5 µL 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,4 ekw., 0,23 mg, 0,38 µmol, 1:2, v/v) i 19 µL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (1 ekw., 0,19 mg, 0,95 µmol) i rozcieńczając 25 µL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 38 µL 10 mM roztworu

Na₂EDTA w MQ (0,4 ekw., 0,14 mg, 0,38 µmol) i dodając 50 µL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,25 mg **5a-3'** soli amonowej (0,19 µmol, 5,0 mOD, wyd. 20%); Rt = 12,86 min.

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1321,2273 dla C₄₂H₅₃N₁₆O₂₆P₄⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1321,2269

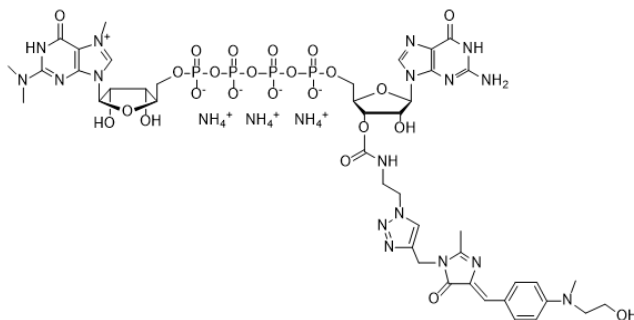
III.6.6.15 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P4-(2'-O-(HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoi)ganozyn-5'-ylo) tetrafosforan, TMGppppG-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-HEMABI (5c-2')



Związek **5c-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 16 µL 38 mM roztworu MQ soli amonowej **5-2'** (0,63 mg, 0,61 µmol, 15,9 mOD) i 24,4 µL 50 mM roztworu DMSO **54** (0,37 mg, 1,20 µmol, 2 ekw.), dodając 6,1 µL 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,4 ekw., 0,14 mg, 0,24 µmol, 1:2, v/v) i 12,2 µL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (1 ekw, 0,12 mg, 0,61 µmol) i rozcieńczając 25 µL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 24 µL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,4 ekw., 0,09 mg, 0,24 µmol) i dodając 50 µL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,31 mg **5c-2'** soli amonowej (0,24 µmol, 6,5 mOD, wyd. 39%); Rt = 13,86 min.

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1318,2640 dla C₄₃H₅₆N₁₇O₂₄P₄⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1318,2638

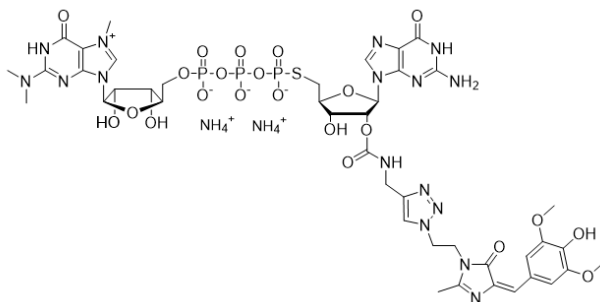
III.6.6.16 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P4-(3'-O-(HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoi)ganozyn-5'-ylo) tetrafosforan, TMGppppG-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-HEMABI (5c-3')



Związek **5c-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 25 µL 38 mM roztworu MQ soli amonowej **5-3'** (0,98 mg, 0,95 µmol, 24,8 mOD) i 38 µL 50 mM roztworu DMSO **54** (0,57 mg, 1,90 µmol, 2 ekw.), dodając 9,5 µL 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,4 ekw., 0,23 mg, 0,38 µmol, 1:2, v/v) i 19 µL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (1 ekw., 0,19 mg, 0,95 µmol) i rozcieńczając 25 µL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 38 µL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,4 ekw., 0,14 mg, 0,38 µmol) i dodając 50 µL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt

oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,30 mg **5c-3'** soli amonowej (0,23 μmol , 6,3 mOD, wyd. 24%); $R_t = 13,81$ min
HRMS (ESI-): obliczone m/z 1318,2640 dla $\text{C}_{43}\text{H}_{56}\text{N}_{17}\text{O}_{24}\text{P}_4^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, zmierzone 1318,2637

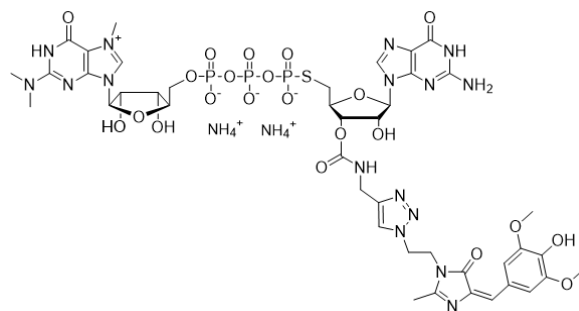
III.6.6.17 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(DMHBI-etylo-1H-1,2,3-triazolo-4-ylo)-metylokarbamoilo)-5'-tioguanozyn-5'-ylo) trifosforan, **TMGppp-5'-SG-2'-O-C(O)NH-CH₂-4-triazolo-CH₂CH₂-DMHBI (7a-2')**



Związek **7a-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej G wychodząc z 85 μL 4,7 mM roztworu MQ soli amonowej **7-2'** (0,37 mg, 0,40 μmol , 10,4 mOD) i 12 μL 50 mM roztworu DMSO **57** (0,20 mg, 0,60 μmol , 1,5 ekw.), dodając 2 μL 40 mM roztworu $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ $\text{CuSO}_4\text{-THPTA}$ (0,2 ekw., 0,05 mg, 0,08 μmol , 1:2, v/v) i 3,2 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,4 ekw., 0,03 mg, 0,16 μmol) i rozcieńczając 40 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 8 μL 10 mM roztworu Na_2EDTA w MQ (0,2 ekw., 0,03 mg, 0,08 μmol) i dodając 40 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,32 mg **7a-2'** soli amonowej (0,25 μmol , 6,6 mOD, wyd. 63%); $R_t = 13,16$ min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1257,2381 dla $\text{C}_{42}\text{H}_{52}\text{N}_{16}\text{O}_{22}\text{P}_3\text{S}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, zmierzone 1257,2394

III.6.6.18 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(3'-O-(DMHBI-etylo-1H-1,2,3-triazolo-4-ylo)-metylokarbamoilo)-5'-tioguanozyn-5'-ylo) trifosforan, **TMGppp-5'-SG-3'-O-C(O)NH-CH₂-4-triazolo-CH₂CH₂-DMHBI (7a-3')**

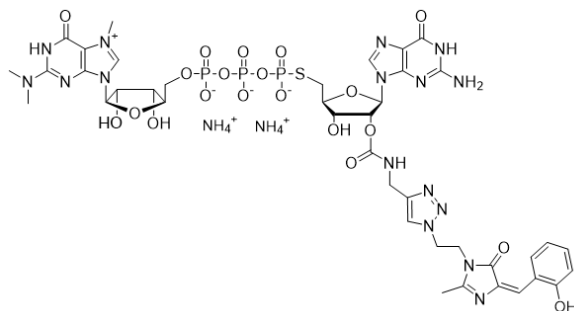


Związek **7a-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej G wychodząc z 68 μL 5,9 mM roztworu MQ soli amonowej **7-3'** (0,37 mg, 0,40 μmol , 10,4 mOD) i 12 μL 50 mM roztworu DMSO **57** (0,20 mg, 0,60 μmol , 1,5 ekw.), dodając 2 μL 40 mM roztworu $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ $\text{CuSO}_4\text{-THPTA}$ (0,2 ekw. 0,05 mg, 0,08 μmol , 1:2, v/v) i 3,2 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,4 ekw., 0,03 mg, 0,16 μmol) i rozcieńczając 40 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 8 μL 10 mM roztworu Na_2EDTA w MQ (0,2 ekw, 0,03 mg, 0,08 μmol) i dodając 40 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient

mocny). Otrzymałem 0,42 mg **7a-3'** soli amonowej (0,33 μmol , 8,7 mOD, wyd. 83%); Rt = 13,26 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1257,2381 dla $\text{C}_{42}\text{H}_{52}\text{N}_{16}\text{O}_{22}\text{P}_3\text{S}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, zmierzone 1257,2396

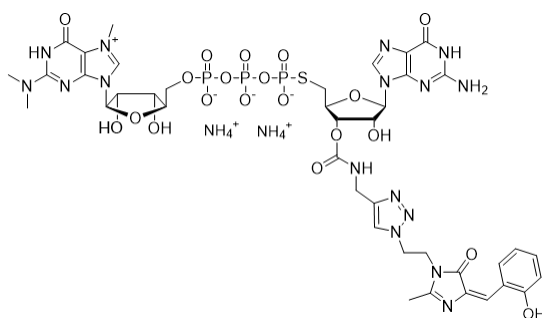
III.6.6.19 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(o-HBI-etylo-1H-1,2,3-triazolo-4-ylo)-metylokarbamoilo)-5'-tioguanozyn-5'-ylo) trifosforan, TMGppp-5'-SG-2'-O-C(O)NH-CH₂-4-triazolo-CH₂CH₂-o-HBI (7b-2')



Związek **7b-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej G wychodząc z 85 μL 4,7 mM roztworu MQ soli amonowej **7-2'** (0,37 mg, 0,40 μmol , 10,4 mOD) i 12 μL 50 mM roztworu DMSO **58** (0,16 mg, 0,60 μmol , 1,5 ekw.), dodając 2 μL 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,2 ekw., 0,05 mg, 0,08 μmol , 1:2, v/v) i 3,2 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,4 ekw., 0,03 mg, 0,16 μmol) i rozcieńczając 40 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 8 μL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,2 ekw., 0,03 mg, 0,08 μmol) i dodając 40 μL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,25 mg **7b-2'** soli amonowej (0,21 μmol , 5,5 mOD, wyd. 53%); Rt = 14,49 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1197,2170 dla $\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{N}_{16}\text{O}_{20}\text{P}_3\text{S}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, zmierzone 1197,2189

III.6.6.20 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(3'-O-(o-HBI-etylo-1H-1,2,3-triazolo-4-ylo)-metylokarbamoilo)-5'-tioguanozyn-5'-ylo) trifosforan, TMGppp-5'-SG-3'-O-C(O)NH-CH₂-4-triazolo-CH₂CH₂-o-HBI (7b-3')

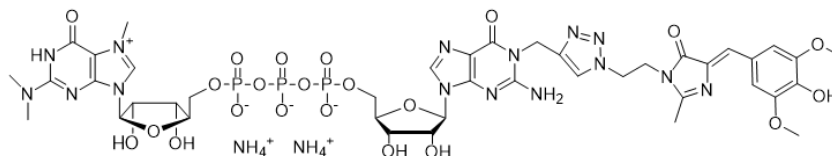


Związek **7b-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej G wychodząc z 68 μL 5,9 mM roztworu MQ soli amonowej **7-3'** (0,37 mg, 0,40 μmol , 10,4 mOD) i 12 μL 50 mM roztworu DMSO **58** (0,16 mg, 0,60 μmol , 1,5 ekw.), dodając 2 μL 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,2 ekw., 0,05 mg, 0,08 μmol , 1:2, v/v) i 3,2 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,4 ekw., 0,03 mg, 0,16 μmol) i rozcieńczając 40 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 8 μL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,2 ekw., 0,03 mg, 0,08 μmol) i dodając 40 μL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient

mocny). Otrzymałem 0,40 mg **7b-3'** soli amonowej (0,34 μmol , 8,8 mOD, wyd. 84%); R_t = 14,60 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1197,2170 dla $\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{N}_{16}\text{O}_{20}\text{P}_3\text{S}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, zmierzone 1197,2185

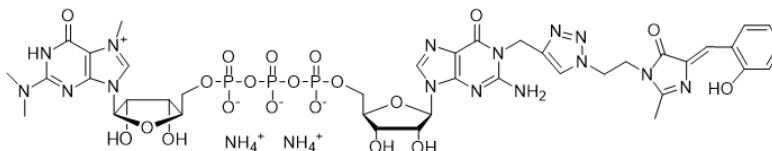
III.6.6.21 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(N1-(DMHBI-etylo-1H-1,2,3-triazolo-4-ylo)-metyloguanozyn-5'-ylo) trifosforan, TMGpppG-N1-CH₂-4-triazolo-CH₂CH₂-DMHBI (9a)



Związek **9a** otrzymałem wg procedury ogólnej G wychodząc z 25 μL 36,7 mM roztworu MQ soli amonowej **9** (0,80 mg, 0,90 μmol , 24,0 mOD) i 10 μL 100 mM roztworu DMSO **57** (0,33 mg, 1,00 μmol , 1,1 ekw.), dodając 1,8 μL 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,2 ekw., 0,07 mg, 0,37 μmol , 1:2, v/v) i 7,3 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,4 ekw., 0,07 mg, 0,37 μmol) i rozcieńczając 30 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 18 μL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,2 ekw., 0,07 mg, 0,18 μmol) i dodając 40 μL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,53 mg **9a** soli amonowej (0,44 μmol , 11,5 mOD, wyd. 48%); R_t = 13,95 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1198,2551 dla $\text{C}_{41}\text{H}_{51}\text{N}_{15}\text{O}_{22}\text{P}_3^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, zmierzone 1198,2566

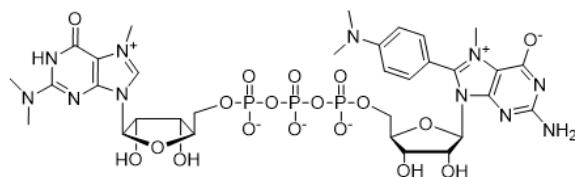
III.6.6.22 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(N1-(o-HBI-etylo-1H-1,2,3-triazolo-4-ylo)-metyloguanozyn-5'-ylo) trifosforan, TMGpppG-N1-CH₂-4-triazolo-CH₂CH₂-o-HBI (9b)



Związek **9b** otrzymałem wg procedury ogólnej G wychodząc z 25 μL 36,7 mM roztworu MQ soli amonowej **9** (0,80 mg, 0,90 μmol , 24,0 mOD) i 10 μL 100 mM roztworu DMSO **58** (0,27 mg, 1,00 μmol , 1,1 ekw.), dodając 1,8 μL 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,2 ekw., 0,07 mg, 0,37 μmol , 1:2, v/v) i 7,3 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,4 ekw., 0,07 mg, 0,37 μmol) i rozcieńczając 55 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 18 μL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,2 ekw., 0,07 mg, 0,18 μmol) i dodając 40 μL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,95 mg **9b** soli amonowej (0,83 μmol , 21,8 mOD, wyd. 91%); R_t = 14,34 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1138,2340 dla $\text{C}_{39}\text{H}_{47}\text{N}_{15}\text{O}_{20}\text{P}_3^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, zmierzone 1138,2349

III.6.6.23 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(8-dimetyloaminofenylo-N⁷metyloguanozyn-5'-ylo) trifosforan, **TMGpppm⁷G^{8-DMAPh} (10)**



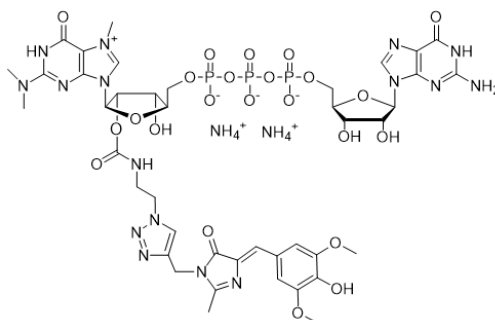
Związek **TMGpppm⁷G^{8-DMAPh}** (10) otrzymałem w reakcji **TMGDP-lm** (8,0 mg, 0,014 mmol) oraz **m⁷GMP^{8-DMAPh}** (10 mg, 0,014 mmol) w DMF w obecności **ZnCl₂**. Produkt oczyściłem za pomocą semi-preparatywnego HPLC w odwróconym układzie faz. Otrzymałem 5,8 mg soli amonowej (6,0 μmoli, 160 mOD, wyd. 43%); Rt = 13,45 min

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ = 7.47 (d, J=8.6, 2H_{ar}), 6.98 (d, J=8.7, 2H_{ar}), 5.96 (d, J=4.1, 1H, H-1'), 5.64 (d, J=5.6, 1H, H1'), 5.24 (t, J=5.7, 1H, H-2'), 4.61 (td, J=6.2, 4.9, 4.1, 2H, H-2', H-3'), 4.45 (t, J=4.7, 1H, H-3'), 4.35 (m, 3H, H-4', H-5'), 4.22 (m, 3H, H-4', H-5'), 4.11 (s, 3H, CH₃), 4.00 (s, 3H, CH₃), 3.15 (s, 6H, 2xCH₃), 3.07 (s, 6H, 2xCH₃).

³¹P NMR (202 MHz, D₂O) δ = -10.44-(-10.71) (m, 2P), -22.21 (t, J=19.1, 1P).

HRMS (ESI-): obliczone m/z 962,20059 dla C₃₂H₄₃N₁₁O₁₈P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 962,2016

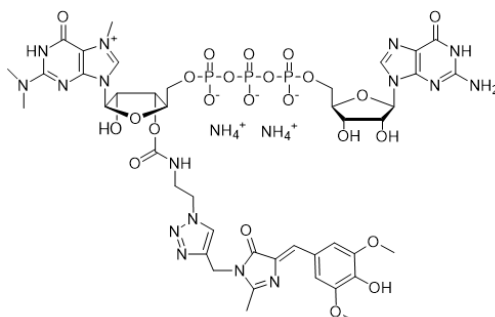
III.6.6.24 P1-(2'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoiło)-N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(guanozyn-5'-ylo) trifosforan, **TMG(2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI)pppG (8a-2')**



Związek **8a-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 73 μL 5,5 mM roztworu MQ soli amonowej **8-2'** (0,38 mg, 0,40 μmol, 10,4 mOD) i 12 μL 50 mM roztworu DMSO **52** (0,18 mg, 0,60 μmol, 1,5 ekw.), dodając 2 μL 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,2 ekw., 0,05 mg, 0,08 μmol, 1:2, v/v) i 3,2 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,4 ekw., 0,03 mg, 0,16 μmol) i rozcieńczając 35 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 8 μL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,2 ekw., 0,03 mg, 0,08 μmol) i dodając 40 μL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,17 mg **8a-2'** soli amonowej (0,14 μmol, 3,6 mOD, wyd. 34%); Rt = 14,05 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1241,2609 dla C₄₂H₅₂N₁₆O₂₃P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1241,2630

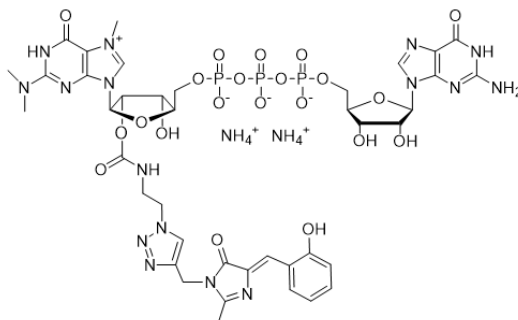
III.6.6.25 P1-(3'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)-N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(guanozyn-5'-ylo) trifosforan, **TMG(3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI)pppG (8a-3')**



Związek **8a-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 66 μL 6,1 mM roztworu MQ soli amonowej **8-3'** (0,38 mg, 0,40 μmol , 10,4 mOD) i 12 μL 50 mM roztworu DMSO **52** (0,18 mg, 0,60 μmol , 1,5 ekw.), dodając 2 μL 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,2 ekw., 0,05 mg, 0,08 μmol , 1:2, v/v) i 3,2 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,4 ekw. 0,03 mg, 0,16 μmol) i rozcieńczając 35 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 8 μL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,2 ekw., 0,03 mg, 0,08 μmol) i dodając 40 μL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,18 mg **8a-3'** soli amonowej (0,14 μmol , 3,8 mOD, wyd. 36%); Rt = 13,76 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1241,2609 dla C₄₂H₅₂N₁₆O₂₃P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1241,2634

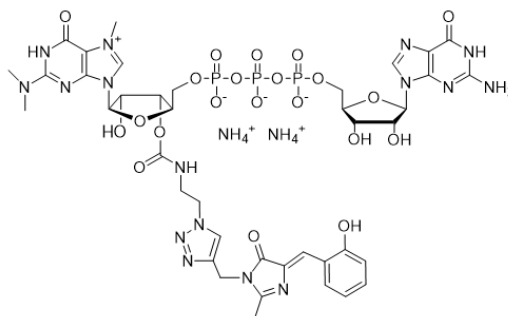
III.6.6.26 P1-(2'-O-(o-HBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)-N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(guanozyn-5'-ylo) trifosforan, **TMG(2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-o-HBI)pppG (8b-2')**



Związek **8b-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 73 μL 5,5 mM roztworu MQ soli amonowej **8-2'** (0,38 mg, 0,40 μmol , 10,4 mOD) i 12 μL 50 mM roztworu DMSO **53** (0,14 mg, 0,60 μmol , 1,5 ekw.), dodając 2 μL 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,05 mg, 0,08 μmol , 1:2, v/v) i 3,2 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,03 mg, 0,16 μmol) i rozcieńczając 70 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 8 μL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,03 mg, 0,08 μmol) i dodając 50 μL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,25 mg **8b-2'** soli amonowej (0,21 μmol , 5,6 mOD wyd. 52%); Rt = 14,22 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1181,2398 dla C₄₀H₄₈N₁₆O₂₁P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1181,2430

III.6.6.27 P1-(3'-O-(o-HBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)-N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(guanozyn-5'-ylo) trifosforan, TMG(3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-o-HBI)pppG (8b-3')

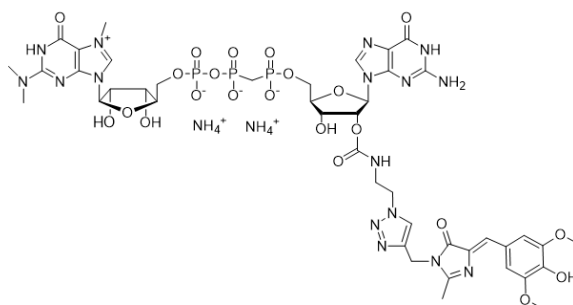


Związek **8b-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 66 μ L 6,1 mM roztworu MQ soli amonowej **8-3'** (0,38 mg, 0,40 μ mol, 10,4 mOD) i 12 μ L 50 mM roztworu DMSO **53** (0,14 mg, 0,60 μ mol, 1,5 ekw.), dodając 2 μ L 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,05 mg, 0,08 μ mol, 1:2, v/v) i 3,2 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,03 mg, 0,16 μ mol) i rozcieńczając 70 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 8 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,03 mg, 0,08 μ mol) i dodając 50 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,40 mg **8b-3'** soli amonowej (0,34 μ mol, 8,8 mOD, wyd. 84%); Rt = 13,76 min

HRMS (ESI⁻): obliczone m/z 1181,2398 dla C₄₀H₄₈N₁₆O₂₁P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1181,2423

III.6.7 Synteza koniugatów FMR i dinukleotydowych analogów TMG kapów z guanozyną modyfikowane w mostku fosforanowym

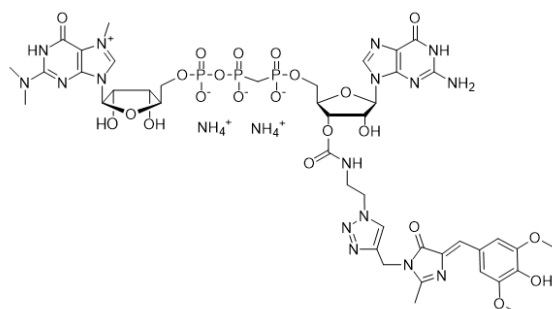
III.6.7.1 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) 2,3-metylenotrifosforan, TMGppCH₂pG-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI (3a-2')



Związek **3a-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 65 μ L 4,2 mM roztworu MQ soli amonowej **3-2'** (0,26 mg, 0,27 μ mol, 7,1 mOD) i 6,6 μ L 50 mM roztworu DMSO **22** (0,10 mg, 0,33 μ mol, 1,2 ekw.), dodając 1,1 μ L 50 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,03 mg, 0,05 μ mol, 1:2, v/v) i 5,5 μ L 20 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,02 mg, 0,11 μ mol) i rozcieńczając 65 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 5 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,02 mg, 0,06 μ mol) i dodając 40 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,30 mg **3a-2'** soli amonowej (0,25 μ mol, 6,4 mOD, wyd. 90%); Rt = 13,54 min

HRMS (ESI⁻): obliczone m/z 1239,2817 dla C₄₃H₅₄N₁₆O₂₂P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1239,2819

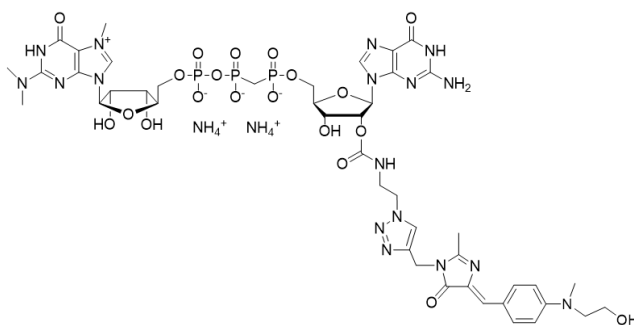
III.6.7.2 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(3'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)ganozozyn-5'-ylo **2,3-metylenotrifosforan,**
TMGppCH₂pG-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI (3a-3')



Związek **3a-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 65 μ L 6 mM roztworu MQ soli amonowej **3-3'** (0,37 mg, 0,39 μ mol, 10,2 mOD) i 9,4 μ L 50 mM roztworu DMSO **22** (0,139 mg, 0,47 μ mol, 1,2 ekw.), dodając 1,6 μ L 50 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,046 mg, 0,08 μ mol, 1:2, v/v) i 1,6 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,031 mg, 0,16 μ mol) i rozcieńczając 65 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 8 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,03 mg, 0,08 μ mol) i dodając 40 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,24 mg **3a-3'** soli amonowej (0,19 μ mol, 5 mOD, wyd. 49%); Rt = 13,51 min

HRMS (ESI⁻): obliczone m/z 1239,2817 dla C₄₃H₅₄N₁₆O₂₂P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1239,2823

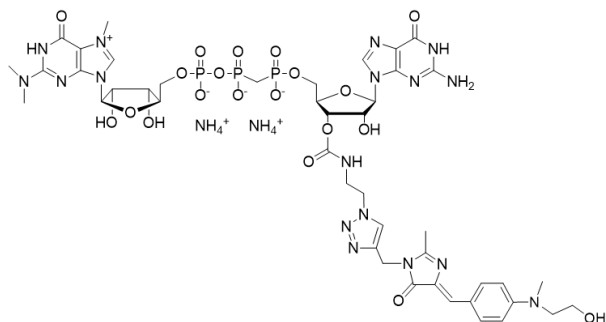
III.6.7.3 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)ganozozyn-5'-ylo **2,3-metylenotrifosforan,**
TMGppCH₂pG-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-HEMABI (3c-2')



Związek **3c-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 65 μ L 4,2 mM roztworu MQ soli amonowej **3-2'** (0,26 mg, 0,27 μ mol, 7,0 mOD) i 6,6 μ L 50 mM roztworu DMSO **54** (0,10 mg, 0,33 μ mol, 1,2 ekw.), dodając 1,1 μ L 50 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,03 mg, 0,05 μ mol, 1:2, v/v) i 5,5 μ L 20 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,02 mg, 0,11 μ mol) i rozcieńczając 65 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 5 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,02 mg, 0,06 μ mol) i dodając 40 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,14 mg **3c-2'** soli amonowej (0,11 μ mol, 3,1 mOD, wyd. 42%); Rt = 14,64 min

HRMS (ESI⁻): obliczone m/z 1236,3184 dla C₄₄H₅₇N₁₇O₂₀P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1236,3191

III.6.7.4 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(3'-O-(HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) 2,3-metylenotrifosforan, TMGppCH₂pG-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-HEMABI (3c-3')

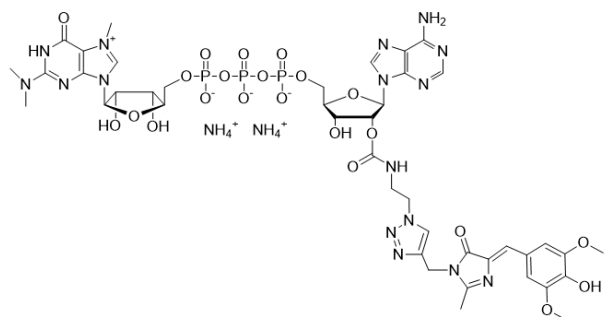


Związek **3c-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 65 μ L 6 mM roztworu MQ soli amonowej **3-3'** (0,37 mg, 0,39 μ mol, 10,2 mOD) i 9,4 μ L 50 mM roztworu DMSO **54** (0,139 mg, 0,47 μ mol, 1,2 ekw.), dodając 1,6 μ L 50 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,046 mg, 0,08 μ mol, 1:2, v/v) i 1,6 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,031 mg, 0,16 μ mol) i rozcieńczając 65 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 8 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,03 mg, 0,08 μ mol) i dodając 40 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,16 mg **3c-3'** soli amonowej (0,13 μ mol, 3,5 mOD, wyd. 33%); Rt = 13,51 min

HRMS (ESI⁻): obliczone m/z 1236,3184 dla C₄₄H₅₇N₁₇O₂₀P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1236,3184

III.6.8 Synteza koniugatów FMR i dinukleotydowych analogów TMG kapów z adenozyzną

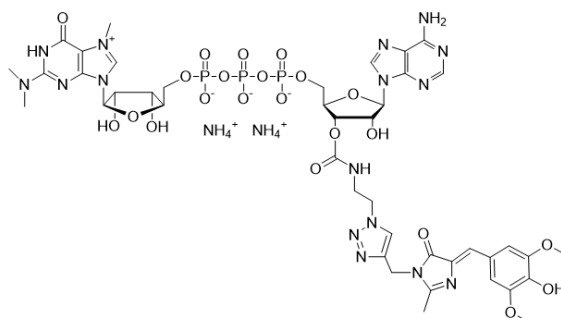
III.6.8.1 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)adenozyn-5'-ylo) trifosforan, TMGpppA-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI (4a-2')



Związek **4a-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 45 μ L 53 mM roztworu MQ soli amonowej **4-2'** (2,20 mg, 2,38 μ mol, 69 mOD) i 76,2 μ L 50 mM roztworu DMSO **52** (1,14 mg, 3,8 μ mol, 1,6 ekw.), dodając 23,8 μ L 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,57 mg, 0,95 μ mol, 1:2, v/v) i 47,6 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,47 mg, 2,38 μ mol) i rozcieńczając 65 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 95 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,35 mg, 0,95 μ mol) i dodając 80 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 1,78 mg **4a-2'** soli amonowej (1,45 μ mol, 42 mOD, wyd. 61%); Rt = 13,75 min

HRMS (ESI⁻): obliczone m/z 1225,2660 dla C₄₂H₅₂N₁₆O₂₂P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1225,2661

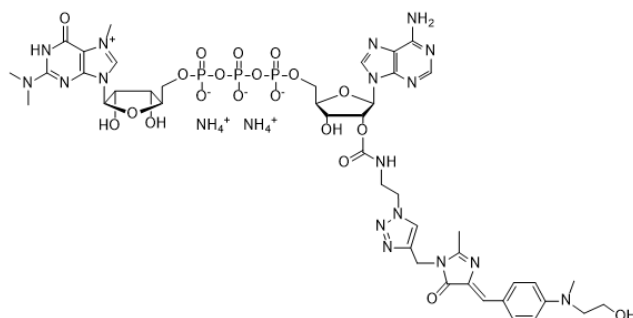
III.6.8.2 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(3'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)adenozyn-5'-ylo) trifosforan, **TMGpppA-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI (4a-3')**



Związek **4a-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 40 μ L 66 mM roztworu MQ soli amonowej **4-3'** (2,49 mg, 2,65 μ mol, 77 mOD) i 106 μ L 50 mM roztworu DMSO **52** (1,59 mg, 5,3 μ mol, 2 ekw.), dodając 26,5 μ L 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,63 mg, 1,06 μ mol, 1:2, v/v) i 53 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,52 mg, 2,65 μ mol) i rozcieńczając 65 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 106 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,39 mg, 1,06 μ mol) i dodając 80 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 2,50 mg **4a-3'** soli amonowej (2,04 μ mol, 59 mOD, wyd. 77%); Rt = 13,86 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1225,2660 dla C₄₂H₅₂N₁₆O₂₂P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1225,2669

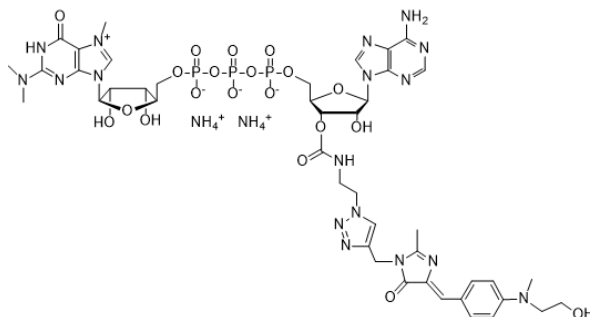
III.6.8.3 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)adenozyn-5'-ylo) trifosforan, **TMGpppA-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-HEMABI (4c-2')**



Związek **4c-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 45 μ L 53 mM roztworu MQ soli amonowej **4-2'** (2,20 mg, 2,38 μ mol, 69 mOD) i 76,2 μ L 50 mM roztworu DMSO **54** (1,14 mg, 3,8 μ mol, 1,6 ekw.), dodając 23,8 μ L 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,57 mg, 0,95 μ mol, 1:2, v/v) i 47,6 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,47 mg, 2,38 μ mol) i rozcieńczając 65 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 95 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,35 mg, 0,95 μ mol) i dodając 80 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 1,89 mg **4c-2'** soli amonowej (0,015 μ mol, 46 mOD, wyd. 65%); Rt = 14,68 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1222,3028 dla C₄₃H₅₅N₁₇O₂₀P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1222,3041

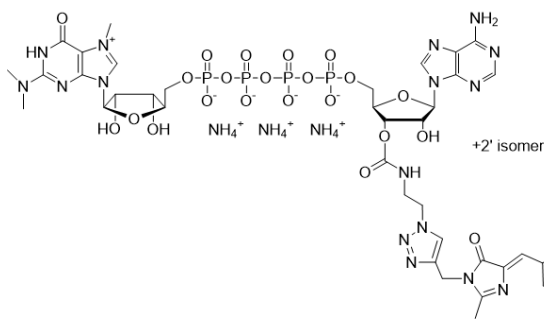
III.6.8.4 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(3'-O-(HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)adenozyn-5'-ylo) trifosforan, **TMGpppA-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-HEMABI (4c-3')**



Związek **4c-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 40 μ L 66 mM roztworu MQ soli amonowej **4-3'** (2,49 mg, 2,65 μ mol, 77 mOD) i 106 μ L 50 mM roztworu DMSO **54** (1,59 mg, 5,3 μ mol, 2 ekw.), dodając 26,5 μ L 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,63 mg, 1,06 μ mol, 1:2, v/v) i 53 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,52 mg, 2,65 μ mol) i rozcieńczając 65 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 106 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,39 mg, 1,06 μ mol) oraz 80 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,97 mg **4c-3'** soli amonowej z ok. 11% zawartością izomeru 2' (0,80 μ mol, 23,5 mOD, wyd. 30%); Rt = 14,63 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1222,3028 dla C₄₃H₅₅N₁₇O₂₀P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1222,3037

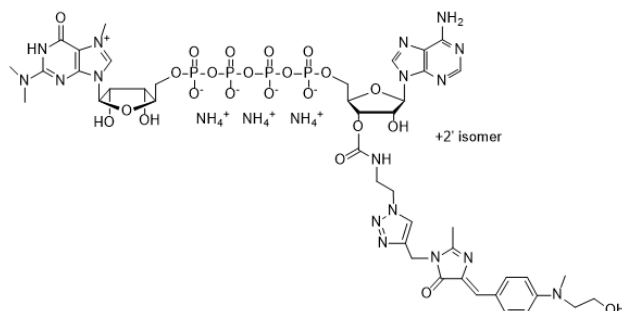
III.6.8.5 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P4-(2'+3'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)adenozyn-5'-ylo) tetrafosforan, **TMGppppA-2'+3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI (6a)**



Związek **6a** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 33 μ L 40 mM roztworu MQ soli amonowej **6** (1,39 mg, 1,38 μ mol, 40 mOD) i 33 μ L 50 mM roztworu DMSO **52** (0,50 mg, 1,66 μ mol, 1,3 ekw.), dodając 14 μ L 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,33 mg, 0,55 μ mol, 1:2, v/v) i 28 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,27 mg, 1,38 μ mol) i rozcieńczając 50 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 106 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,19 mg, 0,55 μ mol) i dodając 80 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,92 mg **6a** soli amonowej (0,71 μ mol, 20,4 mOD, wyd. 51%, mix izomerów 2' i 3'); Rt = 13,09 min (izomer 2') oraz 13,23 min (izomer 3')

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1305,2330 dla C₄₂H₅₃N₁₆O₂₅P₄⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1305,2329

III.6.8.6 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P4-(2'+3'-O-(HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)adenozyn-5'-ylo) tetrafosforan, **TMGppppA-2'+3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-HEMABI (6c)**

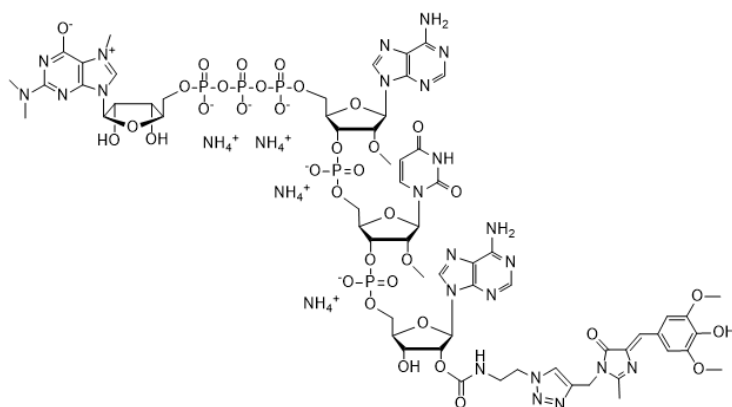


Związek **6c** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 33 μ L 40 mM roztworu MQ soli amonowej **6** (1,39 mg, 1,38 μ mol, 40 mOD) i 33 μ L 50 mM roztworu DMSO **54** (0,49 mg, 1,66 μ mol, 1,3 ekw.), dodając 14 μ L 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,33 mg, 0,55 μ mol, 1:2, v/v) i 28 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,27 mg, 1,38 μ mol) i rozcieńczając 50 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 106 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,19 mg, 0,55 μ mol) i dodając 80 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 1,01 mg **6c** soli amonowej (0,78 μ mol, 22,9 mOD wyd. 56%, mix izomerów 2' i 3'); Rt = 13,83 min (oba izomery)

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1302,2691 dla C₄₃H₅₆N₁₇O₂₃P₄⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1302,2699

III.6.9 Synteza koniugatów FMR i tetranukleotydowych analogów TMG kapu

III.6.9.1 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-((2'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)adenozyno-3',5'-fosforano-2'-O-metylourydy-no-3',5'-fosforano-2'-O-metyloadenozyno-5'-ylo) trifosforan, **TMGpppA_mU_mA-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI (11a-2')**

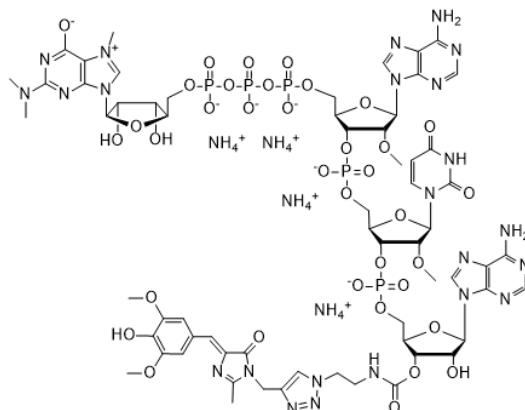


Związek **11a-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 70 μ L 7,8 mM roztworu MQ soli amonowej **11-2'** (0,87 mg, 0,55 μ mol, 25,1 mOD) i 14 μ L 50 mM roztworu DMSO **52** (0,21 mg, 0,70 μ mol, 1,3 ekw.), dodając 30 μ L 10 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,5 ekw., 0,18 mg, 0,30 μ mol, 1:2, v/v) i 30 μ L 20 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (1 ekw., 0,12 mg, 0,60 μ mol) i rozcieńczając 45 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 30 μ L 10

mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,5 ekw., 0,11 mg, 0,30 μmol) i dodając 50 μL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,84 mg **11a-2'** soli amonowej (0,44 μmol, 20,3 mOD, wyd. 81%); Rt = 13,95 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 943,6839 dla C₆₃H₇₈N₂₃O₃₆P₅²⁻ [M-2H]²⁻, zmierzone 943,6855

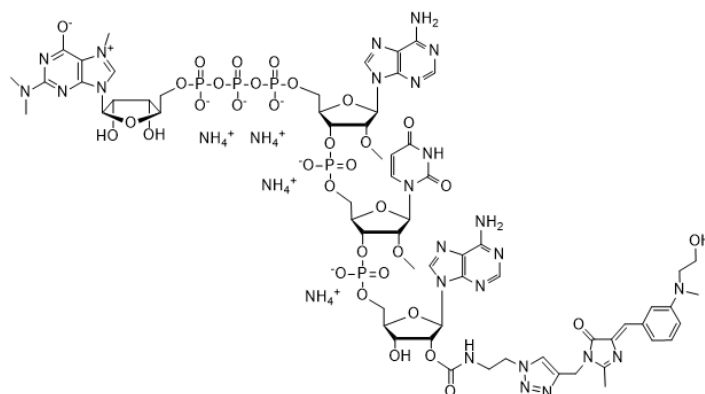
III.6.9.2 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-((3'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)adenozyno-3',5'-fosforano-2'-O-metylourydyno-3',5'-fosforano-2'-O-metyloadenozyno-5'-ylo) trifosforan, TMGpppA_mU_mA-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI (11a-3')



Związek **11a-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 30 μL 7,8 mM roztworu MQ soli amonowej **11-3'** (0,37 mg, 0,235 μmol, 10,8 mOD) i 6 μL 50 mM roztworu DMSO **52** (0,090 mg, 0,30 μmol, 1,3 ekw.), dodając 14,1 μL 10 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,6 ekw., 0,084 mg, 0,14 μmol, 1:2, v/v) i 14,1 μL 20 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (1,2 ekw., 0,056 mg, 0,28 μmol) i rozcieńczając 35 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 14 μL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,6 ekw., 0,05 mg, 0,14 μmol) i dodając 40 μL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,42 mg **11a-3'** soli amonowej (0,224 μmol, 10,2 mOD, wyd. 95%); Rt = 14,00 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 943,6839 dla C₆₃H₇₈N₂₃O₃₆P₅²⁻ [M-2H]²⁻, zmierzone 943,6852

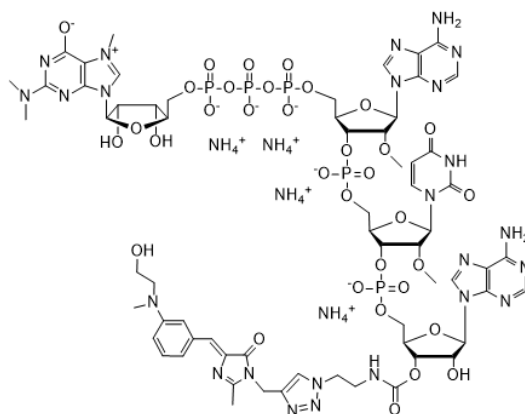
III.6.9.3 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-((2'-O-(HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)adenozyno-3',5'-fosforano-2'-O-metylourydyno-3',5'-fosforano-2'-O-metyloadenozyno-5'-ylo) trifosforan, TMGpppA_mU_mA-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-HEMABI (11c-2')



Związek **11c-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 70 μL 7,8 mM roztworu MQ soli amonowej **11-2'** (0,87 mg, 0,55 μmol , 25,1 mOD) i 14 μL 50 mM roztworu DMSO **54** (0,21 mg, 0,70 μmol , 1,3 ekw.), dodając 30 μL 10 mM roztworu $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ $\text{CuSO}_4\text{-THPTA}$ (0,5 ekw., 0,18 mg, 0,30 μmol , 1:2, v/v) i 30 μL 20 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (1 ekw., 0,12 mg, 0,60 μmol) i rozcieńczając 45 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 30 μL 10 mM roztworu Na_2EDTA w MQ (0,5 ekw., 0,11 mg, 0,30 μmol) i dodając 50 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,70 mg **11c-2'** soli amonowej (0,37 μmol , 17,7 mOD, wyd. 68%); $R_t = 14,17$ min.

HRMS (ESI-): obliczone m/z 942,2023 dla $\text{C}_{64}\text{H}_{81}\text{N}_{24}\text{O}_{34}\text{P}_5^{2-}$ $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$, zmierzone 942,2036

III.6.9.4 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-((3'-O-(HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoił)adenozyno-3',5'-fosforano-2'-O-metylourydyno-3',5'-fosforano-2'-O-metyloadenozyno-5'-ylo) trifosforan, TMGpppA_mU_mA-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-HEMABI (11c-3')

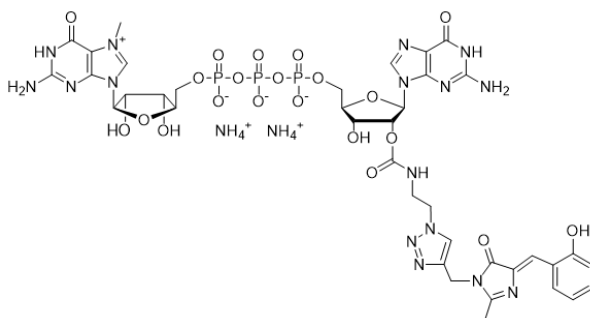


Związek **11c-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 30 μL 7,8 mM roztworu MQ soli amonowej **11-3'** (0,37 mg, 0,235 μmol , 2,8 mOD) 6 μL 50 mM roztworu DMSO **24** (0,089 mg, 0,30 μmol , 1,3 ekw.), dodając 14,1 μL 10 mM roztworu $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ $\text{CuSO}_4\text{-THPTA}$ (0,6 ekw., 0,084 mg, 0,14 μmol , 1:2, v/v) i 14,1 μL 20 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (1,2 ekw., 0,056 mg, 0,28 μmol) i rozcieńczając 35 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 14 μL 10 mM roztworu Na_2EDTA w MQ (0,6 ekw., 0,05 mg, 0,14 μmol) i dodając 40 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,34 mg **11c-3'** soli amonowej (0,178 μmol , 8,5 mOD, wyd. 76%); $R_t = 13,99$ min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 942,2023 dla $\text{C}_{64}\text{H}_{81}\text{N}_{24}\text{O}_{34}\text{P}_5^{2-}$ $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$, zmierzone 942,2038

III.6.10 Synteza koniugatów FMR i dinukleotydowych analogów m⁷G kapów z guanozyną

III.6.10.1 P1-(N⁷-metyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(o-HBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan, MMGpppG-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-o-HBI (14b-2')



Związki **14b-2'** i **14b-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 87 μ L 57 mM roztworu MQ soli amonowej **14** (4,41 mg, 5 μ mol, 113 mOD) i 60 μ L 100 mM roztworu DMSO **53** (1,63 mg, 6 μ mol, 1,2 ekw.), dodając 10 μ L 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,75 mg, 1 μ mol, 1:2, v/v) i 4,5 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,41 mg, 2 μ mol) i rozcieńczając 70 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 10 μ L 100 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,5 mg, 1 μ mol) i dodając 80 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkty oczyściłem za pomocą semipreparatywnego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 1,27 mg **14b-2'** soli amonowej (1,1 μ mol, 23 mOD, wyd. 20%) i 1,62 mg **14b-3'** (1,4 μ mol, 36 mOD, wyd. 32%)

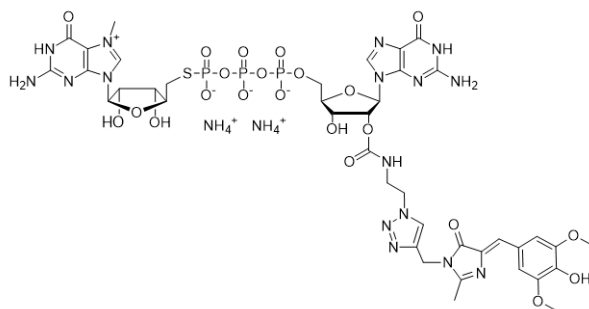
Izomer 2' (23 mOD, Rt = 14,51 min)

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1153,2085 dla C₃₈H₄₄N₁₆O₂₁P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1153,2102

Izomer 3' (36 mOD, Rt = 13,35 min)

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1153,2085 dla C₃₈H₄₄N₁₆O₂₁P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1153,2092

III.6.10.2 P1-(N⁷-metylo-5'-tioguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan, MMG-5'-SpppG-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI (15a-2')

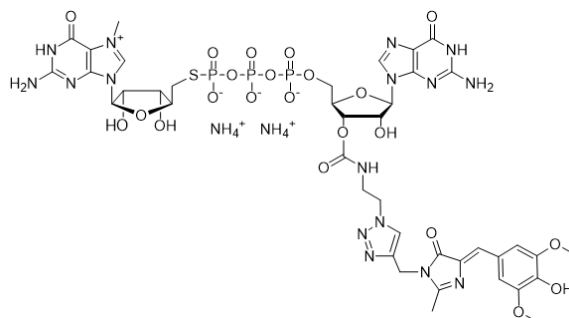


Związek **15a-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 45 μ L 10 mM roztworu MQ soli amonowej **15-2'** (0,42 mg, 0,45 μ mol, 10,2 mOD) i 5,6 μ L 100 mM roztworu DMSO **52** (0,17 mg, 0,56 μ mol, 1,25 ekw.), dodając 1,4 μ L 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA

(0,08 mg, 0,14 μ mol, 1:2, v/v) i 4,5 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,04 mg, 0,23 μ mol) i rozcieńczając 40 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 14 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,05 mg, 0,14 μ mol) i dodając 60 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,30 mg **15a-2'** soli amonowej (0,25 μ mol, 5,6 mOD, wyd. 55%); Rt = 13,16 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1229,2068 dla C₄₀H₄₈N₁₆O₂₂P₃S⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1229,2092

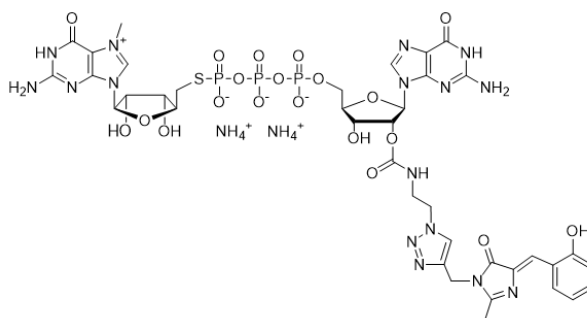
III.6.10.3 P1-(N⁷-metylo-5'-tioguanozyn-5'-ylo)-P3-(3'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoiło)guanozyn-5'-ylo) trifosforan, **MMG-5'-SpppG-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI (15a-3')**



Związek **15a-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 33 μ L 18,4 mM roztworu MQ soli amonowej **15-3'** (0,56 mg, 0,60 μ mol, 13,6 mOD) i 7,5 μ L 100 mM roztworu DMSO **52** (0,23 mg, 0,75 μ mol, 1,25 ekw.), dodając 1,8 μ L 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,11 mg, 0,20 μ mol, 1:2, v/v) i 6 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,059 mg, 0,30 μ mol) i rozcieńczając 40 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 20 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,067 mg, 0,20 μ mol) i dodając 60 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,38 mg **15a-3'** soli amonowej (0,31 μ mol, 7,1 mOD, wyd. 52%); Rt = 12,75 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1229,2068 dla C₄₀H₄₈N₁₆O₂₂P₃S⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1229,2069

III.6.10.4 P1-(N⁷-metylo-5'-tioguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(o-HBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoiło)guanozyn-5'-ylo) trifosforan, **MMG-5'-SpppG-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-o-HBI (15b-2')**

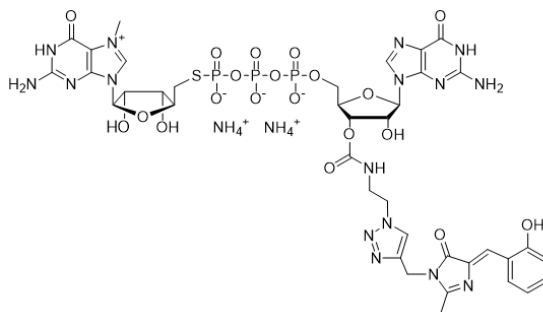


Związek **15b-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 45 μ L 10 mM roztworu MQ soli amonowej **15-2'** (0,42 mg, 0,45 μ mol, 10,2 mOD) i 11,3 μ L 100 mM roztworu DMSO **53** (0,27 mg, 1,13 μ mol, 2,5 ekw.), dodając 1,4 μ L 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,08 mg, 0,14 μ mol, 1:2, v/v) i 4,5 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,04 mg, 0,23 μ mol) i rozcieńczając 70 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 14 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,05 mg, 0,14 μ mol) i dodając 60 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt

oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient supermocny). Otrzymałem 0,27 mg **15b-2'** soli amonowej (0,23 μmol , 5,3 mOD, wyd. 52%); $R_t = 14,55$ min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1169,1857 dla $\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{N}_{16}\text{O}_{20}\text{P}_3\text{S}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, zmierzone 1169,1882

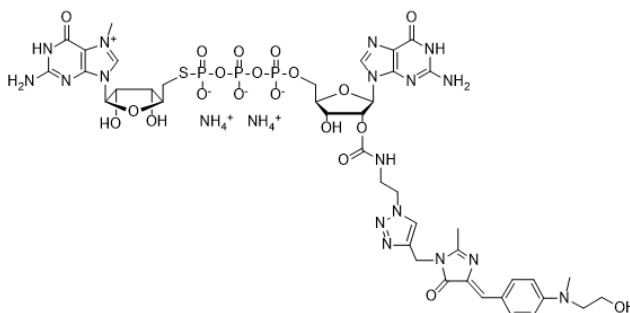
III.6.10.5 P1-(N⁷-metylo-5'-tioguanozyn-5'-ylo)-P3-(3'-O-(o-HBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan, MMG-5'-SpppG-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-o-HBI (15b-3')



Związek **15b-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 33 μL 18,4 mM roztworu MQ soli amonowej **15-3'** (0,56 mg, 0,60 μmol , 13,6 mOD) i 13,1 μL 100 mM roztworu DMSO **53** (0,31 mg, 1,30 μmol , 2,2 ekw.), dodając 1,8 μL 100 mM roztworu $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ CuSO_4 -THPTA (0,11 mg, 0,20 μmol , 1:2, v/v) i 6 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,059 mg, 0,30 μmol) i rozcieńczając 70 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 20 μL 10 mM roztworu Na_2EDTA w MQ (0,067 mg, 0,20 μmol) i dodając 60 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient supermocny). Otrzymałem 0,22 mg **15b-3'** soli amonowej (0,19 μmol , 4,3 mOD, wyd. 32%); $R_t = 13,53$ min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1169,1857 dla $\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{N}_{16}\text{O}_{20}\text{P}_3\text{S}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, zmierzone 1169,1888

III.6.10.6 P1-(N⁷-metylo-5'-tioguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan, MMG-5'-SpppG-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-HEMABI (15c-2')

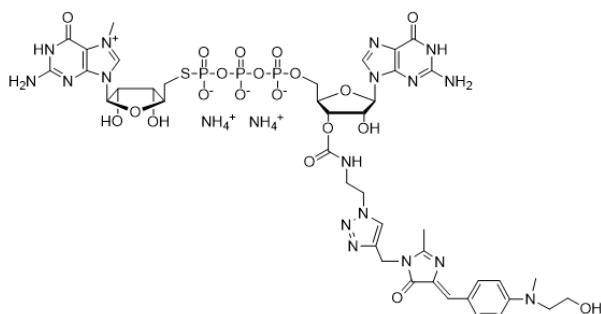


Związek **15c-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 45 μL 10 mM roztworu MQ soli amonowej **15-2'** (0,42 mg, 0,45 μmol , 10,2 mOD) i 5,6 μL 100 mM roztworu DMSO **54** (0,17 mg, 0,56 μmol , 1,25 ekw.), dodając 1,4 μL 100 mM roztworu $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ CuSO_4 -THPTA (0,08 mg, 0,14 μmol , 1:2, v/v) i 4,5 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,04 mg, 0,23 μmol) i rozcieńczając 40 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 14 μL 10 mM roztworu Na_2EDTA w MQ (0,05 mg, 0,14 μmol) i dodając 60 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 1:1, v/v. Produkt oczyściłem

za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,33 mg **15c-2'** soli amonowej (0,27 μmol , 6,5 mOD, wyd. 60%); $R_t = 12,82$ min

HRMS (ESI⁻): obliczone m/z 1226,2435 dla $\text{C}_{41}\text{H}_{51}\text{N}_{17}\text{O}_{20}\text{P}_3\text{S}^-$ [M-H]⁻, zmierzone 1226,2456

III.6.10.7 **P1-(N⁷-metylo-5'-tioguanozyn-5'-ylo)-P3-(3'-O-(HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan, MMG-5'-SpppG-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-HEMABI (15c-3')**

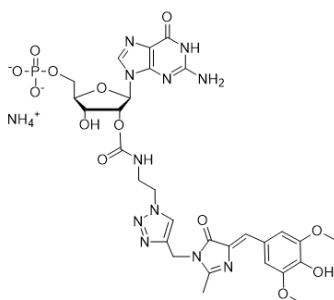


Związek **15c-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 33 μL 18,4 mM roztworu MQ soli amonowej **15-3'** (0,56 mg, 0,60 μmol , 13,6 mOD) i 7,5 μL 100 mM roztworu DMSO **54** (0,22 mg, 0,75 μmol , 1,25 ekw.), dodając 1,8 μL 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,11 mg, 0,20 μmol , 1:2, v/v) i 6 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,059 mg, 0,30 μmol) i rozcieńczając 40 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 20 μL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,067 mg, 0,20 μmol) i dodając 60 μL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,31 mg **15c-3'** soli amonowej (0,25 μmol , 6,0 mOD, wyd. 42%); $R_t = 12,54$ min

HRMS (ESI⁻): obliczone m/z 1226,2435 dla $\text{C}_{41}\text{H}_{51}\text{N}_{17}\text{O}_{20}\text{P}_3\text{S}^-$ [M-H]⁻, zmierzone 1226,2448

III.6.11 Synteza koniugatów FMR i monofosforanu guanozyny

III.6.11.1 **5'-monofosforan 2'-O-((DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo) guanozyny (12a-2'), GMP-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI**

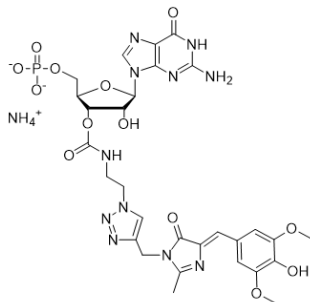


Związek **12a-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 50 μL 20 mM roztworu MQ soli amonowej **12-2'** (0,48 mg, 1,00 μmol , 12,0 mOD) i 60 μL 50 mM roztworu DMSO **52** (0,90 mg, 3,00 μmol , 3 ekw.), dodając 10 μL 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,24 mg, 0,4 μmol , 1:2, v/v) i 20 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,2 mg, 1,00 μmol) i rozcieńczając 25 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 40 μL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,15 mg, 0,4 μmol) i dodając 50 μL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą

analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,23 mg **12a-2'** soli amonowej (0,30 μmol , 3,6 mOD, wyd. 30%); $R_t = 12,66$ min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 774,2002 dla $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{N}_{11}\text{O}_{13}\text{P}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, zmierzone 774,2017

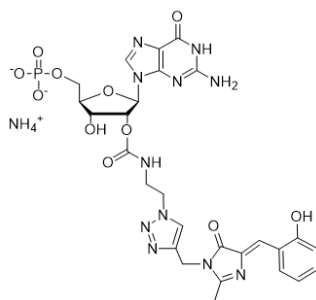
III.6.11.2 5'-monofosforan 3'-O-((DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo) guanozyny (12a-3'**), GMP-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI**



Związek **12a-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 50 μL 20 mM roztworu MQ soli amonowej **12-3'** (0,48 mg, 1,00 μmol , 12 mOD) i 60 μL 50 mM roztworu DMSO **52** (0,90 mg, 3,00 μmol , 3 ekw.), dodając 10 μL 40 mM roztworu $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ $\text{CuSO}_4\text{-THPTA}$ (0,24 mg, 0,4 μmol , 1:2, v/v) i 20 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,2 mg, 1,00 μmol) i rozcieńczając 25 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 40 μL 10 mM roztworu Na_2EDTA w MQ (0,15 mg, 0,4 μmol) i dodając 50 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,38 mg **12a-3'** soli amonowej (0,49 μmol , 5,9 mOD, wyd. 49%); $R_t = 12,72$ min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 774,2002 dla $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{N}_{11}\text{O}_{13}\text{P}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, zmierzone 774,2016

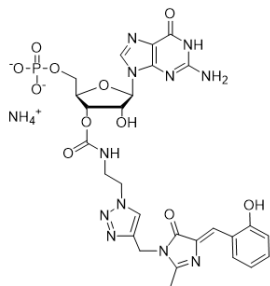
III.6.11.3 5'-monofosforan 2'-O-((o-HBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo) guanozyny (12b-2'**), GMP-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-o-HBI**



Związek **12b-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 80 μL 5 mM roztworu MQ soli amonowej **12-2'** (0,19 mg, 0,4 μmol , 4,8 mOD) i 5 μL 50 mM roztworu DMSO **53** (0,12 mg, 0,5 μmol , 1,25 ekw.), dodając 2 μL 50 mM roztworu $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ $\text{CuSO}_4\text{-THPTA}$ (0,06 mg, 0,10 μmol , 1:2, v/v) i 4,5 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,044 mg, 0,2 μmol) i rozcieńczając 80 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 10 μL 10 mM roztworu Na_2EDTA w MQ (0,04 mg, 0,10 μmol) i dodając 50 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,19 mg **12b-2'** soli amonowej (0,26 μmol , 3,2 mOD, wyd. 65%); $R_t = 15,79$ min

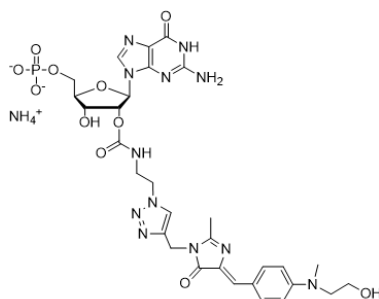
HRMS (ESI-): obliczone m/z 714,1791 dla $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_{11}\text{O}_{11}\text{P}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, zmierzone 714,1796

III.6.11.4 5'-monofosforan 3'-O-((o-HBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo) guanozyny (12b-3'), GMP-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-o-HBI



Związek **12b-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 80 μ L 6,5 mM roztworu MQ soli amonowej **12-3'** (0,25 mg, 0,5 μ mol, 6,2 mOD) i 6,2 μ L 100 mM roztworu DMSO **53** (0,15 mg, 0,6 μ mol, 1,25 ekw.), dodając 3,3 μ L 50 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,08 mg, 0,10 μ mol, 1:2, v/v) i 5,7 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,057 mg, 0,3 μ mol) i rozcieńczając 80 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 13 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,048 mg, 0,13 μ mol) i dodając 50 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,19 mg **12b-3'** soli amonowej (0,33 μ mol, 3,9 mOD, wyd. 63%); Rt = 15,96 min
HRMS (ESI-): obliczone m/z 714,1791 dla C₂₇H₂₉N₁₁O₁₁P⁻ [M-H]⁻, zmierzone 714,1799

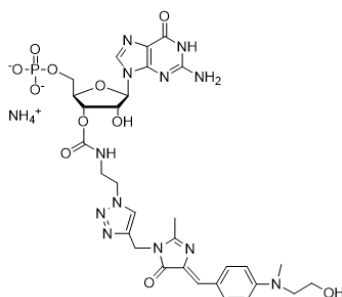
III.6.11.5 5'-monofosforan 2'-O-((HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo) guanozyny (12c-2'), GMP-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-HEMABI



Związek **12c-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 50 μ L 20 mM roztworu MQ soli amonowej **12-2'** (0,48 mg, 1,00 μ mol, 12 mOD) i 60 μ L 50 mM roztworu DMSO **54** (0,89 mg, 3,00 μ mol, 3 ekw.), dodając 10 μ L 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,24 mg, 0,4 μ mol, 1:2, v/v) i 20 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,2 mg, 1,00 μ mol) i rozcieńczając 25 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 40 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,15 mg, 0,4 μ mol) i dodając 50 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,56 mg **12c-2'** soli amonowej (0,72 μ mol, 10,4 mOD, wyd. 72%); Rt = 15,65 min
HRMS (ESI-): obliczone m/z 771,2370 dla C₃₀H₃₆N₁₂O₁₁P⁻ [M-H]⁻, zmierzone 771,2379

III.6.11.6 5'-monofosforan

3'-O-((HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo) guanozyny (**12c-3'**), **GMP-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-HEMABI**

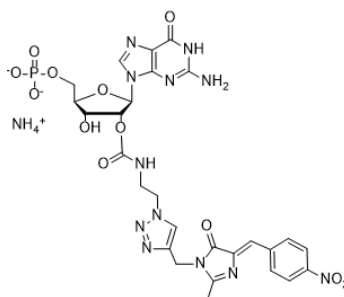


Związek **12c-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 50 μ L 20 mM roztworu MQ soli amonowej **12-3'** (0,48 mg, 1,00 μ mol, 12 mOD) i 60 μ L 50 mM roztworu DMSO **54** (0,89 mg, 3,00 μ mol, 3 ekw.), dodając 10 μ L 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,24 mg, 0,4 μ mol, 1:2, v/v) i 20 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,2 mg, 1,00 μ mol) i rozcieńczając 25 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 40 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,15 mg, 0,4 μ mol) i dodając 50 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,49 mg **12c-3'** soli amonowej (0,63 μ mol, 9,1 mOD, wyd. 63%); Rt = 15,42 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 771,2370 dla C₃₀H₃₆N₁₂O₁₁P⁻ [M-H]⁻, zmierzone 771,2380

III.6.11.7 5'-monofosforan

2'-O-((p-NHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)etylokarbamoilo) guanozyny (**12d-2'**), **GMP-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-p-NHBI**

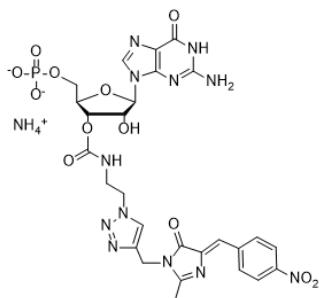


Związek **12d-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 29 μ L 27,8 mM roztworu MQ soli amonowej **12-2'** (0,38 mg, 0,81 μ mol, 9,67 mOD) i 10 μ L 100 mM roztworu DMSO **55** (0,27 mg, 1,00 μ mol, 1,25 ekw.), dodając 2,4 μ L 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,14 mg, 0,24 μ mol, 1:2, v/v) i 10 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,097 mg, 0,48 μ mol) i rozcieńczając 80 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 24 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,09 mg, 0,24 μ mol) i dodając 70 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient supermocny). Otrzymałem 0,20 mg **12d-2'** soli amonowej (0,27 μ mol, 3,3 mOD, wyd. 34%); Rt = 14,07 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 743,1693 dla C₂₇H₂₈N₁₂O₁₂P⁻ [M-H]⁻, zmierzone 743,1696

III.6.11.8 5'-monofosforan

3'-O-((*p*-NHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo) guanozyny (**12d-3'**), **GMP-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-*p*-NHBI**

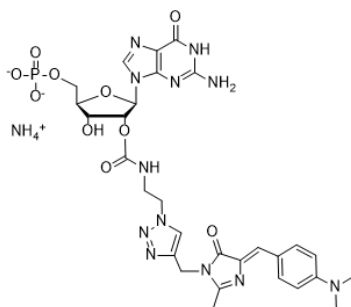


Związek **12d-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 24,5 μ L 32,8 mM roztworu MQ soli amonowej **12-3'** (0,38 mg, 0,81 μ mol, 9,67 mOD) i 10 μ L 100 mM roztworu DMSO **55** (0,27 mg, 1.00 μ mol, 1,25 ekw.), dodając 2,4 μ L 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,14 mg, 0,24 μ mol, 1:2, v/v) i 10 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,097 mg, 0,48 μ mol) i rozcieńczając 80 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 24 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,09 mg, 0,24 μ mol) i dodając 70 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient supermocny). Otrzymałem 0,28 mg **12d-3'** soli amonowej (0,37 μ mol, 4,4 mOD, wyd. 46%); Rt = 14,15 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 743,1693 dla C₂₇H₂₈N₁₂O₁₂P⁻ [M-H]⁻, zmierzone 743,1695

III.6.11.9 5'-monofosforan

2'-O-((DMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo) guanozyny (**12e-2'**), **GMP-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMABI**

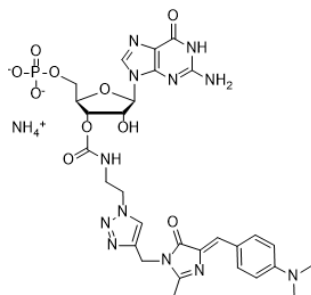


Związek **12e-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 29 μ L 27,8 mM roztworu MQ soli amonowej **12-2'** (0,38 mg, 0,81 μ mol, 9,67 mOD) i 10 μ L 100 mM roztworu DMSO **56** (0,27 mg, 1.00 μ mol, 1,25 ekw.), dodając 2,4 μ L 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,14 mg, 0,24 μ mol, 1:2, v/v) i 10 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,097 mg, 0,48 μ mol) i rozcieńczając 100 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 24 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,09 mg, 0,24 μ mol) i dodając 70 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,57 mg **12e-2'** soli amonowej (0,77 μ mol, 11,5 mOD, wyd. 95%); Rt = 16.76 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z+ 741,2264 dla C₂₉H₃₄N₁₂O₁₀P⁻ [M-H]⁻, zmierzone 741,2269

III.6.11.10 5'-monofosforan

3'-O-((DMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoiło) guanozyny (**12e-3'**), **GMP-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-DMABI**

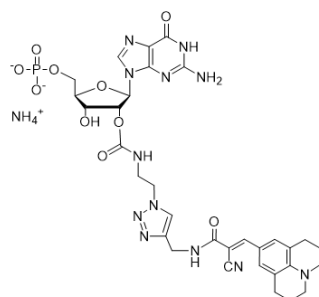


Związek **12e-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 24,5 μL 32,8 mM roztworu MQ soli amonowej **12-3'** (0,38 mg, 0,81 μmol , 9,67 mOD) i 10 μL 100 mM roztworu DMSO **56** (0,27 mg, 1,00 μmol , 1,25 ekw.), dodając 2,4 μL 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,14 mg, 0,24 μmol , 1:2, v/v) i 10 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,097 mg, 0,48 μmol) i rozcieńczając 100 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 24 μL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,09 mg, 0,24 μmol) i dodając 70 μL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,63 mg **12e-3'** soli amonowej (0,75 μmol , 11,2 mOD, wyd. 93%); Rt = min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 741,2264 dla C₂₉H₃₄N₁₂O₁₀P⁻ [M-H]⁻, zmierzone 741,2271

III.6.11.11 5'-monofosforan

2'-O-((ACVJ-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoiło) guanozyny (**12f-2'**), **GMP-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-ACVJ**

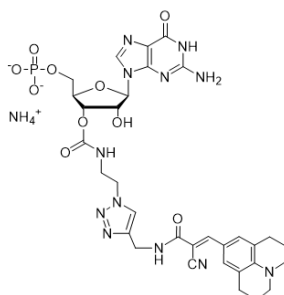


Związek **12f-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 50 μL 20 mM roztworu MQ soli amonowej **12-2'** (0,48 mg, 1,00 μmol , 12 mOD) i 60 μL 50 mM roztworu DMSO **60** (0,92 mg, 3,00 μmol , 3 ekw.), dodając 10 μL 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,24 mg, 0,4 μmol , 1:2, v/v) i 20 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,2 mg, 1,00 μmol) i rozcieńczając 50 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 40 μL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,15 mg, 0,4 μmol) i dodając 70 μL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient supermocny). Otrzymałem 0,40 mg **12f-2'** soli amonowej (0,51 μmol , 11 mOD, wyd. 51%); Rt = 16,54 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 779,2421 dla C₃₂H₃₆N₁₂O₁₀P⁻ [M-H]⁻, zmierzone 779,2425

III.6.11.12 5'-monofosforan

3'-O-((ACVJ-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoi) guanozyny (12f-3'), GMP-3'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-ACVJ

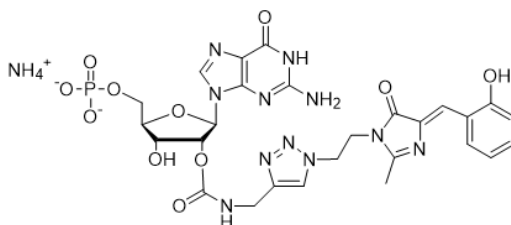


Związek **12f-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 50 μ L 20 mM roztworu MQ soli amonowej **12-3'** (0,48 mg, 1,00 μ mol, 12 mOD) i 60 μ L 50 mM roztworu DMSO **60** (0,92 mg, 3,00 μ mol, 3 ekw.), dodając 10 μ L 40 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,24 mg, 0,4 μ mol, 1:2, v/v) i 20 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,2 mg, 1,00 μ mol) i rozcieńczając 50 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 40 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,15 mg, 0,4 μ mol) i dodając 70 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient supermocny). Otrzymałem 0,47 mg **12f-3'** soli amonowej (0,60 μ mol, 12,9 mOD, wyd. 60%); Rt = 16,72 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 779,2421 dla C₃₂H₃₆N₁₂O₁₀P⁻ [M-H]⁻, zmierzone 779,2429

III.6.11.13 5'-monofosforan

2'-O-((o-HBI-etylo-1H-1,2,3-triazolo-4-ylo)-metylokarbamoi) guanozyny (13b-2'), GMP-2'-O-C(O)NH-CH₂-4-triazolo-CH₂CH₂-o-HBI

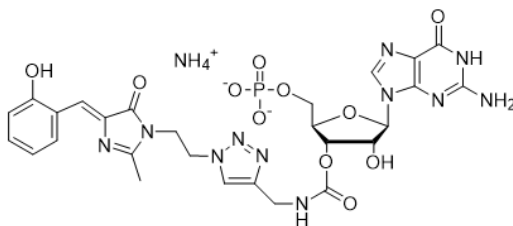


Związek **13b-2'** otrzymałem wg procedury ogólnej G wychodząc z 25 μ L 26 mM roztworu MQ soli amonowej **13-2'** (0,29 mg, 0,65 μ mol, 7,8 mOD) i 6,5 μ L 100 mM roztworu DMSO **58** (0,18 mg, 0,65 μ mol, 1 ekw.), dodając 2,6 μ L 50 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,08 mg, 0,13 μ mol, 1:2, v/v) i 5,2 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,05 mg, 0,26 μ mol) i rozcieńczając 80 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 13 μ L 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,05 mg, 0,13 μ mol) i dodając 40 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,34 mg **13b-2'** soli amonowej (0,47 μ mol, 5,7 mOD, wyd. 73%); Rt = 14,76 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 714,1791 dla C₂₇H₂₉N₁₁O₁₁P⁻ [M-H]⁻, zmierzone 714,1800

III.6.11.14 5'-monofosforan

3'-O-((o-HBI-etylo-1H-1,2,3-triazolo-4-ylo)-metylokarbamoilo) guanozyny (**13b-3'**), **GMP-3'-O-C(O)NH-CH₂-4-triazolo-CH₂CH₂-o-HBI**

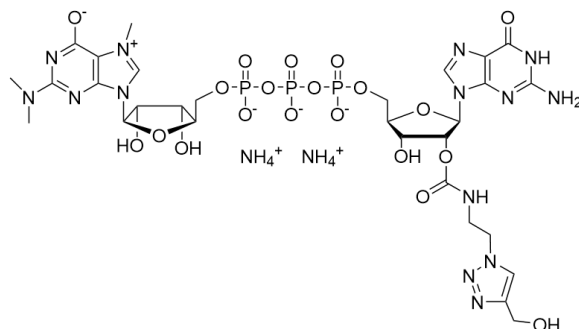


Związek **13b-3'** otrzymałem wg procedury ogólnej G wychodząc z 90 μL 4,2 mM roztworu MQ soli amonowej **13-3'** (0,17 mg, 0,40 μmol , 4,6 mOD) i 4,2 μL 100 mM roztworu DMSO **58** (0,11 mg, 0,40 μmol , 1 ekw.), dodając 2 μL 50 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,06 mg, 0,1 μmol , 1:2, v/v) i 4,5 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,044 mg, 0,2 μmol) i rozcieńczając 80 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 10 μL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,04 mg, 0,1 μmol) i dodając 40 μL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,12 mg **13b-3'** soli amonowej (0,17 μmol , 2,1 mOD, wyd. 45%); Rt = 16,27 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 714,1791 dla C₂₇H₂₉N₁₁O₁₁P⁻ [M-H]⁻, zmierzone 714,1797

III.6.12 Synteza koniugatów dinukleotydowych analogów TMG kapu z guanozyną nie posiadających FMR

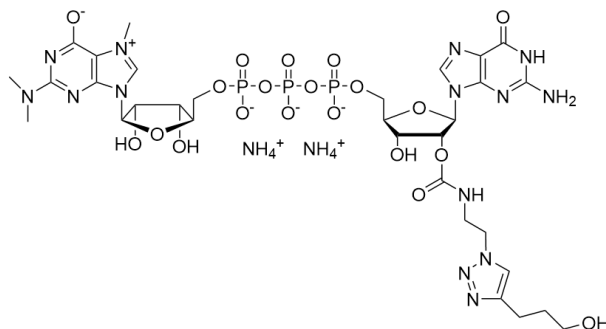
III.6.12.1 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(hydroksymetylo-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan (**17**), **TMGpppG-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂OH**



Związek **17** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 27 μL 19 mM roztworu MQ soli amonowej **1-2'** (0,48 mg, 0,51 μmol , 13,4 mOD) i 30 μL alkoholu propargilowego (29,2 mg, 520 μmol), dodając 1 μL 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,06 mg, 0,1 μmol , 1:2, v/v) i 2,1 μL 100 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,041 mg, 0,2 μmol). Reakcję zakończyłem dodając 10 μL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,04 mg, 0,1 μmol). Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient standardowy). Otrzymałem 0,05 mg **17** soli amonowej (0,051 μmol , 1,3 mOD, wyd. 10%); Rt = 11,77 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 997,1762 dla C₂₉H₄₀N₁₄O₂₀P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 997,1860

III.6.12.2 P1-(N²,N²,N⁷-trimetyloguanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(hydroksypropylo-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan (18), **TMGpppG-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂CH₂CH₂OH**

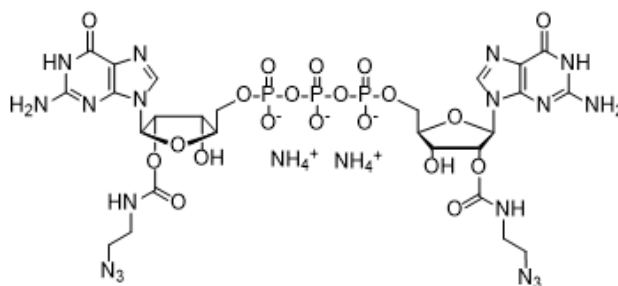


Związek **18** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 27 μL 19 mM roztworu MQ soli amonowej **1-2'** (0,48 mg, 0,51 μmol , 13,4 mOD) i 30 μL alkoholu 4-pentynyloвого (27,1 mg, 322 μmol), dodając 1 μL 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (0,06 mg, 0,1 μmol , 1:2, v/v) i 2,1 μL 100 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,041 mg, 0,2 μmol). Reakcję zakończyłem dodając 10 μL 10 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (0,04 mg, 0,1 μmol). Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient standardowy). Otrzymałem 0,06 mg **18** soli amonowej (0,056 μmol , 1,5 mOD, wyd. 11%); Rt = 13,66 min

HRMS (ESI⁻): obliczone m/z 1025,2075 dla C₃₁H₄₄N₁₄O₂₀P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1025,2083

III.6.13 Synteza podwójnie znakowanych dinukleotydowych koniugatów FMR

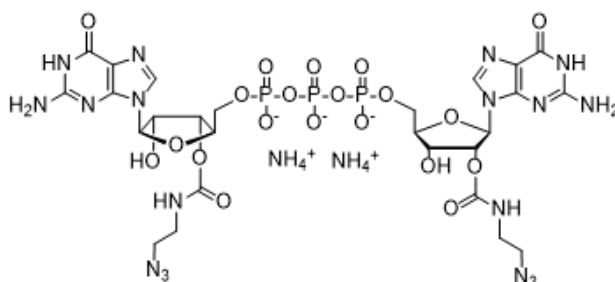
III.6.13.1 P1-(2'-O-(azydoetylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(azydoetylokarbamoilo)-guanozyn-5'-ylo) trifosforan (21-2'+2'), **N₃-CH₂CH₂-NH(O)C-2'-O-GpppG-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-N₃**



Związek **21-2'+2'** otrzymałem wg procedury ogólnej D wychodząc z 9,7 mg soli trietyloamonowej GMP-2'-linker-N₃ (**12-2'**) (0,02 mmol, 210 mOD) i 16,7 mg soli trietyloamonowej GDP-2'+3'-linker-N₃ (**43**) (0,03 mmol, 315 mOD) w bezwodnym DMF i dodałem suchy ZnCl₂ (38,2 mg, 0,20 mmol, 10 ekw.). Reakcję prowadziłem 24 h, wytrząsając za pomocą wytrząsarki typu Vortex. Produkt oczyściłem za pomocą chromatografii jonowej, a następnie stosując analityczne RP-HPLC. Wydajność 24 mOD (1,1 mmol)

HRMS (ESI⁻): obliczone m/z 1011,1415 dla C₂₆H₃₄N₁₈O₂₀P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1011,1427

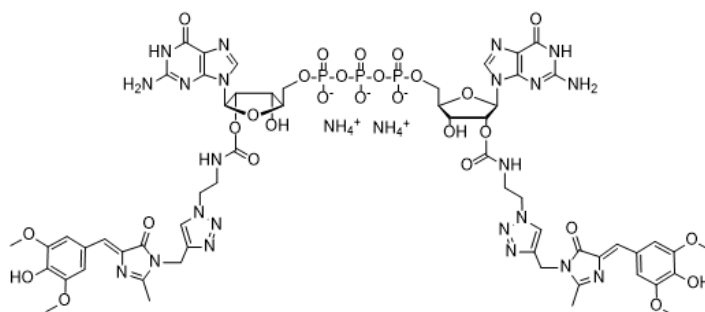
III.6.13.2 P1-(3'-O-(azydoetylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(azydoetylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan (21-2'+3'), $\text{N}_3\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH(O)C-3'-O-GpppG-2'-O-C(O)NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-N}_3$



Związek **21-2'+3'** otrzymałem w reakcji otrzymywania **21-2'+2'** stosując RP-HPLC w ilości 54 mOD (2,5 mmol).

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1011,1415 dla $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_{18}\text{O}_{20}\text{P}_3^-$ [M-H]⁻, zmierzone 1011,1428

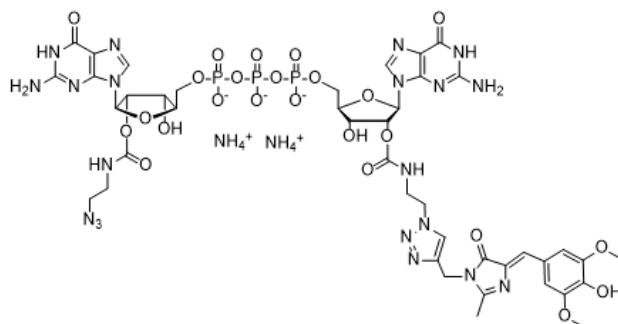
III.6.13.3 P1-(2'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo) trifosforan (22a-2'+2'), $\text{DMHBI-CH}_2\text{-1-triazolo-CH}_2\text{CH}_2\text{-NHC(O)-2'-O-GpppG-2'-O-C(O)NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-1-triazolo-CH}_2\text{-DMHBI}$



Związek **22a-2'+2'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 58 μL 7 mM roztworu MQ soli amonowej **22-2'+2'** (0,40 mg, 0,40 μmol , 8,6 mOD) i 2 porcjami po 6 μL 100 mM roztworu DMSO **52** (0,36 mg, 1,2 μmol , 3 ekw.), dodając 1,6 μL 100 mM roztworu $\text{H}_2\text{O/DMSO}$ $\text{CuSO}_4\text{-THPTA}$ (0,10 mg, 0,16 μmol , 1:2, v/v) i 6,4 μL 100 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,06 mg, 0,3 μmol). Reakcję zakończyłem dodając 16 μL 10 mM roztworu Na_2EDTA w MQ (0,06 mg, 0,16 μmol). Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,32 mg **22a-2'+2'** soli amonowej (0,20 μmol , 4,2 mOD, wyd. 49%); $R_t = 17,16$ min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1611,3635 dla $\text{C}_{58}\text{H}_{66}\text{N}_{22}\text{O}_{28}\text{P}_3^-$ [M-H]⁻, zmierzone 1611,3633

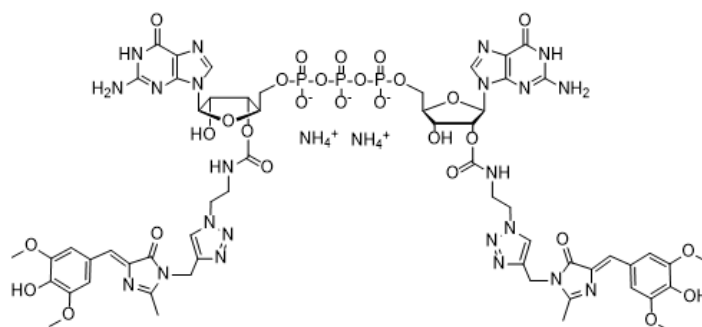
III.6.13.4 P1-(2'-O-(azydoetylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo) guanozyn-5'-ylo) trifosforan (21a-2'+2'), **$\text{N}_3\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH(O)C-2'-O-GpppG-2'-O-C(O)NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-1-triazolo-CH}_2\text{-DMHBI}$**



Produkt **21a-2'+2'** otrzymałem z reakcji otrzymywania **22a-2'+2'** dodając 1 porcję FMR **52** (1,5 ekw.), stosując RP-HPLC, w ilości 0,13 mg (0,10 μmol , 2,1 mOD, wyd. 25%). Rt = 15,42 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1311,2525 dla $\text{C}_{42}\text{H}_{50}\text{N}_{20}\text{O}_{24}\text{P}_3^-$ [M-H]⁻, zmierzone 1311,2524

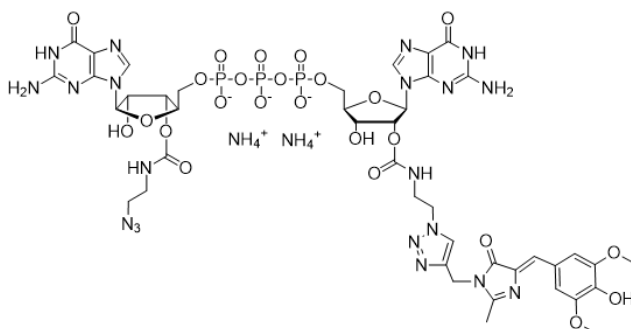
III.6.13.5 P1-(3'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo) guanozyn-5'-ylo) trifosforan (22a-2'+3'), **$\text{DMHBI-CH}_2\text{-1-triazolo-CH}_2\text{CH}_2\text{-NHC(O)-3'-O-GpppG-2'-O-C(O)NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-1-triazolo-CH}_2\text{-DMHBI}$**



Związek **22a-2'+3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 41 μL 10 mM roztworu MQ soli amonowej **22-2'+3'** (0,40 mg, 0,40 μmol , 8,6 mOD) i 2 porcjami po 6 μL 100 mM roztworu DMSO **52** (0,36 mg, 1,2 μmol , 3 ekw.), dodając 1,6 μL 100 mM roztworu $\text{H}_2\text{O/DMSO}$ $\text{CuSO}_4\text{-THPTA}$ (0,10 mg, 0,16 μmol , 1:2, v/v) i 6,4 μL 100 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,06 mg, 0,3 μmol). Reakcję zakończyłem dodając 16 μL 10 mM roztworu Na_2EDTA w MQ (0,06 mg, 0,16 μmol). Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,35 mg **22a-2'+3'** soli amonowej (0,22 μmol , 4,2 mOD, wyd. 49%); Rt = 17,11 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1611,3635 dla $\text{C}_{58}\text{H}_{66}\text{N}_{22}\text{O}_{28}\text{P}_3^-$ [M-H]⁻, zmierzone 1611,3622

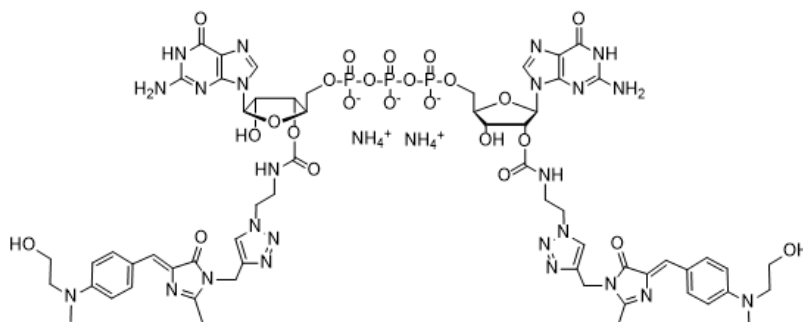
III.6.13.6 P1-(3'-O-(azydoetylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo) guanozyn-5'-ylo) trifosforan (21a-2'+3'), $\text{N}_3\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH(O)C-3'-O-GpppG-2'-O-C(O)NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-1-triazolo-CH}_2\text{-DMHBI}$



Produkt **21a-2'+3'** otrzymałem w reakcji otrzymywania **22a-2'+3'** dodając 1 porcję FMR **52** (1,5 ekw.), stosując RP-HPLC, w ilości 0,17 mg (0,16 μmol , 2,7 mOD wyd. 33%). Rt = 15,42 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1311,2525 dla $\text{C}_{42}\text{H}_{50}\text{N}_{20}\text{O}_{24}\text{P}_3^-$ [M-H]⁻, zmierzone 1311,2526

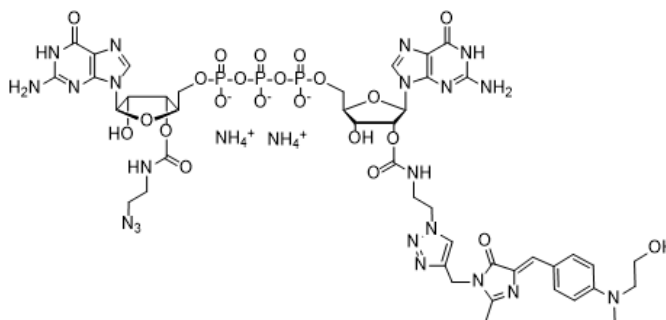
III.6.13.7 P1-(2'-O-(HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo)-P3-(3'-O-(HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo) guanozyn-5'-ylo) trifosforan (22c-2'+3'), $\text{HEMABI-CH}_2\text{-1-triazolo-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH(O)C-2'-O-GpppG-3'-O-C(O)NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-1-triazolo-CH}_2\text{-HEMABI}$



Związek **22c-2'+3'** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 41 μL 10 mM roztworu MQ soli amonowej **22-2'+3'** (0,40 mg, 0,40 μmol , 8,6 mOD) i 2 porcjami po 6 μL 100 mM roztworu DMSO **54** (0,36 mg, 1,2 μmol , 3 ekw.), dodając 1,6 μL 100 mM roztworu $\text{H}_2\text{O/DMSO}$ $\text{CuSO}_4\text{-THPTA}$ (0,10 mg, 0,16 μmol , 1:2, v/v) i 6,4 μL 100 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (0,06 mg, 0,3 μmol). Reakcję zakończyłem dodając 16 μL 10 mM roztworu Na_2EDTA w MQ (0,06 mg, 0,16 μmol). Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient mocny). Otrzymałem 0,26 mg **22a-2'+3'** soli amonowej (0,16 μmol , 4,0 mOD, wyd. 41%); Rt = 18,65 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1605,4370 dla $\text{C}_{60}\text{H}_{72}\text{N}_{24}\text{O}_{24}\text{P}_3^-$ [M-H]⁻, zmierzone 1605,4366

III.6.13.8 P1-(3'-O-(azydoetylokarbamoilo)guanozyn-5'-ylo)-P3-(2'-O-(HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)-etylokarbamoilo) guanozyn-5'-ylo) trifosforan (21c-2'+3'), **N₃-CH₂CH₂-NH(O)C-3'-O-GpppG-2'-O-C(O)NH-CH₂CH₂-1-triazolo-CH₂-HEMABI**

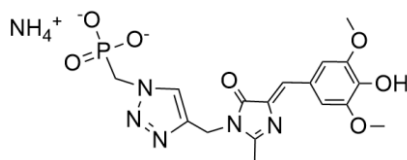


Produkt **21c-2'+3'** otrzymałem z reakcji otrzymywania **22c-2'+3'** dodając 1 porcję FMR **54** (1,5 ekw.), stosując RP-HPLC (g. mocny), w ilości 0,12 mg (0,09 μmol, wyd. 23%). Rt = 16,25 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 1308,2892 dla C₄₃H₅₃N₂₁O₂₂P₃⁻ [M-H]⁻, zmierzone 1308,2889

III.6.14 Synteza C-fosfonianowych pochodnych FMR

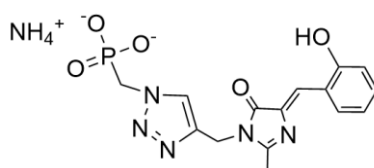
III.6.14.1 DMHBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo-metylomonofosforan (16a), **p-CH₂-1-triazolo-CH₂-DMHBI**



Związek **16a** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 300 μL 200 mM roztworu MQ soli amonowej **64** (8,16 mg, 60 μmol, 2 ekw.) i 300 μL 100 mM roztworu DMSO **52** (8,91 mg, 30 μmol, 1 ekw.), dodając 60 μL 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (3,56 mg, 6 μmol, 1:2, v/v) i 120 μL 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (2,38 mg, 12 μmol) i rozcieńczając 100 μL DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 60 μL 100 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (2,23 mg, 6 μmol) i dodając 100 μL H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient supermocny). Otrzymałem 19,93 mg **16a** soli amonowej (45,5 μmol, wyd. 76%); Rt = 14,46 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 436,1028 dla C₁₇H₁₉N₅O₇P⁻ [M-H]⁻, zmierzone 436,1029

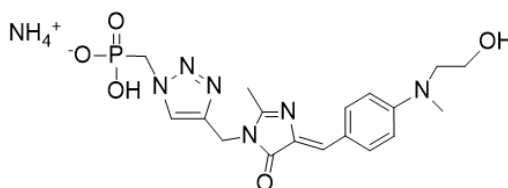
III.6.14.2 o-HBI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo-metylomonofosforan (16b), **p-CH₂-1-triazolo-CH₂-o-HBI**



Związek **16b** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 300 μ L 200 mM roztworu MQ soli amonowej **64** (8,16 mg, 60 μ mol, 2 ekw.) i 300 μ L 100 mM roztworu DMSO **53** (7,20 mg, 30 μ mol, 1 ekw.), dodając 60 μ L 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (3,56 mg, 6 μ mol, 1:2, v/v) i 120 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (2,38 mg, 12 μ mol) i rozcieńczając 150 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 60 μ L 100 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (2,23 mg, 6 μ mol) i dodając 150 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient supermocny). Otrzymałem 16,74 mg **16b** soli amonowej (44,4 μ mol, wyd. 74%); Rt = 16,39 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 376,0816 dla C₁₅H₁₅N₅O₅P⁻ [M-H]⁻, zmierzone 376,0820

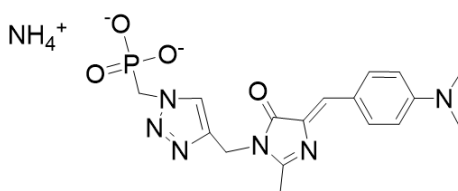
III.6.14.3 HEMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo-metylomonofoforan (**16c**), **p-CH₂-1-triazolo-CH₂-HEMABI**



Związek **16c** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 300 μ L 200 mM roztworu MQ soli amonowej **64** (8,16 mg, 60 μ mol, 2 ekw.) i 300 μ L 100 mM roztworu DMSO **54** (8,91 mg, 30 μ mol, 1 ekw.), dodając 60 μ L 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (3,56 mg, 6 μ mol, 1:2, v/v) i 120 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (2,38 mg, 12 μ mol) i rozcieńczając 100 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 60 μ L 100 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (2,23 mg, 6 μ mol) i dodając 100 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient supermocny). Otrzymałem 17,98 mg **16c** soli amonowej (41,4 μ mol, wyd. 69%); Rt = 14,72 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 433,1395 dla C₁₈H₂₂N₆O₅P⁻ [M-H]⁻, zmierzone 433,1396

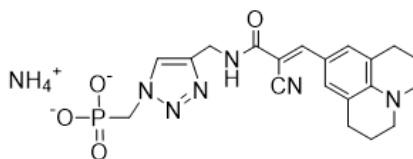
III.6.14.4 DMABI-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo-metylomonofoforan (**16e**), **p-CH₂-1-triazolo-CH₂-DMABI**



Związek **16e** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 300 μ L 200 mM roztworu MQ soli amonowej **64** (3,81 mg, 28 μ mol, 2 ekw.) i 350 μ L 50 mM roztworu DMSO **60** (5,34 mg, 18 μ mol, 1 ekw.), dodając 52 μ L 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (3,12 mg, 5,2 μ mol, 1:2, v/v) i 210 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (2,08 mg, 11 μ mol) i rozcieńczając 200 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 52 μ L 100 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (1,95 mg, 5,2 μ mol) i dodając 200 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient supermocny). Otrzymałem 6,59 mg **16e** soli amonowej (19,6 μ mol, wyd. 70%); Rt = 21,42 min

HRMS (ESI-): obliczone m/z 403,1289 dla C₁₇H₂₀N₆O₄P⁻ [M-H]⁻, zmierzone 403,1290

III.6.14.5 ACVJ-metylo-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo-metylomonofoforan (16f), p-CH₂-1-triazolo-CH₂-ACVJ



Związek **16f** otrzymałem wg procedury ogólnej F wychodząc z 300 μ L 200 mM roztworu MQ soli amonowej **64** (8,16 mg, 60 μ mol, 2 ekw.) i 300 μ L 100 mM roztworu DMSO **60** (8,91 mg, 30 μ mol, 1 ekw.), dodając 60 μ L 100 mM roztworu H₂O/DMSO CuSO₄-THPTA (3,56 mg, 6 μ mol, 1:2, v/v) i 120 μ L 50 mM roztworu MQ askorbinianu sodu (2,38 mg, 12 μ mol) i rozcieńczając 250 μ L DMSO. Reakcję zakończyłem dodając 60 μ L 100 mM roztworu Na₂EDTA w MQ (2,23 mg, 6 μ mol) i dodając 200 μ L H₂O/DMSO 1:1, v/v. Produkt oczyściłem za pomocą analitycznego HPLC w odwróconym układzie faz (gradient supermocny). Otrzymałem 16,98 mg **16f** soli amonowej (38,5 μ mol, wyd. 64%); Rt = 21,42 min

HRMS (ESI⁻): obliczone m/z 441,1446 dla C₂₀H₂₂N₆O₄P⁻ [M-H]⁻, zmierzone 441,1445

III.7. Metodyka badań, badania fizykochemiczne i biofizyczne

III.7.1 Pomiary spektrofotometryczne i spektrofluorymetryczne

Widma absorpcyjne nagrywałem na urządzeniu Shimadzu UV Spectrophotometer UV1800 z przystawką kontrolującą CPS-100 oraz widma emisji i wzbudzania na urządzeniu Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (California, USA) w semimikro kuwetach kwarcowych (Hellma, Germany) z drogami optycznymi 4 mm i 10 mm dla absorpcji i emisji odpowiednio.

III.7.2 Miareczkowanie z wygaszaniem fluorescencji (ang. FQT assay)

Miareczkowania snurportyny przeprowadzałem w buforze o składzie: 50 mM HEPES/NaOH (jeśli nie zaznaczono inaczej pH 7,20), 150 mM NaCl, 1 mM disodowy etylenodiaminotetraoctan (EDTA) i z 2 mM ditiotretitol (DTT) lub bez DTT. Miareczkowania melf4E przeprowadziłem w buforze o składzie: 50 mM HEPES/KOH (pH 7,20, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 2 mM DTT). Wartości pH (± 0.01 jednostek) ustaliłem niezależnie od temperatury i siły jonowej na urządzeniu SevenCompact pH meter S220 (Mettler Toledo, Switzerland). Ze względu na różne warunki, temperaturę otoczenia, próbkę termostatowałem w 19,8-20,0 °C i kontrolowałem sondą termoparową w środku ($\pm 0,2$ °C względem ustawionej na termostacie). Białka wzbudzałem długością fali 280 nm (szczeliny wzb./emisji: 10 nM, napięcie na fotopowielaczu 680-720 V) oraz śledziłem emisję w czasie, odpowiednio przy 345 nm dla snurportyny i 337 nm dla eIF4E. Warunki te zapewniły obserwację jedynie emisji tryptofanów w białku. Intensywność fluorescencji monitorowałem podczas ciągłego miareczkowania synchronizowanego w czasie, w którym co minutę dodawałem porcję liganda o różnych stężeniach, przy pojedynczej długości fali, z czasem integracji 30 sekund i przerwą 30 sekund na dodanie liganda, z powolnym, ale wystarczającym mieszaniem magnetycznym, aby zapewnić mieszanie i utrzymywanie stałej temperatury w całej objętości. Podczas przerwy lampa ksenonowa UV była wyłączona, aby uniknąć fotowysielania próbki. Kuweta nie była dotykana podczas całego eksperymentu, aby zapewnić stałą geometrię dla pomiarów

optycznych. Miareczkowania przeprowadzono dla stężeń od 0,1 do 0,12 μM snurportyny w warunkach stanu stacjonarnego, zapewnionych przez preinkubację w buforze (15 minut). Porcje (1-4 μl) ligandów o rosnącym stężeniu (zależnym od siły wiązania, ale ogólnie od 0,5 μM do 5 mM) dodawałem do 1400 μl roztworu snurportyny. Zastosowałem odpowiednie korektę danych, gdy końcowe rozcieńczenie wynosiło $\geq 2\%$ (ale zawsze $\leq 4,0\%$) oraz ze względu na reabsorpcję kapu (przy 280 nm). Każde miareczkowanie składało się z 28–45 punktów danych o odpowiedniej liczbie (jak największej) w zakresie, w którym całkowite stężenie ligandu ([L]) było zbliżone do stężenia snurportyny ([Pa]). Krzywizna dopasowanej funkcji w tym zakresie ma największy wpływ na dokładność wyznaczanego K_{AS} .

Analiza numeryczna

Krzywe dopasowałem do punktów pomiarowych jako funkcję int. fluorescencji [F] od stężenia liganda [L] zgodnie z równaniem:

$$[F] = y = F_0 - C_x(F_a + F_{wl}) + x \cdot F_{wl}$$

Gdzie $x = [L]$ oraz gdzie równowagowe stężenie kompleksu kap-snurportyna [Cx] jest określone jako:

$$C_x = \frac{\sqrt{\frac{x}{2} + \frac{P_a}{2} + \frac{1}{2K_{AS}} - (K_{AS} \cdot x - K_{AS} \cdot P_a + 1)^2 + 4K_{AS} \cdot P_a}}{2K_{AS}}$$

Z modelu odczytałem wyekstrahowane parametry: K_{AS} (stała asocjacji kompleksu); P_{akt} (stężenie białka aktywnego), $\Delta\phi = F_a$ (różnica między efektywną fluorescencją apo-białka i kompleksu); F_{wl} (fluorescencja wolnego liganda); F_0 (początkowa wartość fluorescencji wynikająca z fluorescencji białka). Jeśli F_{wl} był ujemny lub równy 0, oznaczało to nieosiągnięcie punktu końcowego miareczkowania lub zbyt silny efekt filtra wewnętrznego. Intensywności fluorescencji były korygowane ze względu na efekt filtra wewnętrznego (tylko do pewnego zakresu stężeń, do ok. 10-20 μM). Jego wpływ był pomijalny dla silnych ligandów, z kolei dla słabych ligandów i silnie absorbujących mógł wpłynąć na K_{AS} znacząco. Końcowe wartości K_{AS}/K_D obliczyłem jako średnią geometryczną z 3-7 niezależnych pomiarów lub w przypadku niektórych niekapowanych struktur słabych lub niestabilnych ligandów snurportyny na podstawie jednego pomiaru. Wyniki były zbieżne w 90%. Niepewność jest tu wyższą z dwóch wartości: błędu zewnętrznego (u_{ext}) i wewnętrznego (u_{int}), wyrażoną jako: (u to niepewność z dopasowanego modelu z pojedynczych eksperymentów, x_w – ważona średnia K_{AS}).

$$u_{int} = \sqrt{\frac{1}{\sum \frac{1}{u^2}}} \quad ; \quad u_{ext} = \sqrt{\frac{u_{int}^2}{2} \cdot \sum \left(\frac{x_i - x_w}{u_i} \right)^2}$$

Dopasowanie modelu nieliniowych krzywych metodą iteracji Levenberga-Marquardta (metoda najszybszego spadku) wykonałem w programie OriginPro 8.5.0 SR1 (Microcal Software Inc., USA). Dla silnych ligandów krzywe zbiegają (dopasowują się) same wg kryteriów ($P_{akt} > 0,6$), z kolei dla słabych ligandów ustalałem stały parametr P_{akt} na poziomie 0,6 lub 0,7 celem dopasowania. Analiza statystyczną wykonałem dla danych z wysoką dobrocią dopasowania (ang. goodness of fit ($R^2 \geq 0,99$))

III.7.3 Badania miareczkowania liganda białkiem (saturacja)

Przygotowałem odpowiednie stężenia roztworów: 1 μM stężone roztwory koniugatów z DMHBI, DMABI, HEMABI i ACVJ, 2 μM koniugatów z *o*-HBI, 5 μM koniugatów z *p*-NHBI w: a) buforze HEPES (50 mM HEPES pH 7,20, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) w przypadku miareczkowań snurportyną (lub inne bufory jeśli badałem zależności od pH, patrz niżej), b) buforze HEPES (50 mM HEPES pH 7,20, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA) w miareczkowaniach z melF4E, c) buforze TrisHCl (20 mM TrisHCl pH 7,6, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM MnCl_2) w miareczkowaniach z hNudt16.

W przypadku badania zależności od pH miareczkowania ze **snurportyną** przeprowadzałem również w buforach: a) 50 mM bufor HEPES pH 7,65, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, b) 100 mM TrisHCl pH 8,9, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, c) 50 mM bufor Tris-HCl pH 9,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA stosując tę samą procedurę opisaną niżej.

Widma nagrywałem dla niezwiązanych ligandów, następnie dodawałem porcje (2,5; 5 lub 10 μL) 30 μM roztworu: a) **snurportyny** w buforze HEPES (50 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 2 mM DTT, 10% Glicerol), b) **melF4E** w buforze HEPES (50 mM HEPES pH 7,20, 270 mM KCl, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 10% Glicerol), c) **hNudt16** w buforze TrisHCl (20 mM TrisHCl pH 7,6, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% Glicerol) lub d) **BSA** w buforze HEPES (50 mM HEPES pH 7,20, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) do roztworu liganda i mieszałem roztwór magnetycznie. Po ok. 3 min. (snurportyna, melF4E, BSA) lub powyżej 6 min. (hNudt) ponownie skanowałem widmo. Związki miareczkowałem snurportyną aż do wysycenia (jeśli było to możliwe) lub w przypadku słabych ligandów do ok. 1-2 μM stężenia.

W przypadku koniugatów z DMHBI wzbudzałem kompleks z białkiem w dwóch długościach fal: 390 i 490 nm, dla pozostałych przy pojedynczej długości fali: *o*-HBI = 390 nm, HEMABI = 455 nm, *p*-NHBI = 370 nm, DMABI = 470 nm, DMABN = 440 nm, ACVJ = 440 nm.

Ustawienia: szczeliny wzb./emisji: 10 nm, napięcie fotopowielacza: 600 Volt dla koniugatów DMHBI, DMABI, HEMABI, ACVJ oraz 700 Volt dla *p*-NHBI i *o*-HBI.

III.7.3.1 Miareczkowania z wyznaczaniem stałych dysocjacji ze snurportyną

Dla wybranych związków, które okazały się silnymi ligandami snurportyny na podstawie eksperymentów FQT, powtórzyłem miareczkowania snurportyną na niższych stężeniach związków (10 lub 20 nM stężenia koniugatów z DMHBI lub HEMABI) i przygotowałem pięć różnych stężeń roztworów snurportyny w buforze pomiarowym (50 mM HEPES pH 7,20), od 30 μM do 0,3 μM . Do wolnego liganda dodawałem różne porcje (2-6 μL) roztworów snurportyny i mieszałem magnetycznie. Po ok. 3 minutach skanowałem ponownie. Widma emisji były uśrednianie z 2-3 skanów, a dodatkowo wykonywałem je w 2-3 powtórzeniach i wyciągałem średnią arytmetyczną do dalszej analizy. Wzbudzania kompleksów z białkiem jak wyżej.

Ustawienia: szczeliny wzb./emisji: 10 nm, napięcie fotopowielacza: 800 Volt

III.7.3.2 Miareczkowania z wyznaczaniem stałych dysocjacji z hNudt16

Dla wybranych związków, które okazały się inhibitorami hNudt16, powtórzyłem miareczkowania enzymem na niższych stężeniach (100-200 nM dla koniugatów z DMHBI) i przygotowałem analogicznie pięć różnych stężeń roztworów hNudt16 w buforze TrisHCl (20 mM

TrisHCl pH 7,6, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂), od 30 μ M do 0,3 μ M. Do wolnego liganda dodawałem różne porcje (2-6 μ L) roztworów hNudt16 i mieszałem magnetycznie. Po ok. 6-10 minutach skanowałem ponownie. Widma emisji były uśredniane z 2-3 skanów, a dodatkowo wykonywałem je w 2-3 powtórzeniach i wyciągałem średnią arytmetyczną do dalszej analizy. Wzbudzania kompleksów z białkiem jak wyżej.

Ustawienia: szczeliny wzb./emisji: 10 nm, napięcie fotopowielacza: 800 Volt

III.7.4 Badanie podatności na degradację enzymem hNudt16 oraz kinetyki reakcji degradacji

Reakcje przeprowadziłem stosując 10 μ M stężenie związku i 200 nM hNudt16 w 600 μ L buforu TrisHCl (20 mM TrisHCl pH 7.6, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂) inkubując enzym ze związkiem w 37°C, wolno wytrząsając za pomocą wytrząsarki typu Vortex. W tych warunkach TMGpppG hydrolizował w 55% w ciągu 60 minut. Co 15 minut, pobierałem próbkę oraz zakończyłem reakcje degradując enzym termicznie w 95°C (2,5 min). Próbkę następnie nastrzykiwałem na HPLC z użyciem autosamplera (Agilent 1200 Series) z odwróconym układem faz (kol. Supelcosil LC-18-T i stosując detektor UV-VIS. Substraty i produkty eluowałem w 20 C stosując liniowy gradient metanolu. Podczas analizy monitorowałem związki stosując detekcję absorpcji w 254 nm oraz w długości fali charakterystycznej dla FMR. Zawartość nieprzereagowanego kapu obliczyłem na podstawie integracji odpowiednich sygnałów. Dla szybko hydrolizowanych substratów (z funkcją 5'-tioestrową po stronie TMGuo) powtórzyłem reakcje stosując 100 nM stężenie enzymu i monitorując reakcje w 0, 5, 10 i 15 minucie.

Warunki chromatograficzne: kolumna Supelcosil LC-18-T (5 μ m średnia ziaren), bufor A: 100 mM KH₂PO₄ pH 7, bufor B: 100 mM KH₂PO₄ pH 7/MeOH (1:1), liniowy gradient od 0 do 100% buforu B w 7,5 min, przepływ: 1 mL/min

III.7.5 Badanie zależności widm emisji wolnych koniugatów w różnych układach Gly-Woda i Gly-EtOH

Widma wykonywałem na urządzeniu Synergy H1 Microplate Reader (z lampą ksenonową) dla propargilowych lub azydkowych pochodnych FMR lub koniugatu analogu TMGpppG z ACVJ w stężeniu 1,5 μ M każdy. Dla pochodnych FMR wykonałem test w różnych układach glicerol-etanol (v/v) z użyciem czytnika płytek. W tym celu przygotowałem układy o rosnącym stężeniu glicerolu (co 10 % glicerolu) od 20 do 100 % (v/v). Warto zaznaczyć, że inaczej sporządza się układy objętościowo i wagowo, tj. v/v oraz w/w.

Układ 10 % w/w oznacza 10 mg glicerolu w 90 mg etanolu. Korzystając z $d_{Et} = 0,789$ mg/ μ L otrzymujemy 10 mg glicerolu w 114,1 μ L etanolu (co odpowiada 7,89 mg w 90 μ L etanolu). Układ 10 % v/v oznacza 10 μ L glicerolu w 90 μ L etanolu. Korzystając z $d_{Gly} = 1,26$ mg/ μ L otrzymujemy 12,6 mg glicerolu w 90 μ L etanolu.

Układy objętościowe zawierają więcej glicerolu (tab. 18).

Tabela 18 Odpowiedniki stężeń procentowych dla różnych układów przygotowanych v/v i w/w

% v/v	% w/w
0	0
20	28,5
30	40,6
40	51,6
50	61,5
60	70,5
70	78,8
80	86,5
90	93,5
100	100

Przygotowałem po ok. 2 mL układów v/v odważając glicerol i uzupełniając proporcjonalnie etanolem na podstawie gęstości glicerolu. Pochodne FMR rozpuszczone w DMSO o stężeniu 50 mM rozcieńczyłem w etanolu do stężenia 5 mM a następnie do 0,5 mM. Do eppendorfów odważyłem po ok. 300-400 mg układów (tak by mieć ponad 300 μ L) i dodałem proporcjonalnie 500 μ M r-ru FMR, tak by stężenie finalne wyniosło ok. 1,5 μ M. Zbadałem 5 różnych FMR: DMHBI (**55**), o-HBI (**56**), HEMABI (**57**), DMABN (**62**) i ACVJ (**60**).

Eppendorfy z układami Gly-etanol i z FMR mieszałem na Vortexie przez 2,5 godziny. Do płytki 96-dołkowej rozpipetowałem ok. 160-200 μ L roztworu, wg. przykładowego planu:

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
EtOH	DMHBI w etanolu	DMHBI 20 % Gly	DMHBI 30% Gly	DMHBI 40% Gly	DMHBI 50% Gly	DMHBI 60% Gly	DMHBI 70% Gly	DMHBI 80% Gly	DMHBI 90% Gly	DMHBI 100% Gly
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11
blank	HEMABI w etanolu	HEMABI 20 % Gly	HEMABI 30% Gly	HEMABI 40% Gly	HEMABI 50% Gly	HEMABI 60% Gly	HEMABI 70% Gly	HEMABI 80% Gly	HEMABI 90% Gly	HEMABI 100% Gly
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
blank	ACVJ w etanolu	ACVJ 20% Gly	ACVJ 30% Gly	ACVJ 40% Gly	ACVJ 50% Gly	ACVJ 60% Gly	ACVJ 70% Gly	ACVJ 80% Gly	ACVJ 90% Gly	ACVJ 100% Gly

Procedura pomiaru:

Pomiar wykonywałem dwiema metodami: odczytując intensywność fluorescencji metodą Endpoint oraz wykreślając widma emisji. Najpierw wykonałem pomiar w czasie metodą kinetic (endpoint), co 1,5 minuty przez 7,5 minuty (5 pomiarów), odczyt dla dwóch długości fal emisji (w zależności od FMR) i następnie wykonywałem widma emisji. Parametry zbierania widm zostały przedstawione poniżej.

Kinetic (Endpoint):

Set Temperature	Setpoint 25 °C
Start Kinetic	[Run 0:07:30, Interval 0:01:25]
Read (DMHBI)	Read: (F) 390,515
Start Kinetic	[Run 0:07:30, Interval 0:01:25]
Read (HEMABI)	Read: (F) 440,515
Start Kinetic	[Run 0:07:30, Interval 0:01:25]
Read (ACVJ)	Read: (F) 450,510
Start Kinetic	[Run 0:07:30, Interval 0:01:25]
Read (o-HBI)	Read: (F) 390,615

Widma emisji (Emission Spectra):

Read (DMHBI)	Exc. 370 nm Read: (F) Emission Spectrum [405nm to 700nm by 2]
Read (HEMABI)	Exc. 430 nm Read: (F) Emission Spectrum [465nm to 700nm by 2]
Read (ACVJ)	Exc. 420 nm Read: (F) Emission Spectrum [455nm to 700nm by 2]
Read (DMABN)	Exc. 405 nm Read: (F) Emission Spectrum [435nm to 700nm by 2]
Read (o-HBI)	Exc. 360 nm Read: (F) Emission Spectrum [392nm to 700nm by 2]

Dla widm emisji sprawdzałem różną moc detektora (gain). Dla DMHBI zastosowałem większą moc ze względu na silne wygaszanie fluorescencji a dla pochodnych julolidyny mniejsze jako że posiada silną fluorescencję i jest czuła na zmiany lepkości (duży przyrost fluorescencji w gęstych roztworach). Do analizy (analiza metodą Forstera-Hoffmana) wziąłem tylko wyniki zebrane metodą Endpoint (z ostatniego pomiaru), ponieważ utrzymuje te same moce detektora (Top = Gain 100) i umożliwia porównywanie FMR między sobą. W dodatku dla zbieranych widm związku wzbudzałem często nie w maksimum wzbudzenia, lecz wcześniej, aby zebrać cały kształt widma emisji (urządzenie wymaga dużej przerwy między wzbudzeniem i początkiem emisji).

Dla TMGpppG-3'-L1-ACVJ (**1f-3'**) podobnie zbadałem zależności od lepkości układu w stężeniu 1,5 μ M, z tym że w różnych układach Gly-woda stosując parametry niżej:

Warunki pomiaru metoda ENDPOINT:

Procedure Summary	
Plate Type	96 WELL PLATE
Temperature	Temperature: Setpoint 25 °C
Start Kinetic	Start Kinetic [Run 0:05:00, Interval 0:01:30]
Shake	Shake: Orbital for 0:03
Read	Read: (F) 470,515
End Kinetic	End Kinetic
Read	Read: (F) Emission Spectrum [470nm to 700nm by 1]

Warunki pomiaru (Widma emisji):

Synergy H1 Microplate Reader

Conditions: Kinetic measurements, 4 reads every 1 min 30 s

Fixed excitation: 440 nm,

Emission range: 470-700 nm, step every 1 nm

Gain: 105, read speed: normal, delay: 100

III.7.6 Badanie zależności widm emisji wolnych koniugatów w buforach o różnych pH

Widma wykonywałem w buforach o różnych pH:

1. 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 6,50
2. 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7,20
3. 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,50
4. 100 mM TrisHCl pH 8,10
5. 100 mM TrisHCl pH 8,52
6. 100 mM TrisHCl pH 8,92
7. 120 mM Glicyna-NaOH pH 9,50
8. 120 mM Glicyna-NaOH pH 10,00
9. 100 mM $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ pH 10,42
10. 100 mM $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ pH 10,88

Eksperymenty wykonywałem dla sond z DMHBI w stężeniu 10 μM i 15 μM dla o-HBI. Warunki: napięcie 600/700 V dla sond DMHBI, 800 V dla sond o-HBI. Dobranie takich warunków umożliwiło mi zmierzenie w dokładny sposób zmian intensywności fluorescencji w konkretnych pH.

III.7.7 Badanie obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM) w komórkach HeLa

Badania wykonano za pomocą mikroskopu konfokalnego Nikon A1 z zestawem do FCS PicoHarp 300 i oprogramowaniem SymPhoTime (PicoQuant). Próbki obserwowano za pomocą obiektywu 60x (N.A. 1.2) z imersją wodną.

Komórki HeLa, będące w fazie logarytmicznego wzrostu, inkubowano z koniugatami FMR w stężeniach maksymalnych możliwych do osiągnięcia z roztworów bazowych. Przeprowadzono obrazowanie FLIM z wykorzystaniem lasera 485 nm (temp. 36°C).

III.7.8 Badanie spektroskopowe korelacji fluorescencji (FCS)

Pomiary FCS poprzedzono kalibracją na Rodaminie 110 w 2,5% glukozie w PBS. Wyznaczono wielkość ogniska konfokalnego $\omega_0=210$ nm, oraz współczynnik proporcji $\kappa=6,2$. Na podstawie danych z kalibracji oraz modelu lepkości zależnej od skali w cytoplazmie i jądrze ²²⁸ komórek HeLa, obliczono przewidywane czasy dyfuzji dla wolnych koniugatów oraz białka snurportyny.

Promień hydrodynamiczny koniugatów z FMR wyznaczono w następujący sposób:

Strukturę 3D każdej z cząsteczek zoptymalizowano energetycznie przy użyciu programu Avogadro (model MMFFP94s). Następnie, zoptymalizowany model czasowy oparty o sfery van der Waalsa dla każdej cząsteczki wyeksportowano do pliku .wrl co pozwoliło na późniejszy import w programie Blender (www.blender.org). Zaimportowany model czasowy został następnie dopasowany elipsoidą o półosiach A,B,C, takich że B=C. Następnie obliczono objętość takiej elipsoidy i porównano z objętością atomu węgla uzyskaną w analogiczny sposób. Na tej podstawie wyznaczono znając promień van der Waalsa dla atomu węgla (1.7×10^{-10} m) wyznaczono promień van der Waalsa dla każdego z koniugatu. Otrzymany promień van der Waalsa porównano z promieniem hydrodynamicznym oraz promieniem van der Waalsa barwnika użytego do kalibracji aparatury (rodamina 110), co pozwoliło na oszacowanie promieni hydrodynamicznych badanych koniugatów. Promień hydrodynamiczny snurportyny wyznaczono na podstawie jej masy cząsteczkowej zaczerpniętej z bazy danych Uniprot (<https://www.uniprot.org/uniprot/O95149>), tj. 41,143 kDa. Dalej używając wzoru z pracy Kalwarczyk i wsp. ²⁸³ wyznaczono promień hydrodynamiczny białka:

$$\frac{D_0}{D} = \frac{\int_{Rh1}^{Rh2} P(Rh) \eta_{eff}(rp) dRh}{\int_{Rh1}^{Rh2} P(Rh) dRh}$$

Pomiary FCS przeprowadzono w losowo wybranych punktach cytoplazmy i jąder komórek HeLa inkubowanych z badanymi związkami. We wszystkich wariantach zarejestrowano krzywe FCS – zarejestrowano obecność fluorescencyjnych i dyfundujących molekuł. Dane pomiarowe dopasowano do modelu dyfuzji prostej jednoskładnikowej z uwzględnieniem obecności stanów trypletowych.

III.7.9 Dokowanie

Przygotowanie liganda i dokowanie zostało przeprowadzone na oprogramowaniu MOE (wersja 2019.0101 i 2020.0901). Domyślne pola siłowe – Amber10 i EHT zostały zastosowane odpowiednio do białka i do liganda.

III.7.9.1 Przygotowanie receptora

Jako receptor dokujący wybrano strukturę krystaliczną domeny wiążącej m3G-cap ludzkiej snurportyny1 w kompleksie z ligandem dinukleotydu TMGpppG kap (kod PDB 1XK5). Rozdzielczość struktury wynosi 2,40 Å, ale struktura ma ogólnie złą jakość wyrażoną parametrami z podsumowania „wwPDB Validation”, co może być przyczyną problemów ze znalezieniem prawidłowych konformacji ligandów (rys. 1). Snurportyna nie tworzy dimerów w roztworze, a kap w tej strukturze wiąże się tylko z wolną snurportyną-1, więc nie należy brać pod uwagę białek wchodzących w interakcje. Ligand wiąże się w najbardziej uporządkowanym regionie białka, bez pętli, ale niektóre łańcuchy boczne (dodatnio naładowane reszty Lys144, Lys128 i Arg278) są elastyczne. Kieszeń wygląda na bardzo wystawioną na działanie rozpuszczalnika, chociaż w kryształach upakowania kryształów obserwuje się interakcje z inną cząsteczką snurportyny1, które stabilizują ligand. Te sztuczne interakcje mogą wpływać na analizowaną konformację złożoną. Ponieważ ligand jest polarny i naładowany, sieć wiązań z cząsteczkami wody jest ważna dla tworzenia kompleksu. Większe wiązane cząsteczki wody niż 12 Å zostały usunięte, a kompleks został następnie przygotowany przy użyciu narzędzia QuickPrep w MOE. Składało się to z następujących kroków: automatyczne korekty struktury (brakujące pętle i łańcuchy boczne itp.), określenie stanów protonacji reszt za pomocą narzędzia Protonate3D i ponowne założenie kieszeni z obniżonymi ograniczeniami w systemie (ligand 1, receptor 1, wody 0,1 kcal/mol/Å²) w celu usunięcia kolizji i umożliwienia prawidłowego ponownego dopasowania nieprawidłowych pozycji atomów w miejscu wiązania, zwłaszcza oddziaływania między cząsteczkami wody receptora mostkującego ligand (pozostałe usta-wienia dokowania zostały zachowane domyślnie). Po rozważeniu różnych opcji, cząsteczki wody w centrum aktywnym z mniej niż 3 wiązaniami wodorowymi w przygotowanej strukturze (pozostałości HOH 27, 70, 72, 79, 80) zostały usunięte przed symulacjami dokowania. Przygotowany system został wykorzystany jako receptor do symulacji dokowania.

III.7.9.2 Przygotowanie liganda

Początkową konformację ligandów przygotowano na podstawie struktury ligandu m3GpppG-kap z kompleksu krystalograficznego (PDB). Każdy ligand minimalizowano w próżni przy użyciu domyślnego pola siłowego, ale przy wyłączonych oddziaływaniach elektrostatycznych, aby zapobiec zniekształceniom struktury) i zakładano dominującą protonację związku (forma fenolowa) i stan tautomeryczny (rozważany jest pojedynczy stan na ligand).

III.7.9.3 Protokół dockowania

Założono, że podstawnik TMGpppG analogu posiada znacznik FMR na zewnątrz kieszeni wiążącej snurportyny i wystawiony jest na oddziaływania z rozpuszczalnikiem oraz że przyjmie taką samą lub bardzo podobną pozycję do krystalizowanego liganda, a zatem podjęto próbę protokołu (fragment liganda GMP został doprowadzony do konformacji krystalograficznej). Wstępne próby dokowania z tym protokołem (przy użyciu różnych ustawień) nie powiodły się nawet przy odtwarzaniu oryginalnej pozycji dokowania ligandów (oraz podstawionych

ligandów), dlatego przyjęto inny protokół: ligand krystalograficzny został „przereagowany” (związany kowalencyjnie) z odpowiednim podstawnikiem (linker-triazol-CH₂CH₂-o-HBI) w pozycjach 2' lub 3' rybozy przy użyciu reakcji transkarbamacji. Przeszło 100 pozycji każdego liganda udokładniono i w sumie 100 pozycji (zarówno utworzonych 2' i 3'-podstawionych ligandów) zostało ostatecznie zwróconych. W tym protokole pozycja rybozy prawie nie zmienia się w stosunku do struktury krystalograficznej. W drugim etapie udokładniania protokołu dokowania zastosowano wywołane dopasowanie z (niższe niż domyślne) ograniczeniami dotyczącymi pozostałości miejsca aktywnego wynoszące 1 kcal/mol/Å² oraz z domyślną punktacją GBVI/WSA DG.

III.7.9.4 Analiza danych

Założono, że fragment kapu podstawionych związków będzie zadokowany jako w strukturze krystalizowanej oraz że podstawniki są wystawione na działanie rozpuszczalnika i mogą się łatwo przestawiać. Analizując wyniki wzięto pod uwagę następujące czynniki: wyniki dokowania (S) dla pozycji wybranego liganda, Interakcje, energie odkształcenia liganda (czy ligand jest napięty w konformacji finalnej), RMSD między początkowym umieszczeniem liganda a pozycją zadokowaną liganda. Jeśli RMSD jest wysokie, oznacza to, że ligand poruszał się znacznie podczas ponownego udokładniania struktury i sugeruje, że początkowe umieszczenie liganda nie było optymalne pod względem energii pola siłowego (stosunkowo daleko od minimum energii potencjalnej).

III.7.10 Ekspresja i oczyszczanie snurportyny i innych białek

Sekwencję ludzkiego białka snurportyny1 (ID genu: 10073) uzyskano w wektorze plazmidowym (pET16b_wtSNP1) z Addgene. Białko snurportyny (~44 kDa) ze znacznikiem histydynowym na końcu 5' ulegało nadekspresji w prokariotycznym układzie ekspresyjnym BL21 (DE3) RIL E.coli (Invitrogene). Białko 6xHis-Snurportyna1 indukowano 0,4 mM roztworem IPTG o gęstości optycznej 0,65 (hodowla bakteryjna), a bakterie hodowano dalej przez 16 godzin w temperaturze 18°C. Zebrane komórki poddano lizie w buforze zawierającym: 20 mM HEPES pH= 7,5, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 0,1 mg/ml lizozymu i mieszaninę inhibitorów proteaz (aprotynina, leupeptyna, pepstatyna, PMSF). Lizat poddano sonikacji (15 minut, moc 50%, 15 s włączenie/wyłączenie) i odwirowano. Supernatant naniesiono na 2 x 5 ml kolumnę HisTrap FFFM (Cytiva) zrównoważoną buforem: 20 mM HEPES pH= 7,5, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 5 mM β-merkaptioetanol, 10% glicerol. Białko 6xHis-Snurportin1 przemyto buforem zawierającym 1 M NaCl i eluowano buforem: 20 mM HEPES pH= 7,5, 300 mM NaCl, 300 mM imidazol, 5 mM β-merkaptioetanol, 10% glicerol. Frakcje białkowe dalej oczyszczano na kolumnie filtracyjnej żelowej Superdex 75 pg HiLoad 26/600 (Cytiva). Próbkę ze snurportyną zatężono do ~30 μM, szybko zamrożono i przechowywano w temperaturze -80°C w buforze zawierającym 50 mM HEPES pH= 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 2 mM DTT, 10% glicerol.

Ludzki enzym dekapujący Nudt16 ekspresjonowano i oczyszczano wg protokołu ¹¹³ a białko melf4E wg protokołu ²⁸⁴.

IV. Podsumowanie

W ramach niniejszej pracy zsyntezowałem bibliotekę związków na którą składa się: a) 19 TMG kapów z linkerami funkcjonalizowanymi grupą azydkową lub propargilową (**1-11**), b) 42 koniugaty TMG kapu z różnymi Fluorescencyjnymi Molekularnymi Rotorami (**1-11-a-f**), c) 22 nukleotydowe koniugaty z FMR niezawierające TMG kapu (**12-15a-f**), d) 4 analogi TMG kapu niezawierające FMR ani funkcjonalizowanego linkera (**17-20**) oraz e) 3 związki GpppG podwójnie znakowane FMR (**21-22a-c**). Najważniejszą (i najliczniejszą) klasę związków stanowią tytułowe koniugaty TMG kapu znakowane FMR, pozostałe koniugaty (**12-22**) należy traktować jako związki kontrolne do badań struktura-aktywność w badaniach powinowactwa lub do badań komórkowych (**16a-16f**). Wśród miejsca wprowadzenia modyfikacji w postaci FMR wybrałem pozycje 2' i 3'-O-Guo, -Ade i -TMGuo (39 przykładów) oraz pozycje N1 i C8 Guo (4 przykłady) oraz sprawdziłem ich wpływ na powinowactwo do snurportyny. Z kolei wśród różnych FMR zbadałem 5 analogów fluroforu GFP: DMHBI, o-HBI, *p*-NHBI, HEMABI, DMABI oraz dwa analogi julolidyny (ACVJ, DMABN) i również sprawdziłem ich wpływ na powinowactwo do snurportyny na przykładzie analogu TMGpppG (**1**).

Zsyntezowane związki poddałem badaniom fizykochemicznym (właściwości spektralne i solwatochromizm, zależności emisji wolnych związków od pH i polarności (DMSO-H₂O) środowiska, wyznaczanie pK_a fenoli, badania wrażliwości na zmiany lepkości lub temperatury otoczenia) oraz biofizycznym (charakterystyka powinowactwa do snurportyny (K_D), odpowiedzi związków na wiązanie ze snurportyną (F_m/F₀ oraz dF/dC), odporność na degradację ludzkim enzymem Nudt16, specyficzność substratowa względem białek wiążących kapy: snurportyna, melF4E, hNudt16).

Wyniki badań powinowactwa do snurportyny stanowiły najszerszą część pracy i można je podsumować następująco:

- Wprowadzenie linkera z grupą azydkową lub propargilową w pozycje 2' i 3'-O-Guo lub Ade i 3'-O-TMGGuo w analogach TMGpppN oraz TMGpppA_mU_mA nie zaburza oddziaływań ze snurportyną. Wyjątkiem są pozycje N1 (**9**) i 2'-O-TMGGuo (**8-2'**), które powodują destabilizację lub całkowity brak wiązania,
- Zamiana atomu tlenu na atom siarki w poz. 5' w analogach TMGSpppG (**19**), **2-2'** i **2-3'** jest najmniejszą modyfikacją dającą wymierną korzyść w odniesieniu do wzrostu powinowactwa do snurportyny (6-krotny wzrost), zaś wprowadzenie tej modyfikacji od strony Guo (**20**, **7-2'**, **7-3'**) nie zmienia oddziaływania. Wydłużenie mostka trifosforanowego (**5-**, **6-2'/3'**) również powoduje pewną wymierną korzyść, niezależnie od tego czy drugim nukleotydem jest adenozyne czy guanozyne,
- Wprowadzenie GFP-podobnego FMR (**a-e**) w poz. 2'-O guanozyny z odpowiednim linkerem (L1) powoduje drastyczny wzrost powinowactwa (100x względem TMGpppG). Izomery 3' praktycznie nie wykazują tego efektu stabilizującego i wiążą się 50x słabiej niż 2'. Badania FQT wyłoniły 9 TMG kapowanych związków z K_D poniżej 10 nM. Rodzaj analogu fluroforu GFP **a-e** nie odgrywa znaczącej roli, jednakże zaobserwowałem drastyczny spadek (~40x) efektu stabilizującego dla FMR **f** o większych rozmiarach. Dodatkowo, koniugaty z samym triazolem i alifatycznym alkoholem (**17**, **18**) nie wykazują tego efektu. Oznacza to że GFP-podobny FMR jest tutaj kluczowy i niezbędny. Wprowadzenie go w pozycje 2'/3'-O trimetyloguanozyny (**8**) lub adenozyny

(4) nie powoduje efektu stabilizującego w przypadku dinukleotydu, a dla 4-ej pozycji sekwencji w tetranukleotydzie 2'/3'-O-Ade (**11**, oba izomery) powoduje destabilizację kompleksu ze snurportyną i jest to jedyny taki przykład,

- Wspomniana wcześniej modyfikacja tioestrowa od strony TMGuo czy wydłużenie wiązania do tetrafosforanowego w koniugatach 2' nie wywiera dalszego znaczącego wzrostu (ich wpływ jest marginalny w porównaniu do FMR), chociaż najsilniejszym ligandem okazał się koniugat tetrafosforanowy z HEMABI, **5c-2'** ($K_D = 5 \mu M$),
- Wprowadzenie tych samych modyfikacji (FMR) i konfiguracji (Guo-2'-O-L1) do związków bez TMG kapu (GMP, GpppG i m⁷G kap) również powoduje znaczący wzrost powinowactwa (10-100x) zarówno względem ich 3' odpowiedników jak i TMGpppG. Oznacza to, że ten efekt stabilizujący jest na tyle silny, że zmienia specyficzność substratową snurportyny, która nie wiąże takich niemodyfikowanych nukleotydów *in vivo*, jednakże trzeba tu jasno podkreślić, że to silne wiązanie nadal jest konkurencyjne względem innych białek, np. mElF4E i podobne stałe K_D analogów m⁷G kapu. Ostatecznie zatem stwierdzam że, mimo iż struktura TMG kapu nie jest wymagana do silnego oddziaływania ze snurportyną, jest pożądana ze względu na specyficzność oddziaływania (mElF4E nie wiąże analogów TMG kapu) i tylko takie związki mają szansę być molekularnymi sondami snurportyny w warunkach komórkowych czy złożonych modelach zwierzęcych,
- Przeprowadzone badania komputerowe i obliczeniowe na modelowych ligandach **1b-2'**, **1b-3'** wykazały potencjalne miejsca dokujące w domenie wiążącej TMG kapu snurportyny i pozwoliły na zwizualizowanie korzystnych energetycznie konformacji znacznika, a dodatkowo ujawniły potencjalne oddziaływania hydrofobowe metyloimidazolinonu i pierścienia fenyłowego z resztami Trp107, Ile109, Leu277, Met281, Val285. Stanowi to możliwe wyjaśnienie zwiększonej stabilności kompleksu oraz dodatkową weryfikację zróżnicowanych wyników dla izomerów 2' względem 3', które wg tego modelu nie wpasowują się w tę kieszeń hydrofobową. Najprawdopodobniej zatem kluczowe są oddziaływania hydrofobowe, jednak znacznik nie może być zbyt duży lub sztywny (**f**).

Wyniki badań odpowiedzi ligandów na wiązanie ze snurportyną dały następujące wnioski:

- W kontekście parametru F_m/F_0 i wśród analogów TMG kapu, koniugaty DMHBI: **1a-2'**, **2a-2'**, **3a-2'**, **5a-2'**, wykazały największe zmiany (7 do 12,5-krotne) przy jednoczesnym bardzo wysokim powinowactwie do snurportyny ($K_D \sim 10 nM$). Korespondujące 3' izomery wykazały znacznie mniejsze zmiany ($\sim 1-4$). Co ciekawe, w przypadku koniugatów z o-HBI (**b**), typ linkera i orientacja triazolu mają znaczący wpływ na zmiany fluorescencji po wiązaniu snurportyny, tj. koniugaty **1b-2'**, **1b-3'** wykazały niskie wartości $F_m/F_0 (< 3)$, a **7b-2'**, **7b-3'** i **9b**, w których nukleotyd jest przyłączony do triazolu przez atom węgla (niebieski, L2), znacząco większe (5-9-krotne). Warto zauważyć, że wszystkie związki wykazujące największe wartości F_m/F_0 wykazywały bardzo niską fluorescencję w stanie wolnym (F_0), co czyni je bardzo dobrymi kandydatami na sondy „włączające” fluorescencje,
- W kategorii zmian intensywności fluorescencji przy danym stężeniu białka (dF/dC), największe zmiany wykazał koniugat ACVJ **1f-3'** (463 a.u./ μM), podczas gdy izomer 2' tylko ~ 90 a.u./ μM przy bardzo zbliżonym powinowactwie (K_D). Silne zmiany (~ 300 a.u./ μM) wykazały również 2' koniugaty z HEMABI: **1c-2'**, **3c-2'**, **5c-2'**. W przypadku

tych koniugatów, 3' koniugaty wykazywały znacząco niższe zmiany (2-6 razy). W pozostałych przypadkach zmiany te były niskie (<50 a.u./ μM), czasem nawet mimo bardzo wysokiego powinowactwa, np. **1b-2'**, **7b-2'**, **8b-3'** a w jeszcze innych np. dla **7b-3'** zmiany względne F_m/F_0 były duże, ale zmiany dF/dC małe,

- Porównanie tych trzech wspomnianych parametrów w badaniach biofizycznych ze snurportyną pozwoliły mi na wyłonienie najlepszych kandydatów pod kątem powinowactwa (niskie K_D) i wysokich zmian fluorescencji podczas wiązania i są to: **1a-2'**, **2a-2'**, **3a-2'**, **5a-2'**, **1c-2'**, **3c-2'**, **5c-2'**. Rozważano tylko TMG kapowane związki (specyficzność), mimo że największe odpowiedzi i wysokie powinowactwo wykazał analog GpppG **22a-2'+3'**. Wynik ten jest jednak ważny, ponieważ daje to szansę, że wprowadzenie podobnej konfiguracji bis-modyfikacji do analogu TMGpppG będzie korzystne (wymierna korzyść **22a-2'+3'** względem monopodstawionego **22a-2'**)
- Badania odpowiedzi związku **2a-2'** ze snurportyną, meIF4E oraz BSA wykazały specyficzność względem snurportyny i 12,5-krotny wzrost fluorescencji w stanie wysycenia oraz brak odpowiedzi z pozostałymi białkami,

W kontekście badań z ludzkim enzymem Nudt16 otrzymałem następujące wnioski:

- Wprowadzenie modyfikacji metylenowej ($-\text{CH}_2-$) (**3**) w pozycję między fosforami α - β skutkuje odpornością na degradację, podobnie wprowadzenie modyfikacji tioestrowej ($5'$ -S) od strony Guo (**7**, **20**) i FMR w poz. N1-Guo (**9**) nadają odporności związkom przed degradacją. Wprowadzenie tej samej modyfikacji tioestrowej lecz od strony TMGuo (**2**, **19**) powoduje obserwowalny wzrost szybkości degradacji. Wprowadzenie FMR w poz. $2',3'$ -O nie wpływa znacząco na podatność na degradację, chociaż $2'$ izomer (**8a-2'**) ulegał jej względnie szybciej.
- Skanowanie widm podczas miareczkowań enzymem Nudt16 wykazało, że N1-Guo (**9c**, **9g**) modyfikowane analogi nie są rozpoznawane przez białko, zaś analogi **3a-3'** ($-\text{CH}_2-$) i **7a-2'/3'** ($5'$ -S-Guo) wykazały odpowiedź i na podstawie widm emisji i krzywych miareczkowań mogą być rozważane jako inhibitory tego enzymu, chociaż wymagałoby to dokładniejszych badań np. optymalizacji krzywych miareczkowań enzymem lub pomiar IC_{50} w badaniach z substratem tego enzymu. Nudt16 silniej wiąże jednak analogi GpppG lub NADpppG i wśród nich należałoby szukać silnych specyficznych inhibitorów enzymu a wyniki miały służyć wykazaniu użyteczności metody z blokowaniem mechanizmu TICT (wzrost emisji FMR).

Wyselekcjonowane na podstawie badań biofizycznych związki poddano badaniom w żywych komórkach HeLa, tj. obrazowaniu czasów życia fluorescencji oraz badaniu wsp. dyfuzji. Koniugat **1c-2'** wykazał wzrost czasu życia fluorescencji (3,5 ns) w komórkach, w odróżnieniu od **1a-2'**, **1f-3'** (~ 2 -2,5 ns) i ich fosfonianów. Wykazano, że koniugaty TMG kap-FMR można stosować jako sondy fluorescencyjne do obrazowania snurportyny w żywych komórkach czy potencjalnie do śledzenia jej ruchu w komórce, jednak konieczne są dalsze badania biologiczne, aby zrozumieć pełny potencjał i ograniczenia tych sond. Takie badania komórkowe oddziaływań snurportyny i transportu snRNA fluorescencyjnymi sondami z FMR może mieć znaczenie poznawcze w patologii procesu splicingu i rozwoju nowoodkrytych chorób a także potencjalnie może pomóc naukowcom w odkryciu efektywnej terapii w dystrofii mięśniowej. Identyfikacja dwóch hydrofobowych powierzchni w pobliżu kieszeni wiążącej TMG kap, może również naukowcom ułatwić przyszłe projektowanie silniejszych ligandów snurportyny.

V. Bibliographies

1. Y. Furuichi and A. J. Shatkin, *Advances in Virus Research*, Vol 55, 2000, **55**, 135-184.
2. J. Wang, B. L. A. Chew, Y. Lai, H. P. Dong, L. Xu, S. Balamkundu, W. M. Cai, L. Cui, C. F. Liu, X. Y. Fu, Z. G. Lin, P. Y. Shi, T. K. Lu, D. H. Luo, S. R. Jaffrey and P. C. Dedon, *Nucleic Acids Research*, 2019, **47**, 16.
3. J. D. Bangs, P. F. Crain, T. Hashizume, J. A. McCloskey and J. C. Boothroyd, *Journal of Biological Chemistry*, 1992, **267**, 9805-9815.
4. A. Zinoviev and M. Shapira, *Comparative and Functional Genomics*, 2012, 10.
5. J. Jemielity, J. Kowalska, A. M. Rydzik and E. Darzynkiewicz, *New Journal of Chemistry*, 2010, **34**, 829-844.
6. Ziemniak, M., et al., Two-headed tetraphosphate cap analogs are inhibitors of the Dcp1/2 RNA decapping complex. *RNA*, 2016. **22**(4): p. 518-529.
9. De Benedetti, A. and A.L. Harris, *eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1999. **31**(1): p. 59-72.
10. Graff, J.R., et al., Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduces tumor growth without toxicity. *Journal of Clinical Investigation*, 2007. **117**(9): p. 2638-2648.
11. Robichaud, N., et al., Translational control in the tumor microenvironment promotes lung metastasis: Phosphorylation of eIF4E in neutrophils. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 2018. **115**: p. E2202-E2209.
12. Bitterman, P. and V. Polunovsky, Attacking a Nexus of the Oncogenic Circuitry by Reversing Aberrant eIF4F-Mediated Translation. *MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS*, 2012. **11**: p. 1051-1061.
13. Schoenberg, D.R. and L.E. Maquat, Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 2012. **13**(4): p. 246-259.
14. Tuxworth, W., et al., Regulation of protein synthesis by eIF4E phosphorylation in adult cardiocytes: the consequence of secondary structure in the 5'-untranslated region of mRNA. *BIOCHEMICAL JOURNAL*, 2004. **378**: p. 73-82.
15. Standart, N. and N. Minshall, Translational control in early development: CPEB, *P-bodies and germinal granules*. BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, 2008. **36**: p. 671-676.
16. S. Doamekpor, S. Sharma, M. Kiledjian and L. Tong, *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2022, **298**.
17. Y. Chen, W. Kowtoniuk, I. Agarwal, Y. Shen and D. Liu, *NATURE CHEMICAL BIOLOGY*, 2009, **5**, 879-881.
18. W. Kowtoniuk, Y. Shen, J. Heemstra, I. Agarwal and D. Liu, *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 2009, **106**, 7768-7773.
19. A. Jäschke, K. Höfer, G. Nübel and J. Frindert, *Current Opinion in Microbiology*, 2016, **30**, 44-49
20. M. Kiledjian, *Trends in Cell Biology*, 2018, **28**, 454-464.
21. C. Julius and Y. Yuzenkova, *Nucleic Acids Research*, 2017, **45**, 8282-8290.
22. Levenson-Palmer, R., et al., A distinct RNA recognition mechanism governs *Np⁴* decapping by *RppH*. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 2022. **119**(6).
23. Luciano, D. and J. Belasco, *Np⁴* alarmones function in bacteria as precursors to RNA caps. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 2020. **117**(7): p. 3560-3567.
24. H. Hu, N. Flynn and X. Chen, *Journal*, 2021, **12**, 435-469.
25. X. Jiao, S. Doamekpor, J. Bird, B. Nickels, L. Tong, R. Hart and M. Kiledjian, *CELL*, 2017, **168**, 1015-+.
26. Bird, J., et al., *Highly efficient 5' capping of mitochondrial RNA with NAD⁺ and NADH by yeast and human mitochondrial RNA polymerase*. *ELIFE*, 2018. 7.
27. Zhang, H., et al., *NAD tagSeq reveals that NAD⁺-capped RNAs are mostly produced from a large number of protein-coding genes in Arabidopsis*. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 2019. **116**(24): p. 12072-12077
28. Wang, J., et al., *Quantifying the RNA cap epitranscriptome reveals novel caps in cellular and viral RNA*. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, 2019. **47**(20).
29. A. Galloway and V. H. Cowling, *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, 2019, **1862**, 270-279.
30. A. Matera, R. Terns and M. Terns, *NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY*, 2007, **8**, 209-220.
31. Grzechnik, P., et al., *Nuclear fate of yeast snoRNA is determined by co-transcriptional*

- Rnt1 cleavage*. NATURE COMMUNICATIONS, 2018. **9**.
32. Boon, K., M. Pearson, and M. Kos, *Self-association of Trimethylguanosine Synthase Tgs1 is required for efficient snRNA/snoRNA trimethylation and pre-rRNA processing*. SCIENTIFIC REPORTS, 2015. **5**.
 33. Tycowski, K., A. Aab, and J. Steitz, *Guide RNAs with 5' caps and novel box C/D snoRNA-like domains for modification of snRNAs in metazoa*. CURRENT BIOLOGY, 2004. **14**(22): p. 1985-1995.
 34. Franke, J., J. Gehlen, and A. Ehrenhofer-Murray, *Hypermethylation of yeast telomerase RNA by the snRNA and snoRNA methyltransferase Tgs1*. JOURNAL OF CELL SCIENCE, 2008. **121**(21): p. 3553-3560.
 35. Speckmann, W., et al., *Nuclear retention elements of U3 small nucleolar RNA*. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 1999. **19**: p. 8412-8421.
 36. Speckmann, W., R. Terns, and M. Terns, *The Box C/D motif directs snoRNA 5'-cap hypermethylation*. NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 2000. **28**(22): p. 4467-4473.
 37. Y. Zhu, R. Tomlinson, A. Lukowiak, R. Terns and M. Terns, MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, 2004, **15**, 81-90.
 38. J. Qin and C. Autexier, RNA BIOLOGY, 2021, **18**, 305-315.
 39. M. Rubtsova and O. Dontsova, BIOMOLECULES, 2020, **10**.
 40. L. Wurth, A. Gribling-Burrer, C. Verheggen, M. Leichter, A. Takeuchi, S. Baudrey, F. Martin, A. Krol, E. Bertrand and C. Allmang, NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 2014, **42**, 8663-8677.
 41. V. Yedavalli and K. Jeang, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 2010, **107**, 14787-14792.
 42. T. NILSEN, ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY, 1993, **47**, 413-440.
 43. G. HANNON, P. MARONEY, Y. YU, G. HANNON and T. NILSEN, SCIENCE, 1992, **258**, 1775-1780.
 44. E. Lasda and T. Blumenthal, WILEY INTERDISCIPLINARY REVIEWS-RNA, 2011, **2**, 417-434.
 45. U. FISCHER and R. LUHRMANN, SCIENCE, 1990, **249**, 786-790.
 46. U. FISCHER, E. DARZYNKIEWICZ, S. TAHARA, N. DATHAN, R. LUHRMANN and I. MATTAJ, JOURNAL OF CELL BIOLOGY, 1991, **113**, 705-714.
 47. Goswami, R., et al., *Nuclear localization signal-tagged systems: relevant nuclear import principles in the context of current therapeutic design*. CHEMICAL SOCIETY REVIEWS, 2024. **53**(1): p. 204-226.
 48. Jacobson, M. and T. Pederson, *Localization of signal recognition particle RNA in the nucleolus of mammalian cells*. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 1998. **95**: p. 7981-7986.
 49. Lange, T., A. Borovjagin, and S. Gerbi, *Nucleolar localization elements in U8 snoRNA differ from sequences required for rRNA processing*. RNA, 1998. **4**: p. 789-800.
 50. Lu, J., et al., *Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus*. CELL COMMUNICATION AND SIGNALING, 2021. **19**(1).
 51. Soniat, M. and Y. Chook, *Nuclear localization signals for four distinct karyopherin- β nuclear import systems*. BIOCHEMICAL JOURNAL, 2015. **468**: p. 353-362.
 52. P. Moreno, M. Wenska, K. Lundin, Ö. Wrangé, R. Strömberg and C. Smith, NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 2009, **37**, 1925-1935.
 53. K. Wagstaff and D. Jans, BIOCHEMICAL JOURNAL, 2007, **406**, 185-202.
 54. R. Mahato, JOURNAL OF DRUG TARGETING, 1999, **7**, 249-268.
 55. T. Nagasaki, T. Kawazu, T. Tachibana, S. Tamagaki and S. Shinkai, JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, 2005, **103**, 199-207.
 56. M. TERNS, C. GRIMM, E. LUND and J. DAHLBERG, EMBO JOURNAL, 1995, **14**, 4860-4871.
 57. E. MAXWELL and M. FOURNIER, ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY, 1995, **64**, 897-934.
 58. J. Makarova and D. Kramerov, MOLECULAR BIOLOGY, 2007, **41**, 214-226.
 59. C. Alavian, J. Politz, L. Lewandowski, C. Power and T. Pederson, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 2004, **313**, 351-355.
 60. S. Boulon, C. Verheggen, B. Jady, C. Girard, C. Pescia, C. Paul, J. Ospina, T. Kiss, A. Matera, M. Bordonné and E. Bertrand, MOLECULAR CELL, 2004, **16**, 777-787.
 61. T. Kiss, JOURNAL OF CELL SCIENCE, 2004, **117**, 5949-+.
 62. A. Lukowiak, S. Granneman, S. Mattox, W. Speckmann, K. Jones, H. Pluk, W. van Venrooij, R. Terns and M. Terns, NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 2000, **28**, 3462-3471.

63. H. Hayek, G. Eriani and C. Allmang, *BIOMOLECULES*, 2022, **12**.
64. P. Hoffmann and M. Berry, *THYROID*, 2005, **15**, 769-775.
65. Mostert, V., et al. *Protection from peroxynitrite-mediated oxidation and nitration via selenoprotein P*. in *MACROELEMENTS AND TRACE ELEMENTS*. 1999.
66. Reeves, M., F. Bellinger, and M. Berry, *The Neuroprotective Functions of Selenoprotein M and its Role in Cytosolic Calcium Regulation*. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, 2010. **12**(7): p. 809-818.
67. Saito, Y., *Selenoprotein P as an in vivo redox regulator: disorders related to its deficiency and excess*. *JOURNAL OF CLINICAL BIOCHEMISTRY AND NUTRITION*, 2020. **66**(1): p. 1-7.
68. H. D. Van Doren K, *Mol. Cell. Biol.*, 1990, **10**(4), 1769-1772.
70. NILSEN, T., *TRANSSPLICING OF NEMATODE PREMESENTER RNA*. *ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY*, 1993. **47**: p. 413-440.
71. Wallace A, F.M., Veo and M.C. B, Stepinski J, Jankowska-Anyszka M, Darzynkiewicz E, Davis RE., *The nematode eukaryotic translation initiation factor 4E/G complex works with a trans-spliced leader stem-loop to enable efficient translation of trimethylguanosine-capped, RNAs*. *Mol Cell Biol*, 2010. **30**: p. 1958-1970.
72. LIOU, R. and T. BLUMENTHAL, *TRANS-SPLICED CAENORHABDITIS-ELEGANS MESSENGER-RNAs RETAIN TRIMETHYLGUANOSINE CAPS*. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 1990. **10**(4): p. 1764-1768.
73. J. THOMAS, S. CREWS and C. GOODMAN, *CELL*, 1988, **52**, 133-141.
74. D. Guiliano and M. Blaxter, *PLOS GENETICS*, 2006, **2**, 1871-1882.
75. E. Lasda, M. Allen and T. Blumenthal, *GENES & DEVELOPMENT*, 2010, **24**, 1645-1658.
76. J. Pettitt, B. Müller, I. Stansfield and B. Connolly, *RNA*, 2008, **14**, 760-770.
77. G. Cheng, L. Cohen, C. Mikhli, M. Jankowska-Anyszka, J. Stepinski, E. Darzynkiewicz and R. Davis, *MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY*, 2007, **153**, 95-106.
78. S. Lall, C. Friedman, M. Jankowska-Anyszka, J. Stepinski, E. Darzynkiewicz and R. Davis, *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2004, **279**, 45573-45585.
79. G. Singh, B. Seufzer, Z. Song, D. Zucko, X. Heng and K. Boris-Lawrie, *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 2022, **119**.
80. K. Boris-Lawrie, G. Singh, P. Osmer, D. Zucko, S. Staller and X. Heng, *VIRUSES-BASEL*, 2022, **14**.
81. A. Sharma, A. Yilmaz, K. Marsh, A. Cochrane and K. Boris-Lawrie, *PLOS PATHOGENS*, 2012, **8**.
82. T. Monecke, A. Dickmanns and R. Ficner, *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, 2009, **37**, 3865-3877.
83. J. Mouaikel, U. Narayanan, C. Verheggen, A. G. Matera, E. Bertrand, J. Tazi and R. Bordonné, *Embo Reports*, 2003, **4**, 616-622.
84. G. Colau, M. Thiry, V. Leduc, R. Bordonné and D. L. J. Lafontaine, *Molecular and Cellular Biology*, 2004, **24**, 7976-7986.
85. C. Girard, C. Verheggen, H. Neel, A. Cammas, S. Vagner, J. Soret, E. Bertrand and R. Bordonné, *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2008, **283**, 2060-2069.
86. A. Günzl, A. Bindereif, E. Ullu and C. Tschudi, *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, 2000, **28**, 3702-3709.
87. I. Enünlü, G. Pápai, I. Cserpán, A. Udvardy, K. Jeang and I. Boros, *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, 2003, **309**, 44-51.
88. J. Mouaikel, J. Bujnicki, J. Tazi and R. Bordonné, *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, 2003, **31**, 4899-4909.
89. S. Hausmann and S. Shuman, *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2005, **280**, 4021-4024.
90. S. Hausmann, S. Zheng, M. Costanzo, R. Brost, D. Garcin, C. Boone, S. Shuman and B. Schwer, *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2008, **283**, 31706-31718.
91. S. Hausmann, A. Ramirez, S. Schneider, B. Schwer and S. Shuman, *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, 2007, **35**, 1411-1420.
92. S. Hausmann and S. Shuman, *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2005, **280**, 32101-32106.
93. J. Ruan, E. Ullu and C. Tschudi, *MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY*, 2007, **155**, 66-69.
94. D. Zucko and K. Boris-Lawrie, *CANCER GENE THERAPY*, 2023, **30**, 1274-1284.
95. P. Maccallini, F. Bavasso, L. Scatolini, E. Bucciarelli, G. Noviello, V. Lisi, V. Palumbo, S. D'Angeli, S. Cacchione, G. Cenci, L. Ciapponi, J. Wakefield, M. Gatti and G. Raffa, *PLOS GENETICS*, 2020, **16**.
96. L. Chen, C. Roake, A. Galati, F. Bavasso, E. Micheli, I. Saggio, S. Schoeffner, S. Cacchione, M. Gatti, S. Artandi and G. Raffa, *CELL REPORTS*, 2020, **30**, 1358-+.

97. L. Chen, C. Roake, P. Maccallini, F. Bavasso, R. Dehghannasiri, P. Santonicola, N. Mendoza-Ferreira, L. Scatolini, L. Rizzuti, A. Esposito, I. Gallotta, S. Francia, S. Cacchione, A. Galati, V. Palumbo, M. Kobin, G. Tartaglia, A. Colantoni, G. Proietti, Y. Wu, M. Hammerschmidt, C. De Pittà, G. Sales, J. Salzman, L. Pellizzoni, B. Wirth, E. Di Schiavi, M. Gatti, S. Artandi and G. Raffa, *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, 2022, **50**, 12400-12424.
98. M. G. Song, Y. Li and M. Kiledjian, *Molecular Cell*, 2010, **40**, 423-432.
99. M. V. Deshmukh, B. N. Jones, D. U. Quang-Dang, J. Flinders, S. N. Floor, C. Kim, J. Jemielity, M. Kalek, E. Darzynkiewicz and J. D. Gross, *Molecular Cell*, 2008, **29**, 324-336.
100. E. van Dijk, N. Cougot, S. Meyer, S. Babajko, E. Wahle and B. Seraphin, *Embo Journal*, 2002, **21**, 6915-6924.
101. Z. R. Wang, X. F. Jiao, A. Carr-Schmid and M. Kiledjian, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, **99**, 12663-12668.
102. J. P. Wurm and R. Sprangers, *Current Opinion in Structural Biology*, 2019, **59**, 115-123.
103. L. Cohen, C. Mikhli, C. Friedman, M. Jankowska-Anyszka, J. Stepinski, E. Darzynkiewicz and R. Davis, *RNA*, 2004, **10**, 1609-1624.
104. S. Liu, X. Jiao, H. Liu, M. Gu, C. Lima and M. Kiledjian, *RNA*, 2004, **10**, 1412-1422.
105. E. Grudzien, M. Kalek, J. Jemielity, E. Darzynkiewicz and R. E. Rhoads, *Journal of Biological Chemistry*, 2006, **281**, 1857-1867.
106. Liu, H.D., et al., *The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases*. *Embo Journal*, 2002, **21**(17): p. 4699-4708.
107. Milac, A.L., E. Bojarska, and A. Wypijewska del Nogal, *Decapping Scavenger (DcpS) enzyme: Advances in its structure, activity and roles in the cap-dependent mRNA metabolism*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, 2014, **1839**(6): p. 452-462.
108. Pietrow, P., et al., *Decapping Scavenger Enzyme Activity toward N2-Substituted 5' End mRNA Cap Analogues*. *ACS OMEGA*, 2019, **4**: p. 17576-17580.
109. Shen, V., et al., *DcpS scavenger decapping enzyme can modulate pre-mRNA splicing*. *Rna*, 2008, **14**(6): p. 1132-1142.
110. M. Chrabaszczewska, M. Winiewska-Szajewska, N. Ostrowska, E. Bojarska, J. Stepinski, L. Mancewicz, M. Lukaszewicz, J. Trylska, M. Taube, M. Kozak, E. Darzynkiewicz and R. Grzela, *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, 2021, **22**.
111. R. Grzela, K. Nasilowska, M. Lukaszewicz, M. Tyras, J. Stepinski, M. Jankowska-Anyszka, E. Bojarska and E. Darzynkiewicz, *Rna*, 2018, **24**, 633-642.
112. G. W. Lu, J. Zhang, Y. Li, Z. X. Li, N. Zhang, X. Xu, T. T. Wang, Z. H. Guan, G. F. Gao and J. H. Yan, *Protein & Cell*, 2011, **2**, 64-73.
113. G. Lu, J. Zhang, Y. Li, Z. Li, N. Zhang, X. Xu, T. Wang, Z. Guan, G. Gao and J. Yan, *PROTEIN & CELL*, 2011, **2**, 64-73.
114. M. Zytek, J. Kowalska, M. Lukaszewicz, B. Wojtczak, J. Zuberek, A. Ferenc-Mrozek, E. Darzynkiewicz, A. Niedzwiecka and J. Jemielity, *ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY*, 2014, **12**, 9184-9199.
115. B. Wojtczak, M. Warminski, J. Kowalska, M. Lukaszewicz, M. Honcharenko, C. Smith, R. Strömberg, E. Darzynkiewicz and J. Jemielity, *RSC ADVANCES*, 2016, **6**, 8326-8337.
116. O'Sullivan, J., et al., *Emerging roles of eraser enzymes in the dynamic control of protein ADP-ribosylation*. *NATURE COMMUNICATIONS*, 2019, **10**.
117. B. A. Peculis, K. Reynolds and M. Cleland, *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**, 24792-24805.
118. K. Borden, B. Culjkovic-Kraljacic and V. Cowling, *CELL CYCLE*, 2021, **20**, 1347-1360.
119. M. G. Song, S. Bail and M. Kiledjian, *Rna*, 2013, **19**, 390-399.
120. S. Sharma, E. Grudzien-Nogalska, K. Hamilton, X. Jiao, J. Yang, L. Tong and M. Kiledjian, *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, 2020, **48**, 6788-6798.
121. T. Ghosh, B. Peterson, N. Tomasevic and B. Peculis, *MOLECULAR CELL*, 2004, **13**, 817-828.
122. D. MELTON, P. KRIEG, M. REBAGLIATI, T. MANIATIS, K. ZINN and M. GREEN, *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, 1984, **12**, 7035-7056.
123. I. Hoerr, R. Obst, H. Rammensee and G. Jung, *EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, 2000, **30**, 1-7.
124. V. Litvinova, A. Rudometov, L. Karpenko and A. Ilyichev, *RUSSIAN JOURNAL OF BIOORGANIC CHEMISTRY*, 2023, **49**, 220-235.
125. E. Dolgin, *NATURE*, 2021, **597**, 318-324.
126. <https://www.trilinkbiotech.com/cleancap-m6>, access date 10-2024).
127. S. Pascolo, *VIRUSES-BASEL*, 2021, **13**.
128. Y. N. Lamb, *Drugs*, 2021, **81**, 495-501.

129. U. Sahin, A. Muik, E. Derhovanessian, I. Vogler, L. Kranz, M. et al., *NATURE*, 2020, **586**, 594-+.
130. A. Vogel, I. Kanevsky, Y. Che, K. Swanson, A. Muik, et al, *NATURE*, 2021, **592**, 283-+.
131. K. Piecyk, M. Lukaszewicz, E. Darzynkiewicz and M. Jankowska-Anyszka, *RNA*, 2014, **20**, 1539-1547.
132. S. Blagden and A. Willis, *NATURE REVIEWS CLINICAL ONCOLOGY*, 2011, **8**, 280-291.
133. A. De Benedetti and J. Graff, *ONCOGENE*, 2004, **23**, 3189-3199.
134. B. Culjkovic, I. Topisirovic and K. L. B. Borden, *Cell Cycle*, 2007, **6**, 65-69.
135. B. Konicek, J. Stephens, A. McNulty, N. Robichaud, R. Peery, C. Dumstorf, M. Dowless, P. Iversen, S. Parsons, K. Ellis, D. McCann, J. Pelletier, L. Furic, J. Yingling, L. Stancato, N. Sonenberg and J. Graff, *CANCER RESEARCH*, 2011, **71**, 1849-1857.
136. X. Yang, W. Zhong and R. Cao, *CELLULAR SIGNALLING*, 2020, **73**.
137. N. Robichaud, S. del Rincon, B. Huor, T. Alain, L. Petruccelli, J. Hearnden, C. Goncalves, S. Grotegut, C. Spruck, L. Furic, O. Larsson, W. Muller, W. Miller and N. Sonenberg, *ONCOGENE*, 2015, **34**, 2032-2042.
138. A. Martinez, T. Aasen, M. Sese, B. Castellana, I. Sansano, V. Peg and S. Cajal, *LABORATORY INVESTIGATION*, 2014, **94**, 465A-465A.
139. M. Ziemniak, M. Szabelski, M. Lukaszewicz, A. Nowicka, E. Darzynkiewicz, R. E. Rhoads, Z. Wieczorek and J. Jemielity, *Rsc Advances*, 2013, **3**, 20943-20958.
140. A. Wypijewska, E. Bojarska, M. Lukaszewicz, J. Stepinski, J. Jemielity, R. Davis and E. Darzynkiewicz, *BIOCHEMISTRY*, 2012, **51**, 8003-8013.
141. M. Kalek, J. Jemielity, Z. Darzynkiewicz, E. Bojarska, J. Stepinski, R. Stolarski, R. Davis and E. Darzynkiewicz, *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY*, 2006, **14**, 3223-3230.
142. B. A. Wojtczak, P. J. Sikorski, K. Fac-Dabrowska, A. Nowicka, M. Warminski, D. Kubacka, E. Nowak, M. Nowotny, J. Kowalska and J. Jemielity, *Journal of the American Chemical Society*, 2018, **140**, 5987-5999.
143. J. Singh, M. Salcius, S. Liu, B. Staker, R. Mishra, J. Thurmond, G. Michaud, D. Mattoon, J. Printen, J. Christensen, J. Bjornsson, B. Pollok, M. Kiledjian, L. Stewart, J. Jarecki and M. Gurney, *ACS CHEMICAL BIOLOGY*, 2008, **3**, 711-722.
144. A. Lampio, T. Ahola, E. Darzynkiewicz, J. Stepinski, M. Jankowska-Anyszka and L. Kääriäinen, *ANTIVIRAL RESEARCH*, 1999, **42**, 35-46.
145. L. Hooker, R. Sully, B. Handa, N. Ono, H. Koyano and K. Klumpp, *BIOCHEMISTRY*, 2003, **42**, 6234-6240.
146. M. Jankowska-Anyszka and K. Piecyk, *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS*, 2011, **21**, 6131-6134.
147. J. Huber, U. Cronshagen, M. Kadokura, C. Marshallsay, T. Wada, M. Sekine and R. Lührmann, *EMBO JOURNAL*, 1998, **17**, 4114-4126.
148. S. A. Szczepaniak, J. Zuberek, E. Darzynkiewicz, J. Kufel and J. Jemielity, *Rna*, 2012, **18**, 1421-1432.
149. A. Strasser, A. Dickmanns, R. Lührmann and R. Ficner, *EMBO JOURNAL*, 2005, **24**, 2235-2243.
150. J. Stepinski, C. Waddell, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz and R. Rhoads, *RNA*, 2001, **7**, 1486-1495.
151. E. Grudzien-Nogalska, J. Jemielity, J. Kowalska, E. Darzynkiewicz and R. Rhoads, *RNA*, 2007, **13**, 1745-1755.
152. J. HAMM, E. DARZYNKIEWICZ, S. TAHARA and I. MATTAJ, *CELL*, 1990, **62**, 569-577.
153. C. Hales, E. Dammer, I. Diner, H. Yi, N. Seyfried, M. Gearing, J. Glass, T. Montine, A. Levey and J. Lah, *BRAIN PATHOLOGY*, 2014, **24**, 344-351.
154. I. Diner, C. Hales, I. Bishof, L. Rabenold, D. Duong, H. Yi, O. Laur, M. Gearing, J. Troncoso, M. Thambisetty, J. Lah, A. Levey and N. Seyfried, *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2014, **289**, 35296-35313.
155. G. Biamonti, A. Amato, E. Belloni, A. Di Matteo, L. Infantino, D. Pradella and C. Ghigna, *AGING CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH*, 2021, **33**, 747-758.
156. M. Farhadieh and K. Ghaedi, *FRONTIERS IN MOLECULAR NEUROSCIENCE*, 2023, **16**.
157. F. Gao, S. Almeida and R. Lopez-Gonzalez, *EMBO JOURNAL*, 2017, **36**, 2931-2950.
158. L. Zhu, J. Liu and Y. Wu, *PROGRESS IN BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*, 2012, **39**, 703-708.
159. B. Bai, C. Hales, P. Chen, Y. Gozal, E. Dammer, J. Fritz, X. Wang, Q. Xia, D. Duong, C. Street, G. Cantero, D. Cheng, D. Jones, Z. Wu, Y. Li, I. Diner, C. Heilman, H. Rees, H. Wu, L. Lin, K. Szulwach, M. Gearing, E. Mufson, D. Bennett, T. Montine, N. Seyfried, T. Wingo, Y. Sun, P. Jin, J. Hanfelt, D. Willcock, A. Levey, J. Lah and J.

- Peng, *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 2013, **110**, 16562-16567.
160. T. Kampers, P. Friedhoff, J. Biernat and E. Mandelkow, *FEBS LETTERS*, 1996, **399**, 344-349.
 161. C. Barros, D. Maia, J. dos Santos, C. Medeiros and J. de Araújo, *ANAIS BRASILEIROS DE DERMATOLOGIA*, 2016, **91**, 109-110.
 162. M. AMER, *DERMATOLOGIC CLINICS*, 1994, **12**, 713-717.
 163. K. Mott, 1996.
 164. H. Madsen and J. Stauffer, *ECOHEALTH*, 2022, **19**, 320-323.
 165. mRNA expression in normal human tissues from GTEx: <https://www.gtexportal.org/home/>, Illumina, BioGPS: <http://biogps.org/#goto=welcome>; <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SNUPN>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10073#gene-expression>, data dostęp 10-2024).
 166. Y. Yang, L. Guo, L. Chen, B. Gong, D. Jia and Q. Sun, *SIGNAL TRANSDUCTION AND TARGETED THERAPY*, 2023, **8**.
 168. J. Huber, A. Dickmanns and R. Lührmann, *JOURNAL OF CELL BIOLOGY*, 2002, **156**, 467-479.
 169. E. Paraskeva, E. Izaurralde, F. Bischoff, J. Huber, U. Kutay, E. Hartmann, R. Lührmann and D. Görlich, *JOURNAL OF CELL BIOLOGY*, 1999, **145**, 255-264.
 170. I. Palacios, M. Hetzer, S. Adam and I. Mattaj, *EMBO JOURNAL*, 1997, **16**, 6783-6792.
 171. U. Narayanan, J. Ospina and A. Matera, *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL*, 2002, **13**, 527A-528A.
 172. D. Buhler, V. Raker, R. Lührmann and U. Fischer, *HUMAN MOLECULAR GENETICS*, 1999, **8**, 2351-2357.
 173. C. Rollenhagen and N. Panté, *CANADIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY*, 2006, **84**, 367-376.
 174. C. MARSHALLSAY and R. LUHRMANN, *EMBO JOURNAL*, 1994, **13**, 222-231.
 175. <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/O95149>, data dostęp 10-2024).
 176. Kühn-Hölsken, E., et al., *Mapping the binding site of snurportin 1 on native U1 snRNP by cross-linking and mass spectrometry*. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, 2010. **38**(16): p. 5581-5593.
 177. Bahia, D., et al., *Trimethylguanosine nucleoside inhibits cross-linking between snurportin 1 and m3G-capped U1 snRNA*. *NUCLEOSIDES NUCLEOTIDES & NUCLEIC ACIDS*, 2006. **25**(8): p. 909-923.
 178. W. Malgorzata, Doctoral thesis, 2017.
 179. J. Fang and F. Beland, *CANCER LETTERS*, 2000, **153**, 25-33.
 180. <https://thebiogrid.org/115384>, data dostęp 10-2024).
 181. K. Kirli, S. Karaca, H. Dehne, M. Samwer, K. Pan, C. Lenz, H. Urlaub and D. Görlich, *ELIFE*, 2015, **4**.
 182. C. Zhao, S. Mahboobi, R. Moussavi-Baygi and M. Mofrad, *PLOS ONE*, 2014, **9**.
 183. X. Dong, A. Biswas and Y. Chook, *NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY*, 2009, **16**, 558-560.
 184. X. Dong, A. Biswas, K. Süel, L. Jackson, R. Martinez, H. Gu and Y. Chook, *NATURE*, 2009, **458**, 1136-U1171.
 185. A. Vichas, A. Riley, N. Nkinsi, S. Kamlapurkar, P. Parrish, A. Lo, F. Duke, J. Chen, I. Fung, J. Watson, M. Rees, A. Gabel, J. Thomas, R. Bradley, J. Lee, E. Hatch, M. Baine, N. Rekhtman, M. Ladanyi, F. Piccioni and A. Berger, *NATURE COMMUNICATIONS*, 2021, **12**.
 186. M. Hein, N. Hubner, I. Poser, J. Cox, N. Nagaraj, Y. Toyoda, I. Gak, I. Weisswange, J. Mansfeld, F. Buchholz, A. Hyman and M. Mann, *CELL*, 2015, **163**, 712-723.
 187. U. Stelzl, U. Worm, M. Lalowski, C. Haenig, F. Brembeck, H. Goehler, M. Stroedicke, M. Zenkner, A. Schoenherr, S. Koeppen, J. Timm, S. Mintzlaff, C. Abraham, N. Bock, S. Kietzmann, A. Goedde, E. Toksöz, A. Droege, S. Krobitsch, B. Korn, W. Birchmeier, H. Lehrach and E. Wanker, *CELL*, 2005, **122**, 957-968.
 188. M. Nashabat, N. Nabavizadeh, H. Saraçoğlu, B. Saribas, S. Avcı, E. Börklü, E. Beillard, E. Yılmaz, S. Uygur, C. Kayhan, L. Bosco, Z. Eren, K. Steindl, M. Richter, G. Bademci, A. Rauch, Z. Fattahi, M. Valentino, A. Connolly, A. Bahr, L. Viola, A. Bergmann, M. Rocha, L. Peart, D. Castro-Rojas, E. Buelmann, S. Khan, M. Giarrana, R. Teleanu, J. Gonzalez, A. Pini, I. Schädlich, K. Vill, M. Brugger, S. Zuchner, A. Pinto, S. Donkervoort, S. Bivona, A. Riza, I. Streata, D. Glaeser, C. Baquero-Montoya, N. Garcia-Restrepo, U. Kotzaeridou, T. Brunet, D. Epure, A. Bertoli-Avella, A. Kariminejad, M. Tekin, S. von Hardenberg, C. Boennemann, G. Stettner, G. Zanni, H. Kayserili, Z. Oflazer and N. Escande-Beillard, *NATURE COMMUNICATIONS*, 2024, **15**.
 189. S. Rossi, V. Rompietti, Y. Antonucci, D. Giovannini, C. Scopa, S. Scaricamazza, R. Scardigli, G. Cestra, A. Serafino, M. Carri, N. D'Ambrosi and M. Cozzolino, *NEUROBIOLOGY OF DISEASE*, 2020, **138**.

190. J. Mandrioli, L. Mediani, S. Alberti and S. Carra, *SEMINARS IN CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY*, 2020, **99**, 183-192.
191. K. T. and W. P., *BMC Proc.*, 2015, **9**, 257-261.
192. G. Becchio, *JOURNAL OF ECONOMIC METHODOLOGY*, 2019, **26**, 259-271.
193. S. Yin, R. Lopez-Gonzalez, R. Kunz, J. Gangopadhyay, C. Borufka, S. Gygi, F. Gao and R. Reed, *CELL REPORTS*, 2017, **19**, 2244-2256.
194. V. Gerbino, M. Carri, M. Cozzolino and T. Achsel, *NEUROBIOLOGY OF DISEASE*, 2013, **55**, 120-128.
195. P. Iruzubietta, A. Damborenea, M. Ioghen, S. Bajew, R. Fernandez-Torrón, A. Töpf, A. Herrero-Reiriz, D. Epure, K. Vill, A. Hernández-Laín, M. Manterola, M. Azkargorta, O. Pikatza-Menoio, L. Pérez-Fernandez, M. García-Puga, G. Gaina, A. Bastian, I. Streat, M. Walter, W. Müller-Felber, S. Thiele, S. Moragón, N. Bastida-Lertxundi, A. López-Cortajarena, F. Elortza, G. Gereñu, S. Alonso-Martin, V. Straub, D. de Sancho, R. Teleanu, A. de Munain and L. Blázquez, *BRAIN*, 2024.
196. A. Doody, L. Alfano, J. Diaz-Manera, L. Lowes, T. Mozaffar, K. Mathews, C. Weihl, M. Wicklund, M. Hung, J. Statland, N. Johnson and G.-L. Consortium, *BMC NEUROLOGY*, 2024, **24**.
197. Shruthi Mohan, Shannon McNulty, Courtney Thaxton, Marwa Elnagheeb, Emma Owens, May Flowers, Teagan Nunnery, Autumn Self, Brooke Palus, Svetlana Gorokhova, April Kennedy, Zhiyiv Niu, Mridul Johari, Alassane Baneye Maiga, Kelly Macalalad, Amanda R. Clause, Jacques S. Beckmann, Lucas Bronicki, Sandra T. Cooper, Vijay S. Ganesh, Peter B. Kang, Akanchha Kesari, Monkol Lek, Jennifer Levy, Laura Rufibach, Marco Savarese, Melissa J. Spencer, V. Straub, G. Tasca and C. C. Weihl, *Journal*, 2024.
198. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/O95149/variant-viewer>, data dostęp 10-2024).
199. L. Hao, X. Shang, Y. Wu, J. Chen and S. Chen, *BIOMOLECULES*, 2023, **13**.
200. Y. Xiong, T. Wang, W. Wang, Y. Zhang, F. Zhang, J. Yuan, F. Qin and X. Wang, *HELIYON*, 2024, **10**.
201. J. Zhang, D. Dutta, A. Köttgen, A. Tin, P. Schlosser, M. Grams, B. Harvey, B. Yu, E. Boerwinkle, J. Coresh, N. Chatterjee and C. Consortium, *NATURE GENETICS*, 2022, **54**, 593-+.
202. B. Nachmias and A. Schimmer, *LEUKEMIA*, 2020, **34**, 2875-2886.
203. A. Azmi, M. Uddin and R. Mohammad, *NATURE REVIEWS CLINICAL ONCOLOGY*, 2021, **18**, 152-169.
204. C. Lu, J. Figueroa, Z. Liu, V. Konala, A. Aulakh, R. Verma, E. Cobos, M. Chiriva-Internati and W. Gao, *CURRENT CANCER DRUG TARGETS*, 2015, **15**, 575-592.
205. H. Wang, X. Teng, Y. Lin, C. Jiang, X. Chen and Y. Zhang, *DISCOVER ONCOLOGY*, 2023, **14**.
206. A. Mahipal and M. Malafa, *PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS*, 2016, **164**, 135-143.
207. J. Etchin, A. Berezovskaya, A. Conway, I. Galinsky, R. Stone, E. Baloglu, W. Senapedis, Y. Landesman, M. Kauffman, S. Shacham, J. Wang and A. Look, *LEUKEMIA*, 2017, **31**, 143-150.
208. J. Etchin, T. Sanda, M. Mansour, A. Kentsis, J. Montero, B. Le, A. Christie, D. McCauley, S. Rodig, M. Kauffman, S. Shacham, R. Stone, A. Letai, A. Kung and A. Look, *BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY*, 2013, **161**, 117-127.
209. J. Janssen, B. Löwenberg, M. Manz, B. Biemond, P. Westerweel, S. Klein, M. Fehr, H. Sinnige, A. Efthymiou, M. Legdeur, T. Pabst, M. Gregor, M. van der Poel, D. Deeren, L. Tick, M. Jongen-Lavrencic, F. van Obbergh, R. Boersma, O. de Weerd, Y. Chalandon, D. Heim, O. Spertini, G. van Sluis, C. Graux, G. Stüssi, Y. van Norden and G. Ossenkoppele, *LEUKEMIA*, 2022, **36**, 2189-2195.
210. K. Sakakibara, N. Saito, T. Sato, A. Suzuki, Y. Hasegawa, J. Friedman, D. Kufe, D. VonHoff, T. Iwami and T. Kawabe, *BLOOD*, 2011, **118**, 3922-3931.
211. X. Tian, J. Gao, M. Liu, Y. Lei, F. Wang, J. Chen, P. Chu, J. Gao, F. Long, M. Liang, X. Long, H. Chu, C. Liu, X. Li, Q. Sun, G. Li and Y. Yang, *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*, 2020, **63**, 3881-3895.
212. S. Sasaki, G. Drummén and G. Konishi, *JOURNAL OF MATERIALS CHEMISTRY C*, 2016, **4**, 2731-2743.
213. M. Baranov, K. Lukyanov and I. Yampolsky, *RUSSIAN JOURNAL OF BIOORGANIC CHEMISTRY*, 2013, **39**, 223-244.
214. I. Yampolsky, T. Balashova and K. Lukyanov, *BIOCHEMISTRY*, 2009, **48**, 8077-8082.
215. A. Baldrige, J. Kowalik and L. M. Tolbert, *Synthesis-Stuttgart*, 2010, 2424-2436.
215. Scheuer, K., et al., *Cortical NMDA receptor properties and membrane fluidity are altered in Alzheimer's disease*. *DEMENTIA*, 1996. **7**(4): p. 210-214.
216. M. Ikejiri, M. Tsuchino, Y. Chihara, T. Yamaguchi, T. Imanishi, S. Obika and K.

- Miyashita, *ORGANIC LETTERS*, 2012, **14**, 4406-4409.
217. A. Baldridge, K. Solntsev, C. Song, T. Tanioka, J. Kowalik, K. Hardcastle and L. Tolbert, *CHEMICAL COMMUNICATIONS*, 2010, **46**, 5686-5688.
 218. X. Gong, H. Yang, H. Liu, Y. Jiang, Y. Zhao and H. Fu, *ORGANIC LETTERS*, 2010, **12**, 3128-3131.
 219. M. Baranov, K. Solntsev, K. Lukyanov and I. Yampolsky, *CHEMICAL COMMUNICATIONS*, 2013, **49**, 5778-5780.
 220. R. Saito, M. Hoshi, A. Kato, C. Ishikawa and T. Komatsu, *EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*, 2017, **125**, 965-974.
 221. H. Niwa, S. Inouye, T. Hirano, T. Matsuno, S. Kojima, M. Kubota, M. Ohashi and F. Tsuji, *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 1996, **93**, 13617-13622.
 222. M. Hashimoto, M. Matsumoto and S. Terashima, *TETRAHEDRON*, 2003, **59**, 3041-3062.
 223. Ritter, T., Kværno, L., Werder, M., Hauser, H., and Carreira, E.M., *Org. Biomol. Chem.*, 2005, **3**, p. 3514-3523.
 224. Takacs, E., Berente, Z., Hada, V., Maho, S., Kollar, L. and Skoda Foldes, R., *Tetrahedron*, 2009, **65**, p. 4659-4663.
 225. O'Brien, J.L. and Niemann, C., *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, p. 80-85.
 226. Mauldin, S.C., Hornback, W.J., and Munroe, J.E., *J. Chem. Soc. PT1*, 2001, **13**, p. 1554-1558.
 227. Ward, D.E., Vazquez, A., and Soledade, M.C., *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, p. 1657-1666.
 228. M. Gelmi, F. Clerici and A. Melis, *TETRAHEDRON*, 1997, **53**, 1843-1854.
 229. Y. Wang, D. Shi, Z. Lu and G. Dai, *SYNTHETIC COMMUNICATIONS*, 2000, **30**, 707-712.
 230. R. KIYAMA, T. HONMA, K. HAYASHI, M. OGAWA, M. HARA, M. FUJIMOTO and T. FUJISHITA, *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*, 1995, **38**, 2728-2741.
 231. J. CORNFORTH and M. DU, *JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY-PERKIN TRANSACTIONS 1*, 1990, 1459-1462.
 232. A. Boruah, P. Baruah and J. Sandhu, *JOURNAL OF CHEMICAL RESEARCH*, 1998, 614-615.
 233. M. Kidwai and R. Kumar, *ORGANIC PREPARATIONS AND PROCEDURES INTERNATIONAL*, 1998, **30**, 451-453.
 234. P. W. H., *J. Chem. Soc.*, 1868, **21**, 181-186.
 235. C. Petchprapunkul, 2016.
 236. D. CABARET, J. LIU and M. WAKSELMAN, *SYNTHESIS-STUTTGART*, 1994, 480-482.
 237. A. Melhado, M. Luparia and F. Toste, *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, 2007, **129**, 12638-+.
 238. E. J. Erlenmeyer, *Justus Lieb. Ann. der Chem*, 1893, **275**, 1-8.
 239. T. Stafforst and U. Diederichsen, *EUROPEAN JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY*, 2007, **2007**, 899-911.
 240. M. Petersen, P. Riber, L. Andersen and M. Nielsen, *SYNTHESIS-STUTTGART*, 2007, 3635-3638.
 241. C. CATIVIELA, J. CHUECA, J. GARCIA and E. MELENDEZ, *HETEROCYCLES*, 1984, **22**, 2775-2781.
 242. K. T. Pradeer, *Synthesis*, 1985, **3**, 285-288.
 243. X. He, A. Bell and P. Tonge, *ORGANIC LETTERS*, 2002, **4**, 1523-1526.
 244. B. Prüger and T. Bach, *SYNTHESIS-STUTTGART*, 2007, 1103-1106.
 245. K. Chen, Y. Cheng, C. Lai, C. Hsu, M. Ho, G. Lee and P. Chou, *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, 2007, **129**, 4534-+.
 246. P. Bhatt, D. Wadia, R. Patel and P. Patel, *HETEROCYCLIC COMMUNICATIONS*, 2006, **12**, 79-82.
 247. C. Lee, Y. Chen, H. Lin, Y. Jhong, C. Chang, C. Tsai, C. Kao and T. Chien, *TETRAHEDRON*, 2012, **68**, 5898-5907.
 248. J. Yang, G. Huang, Y. Liu and S. Peng, *CHEMICAL COMMUNICATIONS*, 2008, 1344-1346.
 249. J. Yin, M. Peng and W. Lin, *ANALYTICAL CHEMISTRY*, 2019, **91**, 8415-8421.
 250. Chang, C., et al., *Hemorheological mechanisms in Alzheimer's disease. MICROCIRCULATION*, 2007. **14**(6): p. 627-634.
 251. Zhu, D., et al., *Role of membrane biophysics in Alzheimer's related cell pathways. FRONTIERS IN NEUROSCIENCE*, 2015. **9**.
 252. SCOTT, R., J. COLLINS, and P. HUNT, *ALZHEIMERS-DISEASE AND DOWN-SYNDROME - LEUKOCYTE MEMBRANE FLUIDITY ALTERATIONS. MECHANISMS OF AGEING AND DEVELOPMENT*, 1994. **75**(1): p. 1-10.
 253. VANRENSBURG, S., et al., *MEMBRANE FLUIDITY OF PLATELETS AND ERYTHROCYTES IN PATIENTS WITH ALZHEIMERS-DISEASE AND THE EFFECT OF SMALL AMOUNTS OF ALUMINUM ON PLATELET AND ERYTHROCYTE-MEMBRANES. NEUROCHEMICAL RESEARCH*, 1992. **17**(8): p. 825-829.

254. M. Kubánková, P. Summers, I. López-Duarte, D. Kiryushko and M. Kuimova, *ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES*, 2019, **11**, 36307-36315.
255. L. Zhu, M. Fu, B. Yin, L. Wang, Y. Chen and Q. Zhu, *DYES AND PIGMENTS*, 2020, **172**.
256. Y. Sun, J. Phipps, D. Elson, H. Stoy, S. Tinling, J. Meier, B. Poirier, F. Chuang, D. Farwell and L. Marcu, *OPTICS LETTERS*, 2009, **34**, 2081-2083.
257. Z. Wang, Y. Zheng, D. Zhao, Z. Zhao, L. Liu, A. Pliss, F. Zhu, J. Liu, J. Qu and P. Luan, *JOURNAL OF INNOVATIVE OPTICAL HEALTH SCIENCES*, 2018, **11**.
258. Y. He, J. Shin, W. Gong, P. Das, J. Qu, Z. Yang, W. Liu, C. Kang, J. Qu and J. Kim, *CHEMICAL COMMUNICATIONS*, 2019, **55**, 2453-2456.
259. U. Wenge and H. Wagenknecht, *SYNTHESIS-STUTTGART*, 2011, 502-508.
260. J. Riedl, P. Menova, R. Pohl, P. Orsag, M. Fojta and M. Hocek, *Journal of Organic Chemistry*, 2012, **77**, 8287-8293.
261. D. Dziuba, R. Pohl and M. Hocek, *CHEMICAL COMMUNICATIONS*, 2015, **51**, 4880-4882.
262. W. Yu, T. Wu, C. Huang, I. Chen and K. Tan, *CHEMICAL SCIENCE*, 2016, **7**, 301-307.
263. M. YOSHIKAWA, T. KATO and T. TAKENISHI, *TETRAHEDRON LETTERS*, 1967, 5065-+.
264. Baranowski, M.R., et al., *A fluorescent HTS assay for phosphohydrolases based on nucleoside 5'-fluorophosphates: its application in screening for inhibitors of mRNA decapping scavenger and PDE-I*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2016. **14**(20): p. 4595-4604.
264. T. Mukaiyama and M. Hashimoto, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1971, **44**, 2284-+.
265. M. Warminski, Z. Warminska, J. Kowalska and J. Jemielity, *European Journal of Organic Chemistry*, 2015, **2015**, 6153-6169.
266. M. Kopcjal, B. A. Wojtczak, R. Kasprzyk, J. Kowalska and J. Jemielity, *Molecules*, 2019, **24**, 17.
267. J. Sutharsan, D. Lichlyter, N. Wright, M. Dakanali, M. Haidekker and E. Theodorakis, *TETRAHEDRON*, 2010, **66**, 2582-2588.
269. Baldrige, A., J. Kowalik, and L. Tolbert, *Efficient Synthesis of New 4-Arylideneimidazolin-5-ones Related to the GFP Chromophore by 2+3 Cyclocondensation of Arylideneimines with Imidate Ylides*. *SYNTHESIS-STUTTGART*, 2010(14): p. 2424-2436.
270. Haidekker, M.A. and E.A. Theodorakis, *Molecular rotors - fluorescent biosensors for viscosity and flow*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2007. **5**(11): p. 1669-1678.
271. Maskevich, A.A., et al., *Spectral properties of thioflavin t in solvents with different dielectric properties and in a fibril-incorporated form*. *Journal of Proteome Research*, 2007. **6**(4): p. 1392-1401.
272. Haidekker, M. and E. Theodorakis, *Environment-sensitive behavior of fluorescent molecular rotors*. *Journal of biological engineering*, 2010. **4**.
273. Sutharsan, J., et al., *Molecular rotors: synthesis and evaluation as viscosity sensors*. *TETRAHEDRON*, 2010. **66**: p. 2582-2588.
274. Surynt, P., et al., *Trimethylguanosine cap-fluorescent molecular rotor (TMG-FMR) conjugates are potent, specific snurportin1 ligands enabling visualization in living cells*. *ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY*, 2024. **22**(33): p. 6763-6790.
275. Paige, J., K. Wu, and S. Jaffrey, *RNA Mimics of Green Fluorescent Protein*. *SCIENCE*, 2011. **333**(6042): p. 642-646.
276. Goh, W.L., et al., *Molecular Rotors As Conditionally Fluorescent Labels for Rapid Detection of Biomolecular Interactions*. *Journal of the American Chemical Society*, 2014. **136**(17): p. 6159-6162.
277. Haidekker, M.A., et al., *New fluorescent probes for the measurement of cell membrane viscosity*. *Chemistry & Biology*, 2001. **8**(2): p. 123-131.
278. Lee, S.C., et al., *Fluorescent Molecular Rotors for Viscosity Sensors*. *Chemistry-a European Journal*, 2018. **24**(52): p. 13706-13718.
279. K. Kwapiszewska, T. Kalwarczyk, B. Michalska, K. Szczepanski, J. Szymanski, P. Patalas-Krawczyk, T. Andryszewski, M. Iwan, J. Duszynski and R. Holyst, *SCIENTIFIC REPORTS*, 2019, **9**.
280. G. Bubak, K. Kwapiszewska, T. Kalwarczyk, K. Bielec, T. Andryszewski, M. Iwan, S. Bubak and R. Holyst, *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY LETTERS*, 2021, **12**, 294-301.
281. A. Wypijewska, E. Bojarska, J. Stepinski, M. Jankowska-Anyszka, J. Jemielity, R. Davis and E. Darzynkiewicz, *FEBS JOURNAL*, 2010, **277**, 3003-3013.
282. M. Warminski, E. Trepkowska, M. Smietanski, P. Sikorski, M. Baranowski, M. Bednarczyk, H. Kedzierska, B. Majewski, A. Mamot, D. Papiernik, A. Popielec, R.

- Serwa, B. Shimanski, P. Sklepiewicz, M. Sklucka, O. Sokolowska, T. Spiewla, D. Toczydlowska-Socha, Z. Warminska, K. Wolosewicz, J. Zuberek, J. Mugridge, D. Nowis, J. Golab, J. Jemielity and J. Kowalska, *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, 2024, **146**, 8149-8163.
283. T. Kalwarczyk, M. Tabaka and R. Holyst, *BIOINFORMATICS*, 2012, **28**, 2971-2978.
284. A. Niedzwiecka, J. Marcotrigiano, J. Stepinski, M. Jankowska-Anyszka, A. Wyslouch-Cieszyńska, M. Dadlez, A. C. Gingras, P. Mak, E. Darzynkiewicz, N. Sonenberg, S. K. Burley and R. Stolarski, *Journal of Molecular Biology*, 2002, **319**, 615-635

Tab. A1 Wartości stałych dysocjacji (K_D) oraz Energii Swobodnej Gibbsa (ΔG) dla kompleksów różnych ligandów (analogi TMG kapu bez FMR, koniug. FMR bez TMG kapu, analogi TMG kapu-FMR) ze snurportyną

<i>TMG kapowane analogi bez i z linkerami z grupą azydkową lub propargilową lub triazolem bez FMR</i>					
Skrót związku	K_D (nM)		Powtórzenia	ΔG (kJ/mol)	
	Wartość	Błąd pom.	n =	Wartość	Błąd pom.
TMGpppG	1310,8	163,5	4	-33,38	0,16
TMGppCH ₂ pG	1315,8	17,3	[a]	-32,97	0,03
TMGpCH ₂ ppG	2564,1	65,7	[a]	-31,35	0,06
TMGppNHpG	714,3	51,0	[a]	-34,46	0,17
TMGpNHppG	1250,0	31,3	[a]	-33,10	0,06
TMGpppA	5263,2	277,0	[a]	-29,59	0,13
TMGpppSG	1305,8	120,2	3	-33,00	0,22
TMGSpppG	180,2	11,5	3	-37,81	0,02
TMGpppsG D1	434,8	3,8	[a]	-35,67	0,02
TMGpppsG D2	769,2	5,9	[a]	-34,28	0,02
TMGppsG D1	833,3	69,4	[a]	-34,08	0,20
TMGppsG D2	714,3	10,2	[a]	-34,46	0,03
TMGppppG	416,7	6,9	[a]	-35,77	0,04
TMGpppA _m U _m A	229,9	1,1	[b]	-37,22	0,01
TMGpppG-2'-O-L-CH ₂ CH ₂ N ₃	1113,0	76,9	3	-33,46	0,10
TMGpppG-3'-O-L-CH ₂ CH ₂ N ₃	875,8	72,7	3	-34,10	0,10
TMGSpppG-2'-O-L-CH ₂ CH ₂ N ₃	147,9	12,0	3	-38,29	0,20
TMGSpppG-3'-O-L-CH ₂ CH ₂ N ₃	257,4	20,7	3	-36,94	0,19
TMGppCH ₂ pG-2'-O-L-CH ₂ CH ₂ N ₃	681,1	32,0	3	-34,67	0,14
TMGppCH ₂ pG-3'-O-L-CH ₂ CH ₂ N ₃	780,3	137,3	2	-35,18	0,14
TMGpppA-2'-O-L-CH ₂ CH ₂ N ₃	1287,3	231,3	3	-33,18	0,51
TMGpppA-3'-O-L-CH ₂ CH ₂ N ₃	16154,1	31913,4	3	-29,32	1,88
TMGppppG-2'-O-L-CH ₂ CH ₂ N ₃	154,37	5,56	4	-37,39	0,52
TMGppppG-3'-O-L-CH ₂ CH ₂ N ₃	271,6	18,0	3	-36,12	0,53
TMGppppA-2'-O-L-CH ₂ CH ₂ N ₃	155,2	23,2	3	-36,65	0,44
TMGppppA-3'-O-L-CH ₂ CH ₂ N ₃	342,8	20,4	3	-35,51	0,19
TMGpppSG-2'-O-L-pgyl	548,2	129,4	3	-35,10	0,59
TMGpppSG-3'-O-L-pgyl	608,6	18,7	3	-34,84	0,07
TMGpppG-N1-pgyl	brak wiązania		2	brak	brak
TMG(-2'-O-L-CH ₂ CH ₂ N ₃)pppG	brak powtarzalności		4	brak	brak
TMG(-3'-O-L-CH ₂ CH ₂ N ₃)pppG	923,6	147,8	4	-34,81	0,10
TMGpppA _m U _m A-2'-O-L-CH ₂ CH ₂ N ₃	211,2	9,9	3	-37,42	0,11
TMGpppA _m U _m A-3'-O-L-CH ₂ CH ₂ N ₃	205,8	14,1	3	-37,49	0,17
TMGpppG-2'-O-L1-OH	613,4	32,3	3	-34,83	0,13
TMGpppG-2'-O-L1-CH ₂ CH ₂ OH	494,2	40,7	2	-35,36	0,20

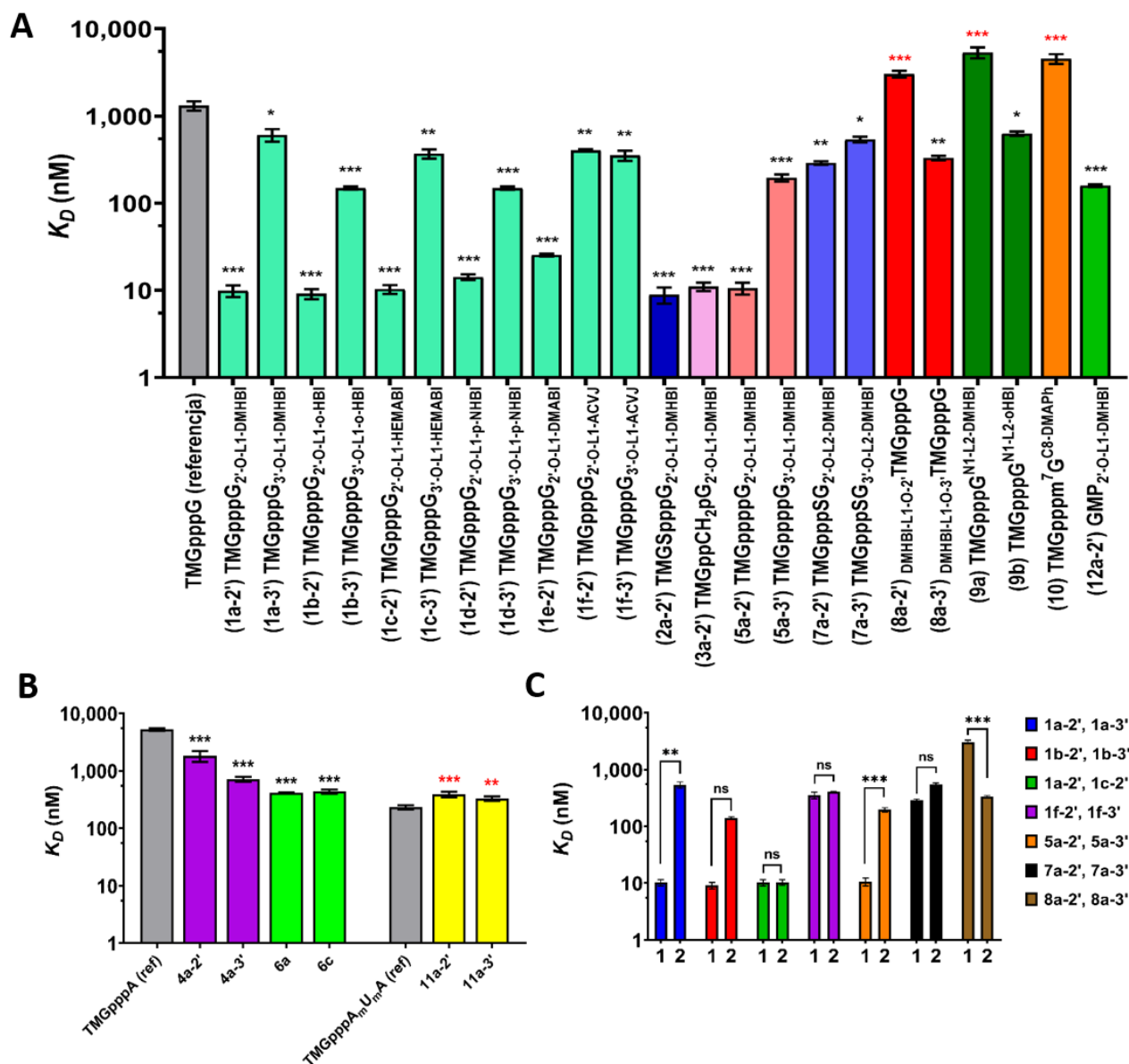
L= -C(O)NH- ; pgyl = -CH₂CCH- ; L1 = -C(O)NH-CH₂CH₂-triazole-4-yl-CH₂-

Tab. A1 Ciąg dalszy...

Koniugaty z FMR nie zawierające TMG kapu					
Skrót związku	K _D (nM)		Powtórzenia	ΔG (kJ/mol)	
	Wartość	Błąd pom	n =	Wartość	Błąd pom
GMP _{2'-O-L1-DMHBI}	159,3	5,6	3	-38,11	0,09
GMP _{3'-O-L1-DMHBI}	NA		1	brak	brak
GMP _{2'-O-L1-oHBI}	105,3	10,5	1	-39,13	0,24
GMP _{3'-O-L1-oHBI}	14925,4	1901,8	2	-28,61	0,27
GMP _{2'-O-L1-pNHBI}	157,8	5,0	2	-38,14	0,08
GMP _{3'-O-L1-pNHBI}	2379,8	512,3	1	-31,53	0,53
GMP _{2'-O-L1-HEMABI}	182,1	11,9	3	-37,78	0,16
GMP _{3'-O-L1-HEMABI}	1007,0	46,2	1	-33,61	0,11
GMP _{2'-O-L1-ACVJ}	28571,4	4081,6	1	-25,48	0,35
GMP _{3'-O-L1-ACVJ}	bd.		0	brak	brak
GMP _{2'-O-L2-oHBI}	>10000	>10000	1	brak	brak
GMP _{3'-O-L2-oHBI}	>10000	>10000	1	brak	brak
DMHBI-L1-2'-O GpppG _{2'-O-L1-DMHBI}	2066,1	106,7	1	-31,87	0,12
N3CH2CH2-L-3'-O GpppG _{2'-O-L1-DMHBI}	40,19	3,7	1	-41,46	0,23
DMHBI-L1-3'-O GpppG _{2'-O-L1-DMHBI}	32,3	1,8	1	-41,99	0,13
MMGpppG _{2'-O-L1-oHBI}	10,7	7,3	2	-44,68	2,03
MMGpppG _{3'-O-L1-oHBI}	130,9	16,3	1	-38,59	0,30
MMGSpppG _{2'-O-L1-DMHBI}	25,2	2,2	3	-42,60	0,21
MMGSpppG _{3'-O-L1-DMHBI}	9628,3	1189,4	1	-28,12	0,30
MMGSpppG _{2'-O-L1-oHBI}	22,2	1,9	3	-42,91	0,21
MMGSpppG _{3'-O-L1-oHBI}	2127,7	316,9	1	-31,80	0,37
MMGSpppG _{2'-O-L1-HEMABI}	19,46	1,04	3	-43,23	0,13
MMGSpppG _{3'-O-L1-HEMABI}	27777,8	5401,2	2	-25,54	0,48
p-CH₂-L1-DMHBI	>10000	>10000	2	brak	brak
p-CH₂-L1-oHBI	>10000	>10000	1	brak	brak
p-CH₂-L1-HEMABI	9434,0	1513,0	2	brak	brak
p-CH₂-L1-ACVJ	Bd.		0	brak	brak
p-CH₂-L1-DMABI	Bd.		0	brak	brak

L1 = -C(O)NH-CH₂CH₂-triazole-4-yl-CH₂- ; L2 = -C(O)NH-CH₂-triazole-1-yl-CH₂CH₂ ; p = fosforan ;
bd = brak danych ; nieaplikowalne = brak dobrego dopasowania/niespełnione kryteria akceptacji

Dane uzyskane z eksperymentów FQT dla kompleksów koniugatów TMG kap-FMR i snurportyny poddałem dwustronnemu testowi ANOVA z analizą post-hoc (Tukey'a) w którym kolumny stanowią kolejne związki a wiersze- cząstkowe wyniki K_D <FQT> oraz obliczyłem wartości p i poziom istotności statystycznej (rys. A1.). Wyniki potwierdziły wysoki poziom istotności dla koniugatów z GFP-podobnymi FMR w poz. 2'-Guo. Test potwierdził również wysoki poziom istotności dla pochodnych modyfikowanych (2a, 3a, 5c) i mniejszy lub brak dla analogów 7a oraz 8a-3', zaś wyniki uzyskane dla 8a-2' i 9a wykazały wysoki poziom istotności, ale zmiany są destabilizujące względem referencji (czerwony).



Rys. A1. Porównanie istotności statystycznej (test dwustronny ANOVA, porównanie multipleksowe Tukey'a) wartości zmierzonych K_D wybranych TMG kapowanych ligandów do snurportyny względem referencji: A. TMGpppG, B. TMGpppA i TMGpppAmUmA oraz C. porównanie K_D do snurportyny między regioizomerami; oznaczono kolorem czerwonym gwiazdki dla zmian destabilizujących kompleksy (zwiększających K_D względem referencji)

Wysoki poziom istotności (***) uzyskałem również dla dinukleotydowych analogów adenozynowych (panel B), chociaż tutaj trzeba zaznaczyć, że są to mniejsze zmiany niż w przypadku guanozy-

nowych **1a-e-2'** oraz w przypadku tetramerowych analogów zmiany są nieznaczące statystycznie. Test potwierdził również brak istotności w przypadku zmiany rodzaju FMR typu **a-e** oraz brak między regioizomerami 2'/3' (panel C). Wykonałem również test z korekcją na odsetek fałszywych odkryć (FDR) wg procedury dwuetapowej Benjamini, Kriegera i Yekutieli'ego i nie wykazał on dla badanych porównań odkryć fałszywych (przy minimalnej istotności statystycznej = *, wynik 'ns' (nieznaczący statystycznie) dał braku odkrycia w tym teście)

Metodologia:

Wybrane otrzymane z pomiarów FQT wartości stałych dysocjacji ligand-snurportyna ($n=3-4$) poddałem w pierwszej kolejności testowi Wilka-Shapiro i wykazał on, że dla wszystkich danych cząstkowych K_D rozkład jest normalny (warunek do testu parametrycznego ANOVA). Następnie dane poddałem dwustronnemu testowi ANOVA (GraphPad Prism, v. 8.0.1) z wieloskładnikową analizą post-hoc Tukey'a. Test ten oparty jest na ogólnym modelu liniowym sumy reszt. Związki podzieliłem na grupy wg kolejnych związków **1-11a-f** oraz porównałem średnie wartości K_D koniugatów TMG kap-FMR ze średnim K_D referencji (TMGpppG dla **1a-f, 2-3, 5, 7, 8, 9a-2'/3'** oraz **10**; TMGpppA dla **4c, 6a, 6c**; TMGpppA_mU_mA dla **11a-2', 11a-3'**) oraz wyniki między regioizomerami 2' i 3'. Każda wartość p została skorygowana w celu uwzględnienia wielokrotnych porównań i przedziałem ufności 0,05 (95%) a wyniki poddałem również weryfikacji celem identyfikacji odkryć fałszywych (FDR) wg procedury dwuetapowej Benjamini, Kriegera i Yekutieli'ego, która takich nie wykazała.

Wartości p reprezentują prawdopodobieństwo z jakim przy założeniu prawdziwości hipotezy zerowej można zaobserwować taki wynik w swoim badaniu (lub bardziej ekstremalny) oraz są podzielone na (standardowo przyjęte dla $\alpha=0,05$) przedziały i oznaczają odpowiednio:

- 1) $< 0,0001 = ****$, ekstremalnie znaczący
0,0001 do 0,001 = $***$, ekstremalnie znaczący
- 2) 0,001 do 0,01 = $**$, bardzo znaczący
- 3) $> \text{lub} = 0,05 = *$, znaczący

Jeśli wartość p jest mniejsza od progu (0,05), oznacza że można „odrzuć” hipotezę zerową i że różnica jest statystycznie istotna. Jeśli wartość p jest większa od progu, oznacza to że nie można odrzucić hipotezy zerowej i że różnica jest statystycznie nieistotna (nie ma wystarczających dowodów, aby odrzucić hipotezę zerową).

Hipoteza zerowa testu dwukierunkowego ANOVA zakłada, że nie ma interakcji między kolumnami (zestawami danych) i wierszami. Dokładniej, stwierdza, że wszelkie różnice systematyczne między kolumnami są takie same dla każdego wiersza i że wszelkie różnice systematyczne między wierszami są takie same dla każdej kolumny. Wynik testu umożliwia określenie w jaki sposób uzyskana odpowiedź jest dotknięta dwoma wybranymi przy tworzeniu podziału czynnikami. W tym teście czynnik wierszy stanowią kolejne wyniki stałych dysocjacji K_D (oczekiwany brak wpływu) a czynnik kolumny różnorodnie modyfikowane struktury nukleotydowe TMG kapu-FMR i/lub różne rodzaje FMR (oczekiwany silny wpływ).

Tab. A2. Porównanie odpowiedzi koniugatów z różnymi FMR obliczone różnymi metodami (A, B, C)

Koniugaty z DMHBI (wzbudzone $\lambda_{exc} = 390$ nm (biały) lub 490 nm (niebieski))		A. Obliczone z całek z całego zakresu widma	B. Obliczone na podstawie intensywności dla wybranej długości fali	Jaka to długość fali (nm)	C. Obliczone na podstawie intensywności dla różnych długości fali
GMP	GMP-2'-O-link-DMHBI_390	9,44	29,66	549	23,10
	GMP-2'-O-link-DMHBI_490	10,18	10,57	545	10,37
	GMP-3'-O-link-DMHBI_390	1,06	1,16	531	1,15
	GMP-3'-O-link-DMHBI_490	2,15	2,16	548	2,09
	GTP-2'-O-link-DMHBI_390	4,46	11,51	546	8,73
	GTP-2'-O-link-DMHBI_490	9,05	9,77	544	9,75
TMG kapowane	TMGpppG-2'-O-link-DMHBI_390	3,74	7,29	541	6,61
	TMGpppG-2'-O-link-DMHBI_490	11,10	11,34	545	11,33
	TMGpppG-3'-O-link-DMHBI_390	1,27	2,53	533	2,42
	TMGpppG-3'-O-link-DMHBI_490	2,93	3,29	542	3,16
	TMGppppG-3'-O-link-DMHBI_390	1,18	1,41	534	1,35
	TMGppppG-3'-O-link-DMHBI_490	3,58	3,72	544	3,62
	TMGpppA-2'-O-link-DMHBI_390	1,41	1,75	538	1,59
	TMGpppA-2'-O-link-DMHBI_490	4,94	5,53	541	5,32
	TMGpppA-3'-O-link-DMHBI_390	1,19	1,21	529	1,20
	TMGppppA-2'+3'-O-link-DMHBI_490	4,87	5,57	536	4,93
	TMGppppA _m U _m A-3'-O-link-DMHBI_490	3,00	3,22	542	3,20
	TMGppCH ₂ pG-3'-O-link-DMHBI_390	1,22	1,47	529	1,45
	TMGppCH ₂ pG-3'-O-link-DMHBI_490	3,78	3,86	544	3,76
	TMGppCH ₂ pG-2'-O-link-DMHBI_390	3,09	6,82	539	5,52
	TMGppCH ₂ pG-2'-O-link-DMHBI_490	7,55	7,75	545	7,75
	TMGpppG-N1-link2-DMHBI_490	1,10	1,12	544	1,12
	TMG(2'-O-link-DMHBI)pppG_390	1,41	2,01	534	1,92
	TMG(3'-O-link-DMHBI)pppG_390	1,85	3,07	538	2,79
	TMG(3'-O-link-DMHBI)pppG_490	1,82	1,87	543	1,85
	TMGpppSG-2'-O-link2-DMHBI_390	1,73	2,99	536	2,78
	TMGpppSG-3'-O-link2-DMHBI_390	1,56	1,97	532	1,92
	TMGpppSG-3'-O-link2-DMHBI_490	3,01	3,41	540	3,25
	TMGSpppG-2'-O-link-DMHBI_390	3,88	9,18	542	7,29
	TMGSpppG-2'-O-link-DMHBI_490	9,76	9,73	545	9,71
	TMGSpppG-3'-O-link-DMHBI_390	1,55	2,63	533	2,29
	TMGSpppG-3'-O-link-DMHBI_490	2,96	3,21	542	3,16
	MMGSpppG-2'-O-link-DMHBI_390	6,57	13,32	543	11,40
	MMGSpppG-2'-O-link-DMHBI_490	10,73	11,53	545	11,32
	MMGSpppG-3'-O-link-DMHBI_390	1,10	1,23	532	1,24
	MMGSpppG-3'-O-link-DMHBI_490	1,64	1,64	544	1,64

Tab. A2. Porównanie odpowiedzi koniugatów z różnymi FMR obliczone różnymi metodami (A, B, C)

Koniugaty z HEMABI (wzbudzane $\lambda_{exc} = 455 \text{ nm}$)		A. Obliczone z całek z całego zakresu widma	B. Obliczone na podstawie intensywności dla wybranej długości fali	Jaka to długość fali (nm)	C. Obliczone na podstawie intensywności dla różnych długości fali
GMP	GMP-2'-O-link-HEMABI	8,00	7,49	531	7,40
	GMP-3'-O-link-HEMABI	2,59	2,36	527	2,36
TMG kapowane	TMGpppG-2'-O-link-HEMABI	2,95	2,80	527	2,80
	TMGpppG-3'-O-link-HEMABI	2,02	2,01	530	2,01
	TMGpppA-2'-O-link-HEMABI	1,07	1,08	526	1,07
	TMGpppA-3'-O-link-HEMABI	1,48	1,20	525	1,18
	TMGpppA _m U _m A-2'-O-link-HEMABI	1,55	1,50	523	1,48
	TMGpppA _m U _m A-3'-O-link-HEMABI	1,35	1,36	521	1,33
	TMGppCH ₂ pG-3'-O-link-HEMABI	1,51	1,48	523	1,45
	TMGppCH ₂ pG-2'-O-link-HEMABI	3,42	3,19	531	3,12
MMG kap	MMGSpppG-2'-O-link-HEMABI	2,21	1,98	529	1,90
	MMGSpppG-3'-O-link-HEMABI	1,04	1,05	525	1,04

Koniugaty z oHBI (wzbudzane $\lambda_{exc} = 390 \text{ nm}$)		A. Obliczone z całek z całego zakresu widma	B. Obliczone na podstawie intensywności dla wybranej dł. fali	Jaka to długość fali (nm)	C. Obliczone na podstawie intensywności dla różnych długości fali
GMP	GMP-2'-O-link-oHBI	2,37	6,56	583	6,43
	GMP-3'-O-link-oHBI	1,82	3,39	609	3,14
	GMP-2'-O-link2-oHBI	1,12	1,29	585	1,24
	GMP-3'-O-link2-oHBI	1,05	1,17	586	1,14
TMG kapowane	TMGpppG-2'-O-link-oHBI	1,17	2,13	591	2,23
	TMGpppG-3'-O-link-oHBI	1,25	1,77	578	1,76
	TMGppppA-2'-O-link-oHBI	1,62	2,35	589	2,31
	TMGppppA-3'-O-link-oHBI	2,38	3,68	598	3,60
	TMGpppG-N1-link2-oHBI	2,15	5,29	588	4,92
	TMG(3'-O-link-oHBI)pppG	1,74	1,86	592	1,68
	TMG(2'-O-link-oHBI)pppG	1,07	1,08	593	1,07
	TMGpppSG-2'-O-link2-oHBI	2,55	5,15	590	4,87
	TMGpppSG-3'-O-link2-oHBI	4,03	7,98	590	7,67
MMG kap	MMGpppG-2'-O-link-oHBI	1,80	3,40	603	3,26
	MMGpppG-3'-O-link-oHBI	1,25	2,15	609	1,88
	MMGSpppG-2'-O-link-oHBI	1,87	3,34	598	2,84
	MMGSpppG-3'-O-link-oHBI	1,39	1,61	601	1,50

Tab. A2. Porównanie odpowiedzi koniugatów z różnymi FMR obliczone różnymi metodami (A, B, C)

Koniugaty z ACVJ (wzbudzone $\lambda_{exc} = 440 \text{ nm}$)		A. Obliczone z całek z całego zakresu widma	B. Obliczone na podstawie intensywności dla wybranej długości fali dla Fmax	Jaka to długość fali (nm)	C. Obliczone na podstawie intensywności dla różnych długości fali
GMP	GMP-2'-O-link-ACVJ	2,37	2,42	514	2,42
	GMP-3'-O-link-ACVJ	1,07	1,09	512	1,09
TMG kap	TMGpppG-2'-O-link-ACVJ	1,45	1,70	504	2,87
	TMGpppG-3'-O-link-ACVJ	2,66	3,60	502	2,42