

Instytut Chemii Bioorganicznej

Polskiej Akademii Nauk



Tomasz Czapik

Rozprawa doktorska pt.:

**BADANIE STRUKTURY I FUNKCJI BIOLOGICZNYCH
ZDETERMINOWANYCH KONFORMACYJNIE
KWASÓW NUKLEINOWYCH**

Pracę wykonano

w

Zakładzie Chemii i Biologii Strukturalnej
Kwasów Nukleinowych

Promotor:

prof. dr hab. Ryszard Kierzek

Poznań, 2020

*Serdecznie dziękuję
Panu prof. dr hab. Ryszardowi Kierzkowi
za powierzenie mi tematu pracy doktorskiej
za wszelką pomoc i udzielone wskazówki
przy realizacji i redagowaniu niniejszej pracy*

Serdeczne podziękowania składam:

Prof. IChB PAN, dr hab. Annie Pasternak za cenne uwagi, dyskusję i pomoc w problemach napotkanych w trakcie realizowania niniejszej rozprawy

Dr Marcie Szabat za wsparcie i nieocenioną pomoc przy redagowaniu niniejszej pracy oraz wiele śmiechu, który motywował w dążeniu do celu

Dr Julicie Piaseckiej za pomoc z *hammerheadem* oraz wspólne „odkrycie” Kalifornii

Zespołowi **Biomolekularnego NMR i Pracowni NMR** za życzliwość i dobre rady, a w szczególności **dr Dorocie Gudanis** i **dr Danielowi Baranowskiemu** za pomoc przy analizowaniu problemów NMR-owskich

Wszystkim pracownikom **Zakładu Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych** za wsparcie i pomoc w trudnych chwilach, oraz za wspaniałą atmosferę w naszej grupie

Pracownikom zaprzyjaźnionych zakładów: **Zakładu Bioinżynierii Kwasów Nukleinowych** i **Zakładu Genomiki Strukturalnej RNA** za wszystkie udzielone rady i odbyte naukowe i poza naukowe dyskusje

Pani Grażynie Dominiak oraz **dr Michałowi Gładyszowi** za wsparcie, cierpliwość, zawsze ciekawe rozmowy oraz wszelką okazaną pomoc przy syntezach chemicznych

Wszystkim zaprzyjaźnionym **doktorantom** za ciekawe dyskusje na seminariach doktoranckich i poza nimi oraz wspólne organizowanie Nocy Naukowców i pokazów chemicznych, ale także za wszystkie chwile spędzone razem

Przyjaciółom którzy wspierają mnie i sprawiają, że moje życie nigdy nie jest nudne

Moim Rodzicom za wiarę we mnie i okazane wsparcie, a także **Mojemu Rodzeństwu**, w szczególności siostrze **Agnieszce** za otrzymanie najpiękniejszych kryształów

Dziękuję

Badanie struktury i funkcji biologicznych zdeterminowanych konformacyjnie kwasów nukleinowych

Kwasy nukleinowe od czasu ich odkrycia są obiektem nieustannych badań. Istotna w przypadku tych polimerów jest sekwencja, czyli ułożenie reszt nukleozydów w łańcuchu. Sekwencjonowanie, czyli określanie struktury pierwszorzędowej nie jest już dzisiaj większym wyzwaniem. Dziś interesującym zagadnieniem dla badaczy kwasów nukleinowych jest struktura drugo-, trzecio-, czy nawet czwartorzędowa. Poznanie reguł, jakie rządzą zwijaniem się kwasów nukleinowych jest niezwykle ważne, ponieważ znając je moglibyśmy przewidywać struktury, na podstawie znajomości samej sekwencji, lub projektować skomplikowane strukturalnie kwasy nukleinowe w laboratoriach. Bardzo istotnym jest też fakt, że struktura kwasu nukleinowego jest nierozzerwalnie związana z funkcją. Niekodujące kwasy nukleinowe to ciągle powiększająca się rodzina funkcjonalnie zróżnicowanych cząsteczek. Badanie powiązań pomiędzy sekwencją a strukturą oraz strukturą a funkcją to jedno z ważniejszych zadań naukowców badających kwasy nukleinowe.

Celem moich badań było zbadanie korelacji między strukturą i funkcją modelowych kwasów nukleinowych, w szczególności wpływu zdefiniowanych konformacyjnie reszt nukleotydu purynowych – pochodnych guanozyny. Do zadań szczegółowych należały: zbadanie tandemowego niesparowania 5'AG/3'GA pod kątem strukturalnym z wykorzystaniem modelowych cząsteczek RNA, oraz zbadanie wpływu modyfikowanych pochodnych guanozyny, umiejscowionych w centrum aktywnym rybozomu *hammerhead*.

Pierścień rybozy nukleozydu może przyjmować 20 różnych zdefiniowanych konformacji. Konformacje typu *North* (*C3'-endo*) oraz *South* (*C2'-endo*) są w dynamicznej równowadze dla naturalnych nukleozydów. Jednak przez stosowanie różnych chemicznych modyfikacji, takich jak spinające mostki metylenowe (LNA), czy dodawanie bardziej elektroujemnych atomów (2'-fluoro) można sterować równowagą między tymi dwiema konformacjami.

Realizację pierwszego zadania szczegółowego mojej pracy doktorskiej rozpocząłem od wybrania modyfikacji guanozyny o zdeterminowanej konformacji, aby wprowadzić je do sekwencji modelowych kwasów rybonukleinowych. Modyfikacjami, które wybrałem do sterowania konformacją wiązania N-glikozydowego były pochodne

STRESZCZENIE

guanozyny podstawione w pozycji C8 grupą metylową lub atomem bromu. Natomiast do wymuszania konformacji furanozy wybrałem nukleotydy o następujących resztach cukrowych: rybozyd, arabinozyd, 2'-deoksy-2'-fluororybozyd, 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozyd, 2'-O,4'-C-metylenorybozyd (LNA), oraz 2',3'-sekorybozyd (UNA). W badaniach wykorzystałem też nukleozydy zawierające niekanoniczne zasady w celu zmiany dystrybucji miejsc akceptoro-donorowych wiązań wodorowych. Wykorzystałem nukleozydy zawierające: 2,6-diaminopurynę, 2-aminopurynę, adeninę, purynę, hipoksantynę oraz puryno-2-on.

Tandemowe niesparowanie 5'AG/3'GA jest jednym z wielu opisanych w literaturze niesparowań występującym w dupleksach RNA. Ten motyw strukturalny ma duży potencjał funkcjonalny ze względu na występujące w nim wolne reszty guanozyny. Wyznaczone przeze mnie parametry termodynamiczne dla serii oligorybonukleotydów zawierających w sekwencji 5'GAGU/3'UGAG zdeterminowane strukturalnie nukleozydy pozwalają lepiej zrozumieć co wpływa na interesującą strukturę, którą scharakteryzował Scott Kennedy et al. w 2012 roku. Ponadto, wykonana w ramach mojej pracy doktorskiej analiza NMR-owska pozwoliła zbadać dynamikę konformacyjną badanego motywu.

Realizacja drugiego zadania szczegółowego polegała na wprowadzeniu strukturalnie zdeterminowanych analogów nukleotydów do struktury rybozomu *hammerhead* w centrum katalitycznym lub w pętli L2. Badania prowadziłem na trzech wariantach modelowego rybozomu *hammerhead*. Zostały one zaprojektowane tak, że substratem dla nich były rejony (+)RNA segmentu 5 wirusa grypy A/California/04/2009 (H1N1). Dla wszystkich modyfikowanych wariantów określiłem parametr szybkości reakcji cięcia. Wyznaczone parametry pozwoliły mi porównać wpływ różnych modyfikacji na aktywność rybozomu.

Otrzymane wyniki są podstawą do dalszych badań nad wpływem struktury kwasów nukleinowych na ich funkcje.

Study of structure and biological functions of conformationally determined nucleic acids

Nucleic acids have been the subject of constant research since their discovery. An important feature of these polymers is the sequence, i.e. the arrangement of nucleosides residues in the chain. Sequencing, i.e. determining primary structure, is no longer a major challenge today. Nowadays, an interesting issue for nucleic acid researchers is the secondary, tertiary, or even quaternary structure. Understanding the rules that govern the folding of nucleic acids is vital, because thanks to that understanding it is possible to predict structures based on knowledge of the sequence itself, or to design structurally complex nucleic acids in laboratories. What is also of great importance is that the structure of the nucleic acid is inextricably linked with function. Non-coding nucleic acids are a constantly growing family of functionally diverse molecules. Studying the relationships between the sequence and structure, and the structure and function, is one of the most important tasks for researchers studying nucleic acids.

The purpose of my research was to examine the correlation between the structure and function of model nucleic acids, in particular the effect of conformationally defined purine nucleotide residues - guanosine derivatives. Specific tasks included: investigating the tandem mismatch of 5'AG / 3'GA in structural terms using model RNA molecules, and investigating the effect of modified guanosine derivatives located at the active center of hammerhead ribozyme.

The nucleoside ribose ring can have up to 20 different defined conformations. North (C3'-endo) and South (C2'-endo) conformations are in dynamic equilibrium for natural nucleosides. However, by using various chemical modifications, such as methylene bonding bridges (LNAs) or adding more electronegative (2'-fluoro) atoms, it is possible to control the balance between these two conformations.

I started the first task of my doctoral dissertation by choosing guanosine modification with a determined conformation to incorporate it into the ribonucleic acid model sequences. The modifications that I chose to control the conformation of the N-glycosidic bond were guanosine derivatives substituted in position C8 with a methyl group or a bromine atom. In order to enforce the conformation of furanose I chose nucleotides with the following sugar residues: riboside, arabinoside,

ABSTRACT

2'-deoxy-2'-fluororiboside, 2'-deoxy-2'-fluoroarabinoside, 2'-O, 4'-C-methylenoriboside (LNA), and 2', 3'- secoriboside (UNA). In my research I also used non-canonical base nucleosides to change the distribution of hydrogen donor acceptor donor sites. I employed nucleosides containing: 2-aminoadenine , 2-aminopurine, adenine, purine, hypoxanthine and purin-2-one.

Tandem mismatch 5'AG / 3'GA is one of many mismatches found in RNA duplexes that have been described in the literature. This structural motif has great functional potential due to free guanosine residues. The thermodynamic parameters I determined for a series of oligorybonucleotides containing structurally restricted nucleosides in the sequence 5'GAGU / 3'UGAG allow for a better understanding what affects the interesting structure characterized by Scott Kennedy et al. in 2012. In addition, NMR analysis carried out as part of my doctoral dissertation were utilized to examine the conformational dynamics of the examined motif.

The second specific task involved the introduction of structurally determined nucleoside analogues into the structure of the hammerhead ribozyme in the catalytic center or in the L2 loop. I conducted research on three variants of the hammerhead model ribozyme. They were designed so that the substrates for them were (+)RNA regions of influenza A virus segment 5 A/California/04/2009 (H1N1). For all modified variants I determined the cut reaction speed parameter. The determined parameters allowed me to compare the effect of various modifications on ribozyme activity.

The obtained results are the basis for further research on the influence of the structure of nucleic acids on their functions.

SPIS TREŚCI

I	CEL DOKTORATU.....	17
II	CZEŚĆ LITERATUROWA.....	21
1.	Konformacje nukleozydów i struktura kwasów nukleinowych	23
1.1.	Konformacja szkieletu cukrowo-fosforanowego	23
1.2.	Konformacja wiązania N-glikozydowego	24
1.3.	Konformacja pierścienia cukrowego	25
1.4.	Konformacja nukleozydów i wiązania wodorowe w kwasach nukleinowych	27
2.	Motywy strukturalne w kwasach nukleinowych.....	30
2.1.	Tandemowe niesparowania	31
3.	Modyfikowane nukleozydy i kwasy nukleinowe	35
3.1.	Modyfikacje w części zasadowej	36
3.2.	Modyfikacje w części cukrowej	38
4.	Funkcjonalne kwasy nukleinowe.....	41
4.1.	Konformacje nukleozydów w funkcjonalnych kwasach nukleinowych ...	44
4.2.	Rybozym <i>hammerhead</i>	46
III	WYNIKI I Dyskusja	49
1.	Synteza zdeterminowanych strukturalnie analogów guanozyny	51
1.1.	Synteza 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydu guanozyny i 8-bromoguanozyny	54
1.2.	Synteza 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydów purynowych i ich amidofosforynów	57
2.	Wybór analogów guanozyny wykorzystanych do modyfikowania motywu sekwencyjnego 5'GAGU	59
3.	Badania termodynamiczne oligorybonukleotydów samokomplementarnych	62

3.1. Modyfikowanie struktur oligorybonukleotydów analogami nukleozydów wpływającymi na ilość tworzonych wiązań wodorowych	62
3.2. Modyfikowanie struktur oligorybonukleotydów analogami nukleozydów wpływającymi na konformację reszty cukrowej i wiązania N-glikozydowego...	67
4. Badania termodynamiczne oligonukleotydów niesamokomplementarnych ..	72
4.1. Duplekсы RNA modyfikowane analogami wpływającymi na liczbę tworzonych wiązań wodorowych	72
4.2. Duplekсы RNA modyfikowane analogami wpływającymi na konformację reszty cukrowej i wiązania N-glikozydowego	75
5. Badania termodynamiczne oligorybonukleotydów tworzących struktury typu spinka do włosów z wbudowanym motywem 5'GAGU/3'UGAG.....	78
6. Badania rejonu iminoprotonowego oligorybonukleotydów typu spinka do włosów z motywem 5'GAGU/3'UGAG metodą spektroskopii NMR	80
7. Projektowanie rybozymów <i>hammerhead</i> i wybór analogów nukleozydów wykorzystanych do modyfikacji centrum katalitycznego	86
7.1. Badanie kinetyki reakcji rybozymów <i>hammerhead</i> modyfikowanych w centrum katalitycznym w pozycji G8	88
7.2. Badanie kinetyki reakcji rybozymów <i>hammerhead</i> modyfikowanych w centrum katalitycznym w pozycji G12	90
7.3. Badanie kinetyki reakcji dla rybozymu <i>hammerhead</i> modyfikowanego w pętli L2	94
7.4. Badanie inhibicji namnażania wirusa grypy z użyciem różnych wariantów rybozymu <i>hammerhead</i>	96
IV PODSUMOWANIE	101
V MATERIAŁY I METODY	107
1. Materiały.....	109
1.1. Odczynniki i rozpuszczalniki.....	109
1.2. Roztwory wodne	109
1.3. Fazy rozwijające do analiz TLC.....	110

1.4.	Żele poliakrylamidowe	110
1.5.	Oligonukleotydy	111
1.6.	Aparatura i oprogramowanie stosowane podczas prowadzenia badań	115
2.	Metody	116
2.4.	Techniki ogólne	116
2.4.1.	Chromatografia cienkowarstwowa i kolumnowa	116
2.4.2.	Spektroskopia NMR i spektrometria mas	116
2.4.3.	Pomiary rentgenowskie i metody obliczeniowe	117
2.5.	Synteza analogów 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydów puryn	117
2.5.1.	Ogólna procedura syntezy N-blokowanych 3',5'-O-(tetraizopropylodisiloksan-1,3-diylo)purynorybozydów	118
2.5.2.	Ogólna procedura syntezy N-blokowanych 3',5'-di-O-acetylo-2'-deoksy-2'-fluoropurynoarabinozydów	120
2.5.3.	Synteza 2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyny	122
2.5.4.	Synteza 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyny	123
2.5.5.	Ogólna procedura blokowania grupy egzoaminowej N ² puryn	125
2.5.6.	Selektywne odblokowanie grup hydroksylowych N-blokowanych 5',3'-di-O-acetylo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydów puryn	126
2.6.	Ogólna procedura syntezy amidofosforynów nukleozydów	128
2.6.1.	Funkcjonalizacja grupy 5'-hydroksylowej blokadą 4,4'-dimetoksytrytylową	128
2.6.2.	Synteza blokowanych amidofosforynów nukleozydów	131
2.7.	Synteza oligonukleotydów	134
2.7.1.	Standardowa procedura odblokowania i oczyszczania trytyl-OFF	134
2.7.2.	Standardowa procedura odblokowania i oczyszczania trytyl-ON	135
2.7.3.	Rozdział oligonukleotydów po odblokowaniu	135
2.7.4.	Odsalanie oligonukleotydów	136
2.7.5.	Oznaczanie stężenia oligonukleotydów	137

SPIS TREŚCI

2.8. Otrzymywanie parametrów termodynamicznych	137
2.9. Otrzymywanie parametru kinetycznego dla rybozemu <i>hammerhead</i>	138
BIBLIOGRAFIA	141
DOROBEK NAUKOWY.....	153

OBJAŚNIENIE SKRÓTÓW

A – adenozyzna	HRMS – spektrometria mas wysokiej rozdzielczości (ang. <i>high-resolution mass spectrometry</i>)
Ac – grupa acetylowa	Hz – herz
ADP – 5'-difosforan adenozyzny	iPr – grupa izopropylowa
AMA – roztwór 1:1 (v/v) 40% roztworu metyloaminy i 25% roztworu amoniaku	J_{HF} – stała sprzężenia proton – fluor
AMP – 5'-monofosforan adenozyzny	J_{HH} – stała sprzężenia proton – proton
APS – nadsiarczan amonu	$k_{obs.}$ – obserwowalna stała szybkości reakcji
ATP – 5'-trifosforan adenozyzny	LNA – 2'-O,4'-C-metyleno kwasy nukleinowe (ang. <i>locked nucleic acid</i>)
BNA – mostkowane kwasy nukleinowe (ang. <i>bridged nucleic acids</i>)	MALDI – metoda jonizacji próbki w spektrometrii mas (ang. <i>matrix assisted laser desorption and ionization</i>)
Bz – grupa benzoilowa	MDCK – linia komórkowa z nerki psa Madin-Darby'ego (ang. <i>Madin-Darby canine kidney</i>)
C – cytozyna	MOI – miano wirusa, liczba cząstek wirusa przypadających na jedną komórkę (ang. <i>multiplicity of infection</i>)
c-di-GMP – bis-3',5'-cykliczny diguanozyno-monofosforan	mRNA – informacyjny RNA (ang. <i>messenger RNA</i>)
CPG – szkło o zdefiniowanej porowatości (ang. <i>controlled pore glass</i>)	MS – spektrometria mas (ang. <i>mass spectrometry</i>)
DCM – dichlorometan	N – dowolny nukleozyd
DMAP – N,N-dimetyloaminopirydyna	NAD – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
DMF – N,N-dimetyloformamid	NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
DMSO – dimetylosulfotlenek	pH – $-\log[H^+]$
DMTr – grupa 4,4'-dimetoksytrytylowa	PNA – kwas peptydonukleinowy (ang. <i>peptide nucleic acid</i>)
DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)	ppm – parts per million
EDTA – wersenian sodu (etylenodiamino-tetraoctan sodu)	Py – pirydyna
ENA – 2'-O,4'-C-etyleno kwasy nukleinowe (ang. <i>2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids</i>)	R – nukleozyd purynowy
G – guanozyna	
H – dowolny nukleozyd poza guanozyną	

OBJAŚNIENIE SKRÓTÓW

RNA – kwas rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*)

RNAi – interferencja RNA (ang. *RNA interference*)

rRNA – rybosomalny kwas rybonukleinowy (ang. *ribosomal RNA*)

siRNA – krótkie interferujące RNA (ang. *small interfering RNA*)

snRNA – mały jądrowy kwas rybonukleinowy (ang. *small nuclear RNA*)

T – tymidyna

TBAF – fluorek tertbutyloaminiowy

TEA – trietyloamina

TEA·3HF – trifluorowodorek trietyloamoniowy

TEAHF – fluorowodorek trietyloamoniowy

TEMED – *N,N,N',N'*-Tetrametyloetylenodiamina

TLC – chromatografia cienkowarstwowa

tRNA – transportujący (transferowy) RNA

U – urydyna

UNA – kwasy nukleinowe o zwiększonej labilności konformacyjnej pierścienia rybozy (ang. *unlocked nucleic acid*)

XNA – sztucznie otrzymane analogi kwasów nukleinowych (ang. *xeno nucleic acids*)

Y – nukleozyd pirymidynowy

I CEL DOKTORATU

W rozprawie doktorskiej poruszam kwestię konformacji kwasów nukleinowych. Bardzo szerokie spektrum struktur, jakie może przyjmować łańcuch kwasu nukleinowego jest sprawą bardzo interesującą i zarazem niezwykle istotną dla lepszego zrozumienia biochemii kwasów nukleinowych. Ze względu na swoją unikatową strukturę, kwas nukleinowy może pełnić różne funkcje, takie jak: przechowywanie i przekazywanie informacji, ale również szereg innych, a równie istotnych funkcji regulatorowych lub nawet katalitycznych. Tę kwestię rozwinę w części literaturowej tej rozprawy i skupię się głównie na katalitycznych kwasach nukleinowych.

Użytecznym narzędziem dla lepszego zrozumienia złożonych struktur kwasów nukleinowych jest wykorzystanie różnego rodzaju modyfikacji chemicznych w kontekście poszczególnych nukleotydów lub większych rejonów kwasów nukleinowych. Wprowadzenie modyfikowanych nukleozydów do kwasu nukleinowego może mieć różne cele, takie jak: wymuszenie konkretnej konformacji jednego nukleotydu lub większego fragmentu badanej cząsteczki, zwiększenie jej stabilności chemicznej, enzymatycznej i termodynamicznej, sterowanie przebiegiem reakcji z udziałem kwasu nukleinowego, oznaczenie izotopowe konkretnej pozycji kwasu nukleinowego. Informacje o strukturze można otrzymać stosując różne techniki, m.in.: pomiary spektroskopowe, NMR-owskie lub krystalograficzne z jednoczesnym wykorzystaniem modyfikacji chemicznych oraz badań termodynamicznych. Informacje uzyskane w różny sposób pozwalają na lepsze zrozumienie dynamiki konformacyjnej różnych struktur RNA.

W moich badaniach wprowadzałem w kwasach nukleinowych modyfikowane nukleozydy, których konformacja była zdeterminowana. Skupiłem się na analogach guanozyny, a zastosowane przeze mnie modyfikacje dotyczyły zarówno części cukrowej, jak i zasady azotowej. W części cukrowej wprowadziłem następujące analogi: 2'-deoksyrybozę, arabinozę, 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozę, 2'-deoksy-2'-fluororybozę, 2'-O,4'-C-metylenorybozę (LNA) oraz 2',3'-sekorybozę (UNA). W części zasadowej użyłem następujących modyfikowanych zasad: 8-bromoguaninę, 8-metyloguaninę, hipoksantynę, 2-hydroksypurynę, purynę, adeninę, 2-aminopurynę oraz 2,6-aminopurynę.

Ze względu na fakt, że struktury drugorzędowe RNA w dużej części składają się z niekanonicznych motywów strukturalnych, postanowiłem zbadać jeden z nich. Wybrałem do badań motyw tandemowych niesparowań, a dokładnie tandemowe niesparowanie 5'AG/3'GA. Modyfikowane analogi nukleozydów wprowadzałem

w sekwencji 5'GAGU3' w środku oligonukleotydu samokomplementarnego oraz niesamokomplementarnego, jak również w oligonukleotydzie o zaprojektowanej strukturze spinki do włosów (ang. *hairpin*). Trzon tej spinki tworzyły dwa fragmenty oligonukleotydu o samokomplementarnej sekwencji, w której wbudowany został motyw 5'GAGU3'. W szeregu eksperymentów wyznaczyłem parametry termodynamiczne dla powyższych oligonukleotydów metodą pomiaru absorbancji, jako funkcji temperatury, tj. metodą topnienia UV (ang. *UV melting*). Modelowe cząsteczki zostały także zbadane z wykorzystaniem technik magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).

W swoich badaniach postanowiłem także sprawdzić wpływ modyfikacji na aktywność katalityczną kwasu nukleinowego. W tym celu wybrałem rybozym *hammerhead* jako obiekt badań i wprowadziłem analogi guanozyny do sekwencji jego centrum katalitycznego. Następnie dla powstałych modyfikowanych rybozymów wyznaczyłem stałe szybkości reakcji rozcinania nici substratu.

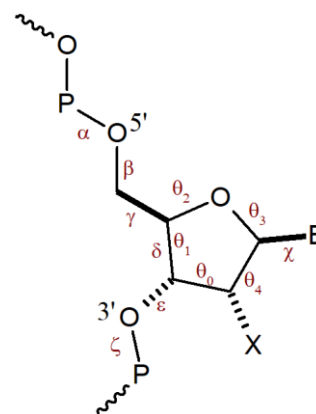
Celami prowadzonych badań były:

1. Zsyntetyzowanie zdeterminowanych konformacyjnie pochodnych guanozyny oraz odpowiednich amidofosforynów, i użycie ich do syntezy modelowych oligonukleotydów RNA.
2. Wyznaczenie parametrów termodynamicznych modyfikowanych dupleksów RNA zawierających tandemowe niesparowanie 5'AG/3'GA sąsiadujące z parą G-U (5'GAGU3').
3. Określenie struktury motywu 5'GAGU/3'UGAG (szczególnie rodzaju tworzonych wiązań wodorowych) zawierającego w różnych pozycjach modyfikowane pochodne guanozyny z wykorzystaniem technik NMR.
4. Zbadanie wpływu modyfikowanych pochodnych guanozyny, umiejscowionych w centrum aktywnym rybozomu *hammerhead* na jego aktywność katalityczną nakierowaną na degradację RNA wirusa grypy.

II CZEŚĆ LITERATUROWA

1. Konformacje nukleozydów i struktura kwasów nukleinowych

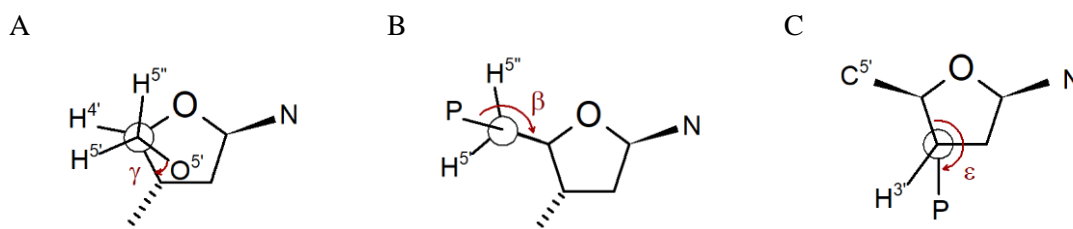
Zasady wchodzące w skład kwasów nukleinowych są planarnymi aromatycznymi związkami heterocyklicznymi. Poza nieznacznymi odgięciami i rozciągnięciami układu aromatycznego wynikającymi z drgań wiązań chemicznych, dochodzi również do rotacji grup egzoaminowych guaniny, adeniny i cytozyny oraz znacznie szybszej (10^{10} s^{-1} w roztworze wodnym w 0°C) rotacji grupy metylowej tyminy¹. Do scharakteryzowania struktury w nukleotydzie można użyć parametrów kątów torsyjnych² α , β , γ , δ , ε oraz ζ dla szkieletu cukrowo-fosforanowego, kątów pierścienia furanozy $\theta_0 - \theta_4$, oraz kąta χ wzdłuż wiązania N-glikozydowego (rysunek 1). Dla uproszczenia wykorzystuje się zależności pomiędzy tymi kątami i przy opisie struktury nukleotydów mówi się o czterech parametrach: pofałdowaniu cukru, konformacji wiązania N-glikozydowego, orientacji grupy C5' oraz konformacji wiązań estrowych grupy fosforanowej. W swoich badaniach interesowałem się konformacją furanozy oraz wiązania N-glikozydowego, dlatego w dalszej części tego rozdziału bardziej szczegółowo przybliżę te zagadnienia.



Rysunek 1. Oznaczenie kątów torsyjnych w reszcie nukleotydojowej według wskazań IUPAC.
X – H w DNA, lub OH w RNA; B – zasada heterocykliczna.

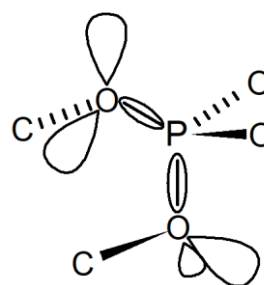
1.1. Konformacja szkieletu cukrowo-fosforanowego

W przeciwieństwie do pozostałych atomów węgla budujących szkielet kwasu nukleinowego, węgiel C5' jest endocykliczny, dlatego orientacja wiązania C4'-C5' ma znaczenie dla usytuowania reszty fosforanowej względem reszty cukrowej (rysunek 2).



Rysunek 2. Projekcja Newmanna najczęściej przyjmowanych konformacji w nukleotydach: (A) synklinalna dla kąta γ , (B) antiperiplanarna dla kąta β i (C) antyklinalna dla kąta ε .

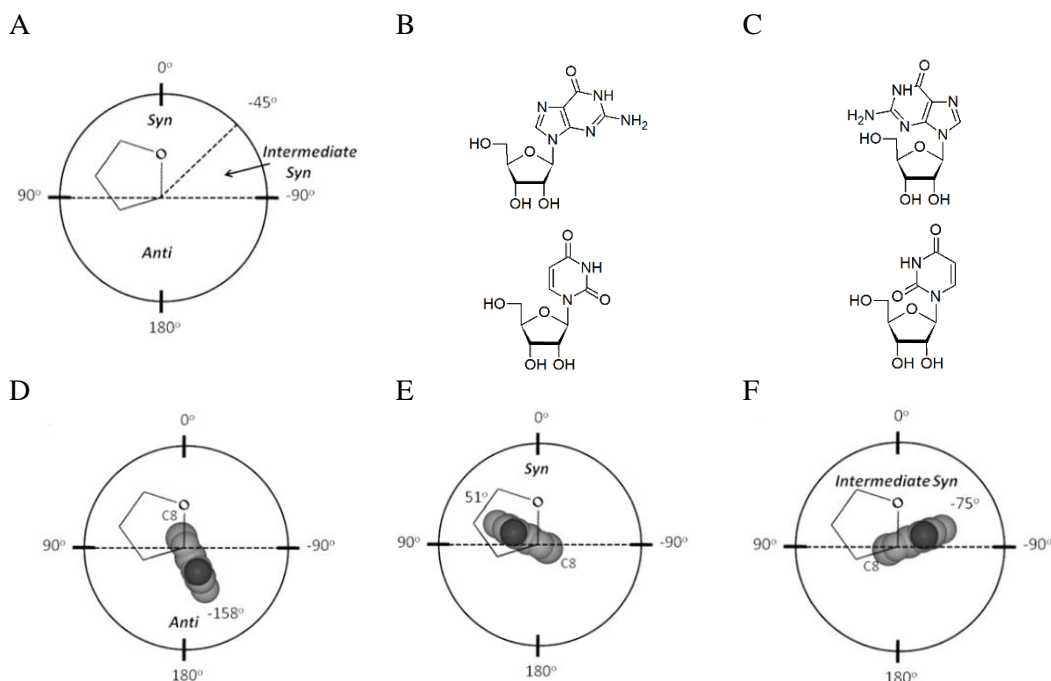
Najkorzystniejsze energetycznie i najczęściej przyjmowane konformacje to synklinalna i antyperiplanarna (rysunek 2A i B). W nukleotydach rotacja wiązań jest dodatkowo ograniczana przez grupę fosforanową, co wymusza przyjmowanie konformacji synklinalnej. Wiązanie C5'-O5' przyjmuje konformację antyperiplanarną (rysunek 2B), natomiast wiązanie C3'-O3' oscyluje pomiędzy konformacją antyklinalną (rysunek 2C) a antyperiplanarną (rysunek 2A). Dla uproszczenia obliczeń związanych ze strukturą szkieletu cukrowo-fosforanowego oraz ze względu na to, że reszta fosforanowa przyjmuje strukturę tetraedryczną, przyjmuje się, że łańcuchy P5'-O5'-C5'-C4' i P3'-O3'-C3'-C4' są sztywne i łączą się ze sobą za pośrednictwem fosforu i węgla C4'. Z badań krystalograficznych tRNA i oligomerów DNA wynika, że struktura ugrupowania fosfodiesterowego, czyli wiązania C-O-P-O-C przyjmuje zgiętą strukturę w wyniku działania efektu *gauche*, gdzie za stabilność takiej struktury odpowiadają oddziaływania orbitali (rysunek 3).



Rysunek 3. Konformacja diestru fosforanowego z uwzględnieniem orbitali molekularnych w efekcie *gauche*.

1.2. Konformacja wiązania N-glikozydowego

Ponieważ powierzchnie zasady i cukru są do siebie w przybliżeniu prostopadłe, a obrót płaszczyzny zasady odbywa się wzdłuż osi wiązania N-glikozydowego, możliwe jest określenie pozycji zasady względem powierzchni cukru. Gdy atom H8 puryny lub H6 pirymidyny znajduje się nad powierzchnią pierścienia to mówimy o konformacji *anti*. Gdy objętościowo większe fragmenty zasad, czyli O2 pirymidyny lub N3 puryny znajdują się nad cukrem nukleozydu to nazywamy taką konformację *syn*. Przy opisywaniu konformacji wiązania N-glikozydowego używa się wartości kąta torsyjnego χ . Kąt torsyjny χ tworzony jest przez płaszczyznę, na której znajduje się zasada oraz powierzchnię przechodzącą przez wiązanie O4'-C1' cukru i wiązanie N-glikozydowe. Kąt ten definiują cztery atomy – dla pirymidyn: O4'-C1'-N1-C2, a dla puryn: O4'-C1'-N9-C4. Uznaje się, że jeżeli $90^\circ \geq \chi \geq -90^\circ$ to nukleozyd jest w konformacji *syn*. Można również wyróżnić konformację nazywaną „pośrednią *syn*” (ang. *intermediate syn*) lub „wysoką *anti*” (ang. *high anti*), dla której $-45^\circ > \chi \geq -90^\circ$. Zakres wartości kąta χ dla konformacji *anti* to reszta zakresu, czyli $90^\circ < \chi < -90^\circ$ (rysunek 4).



Rysunek 4. Graficzne przedstawienie konformacji wiązania N-glikozydowego. A – widok z góry na pierścień cukru; B – guanozyna i urydyna w konformacji *anti*; C – guanozyna i urydyna w konformacji *syn*; D-F – widok z góry na możliwe konformacje guanozyny. Rysunek zaadaptowano z Sokolowski, J. E. *et al.*³

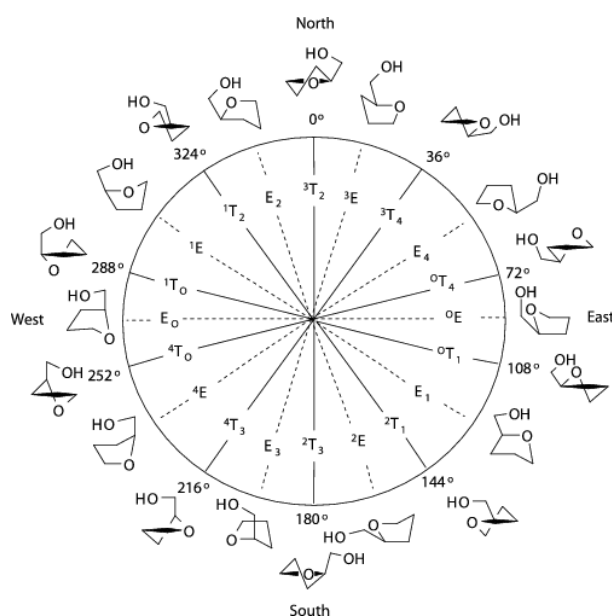
Nukleozydy pirymidynowe przyjmują niemal wyłącznie konformację *anti*, natomiast purynowe przyjmują naturalnie konformację *anti* lub *syn*. Ogólna preferencja do przyjmowania konformacji *anti* jest spowodowana czynnikami sterycznymi, jednocześnie umożliwia ona oddziaływania krawędzi Watsona-Cricka naprzeciwległych zasad. Duży wpływ na konformację nukleozydów pirymidynowych ma karbonylowy atom tlenu w pozycji 2, który stanowi zawadę przestrzenną. W przypadku nukleozydów purynowych również niekorzystne oddziaływania pomiędzy atomem azotu N3 a powierzchnią cukru są w pewien sposób rekompensowane przez inne korzystne oddziaływania, dlatego nukleozydy te przyjmują nie tylko konformację *anti*, ale również *syn*.

1.3. Konformacja pierścienia cukrowego

Reszty cukrowe - ryboza i 2'-deoksyryboza - budujące kwasy nukleinowe tworzą alifatyczny pięciocząłowy pierścień na bazie furanu. Ze względu na hybrydyzację atomów węgla i tlenu budujących ten pięciocząłowy pierścień nie jest energetycznie korzystne ułożenie w płaszczyźnie wszystkich pięciu atomów. Poza tym, ze względu na

chiralność czterech atomów węgla (C1', C2', C3' i C4') możliwe jest istnienie 16 stereoizomerów takiego cukru. W naturalnych kwasach nukleinowych stwierdzono jednak występowanie wyłącznie izomerów β -D-rybozy i β -D-deoksyrybozy. Konformację furanozy można opisać przez wykorzystanie kąta fazowego pseudorotacji (P). Parametr ten informuje o wewnętrznych kątach dwuściennych tworzonych przez wiązania w furanozie. Dzięki obserwacji Martina Karplusa⁴ o korelacji pomiędzy stałą sprzężenia $^3J_{HH}$ a dwuściennym kątem torsyjnym, możliwe jest określenie konformacji nukleozydów z użyciem metody NMR. Kilpatrick wykorzystał tą zależność i jako pierwszy zastosował koncepcję pseudorotacji w ujęciu pięcioczłonowego pierścienia⁵. W swoich badaniach nad konformacjami w cyklopentanie doszedł do wniosku, że zmiany ułożenia atomów nie wnoszą istotnych zmian w energii potencjalnej układu z uwagi na fakt, że wszystkie pozycje w cyklopentanie są równocenne. Zastąpienie jednego atomu węgla innym lub wprowadzenie endocyklicznych grup funkcyjnych powodowało pewne ograniczenia energetyczne w całkowicie swobodnej pseudorotacji układu cyklicznego. To zjawisko szerzej zbadali i opisali Altona i Sundaralingam^{6,7}. Jako, że układ powiązanych ze sobą pięciu atomów tworzy zależności między kątami torsyjnymi θ (rysunek 1, rozdział 1), wyprowadzili oni wzór, który w podany matematyczny sposób opisuje ten związek:

$$\tan(P) = \frac{(\theta_2 + \theta_4) - (\theta_1 + \theta_3)}{2\theta_0(\sin 36^\circ + \sin 72^\circ)}$$



Rysunek 5. Koło pseudorotacji z wyrysowanymi na obwodzie możliwymi konformerami rybozy. Na kole zaznaczono przy pomocy symboli T i E konformacje *twisted* i *envelope*. Wyróżniono również cztery rejony koła odpowiadające kierunkom na kompasie: *North*, *East*, *South*, *West*.

Wszystkie możliwe konformacje pięcioczłonowego cukru można przedstawić na kole pseudorotacji (rysunek 5). Rozpoznaje się dwadzieścia granicznych (energetycznie) konformerów, które można podzielić na dwie grupy: konformacje skręcone (ang. *twisted T*) oraz konformacje kopertowe (ang. *envelope E*). O konformacji skręconej mówimy wtedy, gdy po przeprowadzeniu płaszczyzny przez trzy atomy

tworzące pierścień dwa pozostałe atomy znajdują się po przeciwnych stronach poprowadzonej powierzchni. Konformacja kopertowa to sytuacja, gdy po przeprowadzeniu płaszczyzny przez trzy atomy tylko jeden atom znajduje się poza płaszczyzną.

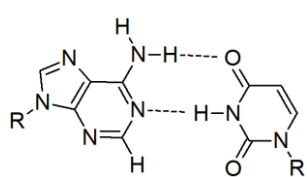
Naturalnie nukleozydy znajdujące się w roztworze występują nie w jednej zamrożonej konformacji, ale ich struktura jest dynamiczna. Nukleozydy występują zazwyczaj w równowadze pomiędzy dwiema lub więcej konformacjami. Przyjmuje się, że niemodyfikowane nukleozydy RNA i DNA w roztworach występują w równowadze konformacyjnej pomiędzy konformerami *North* (*C3'-endo*) i *South* (*C2'-endo*).

1.4. Konformacja nukleozydów i wiązania wodorowe w kwasach nukleinowych

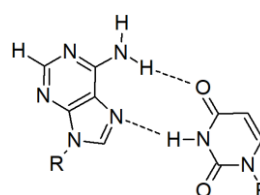
Dla kwasów nukleinowych konformacja nukleotydów może mieć duży wpływ na strukturę całej cząsteczki. Dobrze poznany i charakterystyczny kształt helikalny dupleksu powstałego w wyniku parowania się dwóch fragmentów kwasu nukleinowego może mieć różną skrętność. Wyróżnia się trzy charakterystyczne formy helisy: A, B i Z. Formy A i B są prawoskrętne, natomiast Z jest lewoskrętne. W formie A skręt helisy jest gęsty, przez co wielka bruzda jest wąska i głęboka, natomiast mała bruzda jest płytka i szeroka. Nukleotydy przyjmują wtedy konformację *anti* i często *C3'-endo*. Forma A jest charakterystyczna dla dupleksów RNA. W formie B skręt helisy jest nieco luźniejszy niż w formie A. Duża i mała bruzda helisy B są podobnej głębokości, jednak duża bruzda jest szeroka, a mała jest wąska. Nukleotydy tworzące kwas nukleinowy o strukturze helisy w formie B mają konformację *anti* i *C2'-endo*. Obie formy mogą być tworzone przez dowolne sekwencyjnie fragmenty kwasów nukleinowych. Forma Z jest tworzona przez fragmenty o sekwencji naprzemiennie ułożonych puryn i pirymidyn, głównie G i C. W formie lewoskrętnej konformacje nukleotydów dla G są *syn* i *C3'-endo* natomiast dla C są *anti* i *C2'-endo*¹. Tworzenie struktur helikalnych determinują cztery typy oddziaływań: wiązania wodorowe, warstwowe, elektrostatyczne i hydrofobowe. W tym rozdziale omówię istotne dla moich badań oddziaływanie, czyli wiązania wodorowe.

Pomiędzy zasadami reszt nukleotydów przeciwległych nici dochodzi do charakterystycznych dla kwasów nukleinowych oddziaływań – parowania się zasad. Parowanie to polega na ustawieniu się dwóch zasad azotowych na jednej płaszczyźnie lub na płaszczyznach współosiowych tak, aby ich grupy protonodonorowe i protonoakceptorowe mogły ze sobą oddziaływać. W wyniku tych oddziaływań powstają

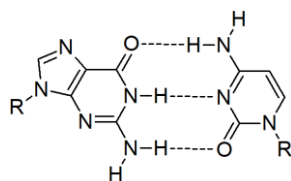
wiązania wodorowe. Są one jedną z głównych sił napędowych tworzenia się dupleksów kwasów nukleinowych. Oddziaływania pomiędzy parami zasad G-C i A-U to klasyczne oddziaływania Watsona-Cricka (rysunek 6), nazywane są też kanonicznymi parami zasad. Poza nimi można również wyróżnić niekanoniczne oddziaływania, do których zaliczyć można oddziaływania odwrócone Watsona-Cricka, gdy nici tworzące dupleks są ułożone równoległe, czyli ich końce 5' są na tym samym końcu helisy. Poza tym wszystkie inne oddziaływania pomiędzy zasadami można nazwać niekanonicznymi, wśród nich wyróżniamy takie oddziaływania jak: pary Hoogstena czy *wooble* oraz pary powstałe przez oddziaływania zasad z zaangażowaniem innych grup akceptorowo-donorowych.



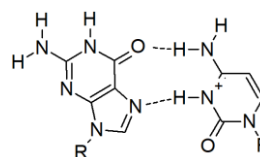
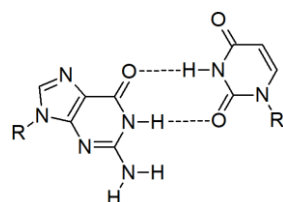
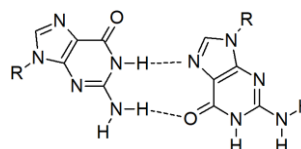
para Watsona-Cricka A=U



para Hoogsteen'a A=U



para Watsona-Cricka G=C

para Hoogsteen'a G=C⁺para *wooble* G=U

para G=G

Rysunek 6. Przykłady wiązań wodorowych powstających pomiędzy zasadami azotowymi.

W przypadku RNA jedna z niekanonicznych par zasad występuje niezwykle często, jest to para pomiędzy guanozyną i urydyną (G-U)⁸. Strukturalnie para ta tworzy tak zwaną parę *wobble* (rysunek 6), gdzie obie zasady oddziałują ze sobą przez zetknięcie krawędzi Watsona-Cricka. Taka para występuje niemal w każdym rodzaju RNA, często pełni bardzo istotną rolę^{8,9}. W intronach I grupy para G-U znajduje się w miejscu splicingowym, również rybozym wirusa zapalenia wątroby typu D (ang. *hepatitis delta virus* – HDV) rozpoznaje miejsce cięcia dzięki obecności pary G-U, a w alaninowym tRNA para G-U występuje konserwatywnie w ramieniu akceptorowym. Para ta może również przyjmować interesujący układ, gdzie jeden z karbonylowych atomów tlenu O2 lub O4 uracylu znajduje

się pomiędzy protonami: iminowym H1 a aminowym H6. Takie oddziaływania nazywa się w literaturze rozwidlonymi (ang. *bifurcated*)^{10,11}.

Poza rozpowszechnioną parą G-U w naturalnie występujących RNA można również znaleźć inne niekanoniczne pary zasad. Cztery zasady nukleinowe mogą utworzyć 10 różnych par, z czego dwie pary to kanoniczne pary Watsona-Cricka. Osiem pozostałych, to tak zwane pojedyncze niesparowania. Trzy z nich to pary homopurynowe (A-G, G-G, A-A), trzy pary są homopirymidynowe (C-U, U-U, C-C), a dwie pary – mieszane (A-C, G-U). Wyłączając wcześniej omówioną parę G-U, najpowszechniej występującymi niekanonicznymi parami są pary A-G, U-U i A-C¹²⁻¹⁵.

Para A-G może przyjmować różne konformacje. Wśród znanych przypadków dochodzi do tworzenia wiązania wodorowego pomiędzy dwiema zasadami w konformacji *anti* przy udziale atomu tlenu karbonylowego O6 guanozyny i grupy aminowej N6 adenozyne. Drugie wiązanie wodorowe między zasadami tworzy się pomiędzy pozycjami N1. To wiązanie wodorowe może tworzyć się bezpośrednio z udziałem grupy N-H guanozyny i atomem azotu N1 adenozyne¹⁶ lub za pośrednictwem cząsteczki wody¹⁷. Znany jest również przypadek, gdy parę G-A tworzy guanozyna w konformacji *syn* i protonowana adenozyna w konformacji *anti*¹⁸. Wiązania wodorowe w przypadku pary o takich konformacjach tworzą się również między atomami O6 grupy karbonylowej i N6 grupy aminowej, natomiast drugie wiązanie tworzy się, pomiędzy protonowaną w adenozyne pozycją N1 a atomem azotu N7 guanozyny. W przypadku pary U-U dochodzi do oddziaływań wodorowych między pozycjami N3 obu pirymidyn i karbonyłowymi atomami tlenu O2 lub O4 drugiej zasady¹³. Natomiast trzecia najczęściej występująca niekanoniczna para A-C może powstawać w przypadku gdy adenozyna jest protonowana, wtedy para ta jest izomorficzna z parą G-U. W przypadku braku protonacji, parowanie może również zachodzić przez oddziaływania między krawędzią Watsona-Cricka cytydyny i krawędzią Hoogstena adenozyne¹⁹.

2. Motywy strukturalne w kwasach nukleinowych

Wszystkie oddziaływania pomiędzy zasadami mają swój udział w tworzeniu struktur w obrębie kwasów nukleinowych. Najczęściej występujące pary zasad w RNA to dwie pary Watsona-Cricka: G-C i A-U oraz para *wobble* G-U. Pary te posiadają regularną strukturę i schemat wiązań wodorowych. Występują one głównie w helikalnych rejonach RNA. Kanoniczne pary zasad stanowią jednak mniej niż połowę motywów strukturalnych w drugorzędowej strukturze RNA²⁰. Poza klasyczną strukturą dwuniciową wśród motywów strukturalnych tworzonych przez kwasy nukleinowe można wymienić: pętle, różnego typu wybrzuszenia i niesparowania, spinki do włosów (ang. *hairpin*), pseudowęzły, rozgałęzienia oraz motywy jednoniciowe. Istnieją również motywy trypleksowe – utworzone przez trzy fragmenty kwasu nukleinowego oraz kwadrupleksy – utworzone przez cztery fragmenty kwasu nukleinowego i oddziałujące ze sobą cztery zasady w jednej płaszczyźnie (np. w G-kwadrupleksach tetrady guanozyn), lub i-motif (ang. *intercalated motif*) również tworzony przez cztery fragmenty kwasu nukleinowego bogatego w reszty cytydyny^{21,22}. Te motywy strukturalne są częściej spotykane w cząsteczkach RNA niż DNA, co często tłumaczy się występowaniem w tych pierwszych grup 2'-hydroksylowych, które mogą umożliwiać stabilizujące oddziaływania w obrębie tworzonej struktury.

Badanie motywów strukturalnych w kwasach nukleinowych jest niezwykle ważne, ponieważ, mimo że sekwencjonowanie nie jest już dużym wyzwaniem, to niestety nie potrafimy na podstawie znanej sekwencji nukleozydów precyzyjnie przewidywać struktury drugorzędowej czy oddziaływań trzeciorzędowych. Powszechnie w kwasach nukleinowych niekanoniczne motywy strukturalne często odpowiadają za istotne funkcje biologiczne. Dla przykładu aptamer wiążący trombinę (ang. *trombine binding aptamer*, TBA) tworzy jednocząsteczkowy kwadrupleks, który jest zdolny do wiązania się z trombiną i zapobiega w ten sposób aktywacji fibrynogenu. W związku z tym aptamer TBA jako jeden z czynników antykoagulacyjnych jest obiektem licznych badań²³⁻²⁵. Innym przykładem są telomerowe kwadrupleksy DNA chroniące chromosomy przed degradacją^{26,27}. W RNA również niekanoniczne motywy strukturalne są często powiązane z jego istotnymi funkcjami biologicznymi. Rejony jednoniciowe lub niesparowania (wybrzuszenia jedno- i dwustronne) przerywające motywy helikalne często są powiązane z funkcjonalnością RNA. Umożliwiają one często oddziaływania trzecio- i czwartorzędowe. Wprowadzanie zmian chemicznych w obrębie tych motywów może nam

ułatwić określenie ich dokładnej struktury lub umożliwić projektowanie oligonukleotydów o pożądanej przez nas strukturze. Przykładowo, obecność pochodnych zawierających w pozycji 2' grupę hydroksylową lub fluor w konfiguracji β znacznie wpływa na ustabilizowanie struktury telomerowych kwadrupleksów²⁸.

2.1. Tandemowe niesparowania

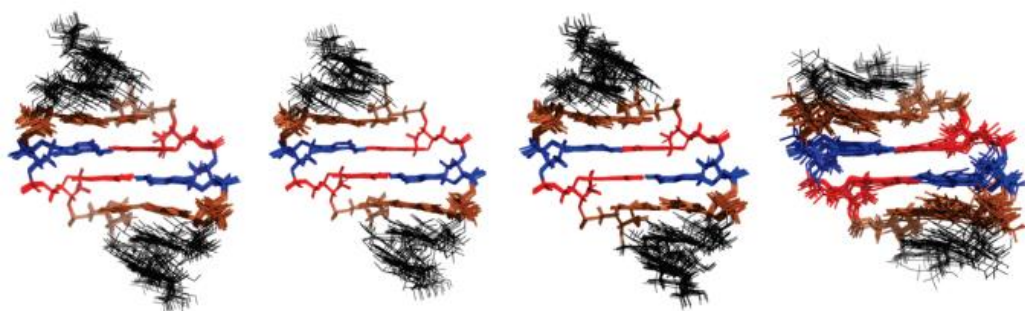
Jednym z bardziej rozpowszechnionych motywów strukturalnych w kwasach nukleinowych są tandemowe niesparowania. Tandemowe niesparowanie to motyw, w którym dwie sąsiadujące niekanoniczne pary zasad są otoczone przez motywy helikalne. Można wyróżnić dwa typy tandemowych niesparowań: symetryczne i asymetryczne. Symetryczne tandemowe niesparowanie to takie, gdzie sekwencje od 5' do 3' końca w górnej i dolnej nici muszą być takie same. W pozostałych sytuacjach mówi się o asymetrycznym tandemowym niesparowaniu. Spośród 1830 możliwych tandemowych niesparowań, aż 1770 to asymetryczne tandemowe niesparowania, a tylko 60 to symetryczne²⁹. Szereg tandemowych niesparowań istniejących w wielu naturalnie występujących RNA³⁰⁻³⁷ wykazuje duży potencjał funkcjonalny, a więc właściwe przewidywanie takich motywów w strukturze drugorzędowej jest niezwykle istotne³⁸.

W swoich badaniach Brent Znosko przeanalizował bazę 1899 struktur drugorzędowych RNA pod kątem występowania w nich tandemowych niesparowań. Wśród tych struktur znajdowały się takie RNA jak mała i duża podjednostka rybosomalnego RNA (rRNA), transportujący RNA (tRNA), RNA RNazy P, introny grupy I i II oraz miRNA. W badaniach uwzględnione zostały także pary zamykające, które zgodnie z założeniami modelu najbliższego sąsiedztwa mają istotny wpływ na stabilność termodynamiczną tworzonej struktury. Z tych badań wynika, że tandemowe niesparowania mogą powodować bardzo szeroki zakres zmian w energii swobodnej dupleksu RNA mieszczący się w zakresie od -1,7 do 3,7 kcal/mol³⁸.

Ciekawe jest to, że częstość występowania tandemowego niesparowania w naturze nie koreluje w prosty sposób z jego stabilnością termodynamiczną. Jedno z najbardziej stabilnych tandemowych niesparowań (5'GGAG3'/3'CAGC5') znajduje się na 28 pozycji listy najczęściej występujących niesparowań. Również wśród 30 najczęściej występujących znajduje się tandemowe niesparowanie (5'AAUA3'/3'UCUU5'), które destabilizuje dupleks o 3,1 kcal/mol. Co ciekawe, wszystkie cztery tandemowe

niesparowania, które mają stabilizujący wpływ na energię swobodną dupleksów RNA (5'GA3'/3'AG5', 5'AA3'/3'AG5', 5'AA3'/3'GG5' i 5'UU3'/3'UU5'), w innym otoczeniu par zamykających mogą wносить efekt destabilizujący. Badania tych samych tandemowych niesparowań, ale z różnymi parami zamykającymi często pokazują rozbieżności we wpływie badanego tandemowego niesparowania na wartość energii swobodnej dupleksu, a odchylenia od wartości wyznaczonych w różnym otoczeniu nukleotydowym mogą różnić się od 0,2 kcal/mol do 1,1 kcal/mol³⁸. Takie same obserwacje zostały dokonane także dla innych motywów strukturalnych^{14,15,39-42}. Odchylenia te tłumaczy się efektami oddziaływań dalekiego zasięgu⁴³, które pomija się w modelu najbliższego sąsiedztwa.

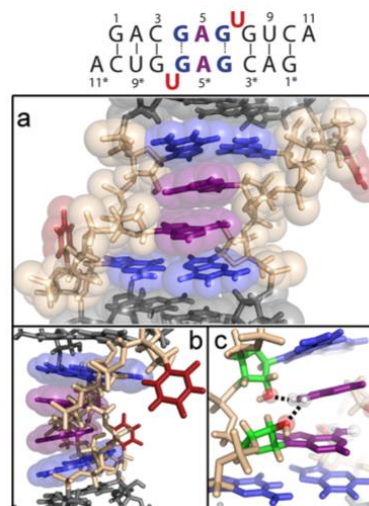
Dla dupleksu zawierającego symetryczne tandemowe niesparowanie 5'AG3'/3'GA5' zostały scharakteryzowane parametry termodynamiczne i strukturalne dla



Rysunek 7. Struktury przewidziane na podstawie danych NMR dla dupleksów zawierających tandemowe niesparowanie AG/GA z zamykającymi parami od lewej do prawej: GC, AU, UA, UG. Rysunek zaadaptowano z Hammond, N. B. *et al.*⁴⁵.

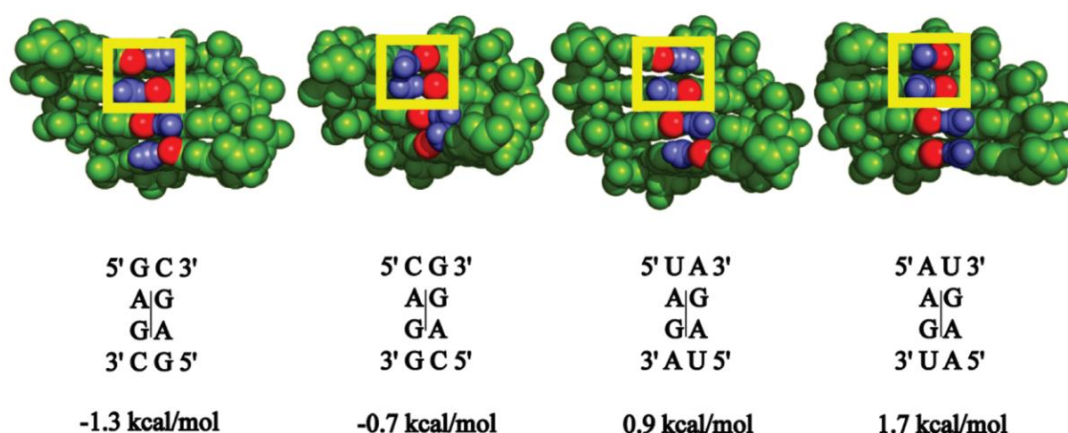
wariantów z różnymi parami zamykającymi⁴⁵. Różnice w energii swobodnej dla tych wariantów dupleksów RNA mieszczą się w zakresie od -1,3 do 3,4 kcal/mol. W przypadku kanonicznych par zamykających Watsona-Cricka struktury przypominają kanoniczne dupleksy RNA (rysunek 7).

W przypadku dupleksu zawierającego 5'AG3'/3'GA5' z zamykającymi parami GU struktura nie jest już tak przewidywalna. Widmo iminoprotonowe takiego dupleksu wskazuje na istnienie dwóch konkurencyjnych struktur, z których struktura niekanoniczna stanowi strukturę dominującą⁴⁴ (rysunek 8).



Rysunek 8. Struktura dominująca dla dupleksu o sekwencji podanej nad rysunkiem. Na fioletowo zaznaczono reszty adeniny, na czerwono uracylu, na granatowo guaniny. Rysunek zaadaptowano z Kennedy, S. D. *et al.*⁴⁴.

Zaobserwowane oddziaływania udało się ustabilizować przez wprowadzenie do dupleksu zawierającego motyw 5'GAGU3'/3'UGAG5' modyfikacji 8-bromoguanozyny w pozycji naprzeciwległej do adenozyiny. Dzięki temu udało się ustalić, że dominująca konformacja dla niemodyfikowanego dupleksu jest znacząco zmieniona. W strukturze tej reszty urydyny są wypętlone na zewnątrz dupleksu, guanozyny parują się ze sobą, a reszty adenozyin oddziałują warstwowo. Interesujące jest to, że reszty guanozyn przyjmują konformację *syn* wiązania N-glikozydowego, a wszystkie z czterech reszt cukrowych – konformację *C2'-endo*. Tak odmienną strukturę można tłumaczyć przez występowanie niekorzystnych oddziaływań warstwowych, które w szeregu par zamykających GC < CG < UA < AU zwiększają się. Efekt ten został dobrze opisany w badaniach Nicolasa Hammonda⁴⁵. W strukturze dupleksu o sekwencji tandemowego niesparowania 5'GAGC3'/3'CGAG5' obserwując oddziaływania warstwowe od strony dużej bruzdy, można zauważyć naprzemiennie układające się grupy aminowe i tleny karbonylowe. Grupa karbonylowa guanozyny od 5'-końca znajduje się nad grupą aminową adenozyiny, a pod nią znajduje się kolejna grupa karbonylowa guanozyny i całość zamknięta jest grupą aminową cytydyny. Podobny motyw ułożenia grup funkcyjnych można zaobserwować w strukturze o sekwencji 5'UAGA3'/3'AGAU5'. Natomiast, jeśli pary zamykające zostały odwrócone, czyli zamiast pary GC i UA zastosowano pary CG i AU, to zaburzony został naprzemienny schemat grup funkcyjnych. W motywie tandemowym o sekwencji 5'CAGG3'/3'GGAC5' nad sobą znajdowały się grupy aminowe cytydyny i adenozyiny oraz grupy karbonylowe dwóch guanozyn (rysunek 9).

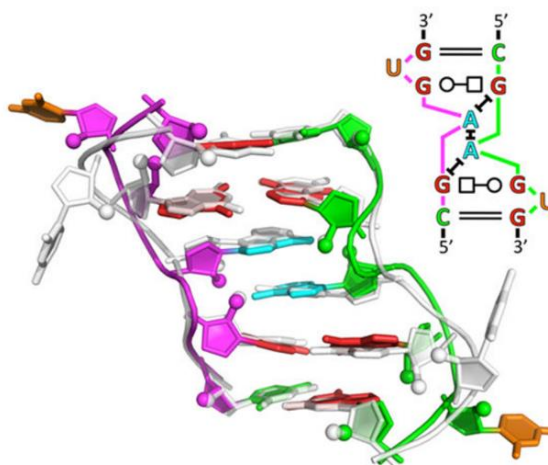


Rysunek 9. Widok na fragmenty dupleksów z tandemowym niesparowaniem od strony dużej bruzdy. Pod dupleksami podano sekwencje i wpływ na energię swobodną tego motywu w dupleksie. Na czerwono zaznaczono grupy karbonylowe, na fioletowo zaznaczono grupy aminowe. Rysunek zaadaptowano z Hammond, N. B. *et al.*⁴⁵

Oddziaływania warstwowe są jednymi z oddziaływań odpowiedzialnych za stabilizację kwasu nukleinowego. Naprzemiennie ułożenie tlenu karbonylowego i grupy

aminowej w dupleksie wprowadza do układu korzystne oddziaływania elektrostatyczne, wynikające z różnoimiennych ładunków cząstkowych na tych grupach funkcyjnych. Ułożenie dwóch grup o jednoimiennym ładunku cząstkowym, czyli dwóch grup aminowych lub karbonylowych prowadzi do destabilizacji układu. W świetle tej obserwacji w przypadku dupleksu z tandemowym niesparowaniem o sekwencji 5'GAGU3'/3'UGAG5' poza naprzemiennym ułożeniem grup guanozyn i adenozyiny, dochodziłoby do niekorzystnego oddziaływania pomiędzy grupami karbonylowymi guanozyiny i urydyny.

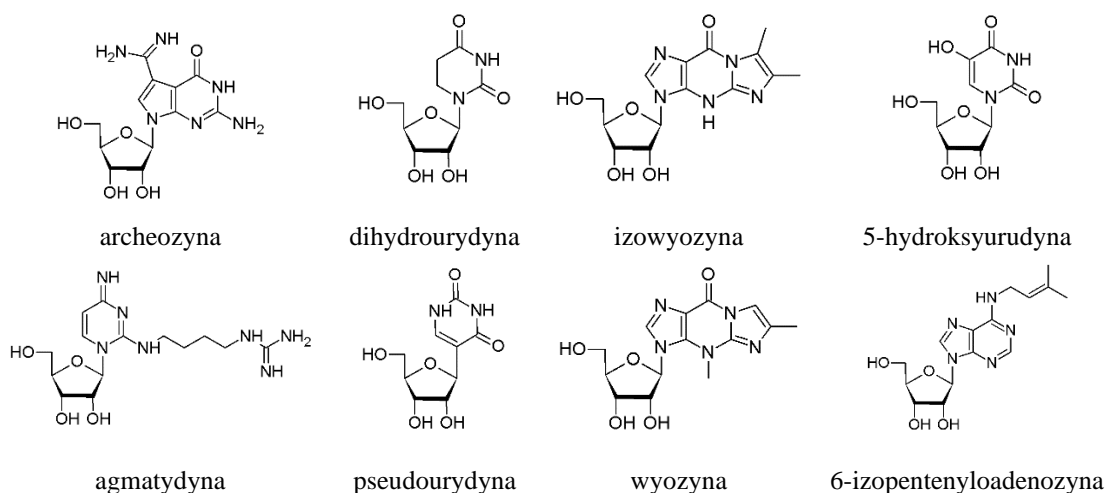
Dalsze badania struktur z wykorzystaniem modelowania molekularnego pokazują, że w przypadku dupleksów zawierających motyw RAGY/YGAR (gdzie R=A lub G, Y=U lub C) możliwe jest istnienie dwóch konformacji. Jednej typowej z tandemowym niesparowaniem AG/GA oraz drugiej alternatywnej, w której wypełnieniu ulegają reszty pirymidyn⁴⁷. Obliczenia komputerowe wskazują też, że wymuszona konformacja dupleksu z motywem 5'GAGU3'/3'UGAG5', w której założono maksymalną liczbę utworzonych wiązań wodorowych pomiędzy zasadami, jest bardziej stabilna niż alternatywne struktury z wypełnieniami dla dupleksów z motywami 5'AAGU3'/3'UGAA5' i 5'GAGC3'/3'CGAG5'. Poza tym praca Aleksandara Spasica *et al.*⁴⁷ sugeruje, że oddziaływania wodorowe w alternatywnej strukturze dla dupleksu z motywem 5'GAGU3'/3'UGAG5' mogą różnić się od zakładanej struktury z maksymalną liczbą wiązań wodorowych. W tej strukturze para G-U oddziaływałaby ze sobą w sposób rozwidlony (ang. *bifurcated*), a para A-G tworzyłaby się tylko przez jedno wiązanie wodorowe pomiędzy grupą egzoaminową guanozyiny N² i azotem iminowym adenozyiny N1. Dominująca struktura dla tego dupleksu została również potwierdzona przez obliczenia komputerowe wykonane na podstawie widm iminoprotonowych z wykorzystaniem metody CS-ROSETTA-RNA⁴⁶ (rysunek 10). W przewidzianej strukturze największe różnice dotyczą ułożenia wypełnionych reszt urydyny, jednak ich ułożenie jest najbardziej dynamicznie swobodne w porównaniu do reszty nukleozydów tworzących tą strukturę.



Rysunek 10. Nałożenie struktury przewidzianej przez obliczenia metodą CS-ROSETTA-RNA (kolorowa) i eksperymentalnej (szara) (PDB: 2LX1). Rysunek zaadoptowano z Sripakdeevong, P. *et al.*⁴⁶

3. Modyfikowane nukleozydy i kwasy nukleinowe

Istnieje ponad 160 znanych naturalnych modyfikacji nukleozydów⁴⁸ i są to w większości modyfikacje potranskrypcyjne. Po procesie transkrypcji nowopowstały kwas nukleinowy jest modyfikowany przy udziale enzymów specyficznie modyfikujących RNA. Modyfikowane nukleotydy naturalnie występują w różnych rodzajach RNA, tj.: tRNA, mRNA, rRNA, małym jądrowym RNA (snRNA) oraz mikroRNA (miRNA). Wśród naturalnie modyfikowanych nukleotydy można wyróżnić analogi, które różnią się od naturalnych metylacją grupy 2'-hydroksylowej lub zasady nukleotydu czy podstawieniem innymi grupami np. resztami aminokwasów lub rybozylem. Istotne są również modyfikacje urydyny, tj. pseudourydyna oraz dihydrourydyna. Poza powyższymi analogami zawierającymi niewielkie zmiany w strukturze w stosunku do naturalnych nukleotydy można również wymienić takie analogi jak: wyozyzna, archeozyna czy queozyna. Struktura zasady heterocyklicznej tych analogów została znacząco zmodyfikowana (rysunek 11).



Rysunek 11. Wzory strukturalne wybranych naturalnie występujących modyfikowanych nukleozydów⁴⁹.

Modyfikowane nukleozydy można otrzymywać także na drodze chemicznej. Powstała do dziś liczbę analogów trudno określić, ponieważ wciąż powstają nowe. Analogi nukleozydów znajdują różne zastosowanie, np. mogą pełnić funkcje leków przeciwwirusowych lub przeciwnowotworowych. Działają jako terminatory transkrypcji lub inhibitory procesów uniemożliwiających poprawny przebieg replikacji DNA. Warto wspomnieć jest również strategia tak zwanych proleków, czyli maskowanych nukleozydów czy nukleotydy. Są to częściowo blokowane nukleozydy i nukleotydy, które po wnikięciu do komórki i po odpowiedniej „obróbce” są gotowe zadziałać w swojej „aktywnej” – odblokowanej formie.

Innym powodem syntetyzowania modyfikowanych nukleozydów jest tworzenie kwasów nukleinowych o większej stabilności termodynamicznej lub bardziej odpornych na działania enzymów. Ogólnie modyfikacje powodują takie zmiany w strukturze, które np. ułatwiają oddziaływania warstwowe czy minimalizują negatywny efekt wynikający z ujemnych ładunków reszt fosforanowych. Ponadto, modyfikacje nukleozydów mogą prowadzić do powstawania nowych parowań w strukturach kwasów nukleinowych. Nowe pary w dupleksach rozszerzają możliwości kodowania informacji zawartych w sekwencji kwasów nukleinowych. Inne modyfikacje mogą stabilizować tworzone struktury^{50,51}.

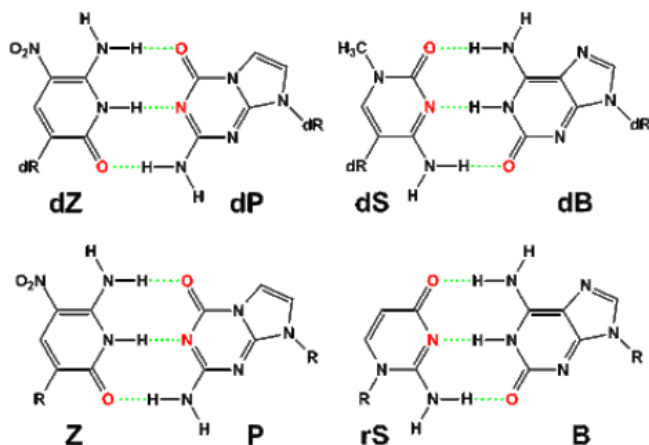
Ze względu na dużą liczbę grup funkcyjnych zarówno w części cukrowej, jak i obrębie zasady heterocyklicznej, istnieje wiele możliwości modyfikowania nukleozydów. Moją pracę opieram na wykorzystaniu takich modyfikacji, które posiadają zdeterminowaną konformację. Głównie interesowały mnie modyfikacje części zasadowej oraz reszty cukrowej, dlatego w dalszej części opisuję przykłady takich analogów.

3.1. Modyfikacje w części zasadowej

Modyfikacje w obrębie szkieletu zasady azotowej nukleozydów mogą prowadzić do stabilizowania oddziaływań warstwowych w wyniku zwiększenia powierzchni oddziaływań zasady heterocyklicznej. Przykładem może być chociażby addycja grupy metylowej w pozycji 5 uracylu lub cytozyny. Na ogół wprowadzenie takiej modyfikacji do nici RNA w duplesie powoduje stabilizację – efekt jest jednak nieznaczny. W przypadku modyfikacji w nici DNA obserwuje się niewielką destabilizację⁵². Również podstawienie tej pozycji podstawnikiem halogenowym nie wpływa znacząco na stabilność dupleksów RNA/RNA^{53,54}. Jedynie wprowadzenie pochodnych zawierających fluor w pozycji C5 uracylu wpływa destabilizująco na dupleks RNA, co tłumaczy się wysoką elektroujemnością fluoru⁵⁵. Natomiast w przypadku pozostałych halogenów efekt indukcyjny powoduje zwiększenie siły wiązań wodorowych. Addycja dłuższych alkilowych podstawników w pozycji 5 pirymidyn wpływa stabilizująco na duplekсы kwasów nukleinowych, aż do długości sześciu atomów węgla⁵⁶. Grupa propynylowa w pozycji 5 zasad pirymidynowych stabilizuje oddziaływania warstwowe. Grupa ta oddziałuje z grupą fosforanową za pośrednictwem cząsteczek wody. Zwiększona energia hydratacji prowadzi do stabilizacji dupleksów zawierających grupę propynylową^{52,53,57}. W przypadku modyfikacji zasad purynowych grupa propynylowa w pozycji 7 analogów

7-deazapuryn również wpływa stabilizująco na duplekсы RNA/DNA^{58,59}. Najprawdopodobniej jest to również spowodowane zwiększeniem oddziaływań warstwowych elektronów π .

Wprowadzenie modyfikacji w postaci halogenu lub grupy metylowej czy nitrowej w pozycję 8 puryn powoduje uprzywilejowanie konformacji *syn* wiązania N-glikozydowego^{60,61}. Taka zmiana konformacyjna przekłada się na obniżenie stabilności dupleksu, gdy modyfikowana jest adenina⁶², natomiast w przypadku modyfikowanej guaniny jest możliwa stabilizacja pewnych motywów strukturalnych. Wprowadzenie 8-bromoguanozyny w miejsce guanozyny w pętli UUCG prowadzi do termodynamicznej stabilizacji struktury w porównaniu z wariantem niemodyfikowanym^{63,64}. Substytucja 8-bromoguanozyną katalitycznie aktywnej cząsteczki rybozemu zależnego od jonów ołowiu (ang. *leadzyme*) pozwoliła ustalić, która z trzech guanozyn tworzących centrum katalityczne posiada konformację *syn*⁶⁵. Wprowadzenie pochodnej 8-bromoguanozyny w pozycji G24 znacznie zwiększa aktywność tego rybozemu.

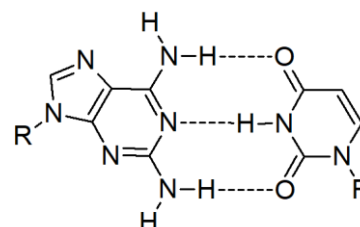


Rysunek 12. Zasady azotowe tworzące pary w „hachimoji” DNA i RNA.

Konformację *syn* w pirymidynach można wymusić przez wprowadzenie grupy metylowej w pozycję 6. Modyfikacja ta znacząco destabilizuje duplekсы, ponieważ wymuszona – nienaturalna konformacja wiązania N-glikozydowego uniemożliwia tworzenie się wiązań wodorowych⁵⁴.

W swoich badaniach Shuichi Hoshika wprowadził cztery nowe pary nukleotydów do RNA i DNA, rozszerzając możliwość kodowania informacji⁶⁶. „Hachimoji” DNA i RNA wykorzystuje zmodyfikowane zasady, tj.: 2-aminoimidazo[1,2a][1,3,5]triazyn-4(1H)-on, 6-amino-5-nitropyridyn-2-on, izoguaninę, izocytozynę i 1-metylocytozynę, co umożliwia tworzenie się oddziaływań wodorowych pomiędzy parami, które przypominają oddziaływania pomiędzy naturalnymi zasadami (rysunek 12).

Wprowadzenie dodatkowych grup funkcyjnych w części zasadowej nukleozydu może przyczynić się do powstania nowych miejsc akceptorowo-donorowych wiązań wodorowych. Wprowadzenie dodatkowej grupy aminowej po stronie krawędzi Watsona-Cricka daje możliwość powstania dodatkowego wiązania wodorowego z przeciwległą zasadą (np. 2-aminoadenina). W parze Watsona-Cricka pomiędzy adeniną, a uracylem powstaje wiązanie pomiędzy atomem wodoru grupy aminowej N⁶ adeniny, a tlenem karbonylowym O⁴ uracylu oraz między iminowym atomem azotu N¹ adeniny i atomem wodoru grupy aminowej N³ uracylu (rysunek 6, rozdział 1.4.). Po dodaniu grupy aminowej w pozycji C2 adeniny może powstać trzecie wiązanie wodorowe z tlenem karbonylowym O² uracylu (rysunek 13). Taka para jest znacznie bardziej stabilna niż jej naturalny odpowiednik.



Rysunek 13. Para Watsona-Cricka pomiędzy zasadami uracylem i 2-aminoadeniną.

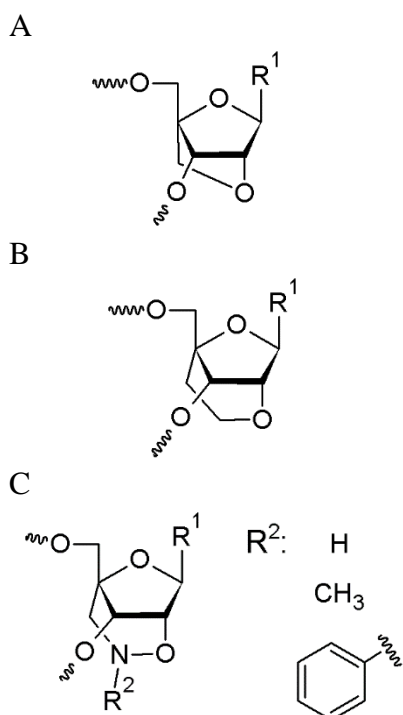
3.2. Modyfikacje w części cukrowej

Ryboza oraz 2'-deoksyryboza są analogami, ponieważ poprzez usunięcie grupy 2'-hydroksylowej możliwe jest otrzymanie deoksyrybozy. W podobny sposób można modyfikować pozostałe dwie grupy hydroksylowe, jednakże usunięcie grup hydroksylowych z pozycji 3' lub 5' nukleozydu uniemożliwia przyłączanie kolejnych nukleozydów w kwasie nukleinowym według klasycznego modelu wiązania 3'-5' internukleotydu. Ze względu na pofałdowany charakter reszty cukrowej wprowadzane modyfikacje wpływają na jego konformację. Zjawisko, które napędza ten efekt jest związane z oddziaływaniami elektronowymi i sterycznymi.

Interesującymi i godnymi uwagi są modyfikacje, które „spinają” co najmniej dwa atomy reszty cukrowej. Analogi te można zaliczyć do jednej grupy, tak zwanych mostkowanych kwasów nukleinowych (BNA, ang. *bridged nucleic acids*). Pochodne te uzyskuje się przez wprowadzenie dodatkowego atomu lub grupy atomów, które łączą co najmniej dwie pozycje pierścienia cukrowego. W wyniku powstania nowego układu cyklicznego konformacja oryginalnego szkieletu rybozy zostaje usztywniona.

Przykładami BNA są 2',4'-BNA nazywane LNA (ang. *locked nucleic acids*) czyli nukleozydy o usztywnionej konformacji pierścienia rybozy (rysunek 14A). Sposób syntezy tych związków został po raz pierwszy opisany przez grupę Takeshiego Imanishiego⁶⁷,

a krótko po tym niezależnie przez grupę Jaspera Wengela⁶⁸. Dzięki swojej charakterystycznej strukturze analogi te bardzo stabilizują strukturę w duplekcie kwasów nukleinowych. Jest to spowodowane przez efekt preorganizacji LNA, dzięki któremu cząsteczka „nie traci energii” na przyjęcie odpowiedniej konformacji, aby utworzyć trwały dupleks^{69,70}.



Rysunek 14. Wzory strukturalne pokazujące struktury nukleozydów BNA;

A – LNA, B – ENA, C – BNA^[NR];
R¹: zasada heterocykliczna

Kolejnymi generacjami BNA, są 2'-O,4'-C-etyleno-mostkowane kwasy nukleinowe (ENA) (ang. *2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids*) (rysunek 14B), 2'-O,4'-C-n-propyleno mostkowane kwasy nukleinowe (PrNA)⁷¹ (ang. *2'-O,4'-C-n-propylene-bridged nucleic acids*) oraz pochodne mostkowane zawierające wiązanie N-O⁷² (rysunek 14C) badane przez grupę Takeshiego Imanishiego. Wprowadzenie do struktury nukleozydu atomu azotu w obrębie części cukrowej miało na celu zniesienie negatywnego efektu płynącego z ujemnego ładunku grup fosforanowych, co ułatwiało hybrydyzację w duplekcie lub trypleksie. Pochodne te mają wspólną cechę strukturalną, która polega na uprzywilejowaniu konformacji *C3'-endo*. W przypadku klasycznych pochodnych LNA, struktura dwóch pierścieni jest tak usztywniona, że układ ten istnieje w postaci jedynie konformera *C3'-endo*. Istnieje też grupa BNA wymuszająca konformację typu *South (C2'-endo)*. Do tej grupy należą między innymi 3'-O-4'-metylenorybonukleozydy⁷³, *trans-3',4'-BNA*⁷⁴, 2',5'-BNA^{ON}, jednak właściwości tworzenia par Watsona-Cricka dla nukleozydów zawierających wiązanie O-N zostały zaburzone⁷⁵.

Konformacją reszty cukrowej można również sterować poprzez wprowadzanie grup funkcyjnych w pozycji 2'. Wśród tych pochodnych można zacząć od zmiany stereochemii grupy hydroksylowej poprzez zastąpienie rybozy – arabinozą. Grupa 2'-hydroksylowa w pozycji β powoduje zmiany konformacyjne w stosunku do naturalnego cukru. Wykazano, że grupa ta determinuje strukturalnie konformację *C2'-endo* cukru⁷⁶. Trwałość termiczna w dupleksach ANA/RNA jest obniżona. Dochodzi do destabilizacji o 1~1,5°C

na parę zasad. Ta destabilizacja może wynikać z oddziaływań z grupą 2'- β -hydroksylową, które mogą powstać w takim dupleksie. Kolejnymi analogami są 2'-fluorowane-2'-deoksy-pochodne. Istnieją dwa izomery tego związku. Jeden o konfiguracji 2'- α -fluoro, który jest analogiem rybonukleozydu oraz drugi o konfiguracji 2'- β -fluoro – analog arabinonukleozydu. Ze względu na swój niewielki rozmiar fluor nie powoduje dużych zawaad sterycznych, a jednocześnie jego duża elektroujemność prowadzi do powstawania znaczących efektów wpływających na konformację pierścienia cukrowego. Analog 2'-fluororybonukleozydu stabilizuje strukturę A w dupleksie z RNA, przesuując równowagę konformacyjną cukru w kierunku *C3'-endo*. Natomiast pochodne serii 2'F-ANA powodują w dupleksie zmiany, które prowadzą do powstania formy pośredniej pomiędzy formą A i B helisy. Konformacja reszt cukrowych w dupleksie 2'F-ANA/RNA przesunięta jest w stronę *O4'-endo*. W badaniach prowadzonych przez grupę Masada Damha dowiedziono, że w kwasach nukleinowych zawierających modyfikacje 2'F-ANA występują oddziaływania stabilizujące pomiędzy atomami 2'F i 8H puryny⁷⁷. W strukturach kwadrupleksów równoległych dochodzi także do stabilizacji przez oddziaływania 2''H i 4'O²⁸, które są możliwe przez efekt indukcyjny wyciągający elektrony, powodowany przez fluor w pozycji 2' na geminalny atom wodoru. Analogi zawierające podstawniki skierowane nad powierzchnię pierścienia cukrowego, takie jak arabinonukleozydy i 2'-fluoroarabinonukleozydy oraz BNA wpływają też znacząco na możliwość przyjmowania preferowanej konformacji *anti* wiązania N-glikozydowego. Grupy funkcyjne nad powierzchnią pierścienia mogą być czynnikami sterycznymi utrudniającymi lub uniemożliwiającymi obrót zasady wokół wiązania N-glikozydowego. Przez utrudnioną rotację takie analogi mogą destabilizować dupleksy. Wprowadzanie takich pochodnych do fragmentów oddziaływujących w sposób niekanoniczny może również zaburzyć stabilność, jeśli dany analog nie będzie mógł osiągnąć optymalnej konformacji wiązania N-glikozydowego.

4. Funkcjonalne kwasy nukleinowe

Kwasy nukleinowe poza funkcją przechowywania i przetwarzania informacji genetycznych posiadają szereg innych funkcji, w tym katalityczne. W tym rozdziale omówię kilka przykładów katalitycznych i regulatorowych kwasów nukleinowych.

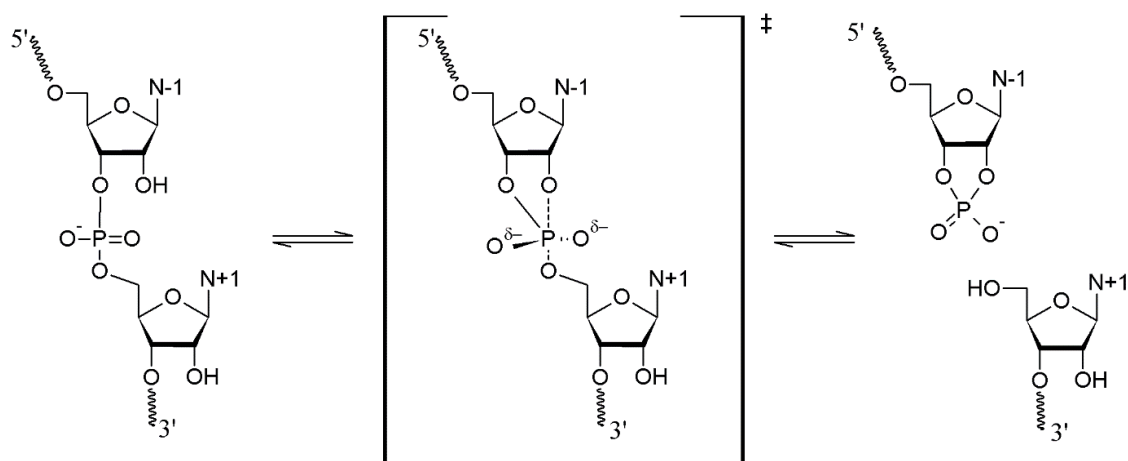
W roku 1989 Thomas Cech wraz z Sidneyem Altmanem otrzymali nagrodę Nobla za badania nad katalitycznymi RNA. Na początku lat 80. Cech odkrył, że w procesie dojrzewania mRNA u *Tetrahymena thermophila* białka nie są odpowiedzialne za splicing. Stwierdził, że RNA samo katalizuje proces splicingu bez udziału innych cząsteczek, w tym enzymów. Sidney Altman badał enzym RNaza P, który jest odpowiedzialny za powstanie tRNA z jego prekursora. W trakcie eksperymentów okazało się, że enzym ten jest rybonukleoproteiną, czyli składa się z białka oraz z RNA. Altman udowodnił, że za proces przecinania prekursorowego tRNA odpowiedzialny jest fragment kwasu rybonukleinowego, a enzym RNaza P był aktywny również, gdy został pozbawiony części białkowej.

Termin rybozym jako określenie dla kwasu rybonukleinowego o działaniu enzymatycznym został po raz pierwszy użyty w publikacji Kelly Kruger *et al.* z 1982 roku⁷⁸. Od tego czasu odkrywano kolejne rybozymy. Ich istnienie podejrzewali już Watson i Crick po odkryciu, jak złożone struktury drugorzędowe może przyjmować RNA. Istnienie kwasów nukleinowych spełniających funkcje katalizatorów jest również interesującym faktem w świetle teorii powstania życia i tak zwanej teorii „Świata RNA”.

Kolejne badania nad kwasami rybonukleinowymi doprowadziły do odkrycia wielu rodzajów rybozymów występujących naturalnie. Wśród najważniejszych znanych rybozymów należy wyróżnić takie jak: I i II grupa intronów⁷⁹, rybozym *hairpin*, *hammerhead*, HDV, *twister*, *hatchet* oraz *pistol*^{80,81,82}. Rybozymy te należą do grupy rybozymów katalizujących rozcinanie wiązania fosfodiesterowego pomiędzy parą nukleotydów. Znane są również rybozymy, które katalizują powstawanie wiązania internukleotydowego^{83,84} czy nawet wiązania peptydowego⁸⁵.

W przypadku rybozymów katalizujących rozcięcie nici RNA bardzo istotna jest konformacja reszty fosforanowej substratu. Ułożenie w jednej linii atomów 2'O, P i 5'O (ang. *in-line*) jest niezbędne dla przebiegu reakcji, przez to w stanie przejściowym grupa fosforanowa przyjmuje strukturę bipiramidy trygonalnej, gdzie pozycje apikalne są zajęte przez atomy 2'O i 5'O. Przejście to jest charakterystyczne dla mechanizmów reakcji typu

S_N2 , gdzie nukleofilem jest tlen grupy 2'-hydroksylowej, natomiast grupą opuszczającą tlen w pozycji 5' (rysunek 15). Według tego mechanizmu przebiegają wszystkie reakcje cięcia kwasów rybonukleinowych, także te katalizowane przez enzymy. Różnice pomiędzy katalizą przez poszczególne rybozomy czy enzymy wynikają z odmiennego centrum kwasowo-zasadowego, które oddziałuje z RNA, na przykład przez odrywanie protonu od grupy 2'-hydroksylowej lub przez stabilizowanie stanu przejściowego⁸⁶. W działaniu większości rybozymów tnących niezwykle istotna jest obecność w mieszaninie reakcyjnej kationu metalu dwuwartościowego, np. kationu magnezu. Może on oddziaływać z RNA przez fosforan lub atomy tlenu rybozy, stabilizując oksoaniony lub aktywując centra nukleofilowe. Tak skondensowany ze względu na swój ładunek i rozmiar przeciwjon, jakim jest kation magnezu bardzo dobrze nadaje się do zubożniania ładunków ujemnych znajdujących się w RNA.



Rysunek 15. Ogólny mechanizm transestryfikacji wiązania internukleotydu z wyróżnieniem stanu przejściowego.

Poza RNA o aktywności enzymatycznej równie istotne są inne funkcjonalne kwasy nukleinowe, takie jak aptamery i ryboprzełączniki. Są to dwie grupy kwasów nukleinowych, które z dużą specyficznością wiążą małe cząsteczki lub białka. Aptamery to cząsteczki wyizolowane *in vitro* z bibliotek DNA lub RNA⁸⁷, ryboprzełączniki to naturalnie występujące aptamery posiadające dodatkowo domenę ekspresyjną⁸⁸. Domena wiążąca ryboprzełączników i aptamerów ze względu na swoją zdolność selektywnego wiązania do docelowej cząsteczki, musi przyjmować odpowiednie struktury umożliwiające to wiązanie. W przypadku aptameru wiążącego monofosforan adenozyiny (AMP) pokazano na strukturze NMR-owskiej, że fragment wiążący jest bardzo dynamiczny i nieuporządkowany, a strukturalizuje się dopiero w obecności AMP lub trifosforanu

adenozyny (ATP)^{89,90}. Aptamer ten podobnie jak wiele innych potrafi również wiązać pochodne swojego głównego substratu, takie jak: dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD⁺), 7-deazaadenozynę i 2'-O-metyloadenozynę^{91,92}. Usunięcie chociażby jednej grupy odpowiedzialnej za tworzenie wiązania wodorowego z substratem może skutkować obniżeniem stałej wiązania nawet o dwa rzędy wielkości⁹¹. Generalnie, jeśli ogólna struktura aptameru zostanie zachowana to nadal będzie on rozpoznawał swoją cząsteczkę docelową, jednak z niższą selektywnością.

Również inny aptamer, który wiąże zieleń malachitową nie posiada zdeterminowanej struktury, w którą wpasowuje się ligand, ale strukturalizuje się w jego obecności. Także ten aptamer może wiązać poza zielenią malachitową, również inne małe cząsteczki, które są podobne strukturalnie, takie jak: N,N'-tetrametylorozamina i pyronina Y⁹³. Po związaniu cząsteczki aptamer wiążący zieleń malachitową przyjmuje bardzo interesującą strukturę „kieszeni wiążącej”. Znajduje się w niej tetrada zasad oraz dwie triady.

Aptamer wiążący teofilinę również potrafi wiązać się z innymi pochodnymi ksantyny, jednak wiąże się 10000 razy słabiej z kofeiną⁹⁴. Dzięki temu aptamer ten może służyć do rozróżniania tych dwóch związków różniących się jedną grupą metylową przyłączoną na atomie azotu N7 ksantyny. Poza konserwatywnym rdzeniem wiążącym teofilinę pozostałe fragmenty tego aptameru mogą być zmieniane bez utraty właściwości wiążącej. Aptamer ten w kompleksie z teofiliną tworzy strukturalną kieszeń wiążącą. Kieszeń ta powstaje z trypletu zasad i niekanonicznej pary, które przez oddziaływania warstwowe i wodorowe wiążą teofilinę. Taka struktura kieszeni wiążącej nie tworzy się w obecności kofeiny⁹⁵. Może to świadczyć o ustrukturalizowaniu się aptamerów w obecności liganda.

Ryboprzełącznik guaninowy został scharakteryzowany w wyniku badania oddziaływań z hipoksantyną⁹⁶. W strukturze krystalograficznej hipoksantyna znajduje się w otoczeniu czterech nukleozydów purynowych, z którymi oddziałuje przez wiązania wodorowe. W strukturze jest widoczne miejsce na grupę egzoaminową, która znajduje się w guaninie. Miejsce to znajduje się w sąsiedztwie grup karbonylowych C74 i U51, z którymi grupa aminowa mogłaby utworzyć stabilizujące wiązania wodorowe. Miejsce wiązania ligandu jest stabilizowane przez tryplety zasad podobnie, jak w innych

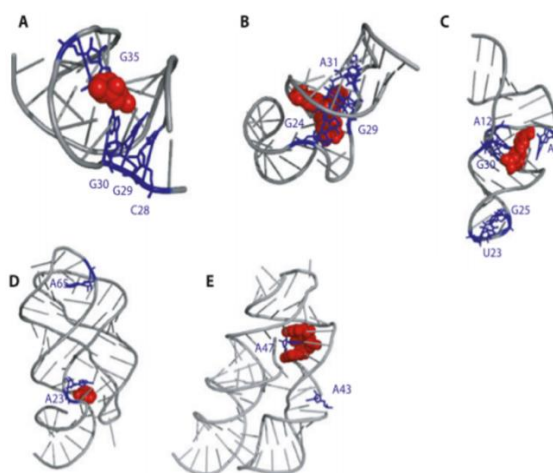
aptamerach. W strukturze tego ryboprzełącznika zauważono również oddziaływania czwartorzędowe pomiędzy pętlami L2 i L3.

Inny ryboprzełącznik zależny od bis-3',5'-cyklicznego diguanozynomonofosforanu (c-di-GMP) oddziałuje z ligandem za pośrednictwem trzech reszt nukleozydowych G20, A47 i C92⁹⁷. Konserwatywność tych zasad jest wysoka dla różnych form tego ryboprzełącznika, jednak zastąpienie wymienionych nukleotydów innymi nie wpływa znacząco na siłę wiązania ligandu. Znaczące zmiany w strukturze tej cząsteczki można zaobserwować przy mutacjach w innych pozycjach, które nie oddziałują bezpośrednio z ligandem i prowadzi to do osłabienia siły wiązania⁹⁸.

4.1. Konformacje nukleozydów w funkcjonalnych kwasach nukleinowych

Centra katalityczne rybozymów zawierają reszty nukleotydów, w przypadku, których kluczową rolę odgrywa konformacja. Analiza struktur wielu rybozymów, aptamerów, ryboprzełączników i rybosomalnych RNA przez grupę Philipa Bevilacqua³ wykazała istotną rolę nukleozydów o konformacji *syn*. Przeanalizowano 51 struktur funkcjonalnych RNA i obliczono, że konformację *syn* we wszystkich strukturach przyjmuje 4,2% nukleozydów. Może wydawać się, że jest to wartość bardzo mała, jednak dystrybucja tych nukleozydów nie jest przypadkowa. Największe skupiska nukleozydów o tej konformacji znaleziono w miejscach istotnych dla funkcji pełnionej przez analizowany rodzaj RNA.

Nukleozydy o konformacji *syn* są zaangażowane w oddziaływania z ligandami w aptamerach i ryboprzełącznikach. Spośród wszystkich nukleozydów o tej



Rysunek 16. Rozmieszczenie nukleozydów o konformacji *syn* w aptamerach i ryboprzełącznikach. A – aptamer cytruliny; B – aptamer zieleni malachitowej; C – aptamer ATP; D – ryboprzełącznik guaninowy; E – ryboprzełącznik c-di-GMP.

Rysunek zaadaptowano z Sokolowski, J. E. *et al.*³

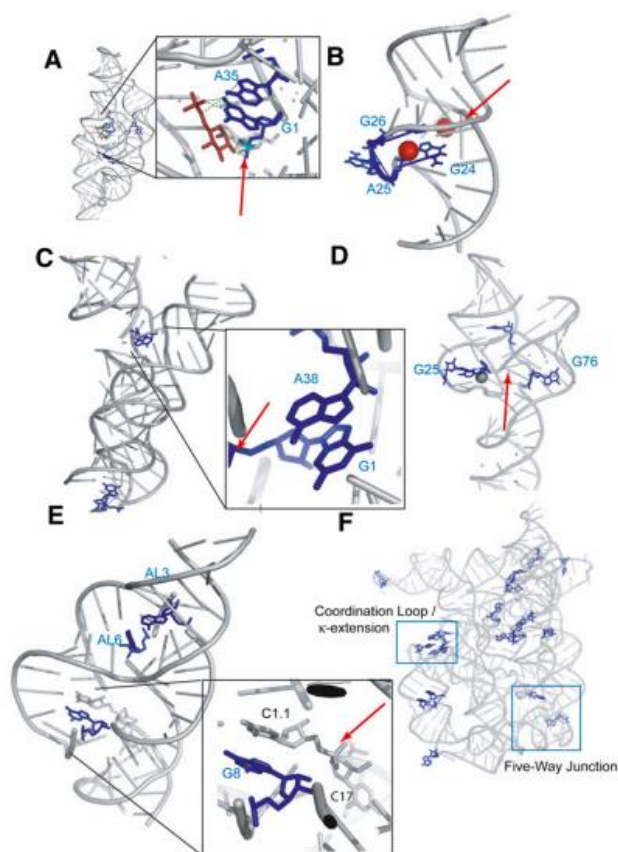
nienaturalnej konformacji w danej strukturze aż 80% odgrywa istotną rolę w funkcji aptamerów, a 63% w przypadku ryboprzełączników. W nukleozydach budujących aptamery łącznie 5% stanowią nukleozydy o konformacji *syn*, a w ryboprzełącznikach

odsetek ten wynosi jedynie 3,7%. W wielu aptamerach zasady w konformacji *syn* znajdują się w kieszeniach wiążących i oddziałują bezpośrednio z ligandem (rysunek 16).

W aptamerze wiążącym zieleń malachitową nukleozydy G24, G29 i A31 przyjmują konformację *syn* i znajdują się w kieszeni wiążącej, a reszty guanozyn znajdują się nad ligandem i oddziałują z nim warstwowo. Co ciekawe, w aptamerze wiążącym teofilinę nie znaleziono nukleozydu o konformacji *syn*, mimo że w większości struktur aptamerów występują one w rejonach odpowiedzialnych za wiązanie ligandu.

W ryboprzełącznikach można znaleźć nukleozydy o konformacji *syn* również poza rejonem odpowiedzialnym za wiązanie ligandu. W ryboprzełączniku guaninowym można znaleźć dwie reszty adenozy w konformacji *syn*, z czego jedna znajduje się w kieszeni wiążącej ligand, a druga znajduje się w pętli odpowiedzialnej za oddziaływanie trzeciorzędowe. Natomiast jedna z adenozyn w ryboprzełączniku zależnym od c-di-GMP również przyjmuje konformację *syn*. Konformacja ta umożliwia interkalację zasady pomiędzy dwie reszty guaniny ligandu.

W rybozymach nukleozydy *syn* odpowiadają za zachowanie struktury, która wykazuje aktywność np. przez oddziaływanie warstwowe (rysunek 17). W rybozymie zależnym od jonów ołowiu (tzw. *leadzyme*) trzy dostępne struktury: krystalograficzna, NMR-owska oraz otrzymana przez modelowanie molekularne wskazują, że trzy guanozyny obecne w centrum katalitycznym mogą uczestniczyć w procesie katalitycznym⁶⁵. Struktura przewidziana przez symulację dynamiki molekularnej



Rysunek 17. Rozmieszczenie nukleozydów o konformacji *syn* w rybozymach. Czerwona strzałka wskazuje miejsce cięcia. A – rybozym glmS; B – leadzyme, jony ołowiu zaznaczono na czerwono; C – rybozym hairpin; D – rybozym HDV; E – rybozym hammerhead; F – Intron grupy II. Rysunek zaadaptowano z Sokolowski, J. E. *et al.*³

okazała się najbardziej podobna do struktury aktywnego rybozymu, którą określono eksperymentalnie przez substytucję każdej z trzech guanozyn na 8-bromoguanozynę. Reszta guanozyny G24 w konformacji *syn* znajduje się w bliskim sąsiedztwie dwóch jonów Pb^{2+} , które są niezbędne do transestryfikacji wiązania internukleotydu. Ponadto, zastąpienie reszty cukrowej tych trzech guanozyn przez pochodne typu LNA wpłynęło na aktywność tego rybozymu. Po zmodyfikowaniu reszty guanozyny G9 doszło do zwiększenia aktywności⁹⁹. Według znanych struktur NMR i krystalograficznych reszta cukru G9 znajdowała się w konformacji *C2'-endo*. Zwiększenie aktywności przez wprowadzenie w to miejsce nukleozydu o zdeterminowanej konformacji *C3'-endo* wskazuje, że w formie aktywnej tego rybozymu dochodzi do zmiany konformacyjnej w jego centrum aktywnym. Obecność nukleozydów o konformacji *syn* w miejscu aktywnym rybozymu umożliwia takie usytuowanie substratu, które promuje atak grupy 2'-hydroksylowej.

W rRNA również znaleziono wiele nukleozydów *syn* w rejonach istotnych dla struktury i aktywności w podjednostce 23S i 16S. Domena V 23S rRNA w rejonie odpowiedzialnym za przenoszenie reszt aminokwasowych z tRNA zawiera aż 18 nukleozydów o konformacji *syn*.

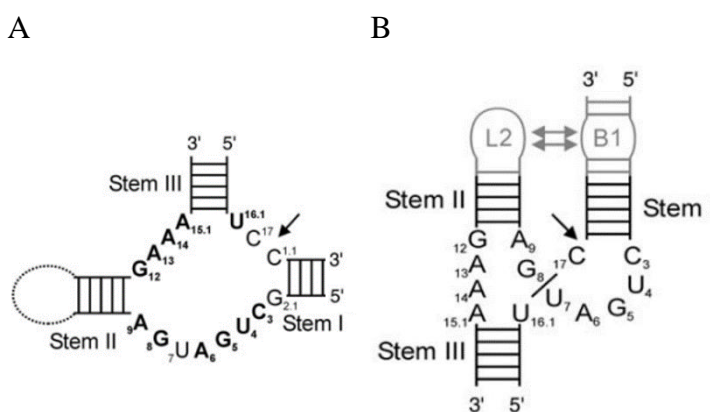
Występowanie nukleozydów o konformacji *syn* w miejscach odpowiedzialnych za aktywność funkcjonalnych RNA może być podstawą do tworzenia w sposób syntetyczny aptamerów czy rybozymów o zwiększonej aktywności lub specyficzności względem substratu.

4.2. Rybozym *hammerhead*

Jednym z szerzej badanych rybozymów jest rybozym typu *hammerhead*. Dlatego w mojej pracy doktorskiej postanowiłem wykorzystać ten motyw strukturalny jako model do swoich badań. Ten rybozym został odkryty w wiroidzie wirusa roślin¹⁰⁰. Ponadto została również określona jego struktura drugorzędowa. Następnie motyw strukturalny rybozymu *hammerhead* był opisany także u eukariontów^{101–105}. Rybozym ten jest zbudowany z trzech helikalnych ramion, które rozchodzą się od katalitycznego rdzenia. Nukleotydy budujące centrum katalityczne są wysoce konserwatywne, natomiast sekwencja rybozymu w rejonach budujących rejony helikalne może być dowolna, tak aby spełnione były reguły parowania zasad. Rybozym *hammerhead* katalizuje transestryfikację docelowego RNA

przez rozpoznanie trypletu 5'-NUH-3' (N - dowolny nukleozyd, H = A lub C lub U). Struktura przestrzenna tego motywu została zbadana metodami krystalograficznymi przy użyciu minimalnej formy tego rybozemu (rysunek 18A). Wszystkie otrzymane struktury wskazują na to, że helisy I i II układają się równoległe do siebie. Badania pokazały, że oddziaływania między pętlą L2 i trzonem helisy I mogą stabilizować strukturę rybozemu i prowadzić do zwiększenia aktywności¹⁰⁶⁻¹¹¹ (rysunek 18B). Wiele badań nad strukturą i funkcją rybozemu *hammerhead* zostało jednak prowadzonych na modelu minimalnym, w którym oddziaływania takie są niemożliwe.

Pomimo, że rozwiązano struktury dla małych rybozemu *hammerhead*, to dane z eksperymentów biochemicznych nie dostarczają pełnych informacji dotyczących potencjalnych oddziaływań w obrębie cząsteczki rybozemu¹¹². Modele dostępne w bazach struktur nie zawsze są spójne, na co ma wpływ także

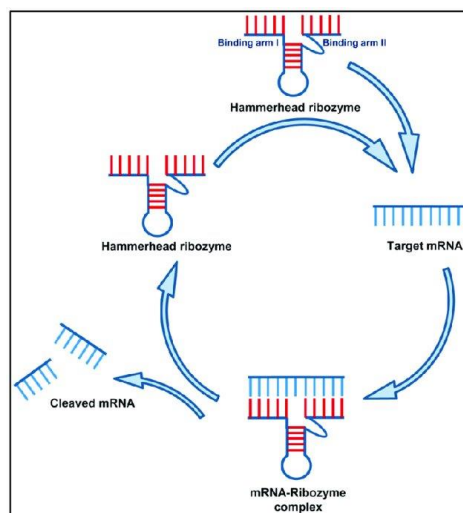


Rysunek 18. (A) Struktura drugorzędowa rybozemu typu *hammerhead*. (B) Oddziaływania trzeciorzędowe między pętlą a trzonem helisy I w strukturze rybozemu. Rysunek zaadaptowano z Przybilski R. et al.¹¹⁰

sposób zaprojektowania rybozemu. Podczas projektowania możemy wybrać jeden z dwóch układów działania rybozemu, tj. układ typu *cis* - rybozemu i substrat stanowią wtedy jedną całość (nić substratu połączona jest z nicią katalityczną rybozemu) lub układ typu *trans*, gdy substrat jest osobnym oligomerem^{107,109}. Struktury krystalograficzne są zamrożonym w czasie stanem o pewnym lokalnym minimum energetycznym, dlatego możliwe jest, że w formie aktywnej rybozemu zmienia swoją konformację.

Dotychczas opublikowane prace wskazują, że istotną rolę w mechanizmie katalizy przez rybozemu *hammerhead* odgrywają dwie reszty guanozyny tj. G8 i G12. Guanozyna w pozycji 12 (G12) pełni rolę ogólnej zasady, oddziałującej przez azot N1 z grupą 2'-hydroksylową, natomiast grupa 2'-hydroksylowa guanozyny G8 – ogólnego kwasu – protonuje tlen O5'. Bez wątplenia konformacja tych dwóch nukleotydów jest istotna zarówno w przypadku wiązania N-glikozydowego, jak i pofałdowania cukru.

W mechanizmie działania rybozemu *hammerhead* istotne są następujące etapy: hybrydyzacja z substratem, transestryfikacja oraz dysocjacja produktów reakcji (rysunek 19). Ponadto, równie ważnym etapem jest uzyskanie przez kompleks rybozym-substrat odpowiedniej konformacji, która umożliwi zajście transestryfikacji. Dotychczasowe badania wskazują, że może to być etap limitujący aktywność rybozemu *hammerhead*¹¹³. Wprowadzane do centrum katalitycznego modyfikacje, takie jak substytucje nukleotydów prowadzą do obniżenia lub całkowitej utraty aktywności rybozemu. Także wprowadzanie modyfikacji chemicznych w obrębie grup funkcyjnych ma negatywny wpływ na aktywność rybozemu. Pozbawienie jednej z ganozyn G12 lub G8 jednej z grup funkcyjnych: aminowej lub karbonylowej, poprzez podstawienie w tych pozycjach 2-aminopuryną lub inozyną prowadzi do znacznego obniżenia aktywności rybozemu. W



Rysunek 19. Cykl działania rybozemu *hammerhead*.

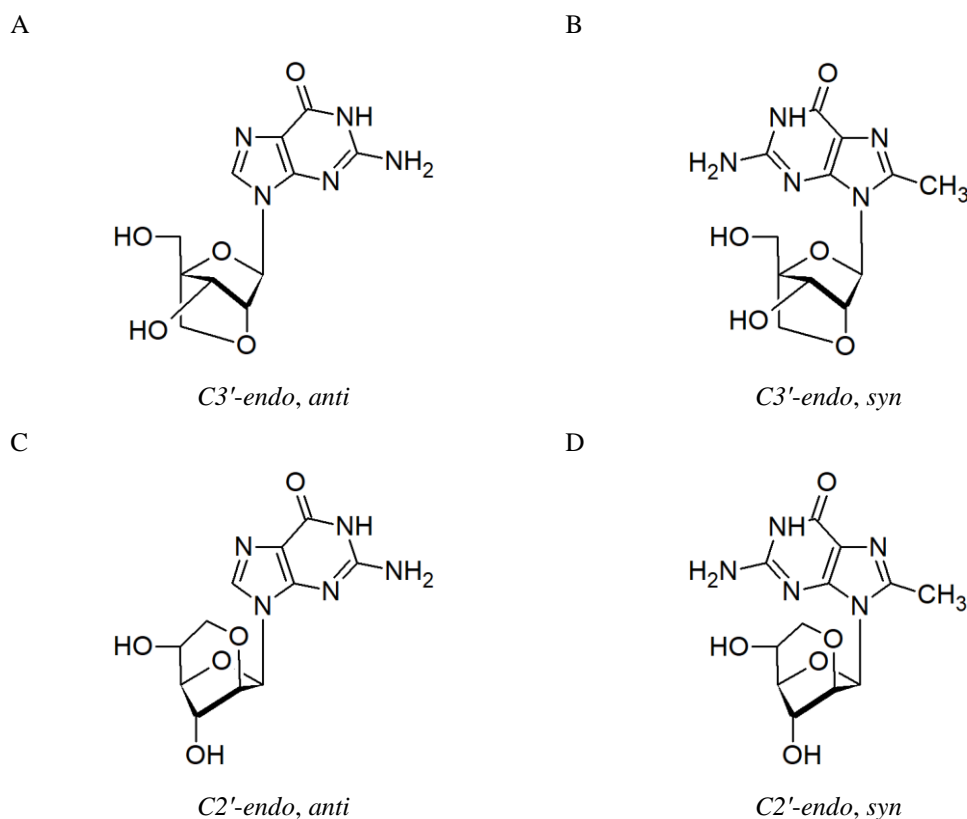
przypadku wprowadzenia inozyny w pozycji G8 zmiana jest najmniejsza¹¹⁴. Być może wprowadzenie innych modyfikacji wymuszających zmiany konformacyjne, a nieingerujące w liczbę grup funkcyjnych odpowiedzialnych za powstające wiązania wodorowe, pomogłoby lepiej zrozumieć dynamikę rdzenia katalitycznego tego rybo

III WYNIKI I DYSKUSJA

1. Synteza zdeterminowanych strukturalnie analogów guanozyny

Pierwszym etapem mojej pracy doktorskiej była chemiczna synteza strukturalnie zdeterminowanych nukleozydów, a następnie oligonukleotydów zawierających tak modyfikowane nukleotydy. Następnie otrzymane modyfikowane oligonukleotydy posłużyły mi do dalszych badań, które dotyczyły wpływu analogów nukleotydów na strukturę dupleksu RNA zawierającego tandemowe niesparowanie 5'AG/3'GA.

Ze względu na szczególne cechy strukturalne nukleozydów zawierających konformację cukru *2'-endo* oraz wiązania glikozydowego *syn*, zależało mi na otrzymaniu tak strukturalnie modyfikowanego nukleozydu. W mojej pracy doktorskiej planowałem zsyntetyzować chemicznie serię nukleozydów posiadających cztery warianty konformacyjne tzn. przyjmujące konformację *C2'-endo*, *C3'-endo* oraz *syn* i *anti*. Były to analogi typu LNA tj.: 2'-O,4'-C-metylenoguanozyna, 2'-O,4'-C-metyleno-8-metyloguanozyna, 2'-O,5'-C-metylenoarabinoguanozyna oraz 2'-O-5'-C-metyleno-8-metyloarabinoguanozyna (rysunek 20). Jednakże, wielomiesięczne próby chemicznej syntezy modyfikowanych nukleozydów 2'-O,5'-C-arabinoguanozyny (rysunek 20C) i 2'-O,5'-C-metyleno-8-metyloarabinoguanozyny (rysunek 20D) przedstawionych na rysunku 20 nie powiodły się.



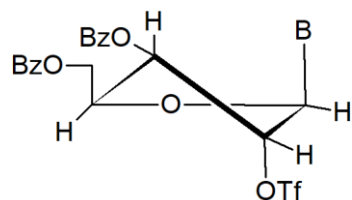
Rysunek 20. Cztery konformacyjnie zdefiniowane analogi guanozyny.

To spowodowało, że konieczna była zmiana podejścia i znalezienie tak modyfikowanej pochodnej, którą można byłoby zsyntetyzować, a strukturalnie spełniałaby założenia i przyjmowała konformację *C2'-endo* lub byłaby to konformacja dominująca. Analiza dostępnych informacji literaturowych sugerowała, że do tych celów nadawałaby się pochodna 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydu^{55,115,116}. Silnie elektroujemny atom fluoru powoduje zmiany konformacyjne pierścienia reszty cukrowej. Ze względu na wybrane modele badawcze, tj.: motyw tandemowego niesparowania 5'AG/3'GA oraz rybozym *hammerhead*, w którego centrum katalitycznym istotną rolę odgrywają dwie reszty guanozyny byłem zainteresowany głównie analogami guanozyny.

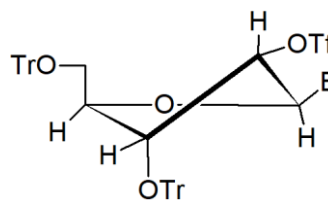
W Zakładzie Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych, w którym wykonywałem swoje badania, od wielu lat syntetyzowano modyfikowane nukleozydy i ich amidofosforiny. W ten sposób powstała biblioteka wielu interesujących pochodnych nukleozydów, którą w części wykorzystałem w swoich badaniach.

Po wybraniu pochodnej z serii 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydów zacząłem projektować syntezę 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydu guanozyny. Ponieważ związek ten jest znany, rozpocząłem od przeglądu literatury dotyczącej jego syntezy. Istniejące metody syntezy tych pochodnych opierają się na modyfikowaniu rybozy do 2-fluoro-1-bromo-pochodnej, którą następnie można sprzęgać z zasadami nukleinowymi w celu otrzymania pożądanego nukleozydu¹¹⁷⁻¹²⁰. Alternatywną metodą jest synteza, w której substratem jest nukleozyd^{120,121}. Metoda oparta na reakcji sprzęgania jest metodą bardziej uniwersalną, ponieważ po uzyskaniu odpowiednio zmodyfikowanego cukru, możliwe jest otrzymanie nukleozydu przez sprzęganie z dowolną zasadą. Ponieważ swoje badania opierałem na badaniach pochodnych guanozyny, a metoda bezpośredniego modyfikowania nukleozydu wydawała mi się łatwiejszą drogą syntetyczną, postanowiłem użyć tej metody.

A

*C3'-endo*

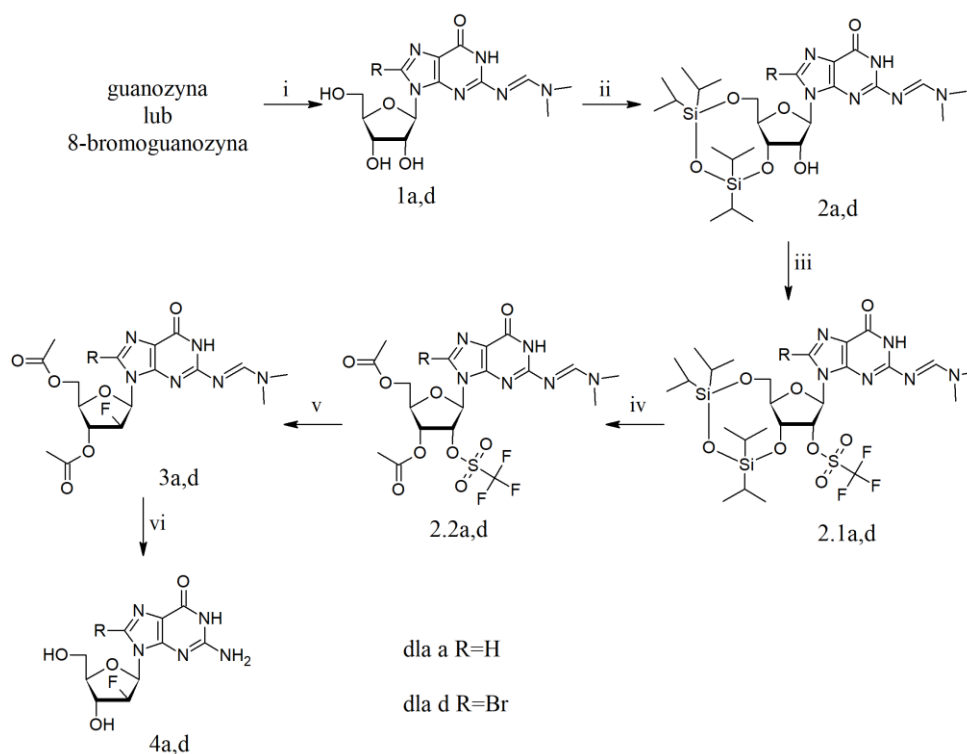
B

*C2'-endo*

Rysunek 21. Konformacje 2'-triflatowanego nukleozydu z benzoilowymi (A) i trytylowymi (B) grupami ochronnymi na grupach 5' i 3'-hydroksylowych. Bz -grupa benzoilowa; Tr – grupa trytylowa; Tf – grupa triflatowa; B – zasada nukleinowa.

Opisana w literaturze metoda wymagała blokowania grup 3' i 5'-hydroksylowych dużymi przestrzennie grupami trytylowymi, które wymuszałyby w substracie określoną konformację reszty cukrowej, a w konsekwencji uniemożliwiałyby zajście reakcji eliminacji podczas substytucji nukleofilowej (rysunek 21). Równoczesne trytylowanie grup 3'- i 5'-hydroksylowych nukleozydów jest jednak bardzo mało wydajne, czasochłonne i nioselektywne, więc po trwającej kilka dni reakcji trytylowania, konieczne jest rozdzielanie produktów reakcji, czyli pochodnych 5'-O-trytylowanej, 2',5'-di-O-trytylowanej i 3',5'-di-O-trytylowanej. Wymagający rozdział izomerów ditrytylowanych, jeśli zakończy się sukcesem, prowadzi do otrzymania pochodnej z niezablokowaną grupą 2'-hydroksylową, która następnie bierze udział w kolejnym etapie syntezy. Substytucje fluorem można prowadzić za pomocą odczynników fluorujących, takich jak trifluorek dietyloaminoosiarki (DAST) czy difluorotrimetylokrzemian tris(dimetyloamino)sulfoniowy (TASF) lub po aktywowaniu grupy hydroksylowej innymi czynnikami, które są źródłem anionu fluorkowego. Ponieważ czynniki fluorujące mają silny charakter zasadowy, konkurencyjna reakcja eliminacji może zachodzić preferencyjnie. Eliminacja z udziałem grupy 2'-hydroksylowej wymaga *trans* diaksjalnego usytuowania z atomem wodoru 3', jednak wymuszona przez podstawniki trytylowe konformacja rybozy *C2'-endo* uniemożliwia przyjęcie takiej orientacji (rysunek 21B). Ostatecznie w swoich eksperymentach postanowiłem użyć mniej zasadowego czynnika fluorującego, w przypadku którego reakcja substytucji zachodziłaby preferencyjnie w stosunku do eliminacji. Dzięki temu mogłem pominąć konieczność przygotowania pochodnej 3',5'-di-O-trytylowanej.

1.1. Synteza 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydu guanozyny i 8-bromoguanozyny



Rysunek 22. Schemat proponowanej syntezy 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydów guaniny i 8-bromoguaniny. i) acetal dimetylowy dimetyloformamidu/metanol; ii) 1,3-dichlorek 1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksanu/py; iii) bezwodnik triflatowy, DMAP, py/dichlorometan; iv) bezwodnik octowy, trifluorowodorek trietyloamoniowy, v) fluorowodorek trietyloamoniowy/THF; iv) 25% amoniaku/metanol.

Pierwsze próby syntezy pochodnych 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydu guaniny i 8-bromoguaniny prowadziłem na guanozynie. Schemat proponowanej syntezy przedstawiam na rysunku 22. W pierwszym etapie grupę egzoaminową blokowałem przy pomocy blokady dimetyloaminometylenowej. Ta zasadolabilna grupa ochronna sprawdza się w automatycznej syntezie oligonukleotydów na podłożu stałym. Wprowadzenie tej blokady jest też wygodne, ponieważ prowadzi do selektywnego podstawienia grupy egzoaminowej. Ponadto, reakcję prowadzi się w metanolu, w którym guanozyna jest tylko nieznacznie rozpuszczalna, podobnie jak produkt (**1a**) czyli N²-(dimetyloaminometyleno)guanozyna. Najlepszą wydajność reakcji blokowania guanozyny wynoszącą 91% otrzymałem, gdy prowadziłem reakcję 6 godzin w 50°C.

Następnie w celu zablokowania grup hydroksylowych postanowiłem użyć 1,3-dichlorku 1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksanu (blokady Markiewicza). Ta blokada pozwala na łatwe i selektywne blokowanie grup 5' i 3'-hydroksylowych¹²². Po zawieszeniu suchego substratu (**1a**) w bezwodnej pirydynie dodałem 1,1 ekwiwalentu 1,3-dichlorku

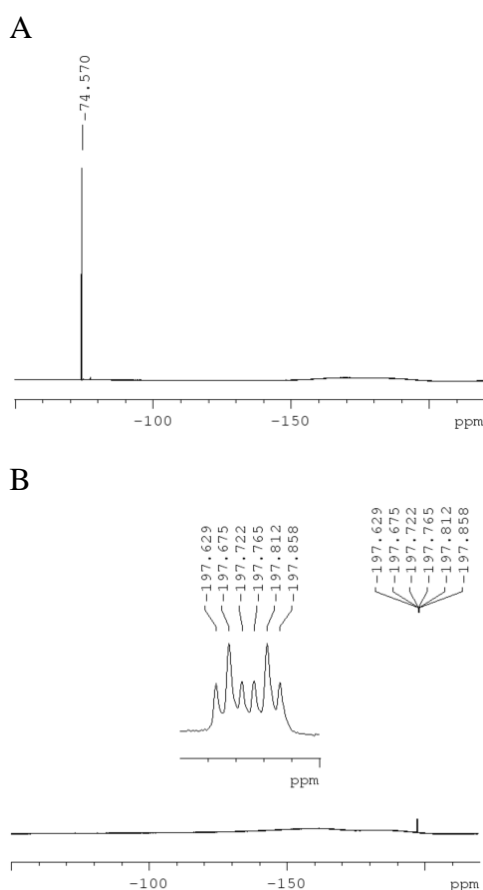
1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksanu. Po zajściu reakcji biała zawiesina przechodziła w bezbarwny roztwór. Ten etap syntezy zachodził ilościowo.

Kolejnym etapem było aktywowanie grupy 2'-hydroksylowej poprzez jej przekształcenie do grupy trifluorometanosulfonowej (triflatowej). Grupa ta pozwala na łatwe zajście substytucji oraz wygodne śledzenie postępu tej reakcji z wykorzystaniem techniki ^{19}F NMR. Grupa triflatowa składa się z układu trzech atomów fluoru odizolowanych od reszty cząsteczki, dzięki czemu na widmie fluorowym nie dochodzi do sprzężeń z jądrami atomów fluoru. W widmie ^{19}F NMR można zaobserwować intensywny sygnał singletowy w okolicach -74 ppm (rysunek 23A) dla związków zawierających grupę triflatową przyłączoną w pozycji 2' (**2.1a**, **2.2a**).

W następnej kolejności w syntezie tych pochodnych przeprowadziłem substytucję grupy 2'-O-triflatowej pochodną fluoru. Ponieważ blokada 1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksanowa jest blokadą opartą na chemii krzemu to jest ona wrażliwa na anion fluorkowy, dlatego przed reakcją substytucji musiałem odblokować grupy 5' i 3'-hydroksylowe. W tym celu użyłem trifluorowodoru trietyloaminy. Niestety w przypadku pochodnej 2'-O-triflatowej zachodziła szybka izomeryzacja do pochodnej 3'-O-triflatowej, a także przez dużą reaktywność tej grupy opuszczającej pochodna ta okazała się być nietrwała w roztworze.

W celu uniknięcia izomeryzacji lub częściowej eliminacji grupy triflatowej, postanowiłem w jednym etapie syntezy wymienić blokadę 1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksanową na

blokadę acetylowe. Proces ten przeprowadziłem przez dodanie ośmiokrotnego nadmiaru molowego bezwodnika octowego podczas odblokowania grupy 1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksanowej. W ten sposób uzyskałem pochodną



Rysunek 23. Widma ^{19}F NMR pokazujące zmianę przesunięcia chemicznego sygnału pochodzącego od substratu (A) i produktu (B).

5',3'-di-O-acetylo-2'-O-triflatową (**3a**), którą użyłem bez dalszego oczyszczania w następnym etapie syntezy. Pochodna triflatowana okazała się być bardzo reaktywna, a oczyszczanie jej chromatograficznie powodowało zmniejszenie wydajności reakcji w wyniku zachodzenia reakcji na żelu z udziałem oczyszczanego związku.

Substytucję nukleofilową prowadziłem w łagodnych warunkach z wykorzystaniem 1M roztworu fluorowodoru trietyloaminy w pirydynie. Najwyższe wydajności tego etapu (75% dla guanozyny), otrzymałem stosując siedmiokrotny nadmiar molowy i prowadząc reakcję w 37°C przez 48 godzin. Powstanie pożądanego produktu (**4a**) sprawdziłem przy użyciu techniki ^{19}F NMR. Na widmie ^{19}F NMR jest widoczna znacząca różnica w przesunięciu chemicznym pomiędzy substratem a produktem, a sygnały nie pokrywają się (rysunek 23). Co więcej, sygnał jądra atomu fluoru sprzęga się z sąsiadującymi jądrami atomów wodoru w cząsteczce produktów, dlatego obserwuje się multiplet w okolicach -198 ppm (rysunek 23B).

W swoich badaniach wpływu konformacyjnie zdeterminowanych analogów nukleozydów na strukturę kwasów nukleinowych chciałem użyć analogicznej pochodnej z wymuszoną konformacją *syn* wiązania N-glikozydowego. W tym celu postanowiłem powtórzyć opracowaną ścieżkę syntezy na 8-bromoguanozynie. Niestety okazało się, że w przypadku pochodnej 8-bromoguanozyny (**2.2d**) nie zachodzi reakcja substytucji w opracowanych warunkach. Najprawdopodobniej reakcja ta była hamowana przez efekt steryczny wywołany resztą guanozyny nad centrum reakcji. Postanowiłem więc zmienić strategię syntezy i przeprowadziłem reakcję bromowania 2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyny (**4a**). W wyniku tej reakcji uzyskałem po raz pierwszy pochodną 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyny, która nie została dotąd opisana w literaturze. Dla charakterystyki tego związku zostały wykonane badania strukturalne z wykorzystaniem technik NMR i rentgenograficznych.

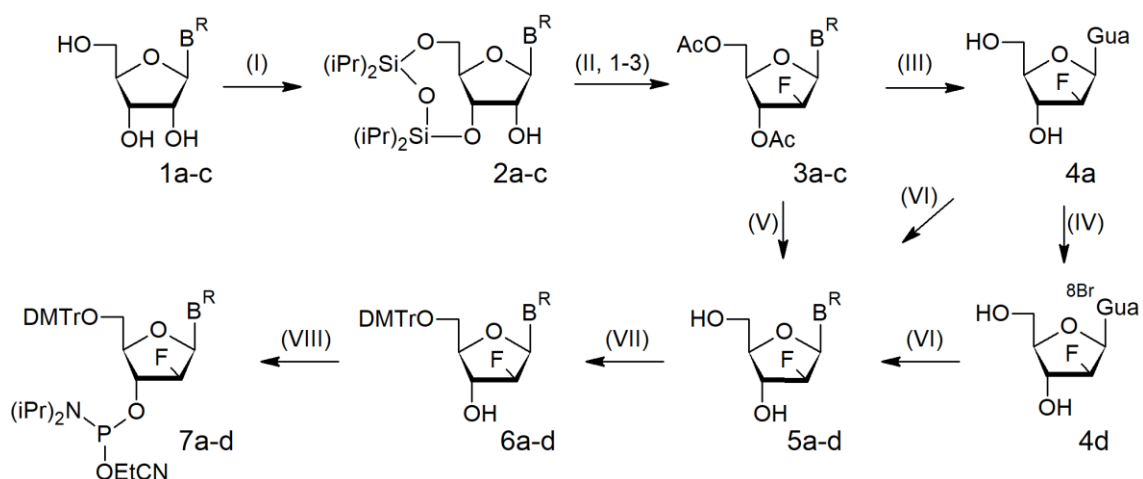
W wyniku krystalizacji 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyny otrzymałem kryształy, a ich strukturę określiła dr Agnieszka Czapik z Zakładu Stereochemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. W strukturze cząsteczki nukleozydu widać wpływ podstawienia pozycji C8 guaniny, w wyniku czego zasada przyjmuje konformację *syn* wiązania N-glikozydowego. Reszta cukrowa przyjmuje konformację *C3'-endo*. Wprowadzenie fluoru w pozycji C2' w konfiguracji β nie spowodowało, że reszta cukrowa przyjęła konformację *C2'-endo*

w kryształach, mimo doniesień literaturowych, z których wynika, że silnie elektronegatywny podstawnik wpływa na konformację i powinien przesunąć równowagę konformacyjną nukleozydu w kierunku konformeru *C2'-endo*^{55,115,116}. Należy zwrócić uwagę, że struktura cząsteczki w kryształach jest jej zamrożonym stanem, który stanowi kompromis pomiędzy najniższą energią wynikającą z konformacji samej cząsteczki, a energią oddziaływań międzycząsteczkowych w kryształach. Nukleozydy w roztworach znajdują się w równowadze dynamicznej skrajnych konformerów. Badania wykorzystujące techniki NMR pozwalają ustalić konformacje tych skrajnych struktur. Dzięki współpracy z dr Danielem Baranowskim z Zakładu Biomolekularnego NMR Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, określono, że dla 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinozyny równowaga konformacyjna między konformerami *C2'-egzo* i *C3'-egzo*, jest przesunięta w kierunku pofałdowania reszty cukrowej *C2'-egzo*. Natomiast z analizy sprzężeń jąder atomowych H1'-C8 przez przestrzeń wynika, że nukleozyd ten przyjmuje konformację *anti* wiązania N-glikozydowego. Rozbieżność między danymi krystalograficznymi a NMR-owskimi może wynikać z faktu, że nukleozyd ten jest labilny konformacyjnie.

1.2. Synteza 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydów purynowych i ich amidofosforynów

Ścieżka syntezy chemicznej, którą opracowałem dla guanozyny sprawdziła się, dlatego postanowiłem przetestować ją również na innych nukleozydach. Wybrałem nukleozydy purynowe, tj. adenozyne i 2-aminoadenozyne, które po odpowiednim zablokowaniu zasad, udało mi się bez problemów przeprowadzić w 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozyd. Próba powtórzenia opracowaną metodą syntezy na cytydynie niestety zakończyła się niepowodzeniem, ponieważ na etapie substytucji pozycji 2' dochodziło do cyklizacji układu i powstawania pochodnej 2,2'-anhydro, co uniemożliwiało otrzymanie pochodnej 2'-β-fluoro.

Opracowana metoda syntezy doskonale sprawdza się dla nukleozydów purynowych, natomiast, aby wprowadzić pochodne do łańcucha oligonukleotydowego musiałem zsyntetyzować amidofosforyny otrzymanych analogów, które są używane w syntezie automatycznej na podłożu stałym. W tym celu zastosowałem klasyczne procedury blokowania funkcji 5'-hydroksylowej grupą 4,4'-dimetoksytrytylową oraz fosfitylacji na grupie 3'-hydroksylowej (rysunek 24).



Rysunek 24. Schemat syntezy purynowych analogów 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydów 1-5(a-d) oraz ich amidofosforynów 7a-d. B – zasady purynowe; R – zasadolabilne grupy ochronne; I - 1,3-dichlorek 1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksanu/py; II - 1) bezwodnik triflatowy, DMAP, py/dichlorometan, 2) bezwodnik octowy, trifluorowodorek trietyloamoniowy, 3) fluorowodorek trietyloamoniowy/THF; III - 25% amoniaku/metanol; IV - brom/woda; V - selektywne usunięcie blokad acetylowych z reszty cukrowej; VI - acetal dimetylowy dimetyloformamidu/metanol; VII - chlorek 4,4'-dimetoksytrytylu/dichlorometan; VIII - tetrazol, N,N,N',N'-tetraizopropylofosforynoamid 2-cyanoetylu/acetonityl.

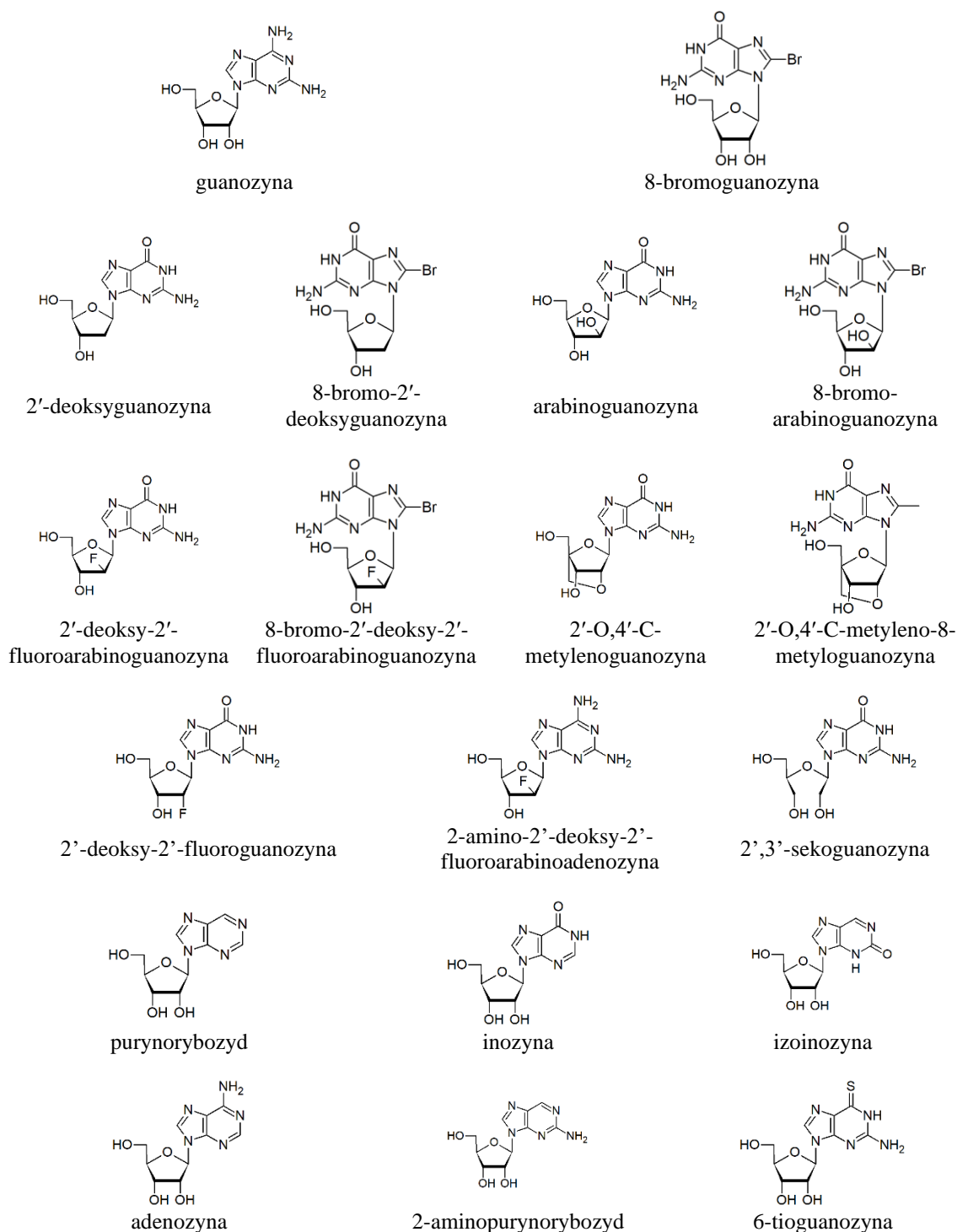
2. Wybór analogów guanozyny wykorzystanych do modyfikowania motywu sekwencyjnego 5'GAGU

Modyfikacje chemiczne kwasu nukleinowego, nukleozydu lub nukleotydu można wykorzystać do wprowadzenia zmiany pożądanej przez eksperymentatora. Jednak, efekt takich modyfikacji nie zawsze możemy przewidzieć. Dlatego przy wyborze analogów nukleozydów miałem na uwadze, że są to związki otrzymane na drodze syntezy chemicznej i nie występują naturalnie. Wymuszanie konformacji rybozy poprzez wykorzystanie pochodnych 2'-deoksy czy 8-bromo pozbawia cząsteczkę wszelkich potencjalnych oddziaływań stabilizujących, które wynikają z obecności grupy 2'-hydroksylowej lub atomu wodoru w pozycji 8 zasady purynowej. Poza tym rozbudowanie struktury nukleozydu wprowadza do niej dodatkowe czynniki steryczne. Należy pamiętać, że wybór modyfikacji wymuszającej określoną konformację musi być wyważony pomiędzy efektem, jaki chce osiągnąć eksperymentator, a ewentualnym niekorzystnym wpływem tej modyfikacji.

Pochodne guanozyny wybrałem ze względów strukturalnych, dlatego w celu osiągnięcia konformacji *syn* wiązania N-glikozydowego użyłem modyfikacji zawierających atom bromu lub grupę metylową w pozycji 8 zasady purynowej. Modyfikacja ta wymusza konformację *syn*, ponieważ duża grupa funkcyjna (grupa metylowa lub atom bromu są zbliżone objętościowo) wymusza usytuowanie zasady nad powierzchnią pierścienia reszty cukrowej.

Pofałdowanie reszty cukrowej jest drugim strukturalnie istotnym elementem, który postanowiłem modyfikować w nukleozydach wprowadzanych do badanych oligorybonukleotydów. Ze względu na elastyczny układ pierścienia pięcioczłonowego i występowanie efektu pseudorotacji możliwe jest przyjmowanie przez rybozę różnych konformacji w roztworze wodnym. Dla nukleozydów przyjmuje się, że w roztworze wodnym istnieje równowaga pomiędzy konformacjami typu *North* (*C3'-endo*) i *South* (*C2'-endo*) i równowaga między tymi formami jest przesunięta w kierunku *C3'-endo*. Wykazano, że w przypadku rybonukleozydów przewaga w kierunku *C3'-endo* jest większa niż dla 2'-deoksyrybonukleotydów. Jest to spowodowane przez różnice w elektroujemności i pozycji atomów przyłączonych w pozycji 2' reszty cukrowej. Korzystając z tych informacji wykorzystałem następujące modyfikacje rybozy: 2'-deoksyrybozę, arabinozę, 2'-deoksy-2'-fluororybozę, 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozę, 2'-O,4'-C-metylenorybozę oraz

2',3'-sekorybozę (rysunek 25). Pochodną UNA wykorzystałem jako labilną konformacyjnie pochodną, która przez brak wiązania między atomami węgla 2' i 3' rybozy nie „narzuca” żadnej sztywności strukturze szkieletu cukrowo-fosforanowego.



Rysunek 25. Wzory strukturalne stosowanych modyfikacji guanozyny.

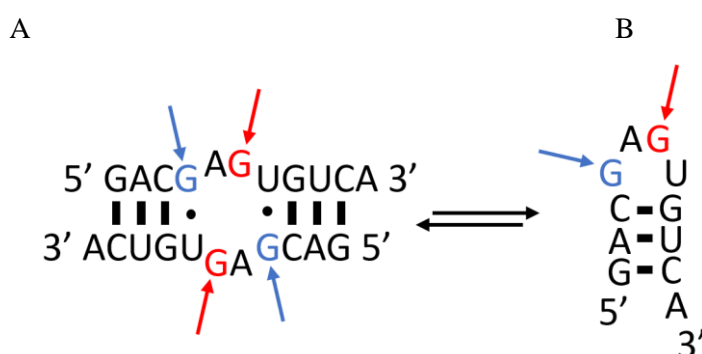
Poza tymi strukturalnymi modyfikacjami w swoich badaniach postanowiłem też sprawdzić wpływ, jaki spowoduje wprowadzenie do badanego motywu sekwencyjnego

5'GAGU3' różnych zmian w układzie grup funkcyjnych odpowiedzialnych za tworzenie wiązań wodorowych między zasadami. W tej serii badań wybrałem modyfikacje zasady purynowej będące analogami guaniny. Wśród tych modyfikacji znalazły się: hipoksantyna, puryna, adenina, 2-aminopuryna oraz 2,6-aminopuryna (rysunek 25).

W przypadku badanego przeze mnie motywu 5'GAGU/3'UGAG możliwe jest utworzenie par AG i GU oraz ze względu na istnienie alternatywnej konformacji możliwe są też pary GG⁴⁴. W publikacji Aleksandara Spasica *et al.*⁴⁷ autorzy proponują oddziaływania, które występują między tymi parami. W związku z tym postanowiłem wykorzystać analogi guanozyny i wprowadzić je do sekwencji wybranego motywu, aby sprawdzić ich wpływ na stabilność termodynamiczną.

3. Badania termodynamiczne oligorybonukleotydów samokomplementarnych

W tej części mojej pracy doktorskiej wykonałem badania trwałości termodynamicznej modyfikowanych oligorybonukleotydów samokomplementarnych z użyciem metody topnienia UV. Pierwszy badany przeze mnie modelowy oligonukleotyd zawierający motyw 5'GAGU/3'UGAG był wybrany na podstawie pracy Scotta Kennedy'ego⁴⁴. Jest to oligorybonukleotyd o sekwencji samokomplementarnej 5'GACGAGUGUCA, który może tworzyć dupleks zawierający stabilizującą resztę adenozyiny na 5' końcu, a trzy nukleotydy otaczające badany motyw tworzą pary Watsona-Cricka (rysunek 26A). Istnieje również możliwość, że zamiast dupleksu utworzy się struktura spinki do włosów, której trzon będą budowały trzy pary Watsona-Cricka, a jej pętlę cztery nukleotydy GAGU (rysunek 26B). Co ciekawe, między obiema strukturami występuje równowaga. W moich badaniach termodynamicznych wykorzystałem wariant oligorybonukleotydu 5'GACGAGUGUCA zawierający zmodyfikowane reszty guanozyny G4 lub G6 w celu sprawdzenia ich wpływu na stabilność jego struktury. W kolejnych podrozdziałach przedstawię i omówię parametry termodynamiczne otrzymane dla modyfikowanych oligonukleotydów.



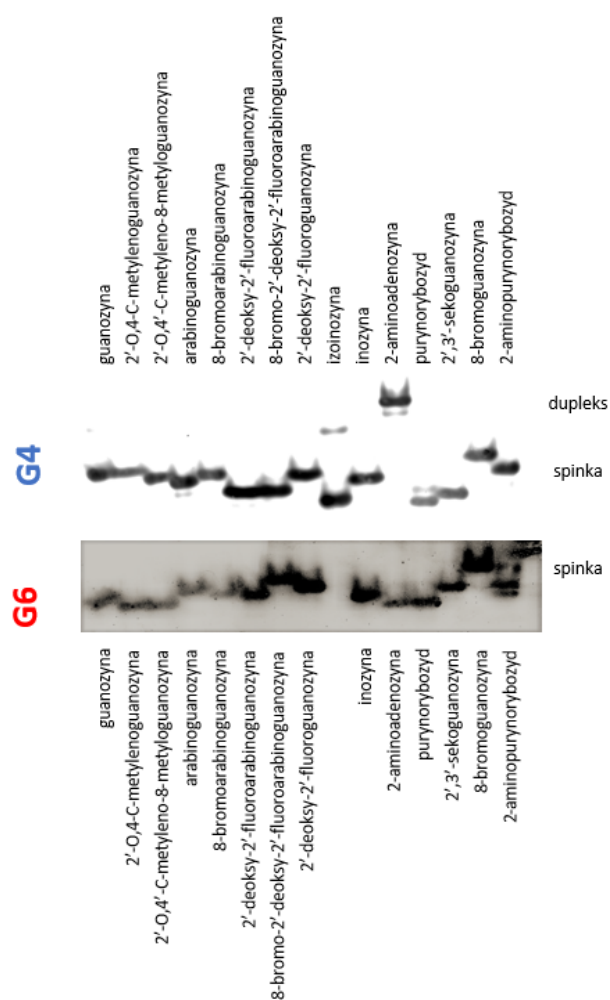
Rysunek 26. Równowaga między strukturą dupleksu (A) i spinki (B) dla oligorybonukleotydów samokomplementarnych. Na niebiesko zaznaczono modyfikowaną pozycję G4, na czerwono – G6.

3.1. Modyfikowanie struktur oligorybonukleotydów analogami nukleozydów wpływającymi na ilość tworzonych wiązań wodorowych

Jak wspomniałem wcześniej, modelowy oligorybonukleotyd może tworzyć zarówno strukturę dupleksu, jak i spinki do włosów. Wiadomo, że w przypadku topnienia struktury dwucząsteczkowej (dupleksu) jego temperatura topnienia (T_m) rośnie liniowo wraz ze wzrostem stężenia oligonukleotydu. Natomiast dla formy jednocząsteczkowej

(spinki) wartości parametru T_m dla różnych ich stężeń są takie same. W tym miejscu warto nadmienić, że w przeprowadzonych pomiarach temperatury topnienia stosowałem niskie stężenie oligonukleotydu, co powodowało przesunięcie równowagi między dupleksem i spinką w kierunku struktury spinki. Ze względów czynnika kinetycznego przy wyższym stężeniu oligonukleotydów utworzenie duplexu jest łatwiejsze. Na podstawie analizy termodynamicznej zaobserwowałem brak zależności między stężeniem oligonukleotydu a temperaturą topnienia. To wskazuje, że badane warianty przyjmowały strukturę spinki do włosów.

Dodatkowo, aby potwierdzić, która z obu struktur jest dominująca wykonałem rozdział elektroforetyczny na żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących. Technika ta jest użytecznym narzędziem do ilościowej analizy struktury kwasów nukleinowych. Różnica w masie/ładunku pomiędzy formą jednoniciową (spinka)



Rysunek 27. Mobilność oligonukleotydów modyfikowanych w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących w temperaturze 4°C.

i dwuniciową (dupleks) DNA lub RNA wpływa na szybkość ich migracji w żelu, co obrazują prążki na różnej wysokości żelu. W mojej pracy doktorskiej przeprowadziłem analizę elektroforetyczną dla wszystkich wariantów modelowego oligonukleotydu. Na podstawie uzyskanego obrazu żelu zauważyłem, że większość prążków znajdowała się na podobnej wysokości żelu, tylko jeden prążek migrował wolniej – wariant z modyfikacją w pozycji G4 (2-aminoadenozyna, górny panel – rysunek 27). Na tej podstawie możliwe jest stwierdzenie, że większość wariantów modyfikowanych w pozycji G4 przyjmowała strukturę spinki, wyjątek stanowił wariant zawierający 2-aminoadenozynę (górny panel – rysunek 27).

W przypadku wariantów z modyfikacją w pozycji G6 sytuacja jest podobna. Otrzymane wyniki sugerują, że wszystkie badane warianty tworzą strukturę spinki do włosów, o czym świadczy podobna migracja prążków na żelu (dolny panel - rysunek 27). Jednak, na żelu można zauważyć małe różnice w migracji prążków dla modyfikowanych wariantów zarówno w pozycji G4, jak i G6 (rysunek 27). Przypuszczam, że taki obraz żelu może wynikać z tego, że modyfikacje wprowadzone do modelowego oligorybonukleotydu mogą zaburzać schemat wiązań wodorowych w strukturze spinki do włosów.

Wyznaczone parametry termodynamiczne dla wariantów oligorybonukleotydu samokomplementarnego z modyfikacją w pozycji G4 zostały przedstawione w tabeli 1. Na podstawie otrzymanych wyników zaobserwowałem, że większość wariantów oligorybonukleotydów z modyfikacją w pozycji G4 odznacza się mniejszą stabilnością termodynamiczną w porównaniu z niemodyfikowanym wariantem (tabela 1). Szeroki zakres różnic w wartościach energii swobodnej dla badanych wariantów można tłumaczyć potencjalnymi oddziaływaniami między resztą urydyny i modyfikowaną resztą guanozyny G4. Spośród wszystkich modyfikowanych wariantów oligomer zawierający 2-aminoadenozynę odznaczał się najwyższą stabilnością termodynamiczną ($\Delta G^{\circ}_{37} = -5,91$ kcal/mol), podczas gdy wariant posiadający analog 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydowy charakteryzował się najmniejszą wartością energii swobodnej ($\Delta G^{\circ}_{37} = -0,91$ kcal/mol). W jasny sposób ilustruje to fakt, że mimo potencjalnego silnego oddziaływania pomiędzy zasadami 2-aminoadeniną i uracylem przez wiązania wodorowe (rysunek 13, rozdział 3.1., część literaturowa), które najprawdopodobniej odpowiadają za dużą stabilizację w oligomerze zawierającym 2-aminoadenozynę, to ta sama zasada nie oddziałuje już w ten sam stabilizujący sposób w oligomerze zawierającym analog 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydowy. Najprawdopodobniej jest to spowodowane zmianą konformacji rybozy oraz uniemożliwieniem najkorzystniejszych oddziaływań między zasadami, chociażby w wyniku zmiany konformacji wiązania N-glikozydowego.

Warto również zwrócić uwagę na dwa inne warianty, a mianowicie zawierający izoinozynę oraz 2-aminoadenozynę, dla których zanotowałem efekt stabilizujący równy odpowiednio 0,34 lub 3,56 kcal/mol (tabela 1). Można przypuszczać, że pomiędzy zasadami izoinozyny i urydyny powstają wiązania wodorowe pomiędzy grupami karbonyłowymi a protonami grup amidowych pierścienia aromatycznego, więc możliwe jest utworzenie dwóch wiązań wodorowych między tymi zasadami. Podobnie w przypadku drugiej modyfikacji – 2-aminoadenozyny, dwie grupy aminowe zasady potencjalnie mogą

utworzyć wiązania z dwiema grupami karbonyłowymi uracylu. Znaczna stabilizacja energii swobodnej w przypadku tego wariantu oligonukleotydu wskazuje na potencjalne utworzenie się trzech wiązań wodorowych w parze pomiędzy 2-aminoadeniną i uracylem.

Tabela 1. Parametry termodynamiczne dla oligorybonukleotydu samokomplementarnego o strukturze spinki z modyfikacją wpływającą na liczbę wiązań wodorowych w pozycji G4.

Sekwencja (5'-3') GACXAGUGUCA	$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta S^\circ$ (eu)	$-\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	T_M^b (°C)	$\Delta\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	ΔT_M^b (°C)
guanozyna	30,9 ± 2,3	92,1 ± 7,1	2,35 ± 0,12	62,5	0	0
izoinozyna	36,2 ± 2,5	108,1 ± 7,5	2,69 ± 0,29	61,9	-0,34	-0,6
inozyna	31,8 ± 1,2	95,0 ± 3,7	2,33 ± 0,12	61,5	0,02	-1
purynorybozyd	30,4 ± 3,6	91,6 ± 11,2	1,99 ± 0,17	58,7	0,36	-3,8
2-aminopurynorybozyd	32,9 ± 6,6	100,1 ± 22,0	1,51 ± 0,26	52,1	0,84	-10,4
2-aminoadenozyna	65,2 ± 1,9	191,0 ± 4,7	5,91 ± 0,35	67,9	-3,56	5,4
adenozyna	21,9 ± 4,3	66,4 ± 13,3	1,27 ± 0,24	56,2	1,08	-6,3
6-tioguanozyna	32,0 ± 1,1	96,1 ± 3,3	2,17 ± 0,14	59,6	0,18	-2,9
2'-deoksy-2'-fluoroarabino- 2-aminoadenozyna	17,3 ± 1,4	52,9 ± 4,3	0,91 ± 0,10	54,3	1,44	-8,2

Parametry otrzymano ze średniej z dopasowań do krzywych topień. Bufor użyty podczas topień: 1 M chlorek sodu, 20 mM kakodylan sodu, 0,5 mM Na₂EDTA, pH 7.0; b – parametr wyznaczono dla stężenia oligonukleotydu 10⁻⁴ M

Niewielka różnica w wartości energii swobodnej pomiędzy oligonukleotydem bez modyfikacji a tym zawierającym inozynę ($\Delta\Delta G^\circ_{37} = 0,02$ kcal/mol), a jednocześnie większa różnica w przypadku wprowadzenia 2-aminopurynorybozydu ($\Delta\Delta G^\circ_{37} = 0,84$ kcal/mol), pozwala sądzić, że w stabilizacji struktury tej spinki kluczową rolę odgrywa tlen karbonylowy O6 guanozyny. Grupa 2-aminowa ma destabilizujący wpływ, a jej brak w przypadku purynorybozydu prowadzi do stabilizacji w stosunku do 2-aminopurynorybozydu. Natomiast w przypadku adenozy, grupa aminowa w pozycji C6 zasady purynowej prowadzi do destabilizacji w stosunku do niemodyfikowanego nukleozydu. Zastąpienie grupy karbonylowej grupą tionylową również powoduje destabilizację, co jest spowodowane większym rozmiarem atomu siarki.

W tabeli 2 zaprezentowałem parametry termodynamiczne dla oligomeru samokomplementarnego z modyfikacją w pozycji G6.

Tabela 2. Parametry termodynamiczne dla oligorybonukleotydu samokomplementarnego o strukturze spinki z modyfikacją wpływającą na liczbę wiązań wodorowych w pozycji G6.

Sekwencja (5'-3') GACGAXUGUCA	$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta S^\circ$ (eu)	$-\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	T_M^b (°C)	$\Delta\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	ΔT_M^b (°C)
guanozyna	30,9 ± 2,3	92,1 ± 7,1	2,35 ± 0,12	62,5	0	0
izoinozyna	34,7 ± 1,2	103,3 ± 3,7	2,62 ± 0,10	62,4	-0,27	-0,1
inozyna	38,0 ± 5,4	113,4 ± 15,7	2,89 ± 0,15	62,5	-0,54	0
purynorybozyd	35,6 ± 3,4	102,9 ± 10,3	2,68 ± 0,23	63,1	-0,33	0,6
2-aminopurynorybozyd	36,4 ± 1,8	108,4 ± 5,4	2,76 ± 0,09	62,4	-0,41	-0,1
2-aminoadenozyna	41,2 ± 5,9	123,4 ± 18,1	2,93 ± 0,51	60,7	-0,58	-1,8
adenozyna	36,7 ± 2,5	108,7 ± 7,5	3,00 ± 0,22	64,6	-0,65	2,1
6-tioguanozyna	37,3 ± 2,3	111,2 ± 6,7	2,82 ± 0,22	62,3	-0,47	-0,2
2'-deoksy-2'-fluoroarabino-2- aminoadenozyna	38,2 ± 3,2	113,7 ± 9,6	2,96 ± 0,31	63,0	-0,61	0,5

Parametry otrzymano ze średniej z dopasowań do krzywych topnień. Bufor użyty podczas topnień: 1 M chlorek sodu, 20 mM kakodylan sodu, 0,5 mM Na2EDTA, pH 7.0; b – parametr wyznaczono dla stężenia oligonukleotydu 10⁻⁴ M

Na podstawie otrzymanych danych termodynamicznych można stwierdzić, że modyfikacje wprowadzone w pozycji G6 nie wpływają znacząco na wartości energii swobodnej (tabela 2). Wszystkie modyfikacje wywołują efekt stabilizujący w porównaniu z wariantem bez modyfikacji. Największy efekt stabilizujący wnosi adenozyzna, wartość parametru $\Delta\Delta G^\circ_{37}$ wynosi -0,65 kcal/mol (tabela 2). Ponieważ pozycja modyfikowanego nukleotydu nie pozwala na powstawanie potencjalnych par z innymi nukleozydami, można przypuszczać, że efekt stabilizujący w tym przypadku jest wynikiem korzystnych oddziaływań warstwowych adenozyzny. Izoinozyna, purynorybozyd oraz 2-aminopurynorybozyd to trzy modyfikacje, które w niewielkim stopniu stabilizują strukturę spinki (parametr $\Delta\Delta G^\circ_{37}$ wynosi odpowiednio: -0,27, -0,33 oraz -0,41 kcal/mol). Otrzymane wartości mogą oznaczać, że grupa funkcyjna w pozycji 2 puryny w małym stopniu wpływa na stabilizację powstałej spinki. Grupa aminowa w porównaniu z grupą karbonylową wprowadza większy efekt stabilizujący w tej pozycji. Efekt ten można

zauważyć również dla grupy funkcyjnej w pozycji 6 puryny, ponieważ inozyna stabilizuje spinkę słabiej niż adenozyne. Różnica wartości energii swobodnej między wariantami z tymi modyfikacjami wynosi 0,11 kcal/mol. Modyfikowanie pozycji G6 analizowanego oligorybonukleotydu pochodną 6-tioguanozyny skutkuje stabilizacją struktury spinki ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -0,47$ kcal/mol). 6-Tioguanozyna jest modyfikacją, która wnosi do struktury dupleksu efekt destabilizujący, ale zaobserwowano, że w pozycjach niesparowań lub niesparowanych końców może stabilizować strukturę oligonukleotydu¹²³.

3.2. Modyfikowanie struktur oligorybonukleotydów analogami nukleozydów wpływającymi na konformację reszty cukrowej i wiązania N-glikozydowego

Wpływ pofałdowania rybozy na stabilność RNA można zaobserwować w przypadku serii oligonukleotydów modyfikowanych w pozycji G4 oligomeru analogami o wymuszonej konformacji reszty cukrowej. W przypadku tych analogów jedyną zmianą wprowadzaną w reszcie guaniny jest modyfikacja pozycji 8 w celu zmiany konformacji wiązania N-glikozydowego. Potencjalne miejsca tworzenia oddziaływań wodorowych między zasadami w rejonach dwuniciowych pozostają niezmienione. Różnica w wartościach energii swobodnej pomiędzy najbardziej i najmniej stabilnym oligonukleotydem modyfikowanym w pozycji G4 wynosi 1,87 kcal/mol (tabela 3). Największy efekt stabilizujący wprowadza 2',3'-sekoguanozyna ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -0,76$ kcal/mol), natomiast najbardziej destabilizująca jest 8-bromoarabinoguanozyna ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 1,11$ kcal/mol). Porównując parami oligomery modyfikowane analogami guanozyny i 8-bromoguanozyny z różnymi resztami cukrowymi, można zauważyć, że poza 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydami wprowadzenie 8-bromoguaniny powoduje efekt destabilizujący. W tym przypadku jest to najprawdopodobniej spowodowane uniemożliwieniem utworzenia wiązań wodorowych z przeciwległą urydyną. Można sądzić, że dla struktury spinki do włosów wiązanie N-glikozydowe przyjmuje konformację *anti*. W przypadku modyfikacji 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydem efekt energetyczny jest odwrotny, a bardziej stabilny jest konformer *syn*. Różnica wartości energii swobodnej między tymi dwiema modyfikacjami wynosi tylko 0,26 kcal/mol. Najmniejszą różnicę wartości parametru $\Delta\Delta G$ można zaobserwować w przypadku oligomerów modyfikowanych analogami 2'-deoksyrybozydowymi ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -0,16$ kcal/mol). Dla pary oligomerów zawierającej guanozynę i 8-bromoguanozynę różnica ta jest większa i wynosi

0,58 kcal/mol, a dla pary LNA różnica ta wynosi 0,89 kcal/mol. Największą różnicę w wartości energii swobodnej można zaobserwować dla pary arabinozydów, która wynosi 1,47 kcal/mol. Co ciekawe, najbardziej różne konformacyjnie analogi, czyli usztywnione LNA i labilne UNA są jednocześnie dwiema modyfikacjami guanozyny, które wprowadzone do oligorybonukleotydu powodują najwyższy efekt stabilizujący strukturę spinki. Może to oznaczać, że efekt strukturalny pochodzący z wysoce zdefiniowanej konformacji analogu LNA guanozyny jest kompensowany w przypadku modyfikacji UNA poprzez labilność struktury i możliwe osiągnięcie najbardziej optymalnej energetycznie orientacji.

Tabela 3. Parametry termodynamiczne dla oligorybonukleotydu samokomplementarnego o strukturze spinki z modyfikacją wpływającą na konformację reszty cukrowej i wiązania N-glikozydowego w pozycji G4.

Sekwencja (5'-3') GACXAGUGUCA	$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta S^\circ$ (eu)	$-\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	T_M^b (°C)	$\Delta\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	ΔT_M^b (°C)
guanozyna	30,9 ± 2,3	92,1 ± 7,1	2,35 ± 0,12	62,5	0	0
8-bromoguanozyna	30,5 ± 2,3	92,5 ± 7,0	1,77 ± 0,11	56,2	0,58	-6,3
2'-deoksyguanozyna	31,0 ± 2,2	93,4 ± 6,8	2,04 ± 0,18	58,9	0,31	-3,6
8-bromo-2'-deoksyguanozyna	30,6 ± 1,5	92,6 ± 4,7	1,88 ± 0,11	57,3	0,47	-5,2
arabinoguanozyna	33,9 ± 4,0	100,5 ± 11,8	2,71 ± 0,30	63,9	-0,36	1,4
8-bromoarabinoguanozyna	28,3 ± 2,2	87,2 ± 6,5	1,24 ± 0,23	51,2	1,11	-11,3
2'-deoksy-2'- fluoroarabinoguanozyna	31,3 ± 2,0	91,7 ± 5,8	2,25 ± 0,07	61,0	0,10	-1,5
8-bromo-2'-deoksy-2'- fluoroarabinoguanozyna	32,9 ± 3,9	97,9 ± 11,5	2,51 ± 0,24	62,7	-0,16	0,2
2'-deoksy-2'-fluoroguanozyna	34,1 ± 3,7	102,0 ± 10,9	2,45 ± 0,26	61,0	-0,10	-1,5
2'-O,4'-C-metylenoguanozyna	35,9 ± 3,3	106,0 ± 10,1	2,99 ± 0,15	65,2	-0,64	2,7
8-metylo-2'-O,4'-C- metylenoguanozyna	31,7 ± 10,3	95,4 ± 30,9	2,10 ± 0,65	59,1	0,25	-3,4
2',3'-sekoguanozyna	34,8 ± 0,4	102,3 ± 1,2	3,11 ± 0,05	67,4	-0,76	4,9

Parametry otrzymano ze średniej z dopasowań do krzywych topnień. Bufor użyty podczas topnień: 1 M chlorek sodu, 20 mM kakodylan sodu, 0,5 mM Na₂EDTA, pH 7.0; b – parametr wyznaczono dla stężenia oligonukleotydu 10⁻⁴ M

Kolejną serię badanych przeze mnie modyfikacji stanowiły takie, które wpływały na konformację reszty cukrowej i wiązania N-glikozydowego w pozycji G6. W tabeli 4

przedstawiłem parametry termodynamiczne dla oligomeru samokomplementarnego zawierającego jeden z 11 analogów nukleozydów. Ogólnie uzyskane dane termodynamiczne dla wariantów z modyfikacją w pozycji G6 pokazują, że nie ma prostej korelacji pomiędzy konformacją wprowadzanego analogu a stabilnością struktury, jak miało to miejsce w przypadku modyfikacji pozycji G4. Na podstawie otrzymanych wyników można zauważyć, że pięć wariantów oligomeru modyfikowanego w pozycji G6 odznaczało się mniejszą stabilnością termodynamiczną względem niemodyfikowanego wariantu. W tej grupie oligomer modyfikowany 8-bromo-2'-deoksyguanozyną odznaczał się najwyższą wartością energii swobodnej równą $-1,46$ kcal/mol (tabela 4). Natomiast pozostałe sześć badanych modyfikacji powodowało efekt stabilizujący, a wśród nich największą wartość energii swobodnej zanotowałem dla analogu 8-bromoarabinozyny ($\Delta G^{\circ}_{37} = -3,02$ kcal/mol).

Wpływ grupy 2'-hydroksylowej na stabilność struktur RNA jest również istotny. Wśród wprowadzonych modyfikacji typu 2'-deoksy- tylko 2'-deoksy-2'-fluororybozyd guanozyny powoduje stabilizację struktury oligomeru. Możliwe, że jest to wywołane uprzywilejowaniem korzystniejszej konformacji *C3'-endo*. Natomiast grupa 2'-hydroksylowa w konfiguracji β również skutkuje obniżeniem energii swobodnej.

Zauważyłem, że różnica w wartości energii swobodnej w przypadku modyfikacji w pozycji G6 jest ponad 2,5 razy większa dla modyfikacji reszty cukrowej w porównaniu z modyfikacjami, które ingerowały w rozmieszczenie grup funkcyjnych w zasadzie heterocyklicznej. Ta obserwacja sugeruje, jak istotna jest konformacja nukleozydów w strukturze kwasów nukleinowych.

Analogicznie jak w przypadku modyfikacji pozycji G4, porównując parami pochodne o wymuszonej konformacji *syn* i *anti*, nie znalazłem ogólnej reguły. Dla rybozydów i 2'-deoksyrybozydów pochodna 8-bromo destabilizuje utworzoną strukturę. Natomiast w pozostałych przypadkach: arabinozydach, 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydach oraz 2'-O,4'-C-metylenorybozydach to właśnie analog o wymuszonej konformacji *syn* wiązania N-glikozydowego powoduje obniżenie energii swobodnej oligomeru, czyli stabilizację struktury.

Spośród analogów guanozyny w pozycji G6 najbardziej stabilizującą modyfikacją jest 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozyd ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = -0,50$ kcal/mol), a najbardziej destabilizującą 2'-deoksy-2'-fluororybozyd ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 0,34$ kcal/mol). Obserwowany efekt może być

spowodowany przez duży wpływ atomu fluoru w różnych konfiguracjach. Warty uwagi jest też fakt, że również obecność grupy 2'-hydroksylowej wydaje się nie mieć wpływu na strukturę spinki.

Tabela 4. Parametry termodynamiczne dla oligorybonukleotydu samokomplementarnego o strukturze spinki z modyfikacją wpływającą na konformację reszty cukrowej i wiązania N-glikozydowego w pozycji G6.

Sekwencja (5'-3') GACGAXUGUCA	$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta S^\circ$ (eu)	$-\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	T_M^b (°C)	$\Delta\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	ΔT_M^b (°C)
guanozyna	30,9 ± 2,3	92,1 ± 7,1	2,35 ± 0,12	62,5	0	0
8-bromoguanozyna	24,6 ± 3,6	73,8 ± 11,3	1,69 ± 0,06	60,0	0,66	-2,5
2'-deoksyguanozyna	30,3 ± 6,7	90,1 ± 20,0	2,39 ± 0,47	63,5	-0,04	1,0
8-bromo-2'-deoksyguanozyna	20,9 ± 4,9	62,8 ± 14,4	1,46 ± 0,50	60,2	0,89	-2,3
arabinoguanozyna	34,9 ± 2,2	104,1 ± 6,5	2,64 ± 0,18	62,3	-0,29	-0,2
8-bromoarabinoguanozyna	37,0 ± 1,9	109,5 ± 6,1	3,02 ± 0,17	64,6	-0,67	2,1
2'-deoksy-2'- fluoroarabinoguanozyna	36,9 ± 3,6	109,8 ± 10,4	2,85 ± 0,44	62,9	-0,50	0,4
8-bromo-2'-deoksy-2'- fluoroarabinoguanozyna	38,6 ± 3,4	114,8 ± 8,7	2,99 ± 0,65	63,0	-0,64	0,5
2'-deoksy-2'-fluoroguanozyna	29,0 ± 9,6	86,9 ± 28,8	2,01 ± 0,67	60,1	0,34	-2,4
2'-O,4'-C-metylenoguanozyna	25,2 ± 2,2	73,8 ± 4,8	2,30 ± 0,90	68,1	0,05	5,6
8-metylo-2'-O,4'-C- metylenoguanozyna	35,8 ± 1,1	107,1 ± 3,6	2,56 ± 0,07	60,9	-0,21	-1,6
2',3'-sekoguanozyna	32,2 ± 3,6	96,4 ± 10,8	2,32 ± 0,32	61,1	0,03	-1,4

Parametry otrzymano ze średniej dopasowania do krzywych topnień. Bufor użyty podczas topnień: 1 M chlorek sodu, 20 mM kakodylan sodu, 0,5 mM Na₂EDTA, pH 7.0; b – parametr wyznaczono dla stężenia oligonukleotydu 10⁻⁴ M

Zarówno obecność w tym miejscu oligonukleotydu grupy 2'-hydroksylowej, jak i jej brak wydaje się nie wpływać znacząco na stabilność termodynamiczną. Dla wariantu oligorybonukleotydu zawierającego guanozynę ($\Delta G^\circ_{37} = -2,35$ kcal/mol) wartość energii swobodnej nie różni się od oligomeru zawierającej w pozycji G6 2'-deoksyguanozynę ($\Delta G^\circ_{37} = -2,39$ kcal/mol). W przypadku oligorybonukleotydów zawierających 8-bromowane pochodne pojawia się już bardziej znacząca różnica w wartości energii swobodnej. Dla wariantu zawierającego w pozycji G6 8-bromoguanozynę wartość energii swobodnej wynosi -1,69 kcal/mol (tabela 4), a dla wariantu zawierającego

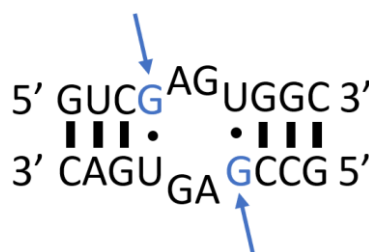
8-bromo-2'-deoksyguanozynę wartość ta jest wyższa o 0,23 kcal/mol. Różnica ta w przypadku tych dwóch ostatnich pochodnych może nie wynikać z obecności grupy 2'-hydroksylowej, ale z rotacji zasady nukleinowej wokół wiązania N-glikozydowego.

Pochodne UNA i LNA wprowadzone w pozycji G6 wydają się mieć podobny wkład energetyczny w stabilność struktury modyfikowanego oligonukleotydu. W porównaniu do modyfikacji w pozycji G4 tym razem ich wpływ jest nieznaczny. Jednak porównanie wkładu energetycznego wysoce labilnej strukturalnie pochodnej UNA i konformacyjnie zdefiniowanej LNA wydaje się być bardzo interesujące, jednak trudne do wytłumaczenia bez przeprowadzenia dalszych badań.

4. Badania termodynamiczne oligonukleotydów niesamokomplementarnych

W mojej pracy doktorskiej wykorzystałem modelowe oligonukleotydy o samokomplementarnych sekwencjach, które okazały się tworzyć strukturę spinki w warunkach prowadzonych badań termodynamicznych. Z tego powodu postanowiłem przygotować serię oligonukleotydów o sekwencjach niesamokomplementarnych z zachowaniem wcześniej wybranego motywu 5'GAGU/3'UGAG w środku dupleksu. Sekwencje zaprojektowanych oligonukleotydów były następujące: 5'GUCGAGUGGC3'/3'CAGUGAGCCG5', a wybrane modyfikowane nukleotydy wprowadzałem równocześnie w miejsce G4 obu nici (rysunek 28).

Oligorybonukleotydy tworzące dupleks zostały zaprojektowane przeze mnie tak, aby w pojedynczej nici nie tworzyły struktury spinki do włosów. To znaczy, że w obrębie pojedynczej nici nie występowały nukleotydy, które mogłyby utworzyć więcej niż jedną parę Watsona-Cricka. W związku z tym, dla takich oligorybonukleotydów możliwą strukturą jest wyłącznie dupleks. W obrębie zaprojektowanego dupleksu tworzy się sześć par Watsona-Cricka, z czego pięć to silne pary GC, a jedna to para AU.



Rysunek 28. Struktura spinki do włosów nie tworzy się w przypadku dupleksu powstałego z nici o niesamokomplementarnych sekwencjach. Na niebiesko zaznaczono modyfikowaną pozycję G4.

4.1. Dupleksy RNA modyfikowane analogami wpływającymi na liczbę tworzonych wiązań wodorowych

W tabeli 5 zostały zestawione parametry termodynamiczne dla dupleksów niesamokomplementarnych zawierających modyfikacje wpływające na liczbę wiązań wodorowych w pozycji G4. W przypadku dupleksu reszta guanozyny G4 znajduje się naprzeciw reszty urydyny (rysunek 28, rozdział 4.). Pozwala to przypuszczać, że zmiana grup funkcyjnych w reszcie guanozyny będzie znacząco wpływała na energię swobodną i stabilność termodynamiczną modyfikowanego dupleksu. Dla tej serii dupleksów różnica w energii swobodnej między wartością najniższą i najwyższą wynosi 6,01 kcal/mol (tabela 5). Najbardziej stabilnym dupleksem okazał się wariant modyfikowany w pozycji G4 2-aminoadenozyną ($\Delta G^{\circ}_{37} = -11,39$ kcal/mol). Największy efekt destabilizujący dupleks uzyskałem natomiast po wprowadzeniu inozyny ($\Delta G^{\circ}_{37} = -5,38$ kcal/mol).

Z uzyskanych danych wynika, że wprowadzenie większego atomu siarki w miejsce tlenu karbonylowego powoduje wzrost energii swobodnej dupleksu o 0,41 kcal/mol, czyli energia swobodna dupleksu zawierającego dwie takie modyfikacje wzrasta o 0,82 kcal/mol (tabela 5), co oznacza destabilizację jego struktury. Spośród wszystkich badanych modyfikacji inozyna wywoływała największy destabilizujący wpływ na trwałość termodynamiczną dupleksu (w przeliczeniu na jedną modyfikację $\Delta\Delta G^\circ_{37} = 1,05$ kcal/mol), a zaraz za nią purynorybozyd (w przeliczeniu na jedną modyfikację $\Delta\Delta G^\circ_{37} = 0,56$ kcal/mol). To wskazuje na destabilizujący charakter grupy karbonylowej w pozycji C6, ale także na destabilizację powodowaną brakiem grupy funkcyjnej w pozycji C2. Natomiast, przy wprowadzeniu do dupleksu izoinozyny energia swobodna dupleksu jest mniejsza ($\Delta\Delta G^\circ_{37} = -0,7$ kcal/mol) od energii swobodnej dla wariantu z guanozyną.

Otrzymane dane termodynamiczne pokazują również wzrost stabilności termodynamicznej dupleksów modyfikowanych analogami zawierającymi grupy aminowe. W przypadku tych pochodnych wariant z 2-aminoadenozyną charakteryzuje się największą trwałością termodynamiczną ($\Delta G^\circ_{37} = -11,39$ kcal/mol). Zaobserwowałem również, że energia swobodna dupleksu zawierającego 2-aminopurynorybozyd jest mniejsza od energii swobodnej niemodyfikowanego dupleksu o 1,23 kcal/mol, co wskazuje na potencjalnie destabilizujący efekt grupy karbonylowej guanozyny w tym dupleksie. W badanym motywie 5'GAGU/3'UGAG naprzeciw modyfikowanej pochodnej guanozyny znajduje się urydyna, co umożliwia utworzenie pary AU, dlatego wprowadzenie w tej pozycji adenozyne spowodowało stabilizację dupleksu ($\Delta\Delta G^\circ_{37} = -0,84$ kcal/mol). Co więcej, zauważyłem, że dodanie kolejnej grupy egzoaminowej w pozycji 2 poprzez użycie analogów 2-aminoadeniny jeszcze bardziej obniża energię swobodną dupleksu. Energia swobodna dupleksu z 2-aminoadeniną przyjmuje mniejszą wartość, równą -3,92 kcal/mol (tabela 5) w porównaniu z wariantem niemodyfikowanym. Natomiast dla wariantu z 2'-deoksy-2'-fluoroarabino-2-aminoadeniną energia swobodna zmniejsza się tylko o 0,71 kcal/mol na jedną modyfikację w stosunku do niemodyfikowanego dupleksu. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że zmiana konformacji cukru w dupleksie znacząco wpływa na efekt stabilizujący, który wynika z możliwości utworzenia się trzech wiązań wodorowych między resztą 2-aminoadeniny i uracylu. Najprawdopodobniej ułożenie zasad wymuszone zmienioną konformacją cukru uniemożliwia efektywne oddziaływanie między zasadami.

Tabela 5. Parametry termodynamiczne dla dupleksu niesamokomplementarnego z modyfikacją wpływającą na liczbę wiązań wodorowych w pozycji G4.												
Sekwencja dupleksu 5' GUCXAGUGGC 3' 3' CAGUGAXCCG 5'	Średnia dopasowania krzywych topnienia				Wykres zależności T_M^{-1} od $\log C_T$							
	$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta S^\circ$ (eu)	$-\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	T_M^b (°C)	$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta S^\circ$ (eu)	$-\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	T_M^b (°C)	$\Delta\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	ΔT_M^b (°C)	$\Delta\Delta G^\circ_{37}^c$ (kcal/mol)	
guanozyna	76,5 ± 8,2	222,1 ± 26,4	7,60 ± 0,23	41,4	66,3 ± 2,5	189,8 ± 7,8	7,47 ± 0,04	41,4	0	0	0	
izoinozyna	78,4 ± 5,1	226,4 ± 16,4	8,14 ± 0,11	43,5	82,3 ± 4,8	238,8 ± 15,1	8,17 ± 0,10	43,3	-0,70	1,9	-0,35	
inozyna	53,7 ± 4,3	156,1 ± 14,5	5,28 ± 0,16	29,9	50,2 ± 1,3	144,3 ± 4,2	5,38 ± 0,05	30,1	2,09	-11,3	1,05	
purynorybozyd	58,7 ± 9,4	168,9 ± 30,6	6,31 ± 0,15	35,8	54,9 ± 2,3	156,6 ± 7,6	6,36 ± 0,05	36,0	1,11	-5,4	0,56	
2-aminopurynorybozyd	75,2 ± 17,7	214,3 ± 57,1	8,74 ± 0,10	46,4	73,3 ± 5,6	208,3 ± 18,1	8,70 ± 0,11	46,5	-1,23	5,1	-0,62	
2-aminoadenozyna	107,1 ± 25,2	305,5 ± 78,6	12,32 ± 0,89	54,7	84,0 ± 10,1	234,1 ± 30,8	11,39 ± 0,55	56,0	-3,92	14,6	-1,96	
adenozyna	80,9 ± 4,3	23,8 ± 13,3	9,34 ± 0,19	48,1	73,8 ± 1,5	208,60 ± 4,7	9,14 ± 0,03	48,4	-1,67	7	-0,84	
6-tioguanozyna	56,3 ± 7,3	159,9 ± 23,9	6,70 ± 0,13	37,9	54,1 ± 1,3	152,98 ± 4,4	6,65 ± 0,03	37,7	0,82	-3,7	0,41	
2'-deoksy-2'-fluoroarabino-2- aminoadenozyna	80,9 ± 3,7	231,7 ± 11,7	9,01 ± 0,12	46,8	75,4 ± 2,0	214,57 ± 6,4	8,88 ± 0,04	47,0	-1,41	5,6	-0,71	

Bufor użyty podczas topnień: 1 M chlorek sodu, 20 mM kakodylan sodu, 0,5 mM Na₂EDTA, pH 7.0; b – parametr wyznaczono dla stężenia oligonukleotydu 10⁻⁴ M, c – wartość $\Delta\Delta G^\circ_{37}$ w przeliczeniu na jedną modyfikację.

4.2. Dupleksy RNA modyfikowane analogami wpływającymi na konformację reszty cukrowej i wiązania N-glikozydowego

W tej części mojej pracy doktorskiej badałem stabilność termodynamiczną dupleksów niesamokomplementarnych modyfikowanych analogami wpływającymi na konformację reszty cukrowej i wiązania N-glikozydowego w pozycji G4. W tabeli 6 zebrałem parametry termodynamiczne dla wszystkich badanych wariantów dupleksu. Biorąc pod uwagę uzyskane dane mogę stwierdzić, że wprowadzanie modyfikacji reszty cukrowej spowodowało destabilizację niemal we wszystkich przypadkach. Analogi LNA i UNA jako jedyne w tej serii powodowały efekt stabilizujący. Różnica między największą (2',3'-sekoguanozyna) a najmniejszą (8-bromo-2'-deoksyguanozyna) wartością energii swobodnej wynosi 4,05 kcal/mol. Porównując wpływ analogów cukrowych najwyższy efekt stabilizujący wprowadza najbardziej labilna pochodna guanozyny, czyli UNA, a energia swobodna dupleksu zawierającego tę pochodną przyjmuje wartość równą -8,56 kcal/mol. Jednocześnie pochodne LNA o najbardziej zdefiniowanej konformacji reszty cukrowej wprowadzone do dupleksu obniżają stabilność termodynamiczną dupleksu w stosunku do wariantu bez modyfikacji. Pochodna zawierająca resztę 8-metyloguaniny, a więc wymuszoną konformację *syn* wiązania N-glikozydowego stabilizuje dupleks w mniejszym stopniu niż analog zawierający resztę guaniny. Różnica w energii swobodnej dla dupleksów modyfikowanych dwoma analogami 2'-O,4'-C-metylenorybozy wynosi 0,79 kcal/mol. Można sądzić, że badany dupleks jest stabilizowany, gdy guanozyna przyjmuje konformację *C3'-endo, anti*, a więc zgodną z konformacją nukleozydów w strukturze helisy A.

Porównując dupleksy z wprowadzonym analogiem reszty cukrowej pozbawione grupy 2'-hydroksylowej, a więc: 2'-deoksyguanozyna, 2'-deoksy-2'-fluoroguanozyna i 2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna, można zauważyć różnice w ich stabilności termodynamicznej. Przy czym różnica w energii swobodnej dupleksów z modyfikacjami fluorowanymi z atomem fluoru w pozycji α i β wynosi 1,94 kcal/mol. Wartość energii swobodnej dla dupleksu z 2'-deoksyguanozyną wynosi -5,04 kcal/mol (tabela 6). Wartość energii swobodnej dupleksu zawierającego 2'-deoksyguanozynę jest pośrednią pomiędzy tą wartością dla dupleksu z 2'-deoksy-2'-fluoroguanozyną i 2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyną. Może to wskazywać, że konformacja cukru wymuszona przez fluor w pozycji α wnosi do dupleksu większy efekt stabilizujący. Konformacja wymuszona przez fluor w pozycji β powoduje wzrost energii swobodnej

dupleksu, natomiast brak atomu fluoru w 2'-deoksyguanozynie umożliwia reszcie cukrowej przyjęcie konformacji pośredniej pomiędzy tymi dwiema, w których fluor skierowany jest „nad” lub „pod” powierzchnię pierścienia. Niewielka różnica wartości energii swobodnej dupleksów z 2'-deoksy-2'-fluoroguanozyną i niemodyfikowanej ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 0,83$ kcal/mol) wskazuje na większą stabilność układu o konformacji *C3'-endo* nukleozydu, a więc zbliżonej do tej w strukturze helisy typu A. Różnice w wartościach energii swobodnej w tych dupleksach mogą wynikać także z braku grupy 2'-hydroksylowej i obecności w tym miejscu atomu fluoru, co może również prowadzić do destabilizacji.

Ponadto, zaobserwowałem, że odwrócona konfiguracja grupy 2'-hydroksylowej guanozyny w duplesie również znacząco wpływa na jego stabilność termodynamiczną. Jednak dopiero wymuszenie konformacji *syn* w modyfikowanym nukleotydzie wprowadza w duplesie zmiany, które prowadzą do dalszej destabilizacji dupleksu, energia swobodna dupleksu przyjmuje najwyższą wartość -4,51 kcal/mol dla wariantu modyfikowanego 8-bromo-2'-deoksyguanozyną. We wszystkich badanych przypadkach z modyfikacją o wymuszonej konformacji *syn* energia swobodna dupleksu jest mniejsza. Różnice energii swobodnej dupleksów między parami analogów o konformacji *syn* i *anti* zmieniają się od wartości 2,23 kcal/mol dla dupleksu zawierającego rybozydy do wartości 0,17 kcal/mol dla dupleksu zawierającego 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydy. Różnice te w przypadku zestawienia pozostałych par są następujące: dla dupleksu z 8-bromoarabinoguanozyną i wariantu z arabinoguanozyną 0,95 kcal/mol, dla dupleksów z 8-metylo-2'-O,4'-C-metylenoguanozyną i z 2'-O,4'-C-metylenoguanozyną 0,79 kcal/mol, a dla 2'-deoksyrybozydów 0,53 kcal/mol. Różnica ta więc maleje w szeregu: rybozydy > arabinozydy > 2'-O,4'-C-metylenorybozydy > 2'-deoksyrybozydy > 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydy. Zmiany te mogą wynikać nie tylko z różnicy pofałdowania reszty cukrowej, ale także ze swobody przyjmowania przez zasadę azotową konformacji *syn* w przypadku pochodnych zawierających 8-bromoguaninę i *anti* w przypadku tych zawierających niemodyfikowaną zasadę.

Tabela 6. Parametry termodynamiczne dla dupleksu niesamokomplementarnego z modyfikacją wpływającą na konformację reszty cukrowej i wiązania N-glikozydowego w pozycji G4.

Sekwencja dupleksu 5' GUCXAGUGGC 3' 3' CAGUGAXCCG 5'	Średnia dopasowania krzywych topnienia				Wykres zależności T_M^{-1} od $\log C_T$						
	$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta S^\circ$ (eu)	$-\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	T_M^b (°C)	$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta S^\circ$ (eu)	$-\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	T_M^b (°C)	$\Delta\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	ΔT_M^b (°C)	$\Delta\Delta G^\circ_{37}^c$ (kcal/mol)
ganozyna	76,5 ± 8,2	222,1 ± 26,4	7,60 ± 0,23	41,4	66,3 ± 2,5	189,8 ± 7,8	7,47 ± 0,04	41,4	0	0	0
8-bromoganozyna	48,3 ± 4,7	138,4 ± 15,9	5,40 ± 0,23	29,9	52,3 ± 3,4	151,5 ± 11,3	5,24 ± 0,14	29,5	2,23	11,9	1,12
2'-deoksyganozyna	54,7 ± 3,3	159,8 ± 10,8	5,12 ± 0,07	29,2	56,7 ± 1,9	166,6 ± 6,3	5,04 ± 0,08	29,0	2,43	12,4	1,22
8-bromo-2'-deoksyganozyna	37,3 ± 12,4	104,7 ± 43,1	4,83 ± 1,04	23,5	38,4 ± 5,7	109,1 ± 19,7	4,51 ± 0,50	21,5	2,96	19,9	1,48
arabinoganozyna	36,7 ± 7,3	99,0 ± 24,4	5,95 ± 0,30	32,2	40,8 ± 3,8	113,1 ± 12,5	5,75 ± 0,15	31,2	1,72	10,2	0,86
8-bromoarabinoganozyna	50,1 ± 5,1	147,4 ± 16,9	4,40 ± 0,20	24,4	42,7 ± 1,8	112,2 ± 6,0	4,80 ± 0,12	24,9	2,67	16,5	1,34
2'-deoksy-2'- fluoroarabinoganozyna	38,6 ± 9,8	108,2 ± 33,1	4,99 ± 0,5	25,1	42,8 ± 6,4	122,7 ± 21,6	4,70 ± 0,38	24,3	2,77	17,1	1,39
8-bromo-2'-deoksy-2'- fluoroarabinoganozyna	45,8 ± 7,2	117,2 ± 35,8	4,72 ± 0,91	21,5	43,6 ± 2,1	121,2 ± 4,7	4,53 ± 0,05	21,1	2,94	20,3	1,47
2'-deoksy-2'-fluoroganozyna	67,2 ± 6,7	195,0 ± 22,1	6,66 ± 0,16	37,6	54,7 ± 2,9	154,8 ± 9,3	6,64 ± 0,04	37,6	0,83	3,8	0,42
2'-O,4'-C-metylenoganozyna	53,9 ± 6,4	147,0 ± 20,2	8,33 ± 0,20	47,7	55,6 ± 1,6	152,2 ± 5,1	8,40 ± 0,03	47,8	-0,93	-6,4	-0,47
8-metylo-2'-O-4'-C- metylenoganozyna	71,7 ± 5,6	206,5 ± 17,4	7,66 ± 0,19	42,0	66,0 ± 1,5	188,4 ± 4,9	7,61 ± 0,01	42,1	-0,14	-0,7	-0,07
2',3'-sekoganozyna	35,1 ± 6,6	86,6 ± 20,6	8,19 ± 0,54	52,4	49,0 ± 12,8	130,4 ± 39,7	8,56 ± 1,03	50,4	-1,09	-9	-0,55

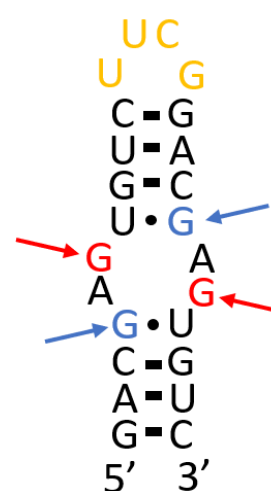
Bufor użyty podczas topień: 1 M chlorek sodu, 20 mM kakodylan sodu, 0,5 mM Na₂EDTA, pH 7.0; b – parametr wyznaczono dla stężenia oligonukleotydu 10⁻⁴ M, c – wartość $\Delta\Delta G^\circ_{37}$ w przeliczeniu na jedną modyfikację.

5. Badania termodynamiczne oligorybonukleotydów tworzących struktury typu spinka do włosów z wbudowanym motywem 5'GAGU/3'UGAG.

W trakcie realizacji mojej pracy doktorskiej zaprojektowałem również oligonukleotyd o strukturze spinki do włosów, której trzon stanowi samokomplementarna sekwencja 5'GACGAGUGUC, natomiast połączenie między końcem 3' jednej nici a 5' drugiej stanowi czteronukleotydowy fragment o sekwencji 5'UUCG. W ten sposób powstała cząsteczka o długości 24 nukleotydów, której trzon zawierał badany motyw 5'GAGU/3'UGAG.

W pierwszym etapie modelowy oligonukleotyd modyfikowałem w pozycji G4 lub G6 motywu 5'GAGU/3'UGAG (rysunek 29). W te miejsca wprowadziłem następujące modyfikacje: 8-bromoguanozynę, arabinoguanozynę oraz 8-bromoarabinoguanozynę. W ten sposób otrzymałem siedem oligomerów z dwiema modyfikowanymi resztami nukleotydów, dla których w następnym etapie wyznaczyłem parametry termodynamiczne zebrane w tabeli 7.

Wartości energii swobodnej dla badanych spinek są wyższe w porównaniu do wartości energii swobodnych dla dupleksów niesamokomplementarnych. Wynika to z braku termodynamicznego udziału procesu inicjacji podczas tworzenia spinki, która dla dupleksów wnosi 4,09 kcal/mol. Porównując wpływ jaki miały te same modyfikacje na zmianę energii swobodnej w przypadku dupleksu niesamokomplementarnego (rozdział 4) z danymi uzyskanymi dla spinki zaobserwowałem pewne podobieństwa. Na podstawie otrzymanych wyników można zauważyć, że wszystkie modyfikacje w pozycji G4 mają niekorzystny wpływ na stabilność termodynamiczną spinki i prowadzą do jej destabilizacji. Zmiany wartości energii swobodnej ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$) dla tych wariantów spinek wynoszą od 0,4 do 0,82 kcal/mol (tabela 7). Spośród tych modyfikacji pochodna 8-bromoarabinoguanozyna w największym stopniu destabilizuje badaną spinkę (w przeliczeniu na jedną modyfikację $\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 0,41$ kcal/mol). Ogólnie spinki modyfikowane analogami o wymuszonej konformacji *syn* są mniej stabilne termodynamiczne w stosunku do tych modyfikowanych analogami o konformacji *anti*.



Rysunek 29. Schemat przedstawiający modelową spinkę. Niebieskimi strzałkami zaznaczono pozycje G4, a czerwonymi pozycje G6.

Tabela 7. Parametry termodynamiczne dla oligomeru typu spinka do włosów z dwiema modyfikacjami wprowadzonymi w trzonie spinki w pozycjach G6 lub G4.

Sekwencja (5' – 3') 5' GACGAGUGUCUUCGGACGAGUGUC 3'		$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta S^\circ$ (eu)	$-\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	T_M^b (°C)	$\Delta\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	ΔT_M^b (°C)	$\Delta\Delta G^\circ_{37}^c$ (kcal/mol)
Rodzaj modyfikacji	Pozycja modyfikacji							
guanozyna		25,5 ± 3,4	75,2 ± 10,6	2,15 ± 0,21	65,6	0	0	0
8-bromoguanozyna	G4	20,8 ± 4,1	62,6 ± 12,5	1,42 ± 0,41	59,7	0,73	5,9	0,37
8-bromoguanozyna	G6	39,2 ± 0,7	114,6 ± 2,1	3,70 ± 0,08	69,3	-1,55	-3,7	-0,78
arabinoguanozyna	G4	19,0 ± 1,4	55,6 ± 4,4	1,75 ± 0,19	68,5	0,40	2,9	0,2
arabinoguanozyna	G6	21,6 ± 1,4	62,8 ± 4,3	2,09 ± 0,06	70,3	0,06	-4,7	0,03
8-bromoarabinoguanozyna	G4	18,3 ± 4,5	54,8 ± 14,6	1,33 ± 0,13	61,2	0,82	4,4	0,41
8-bromoarabinoguanozyna	G6	20,9 ± 0,9	62,0 ± 2,9	1,65 ± 0,11	63,6	0,50	2	0,25

Parametry otrzymano ze średniej dopasowania do krzywych topień. Bufor użyty podczas topień: 1 M chlorek sodu, 20 mM kakodylan sodu, 0,5 mM Na₂EDTA, pH 7.0; b – parametr wyznaczono dla stężenia oligonukleotydu 10⁻⁴ M; c – wartość $\Delta\Delta G^\circ_{37}$ w przeliczeniu na jedną modyfikację.

Dla spinek zawierających modyfikacje w pozycji G6 najbardziej stabilny jest wariant z 8-bromoguanozyną ($\Delta\Delta G^\circ_{37} = -1,55$ kcal/mol). Może to wskazywać na utworzenie bardziej stabilnej struktury, być może tej, opisananej przez Scotta Kennedy'ego *et al*⁴⁴. Co ciekawe, energia swobodna spinki z arabinoguanozyną niewiele różni się od energii swobodnej niemodyfikowanej cząsteczki ($\Delta\Delta G^\circ_{37} = 0,06$ kcal/mol), czyli ta pochodna ma nieznaczny destabilizujący wpływ na stabilność termodynamiczną spinki. Analog o wymuszonej konformacji *syn* wprowadza niewielki efekt destabilizujący. Można przypuszczać, że być może bardziej stabilna struktura wymaga innej konformacji reszty cukrowej od tej, jaką wymusza arabinoza (*C2'-endo*) lub grupa 2'-hydroksylowa w pozycji β, która uniemożliwia oddziaływania w obrębie cząsteczki istotne dla stabilności jej struktury.

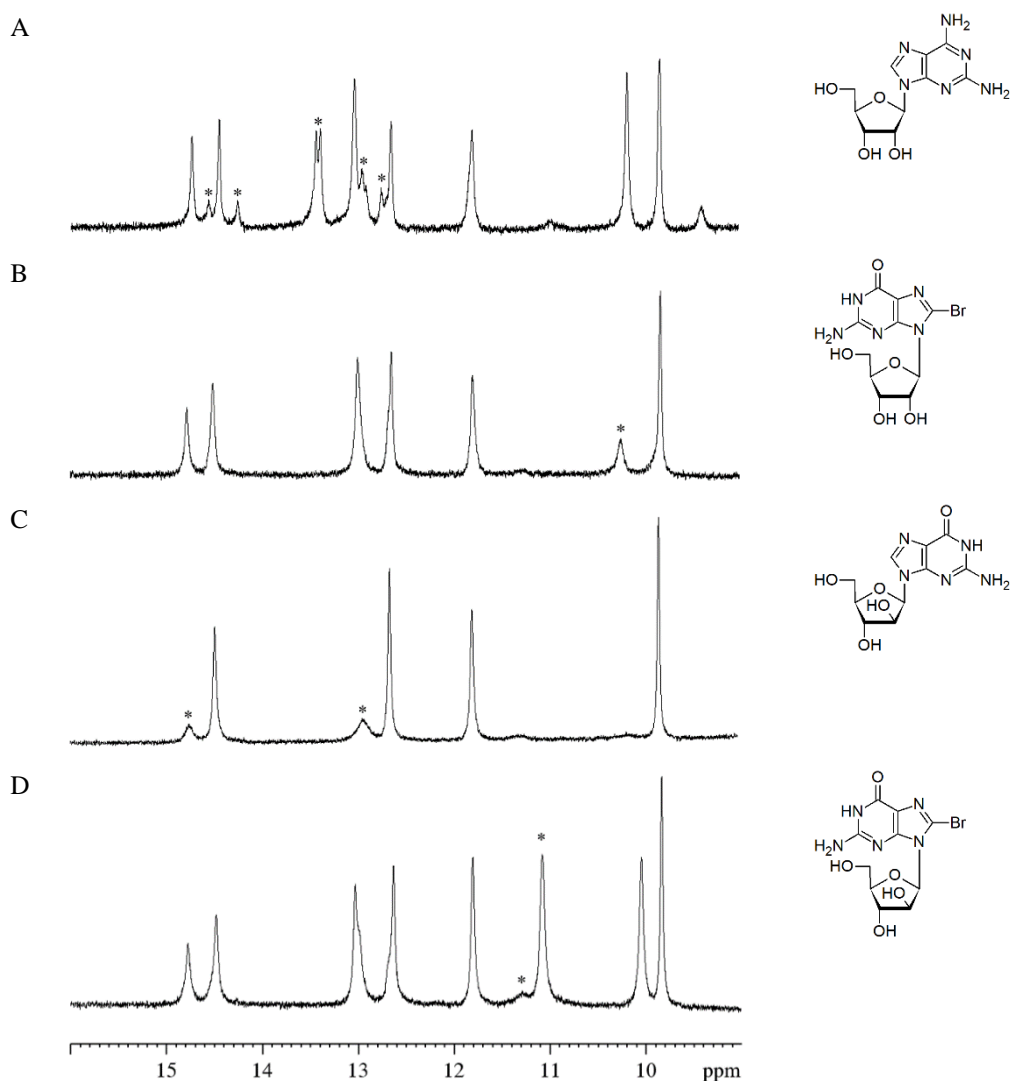
6. Badania rejonu iminoprotonowego oligorybonukleotydów typu spinka do włosów z motywem 5'GAGU/3'UGAG metodą spektroskopii NMR

Wiązania wodorowe odpowiadają za tworzenie się złożonych struktur RNA. Występują różne rodzaje wiązań wodorowych, różniące się siłą wiązania oraz charakterem kwasowo-zasadowym donora i akceptora. Ponieważ do oligorybonukleotydów o strukturze spinki zawierających motyw 5'GAGU/3'UGAG wprowadzałem modyfikacje w pozycji G4 lub G6, postanowiłem w ramach mojej pracy doktorskiej porównać charakter wiązań wodorowych takich struktur przy użyciu spektroskopii NMR. Techniki spektroskopii NMR pozwalają na bardzo wnikliwie i interesujące analizy struktury kwasów nukleinowych¹²⁴. Jednak, duża ilość materiału oraz długotrwałość tego typu badań jest niewątpliwie największą niedogodnością tej metody.

Widma ¹H NMR dla oligorybonukleotydów zostały wykonane przez dr Dorotę Gudanis z Zakładu Biomolekularnego NMR w naszym Instytucie. Regiony iminowe wykonanych widm dla badanych cząsteczek modyfikowanych w pozycjach G4 lub G6 prezentuję na rysunkach odpowiednio 30 oraz 31. Oligorybonukleotydy wykorzystane do badań strukturalnych NMR, podobnie jak w przypadku badań termodynamicznych, modyfikowałem wykorzystując następujące analogi guanozyny: arabinoguanozynę, 8-bromoguanozynę, 8-bromoarabinoguanozynę. Widma ¹H NMR zostały zarejestrowane w buforze o składzie: 80 mM chlorek sodu, 20 mM fosforan sodu, 0,05 mM EDTA i pH 6.01, zawierającym 10% D₂O.

Na rysunku 30 przedstawiłem widma ¹H NMR niemodyfikowanej spinki oraz jej wariantów modyfikowanych w pozycji G4. Na podstawie otrzymanych wyników można zauważyć, że w rejonie iminoprotonowym dla niemodyfikowanej spinki występuje duża liczba sygnałów oraz widoczne różnice w ich intensywnościach. Można zaobserwować dwie pary sygnałów między 14 i 15 ppm oraz drugą parę między 12.5 i 13 ppm (rysunek 30A). Analizując powyższe wyniki można stwierdzić, że w warunkach eksperymentu NMR istnieje równowaga między różnymi konformacjami spinki. Sygnały o wyższej intensywności pochodzą od struktury, która jest dominująca i przeważa w badanym układzie. Sygnały mniej intensywne (zaznaczone gwiazdką, rysunek 30A) pochodzą od innych form konformacyjnych i nie pojawiają się na widmach dla wszystkich wariantów modyfikowanych spinek. Po wprowadzeniu do oligorybonukleotydu 8-bromoguanozyny w pozycję G4 widmo ulega znacznemu uproszczeniu, to znaczy sygnały iminowe, które

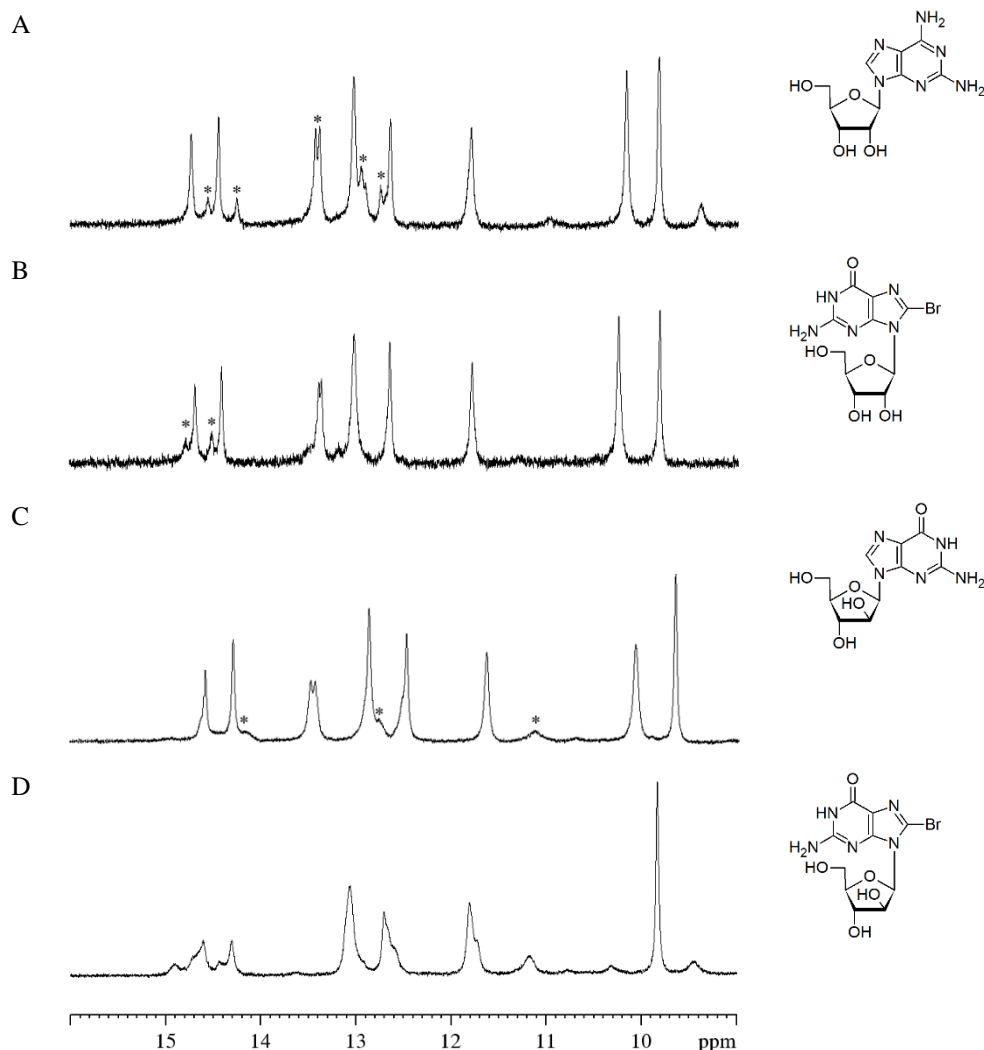
pochodzą od innych struktur zanikają. Ponadto, zarejestrowany sygnał powyżej 10 ppm ma znacznie mniejszą intensywność (zaznaczony gwiazdką, rysunek 30B). Obniżenie intensywności tego sygnału może świadczyć o osłabieniu wiązania wodorowego powstałej struktury. Wprowadzenie arabinoguanozyny do oligorybonukleotydu również powoduje pewne zmiany w strukturze spinki, na co wskazuje uzyskane widmo ^1H NMR (rysunek 30C). Znacznemu osłabieniu ulegają sygnały przy 13 i 15 ppm (zaznaczone gwiazdką, rysunek 30C), a sygnał powyżej 10 ppm całkowicie zanika. Obserwacje te pozwalają zasugerować, że struktura spinki zawierająca arabinoguanozynę jest strukturalnie jednorodna w warunkach eksperymentów NMR. Widmo iminoprotonowe dla spinki zawierającej 8-bromoarabinoguanozynę w pozycji G4 przypomina to zarejestrowane dla



Rysunek 30. Widma ^1H NMR rejonu iminoprotonowego spinki z pętlą UUGC. W pozycji G4 wprowadzono analogi guanozyny: (A) guanozynę, (B) 8-bromoguanozynę, (C) arabinoguanozynę oraz (D) 8-bromoarabinoguanozynę. Obok widm umieszczono wzory strukturalne pochodnych użytych do ich modyfikacji. Widma rejestrowano w 5°C w buforze 80 mM chlorek sodu, 20 mM fosforan sodu, 0,05 mM EDTA i pH 6.01.

spinki modyfikowanej 8-bromoguanozyną. Jednak można zauważyć, że dla pochodnej 8-bromoarabinoguanozyny dodatkowo pojawia się sygnał iminowy przy 11 ppm oraz drugi bardzo słaby sygnał przy 11.5 ppm (zaznaczone gwiazdką, rysunek 30D).

Widma iminoprotonowe oligorybonukleotydów zawierających modyfikacje w pozycji G6 zaprezentowałem na rysunku 31. Podobnie, jak w przypadku modyfikacji G4 spinka z guanozyną była strukturą referencyjną.



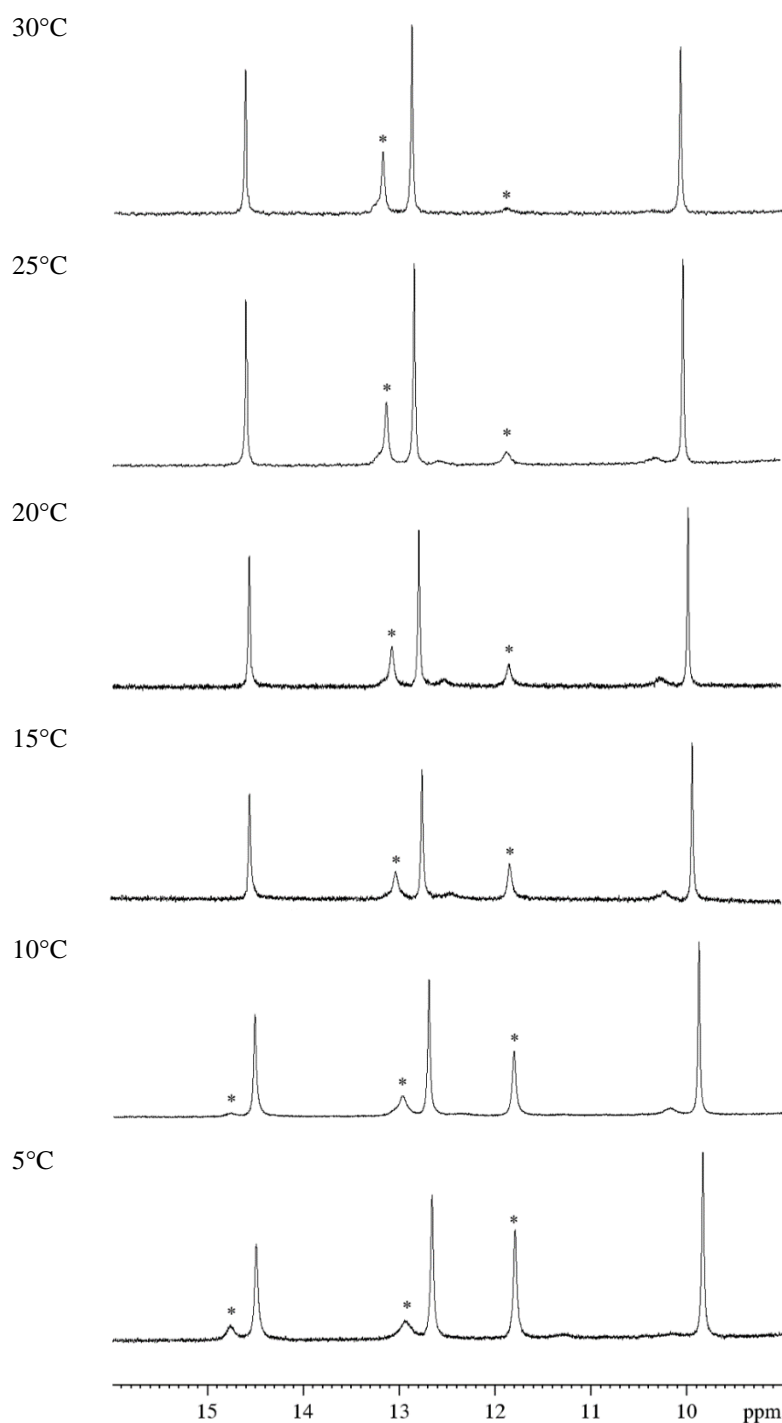
Rysunek 31. Widma ^1H NMR rejonu iminoprotonowego spinki z pętlą UUGC. W pozycji G6 wprowadzono następujące analogi guanozyny: (A) guanozynę, (B) 8-bromoguanozynę, (C) arabinoguanozynę oraz (D) 8-bromoarabinoguanozynę. Obok widm umieszczono wzory strukturalne pochodnych użytych do ich modyfikacji. Widma rejestrowano w 5°C w buforze 80 mM chlorek sodu, 20 mM fosforan sodu, 0,05 mM EDTA i pH 6.01.

Z otrzymanych widm ^1H NMR wynika, że intensywność sygnałów dla spinki z podobnymi nukleotydami w pozycji G6 nie zmniejsza się tak, jak w przypadku spinek modyfikowanych w pozycji G4. Analizując widma iminoprotonowe dla spinki referencyjnej (rysunek 31A) oraz z 8-bromoguanozyną (rysunek 31B) lub

arabinoguanozyną (rysunek 31C) można zaobserwować, że we wszystkich trzech przypadkach pojawiają się sygnały iminowe w tych samych regionach. Odmienny układ sygnałów iminowych został zarejestrowany dla spinki z 8-bromoarabinoguanozyną (rysunek 31D). Na widmie iminoprotonowym spinki zawierającej 8-bromoguanozynę widoczne jest przesunięcie dwóch sygnałów o niższej intensywności w zakresie 15-14 ppm (zaznaczone gwiazdką, rysunek 31B) względem widma referencyjnej spinki (rysunek 31A). Dla oligorybonukleotydu zawierającego arabinoguanozynę można zaobserwować w regionie iminowym tylko dwa sygnały między 14 i 15 ppm. Dodatkowo, na widmie widoczne są także szerokie sygnały o bardzo małej intensywności w zakresie 11, 13 i 14 ppm (zaznaczone gwiazdką, rysunek 31C). Może to świadczyć o słabych oddziaływaniach między zasadami lub o szybkiej wymianie protonów, czyli dynamicznej strukturze spinki. W przypadku oligorybonukleotydu modyfikowanego 8-bromoarabinoguanozyną na widmie ^1H NMR zaobserwowałem sygnały iminowe o małych intensywnościach w zakresie 11-15 ppm, co może wskazywać na bardzo dynamiczną strukturę tej spinki (rysunek 31D).

Wyniki otrzymane podczas analizy strukturalnej NMR (rysunki 30 i 31) pozostają w zgodności z uzyskanymi danymi termodynamicznymi (tabela 7, rozdział 5). Spinki modyfikowane w pozycji G4 były mniej stabilne termodynamicznie, a na widmach iminoprotonowych obserwowałem mniej sygnałów iminowych (rysunek 30). Ogólnie mniejsza liczba pików, które obserwuje się na widmach ^1H NMR dla spinek z modyfikacjami w pozycji G4 wskazuje na bardziej labilne struktury, co odzwierciedla również ich niższa stabilność termodynamiczna. Spinki modyfikowane w pozycji G6, z wyjątkiem modyfikowanej 8-bromoarabinoguanozyną, wykazywały znacznie wyższą stabilność termodynamiczną. Widoczne jest to również na widmach ^1H NMR, gdzie tylko spinka modyfikowana 8-bromoguanozyną w pozycji G6 ma znacznie więcej sygnałów o niskiej intensywności, co wskazuje na małą stabilność jej struktury (rysunek 31D). Pozostałe spinki modyfikowane w pozycji G6 posiadają po osiem dobrze zdefiniowanych sygnałów w widmach ^1H NMR i również trwałość termodynamiczna tych wariantów jest większa lub podobna do spinki bez modyfikacji (tabela 7, rozdział 5).

W przypadku oligorybonukleotydu modyfikowanego w pozycji G4 arabinoguanozyną zaobserwowano, że niektóre sygnały zmieniały się wraz ze zmianą temperatury w rejestrowanych widmach (zaznaczone gwiazdką, rysunek 32). W celu uwidocznienia tych zmian wykonano dla tej spinki widma ^1H NMR w temperaturach 5°C ,



Rysunek 32. Widma ¹H NMR rejonu iminoprotonowego dla spinki modyfikowanej arabinoguanozyną w pozycji G4 w różnych temperaturach. Widma rejestrowano w buforze 80 mM chlorek sodu, 20 mM fosforan sodu, 0,05 mM EDTA i pH 6.01.

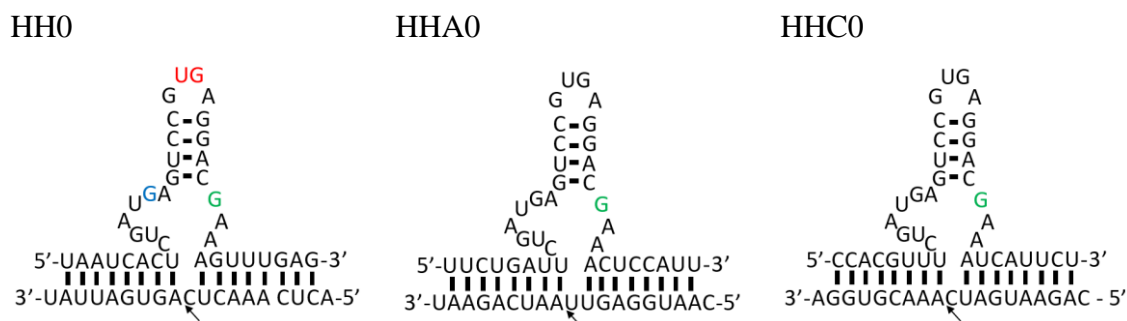
10°C, 15°C, 20°C, 25°C i 30°C (rysunek 32). Na widmach widoczne jest wyraźne wzmocnianie i wyostrzenie się sygnału przy 13 ppm wraz ze wzrostem temperatury. Jednocześnie sygnał poniżej 12 ppm, który jest bardzo dobrze zdefiniowany w 5°C, całkowicie zanika w temperaturze 30°C. Ponadto, słabo zdefiniowany, szeroki i niski sygnał poniżej 15 ppm również zanika. Trzy pozostałe sygnały przy: 14.5, powyżej 12.5

i poniżej 10 ppm, które nie zmieniają się w badanym zakresie temperatur najprawdopodobniej pochodzą od silnych par otaczających badany motyw 5'GAGU/3'UGAG w badanej spince. W tym wypadku można więc powiedzieć, że struktura tego motywu nie jest uporządkowana.

Mimo niewielkich zmian w chemicznej strukturze całego oligorybonukleotydu, jego struktura przestrzenna ulega zmianie, co widać jednoznacznie na widmach ^1H NMR rejonu iminoprotonowego. Na podstawie analizy strukturalnej NMR można ogólnie stwierdzić, że nukleozydy o zdeterminowanej konformacji są przydatnym narzędziem do wprowadzania zmian w strukturze RNA. Jednak do wykonania pełnej charakterystyki badanych spinek wymagane byłoby wykonanie dalszych analiz NMR. Przykładowo, można by wykorzystać korelacyjne widma dwuwymiarowe wykorzystujące sprzężenia między heteroatomami oraz widma wykorzystujące efekt Overhausera. Badania te mogłyby pomóc w lepszym zrozumieniu badanej struktury przez przypisanie zaobserwowanym sygnałom konkretnych reszt nukleotydowych, oraz umożliwiłyby określenie struktury badanego motywu 5'GAGU/3'UGAG

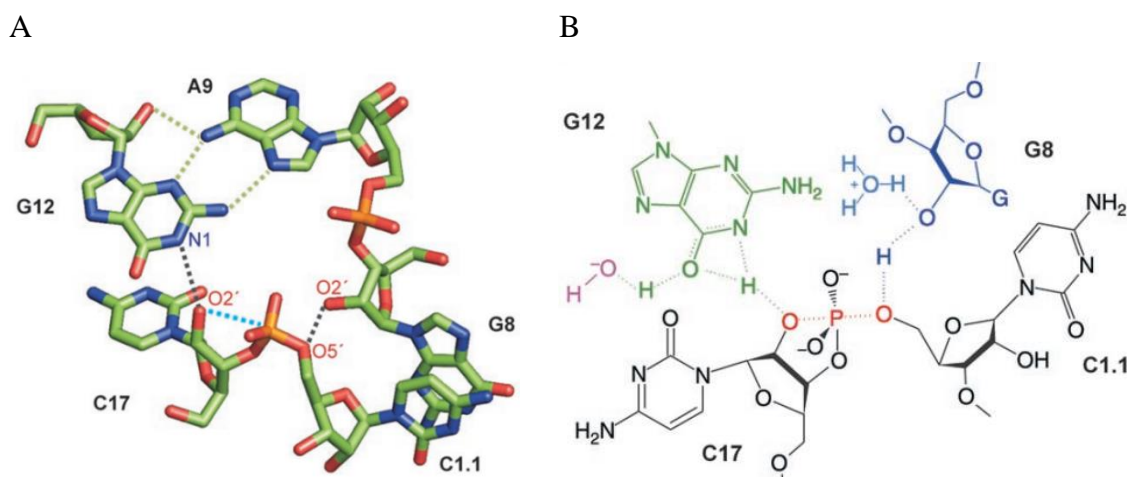
7. Projektowanie rybozymów *hammerhead* i wybór analogów nukleozydów wykorzystanych do modyfikacji centrum katalitycznego

Badane przeze mnie modelowe rybozimy *hammerhead* zostały zaprojektowane przez dr Julitę Piasecką z Zakładu Genomiki Strukturalnej RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, jako narzędzie do specyficznego rozcięcia 5 segmentu (+)RNA wirusa grypy. Ramiona rybozimu zostały zaprojektowane tak, aby hybrydowały do wybranych fragmentów (+)RNA wirusa grypy. Docelowe fragmenty wirusowego (+)RNA to rejony 183-202, 614-633 i 627-646, odpowiednio dla rybozymów oznaczonych: HH0, HHA0 i HHC0 (rysunek 33). Trzy wybrane sekwencje docelowe posiadają różne tryplety nukleotydowe, po których następuje katalityczne rozcięcie nici RNA. Wybór różnych trypletów nukleotydowych, po których następuje cięcie katalityczne ma znaczenie, co pokazują doniesienia literaturowe¹²⁵⁻¹²⁸. Tryplety nukleotydowe to sekwencja trzech nukleotydów, po których następuje cięcie katalizowane przez rybozym. Pierwszy rybozym HH0 i jego modyfikowane warianty były nakierowane na substrat S0, który posiada tryplet CUC. Drugi rybozym HHA0 i jego warianty były nakierowane na substrat SA o tryplecie GUU. Natomiast trzeci rybozym HHC0 i jego modyfikowane warianty na substrat SC, w którym tryplet nukleotydowy ma sekwencję AUC. W przypadku wszystkich trzech rybozymów helisa II została utworzona z czterech par Watsona-Cricka i jest zamknięta pętlą L2 o sekwencji 5'GUGA3'. Użyte przeze mnie modelowe substraty oligorybonukleotydowe (S0, SA, SC) odpowiadają sekwencji rejonów RNA wirusa grypy, na które zostały nakierowane te trzy rybozimy. W celu wizualizacji przebiegu ich rozcinania przez rybozimy końce 5' wszystkich trzech substratów RNA były wyznakowane fluoresceiną.



Rysunek 33. Sekwencje i struktura drugorzędowa rybozymów HH0, HHA0 i HHC0 z zaznaczonymi miejscami modyfikacji, na zielono zaznaczono resztę guanozyny G12, na niebiesko resztę guanozyny G8, a na czerwono nukleozydy w pętli L2. Czarna strzałka wskazuje miejsce cięcia w nici substratu.

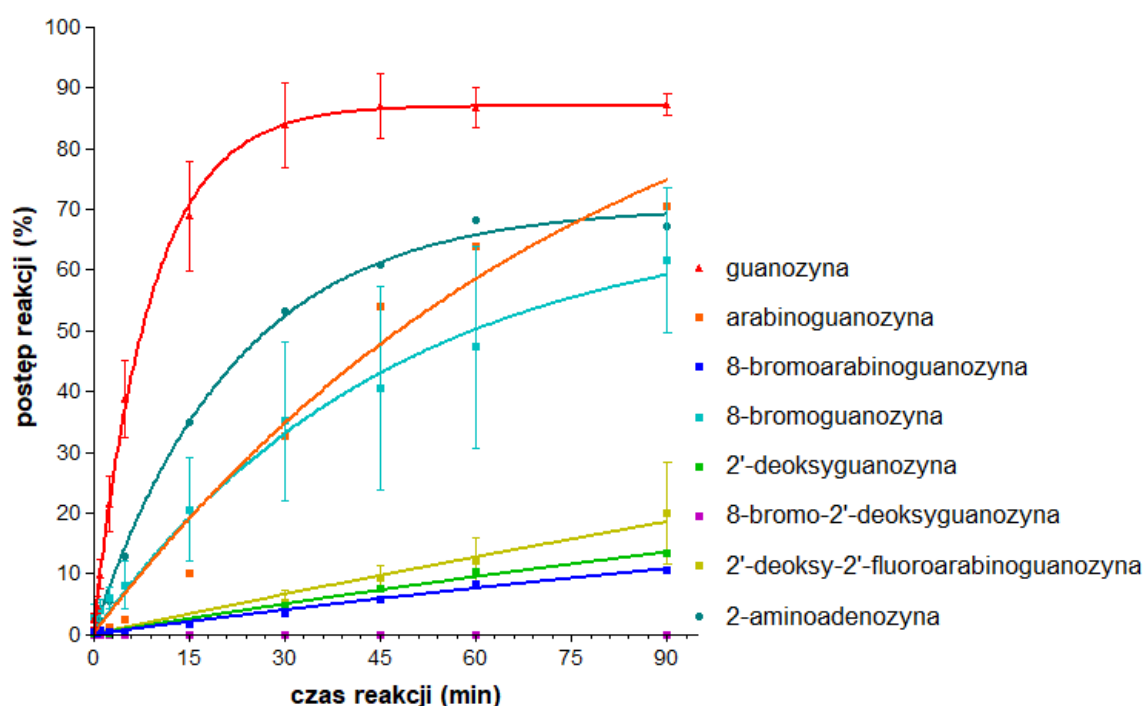
Według obecnej wiedzy na temat mechanizmu działania rybozomu *hammerhead* wiadomo, że w bezpośredniej katalizie transestryfikacji biorą udział reszty guanozyny G8 i G12. W mojej pracy doktorskiej postanowiłem wprowadzić szereg modyfikacji w te dwa miejsca, ponieważ chciałem zbadać jak konformacyjnie zdeterminowane analogi nukleozydów wpłyną na szybkość działania rybozomu. Wśród analogów, jakie wybrałem do modyfikowania rybozomu znalazły się: 8-bromoguanozyna, arabinoguanozyna, 8-bromoarabinoguanozyna, 2'-deoksyguanozyna, 2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna, 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna, 8-bromo-2'-deoksyguanozyna, 2-aminoadenozyna, 2',3'-sekourydyna i 2',3'-sekoizoguanozyna. Pochodne guanozyny były wybrane tak, aby determinowały konformację wiązania N-glikozydowego lub reszty cukrowej. Pochodna 2-aminoadenozyny została zastosowana, aby zmienić charakter krawędzi Watsona-Cricka zasady purynowej, natomiast nukleozydy serii UNA były wykorzystane do modyfikowania pętli L2 rybozomu. Wprowadzenie labilnych konformacyjnie analogów miało na celu umożliwienie przyjęcia optymalnej struktury oraz ułatwienie potencjalnych oddziaływań pętli w strukturze aktywnego katalitycznie rybozomu, w której trzony helis I i II układają się równoległe (rysunek 16. rozdział 4.2, część literaturowa).



Rysunek 34. Reszty nukleotydów uczestniczące bezpośrednio w katalizie reakcji transestryfikacji w rybozomie *hammerhead*. A - struktura krystalograficzna ułożenia reszt nukleotydów dookoła grupy fosforanowej biorącej udział w reakcji, B - proponowany stan przejściowy z zaznaczeniem istotnej roli guanozyny G12 i guanozyny G8. Rysunek zaadaptowano z Przybilski, R. *et al.*¹¹⁰.

7.1. Badanie kinetyki reakcji rybozymów *hammerhead* modyfikowanych w centrum katalitycznym w pozycji G8

Guanozyna w pozycji G8 rybozemu *hammerhead* według proponowanego mechanizmu oddziałuje z nicią substratu za pośrednictwem grupy 2'-hydroksylowej. Ta grupa funkcyjna pełni rolę kwasu i protonuje tlen 5' w nici substratu (rysunek 34). Modyfikowanie pozycji G8 centrum katalitycznego rybozemu pochodną 2'-deoksy- całkowicie hamuje jego aktywność katalityczną¹¹². Podejrzywałem również, że pochodna arabinoguanozyny w pozycji G8, ze względu na odwrotną do naturalnej konfigurację grupy hydroksylowej, może uniemożliwić zajście reakcji.



Rysunek 35. Krzywe kinetyczne dla rybozymów HH0 modyfikowanych w pozycji G8.

W pierwszym etapie tej części pracy doktorskiej przeprowadziłem reakcje z modyfikowanymi rybozymami HH0 i substratem S0. Stosowałem pięciokrotny molowy nadmiar substratu oraz 5 mM stężenie jonów magnezu. Po przeprowadzeniu reakcji i zatrzymaniu jej w 10 punktach czasowych (0, 0.5, 1, 2.5, 5, 15, 30, 45, 60, 90 min) zwizualizowałem przebieg reakcji na żelu poliakrylamidowym. Następnie wyznaczyłem krzywe kinetyczne (rysunek 35), na podstawie których wyznaczyłem wartości parametru k_{obs} , który opisuje szybkość działania rybozemu (tabela 8). Parametr k_{obs} opisuje szybkość zachodzącej reakcji od substratu do produktu. Uwzględnia on stałe szybkości wszystkich procesów składających się na szybkość działania rybozemu, czyli szybkość hybrydyzacji

substratu i rybozemu, szybkość rozcinania substratu, szybkość dysocjacji rybozemu i produktów.

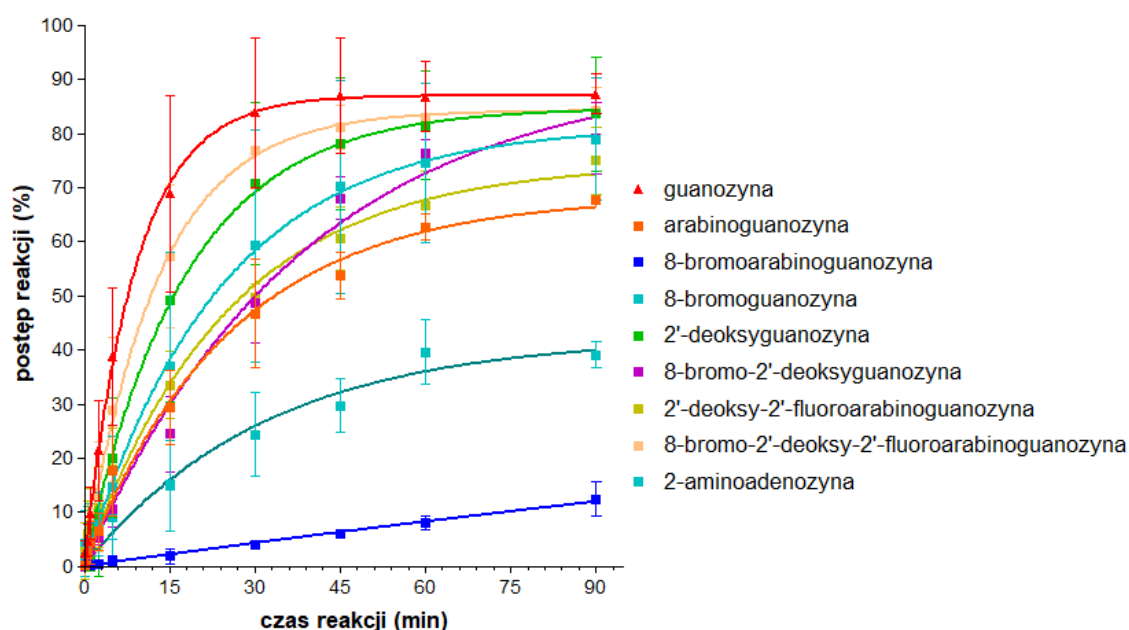
Na podstawie uzyskanych danych zauważyłem, że wszystkie modyfikacje obniżyły aktywność rybozemu, jednak wyraźne zatrzymanie reaktywności rybozemu widoczne jest dopiero dla pochodnych 2'-deoksy. Jest to uzasadnione, ponieważ brak grupy hydroksylowej istotnej dla procesu katalitycznego uniemożliwia zajście reakcji i protonację atomu tlenu 5' rozcinanego wiązania fosfodiesterowego w nici substratu. Wartości parametru kinetycznego k_{obs} (tabela 8) dla pochodnych: 2'-deoksyguanozyny, 2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyny oraz ich analogów 8-bromo- wskazują, że aktywność katalityczna tak modyfikowanego rybozemu została praktycznie całkowicie zatrzymana. Rybozemu modyfikowany arabinoguanozyną wykazywał aktywność ($k_{obs} = 0,013 \text{ min}^{-1}$) o rząd wielkości niższą od niemodyfikowanego wariantu ($k_{obs} = 0,112 \text{ min}^{-1}$). W tym przypadku spadek aktywności katalitycznej był spowodowany odwróconą konfiguracją grupy 2'-hydroksylowej guanozyny. To oznacza, że odchylenie tej grupy hydroksylowej wywołane odwrotną konfiguracją utrudnia przyjęcie przez centrum katalityczne aktywnej struktury, ale nie uniemożliwia tego. Pochodne 8-bromoguanozyny i 2-aminoadenozyny wprowadzone do cząsteczki rybozemu wywołują podobny efekt, a mianowicie obniżają jego aktywność. Poza tym, że nukleozyd w pozycji G8 oddziałuje z nicią substratu za pośrednictwem grupy hydroksylowej, to również zasada heterocykliczna nukleozydu w tej pozycji jest zaangażowana w oddziaływania wodorowe w strukturze tego rybozemu. W przypadku 8-bromoguanozyny odwrócona konformacja wiązania N-glikozydowego może utrudniać lub nawet uniemożliwiać korzystne

Tabela 8. Szybkość reakcji rybozymów HH0 modyfikowanych w pozycji G8.	
Modyfikacja	$k_{obs} (\text{min}^{-1})$
guanozyna	0,112
8-bromoguanozyna	0,022
arabinoguanozyna	0,013
8-bromoarabinoguanozyna	0,004
2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna	0,002
8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna	nie oznaczono
2'-deoksyguanozyna	0,003
8-bromo-2'-deoksyguanozyna	nie oznaczono
2-aminoadenozyna	0,029

oddziaływania, które są odpowiedzialne za stabilizację struktury centrum katalitycznego w trakcie reakcji transestryfikacji. W przypadku pochodnej 2-aminoadenozyny sytuacja jest podobna, ta modyfikacja również niekorzystnie wpływa na aktywność katalityczną rybozomu. Sugeruje się, że w formie aktywnej rybozomu, który zawiera niemodyfikowany nukleozyd, guanozyna G8 oddziałuje z resztą urydyny przez wiązania wodorowe. Wiadomo, że w parze G-U występują słabe oddziaływania, dlatego zamiana reszty guaniny na 2-aminoadeninę mogła doprowadzić do wzmocnienia oddziaływań z resztą urydyny. W konsekwencji to podstawienie ograniczyło labilność struktury centrum katalitycznego rybozomu i również obniżyło szybkość reakcji.

7.2. Badanie kinetyki reakcji rybozymów *hammerhead* modyfikowanych w centrum katalitycznym w pozycji G12

Guanozyna w pozycji G12 jest zaangażowana za pośrednictwem zasady purynowej w proces katalityczny (rysunek 34, rozdział 7). Reszta guaniny umożliwia deprotonację grupy 2'-hydroksylowej w nici substratu w miejscu cięcia. Reszta purynowa pełni więc rolę zasady w procesie katalitycznym. Dlatego, modyfikowanie tej reszty nukleotydowej pochodnymi pozbawionymi grupy 2'-hydroksylowych nie powinno mieć znacznego wpływu na przebieg reakcji katalitycznej rybozomu. Jednak należy zaznaczyć, że konformacja reszty cukrowej tego nukleozydu może mieć pośredni wpływ na dostępność zasady heterocyklicznej w procesie katalizy.



Rysunek 36. Krzywe kinetyczne dla rybozymów HH0 modyfikowanych w pozycji G12.

W tej części moich badań wykorzystałem trzy rybozomy, tj. HH0, HHA0 i HHC0, które zmodyfikowałem w pozycji G12. Rybozomy te różnią się wyłącznie ramionami wiążącymi substrat, a dokładniej sekwencją samego substratu i trypletu nukleotydowego, po którym dochodzi do katalitycznego cięcia. Do modyfikacji rybozomu HH0 użyłem tych samych analogów guanozyny, jak w przypadku modyfikacji pozycji G8. Rybozomy HHA0 i HHC0 modyfikowałem wyłącznie 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyną lub 8-bromoguanozyną w pozycji G12. Dla przygotowanych modelowych rybozomów przeprowadziłem reakcje z odpowiednimi substratami: dla rybozomu HH0 był to S0, dla rybozomu HHA0 był to SA, natomiast dla HHC0 substratem był SC. Stosowałem pięciokrotny nadmiar molowy substratu oraz 5 mM stężenie jonów magnezu. Po przeprowadzeniu reakcji i zatrzymaniu jej w 10 punktach czasowych, czyli po 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 15, 30, 45, 60, 90 min zwizualizowałem przebieg reakcji na żelu poliakrylamidowym. Następnie wyznaczyłem krzywe kinetyczne (rysunek 36 i 37), na podstawie których wyznaczyłem wartości parametru k_{obs} (tabela 9).

Tabela 9. Szybkość reakcji rybozomów HH0 modyfikowanych w pozycji G12.	
Modyfikacja	k_{obs} (min^{-1})
guanozyna	0,112
8-bromoguanozyna	0,042
arabinoguanozyna	0,040
8-bromoarabinoguanozyna	0,002
2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna	0,040
8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna	0,077
2'-deoksyguanozyna	0,057
8-bromo-2'-deoksyguanozyna	0,026
2-aminoadenozyna	0,032

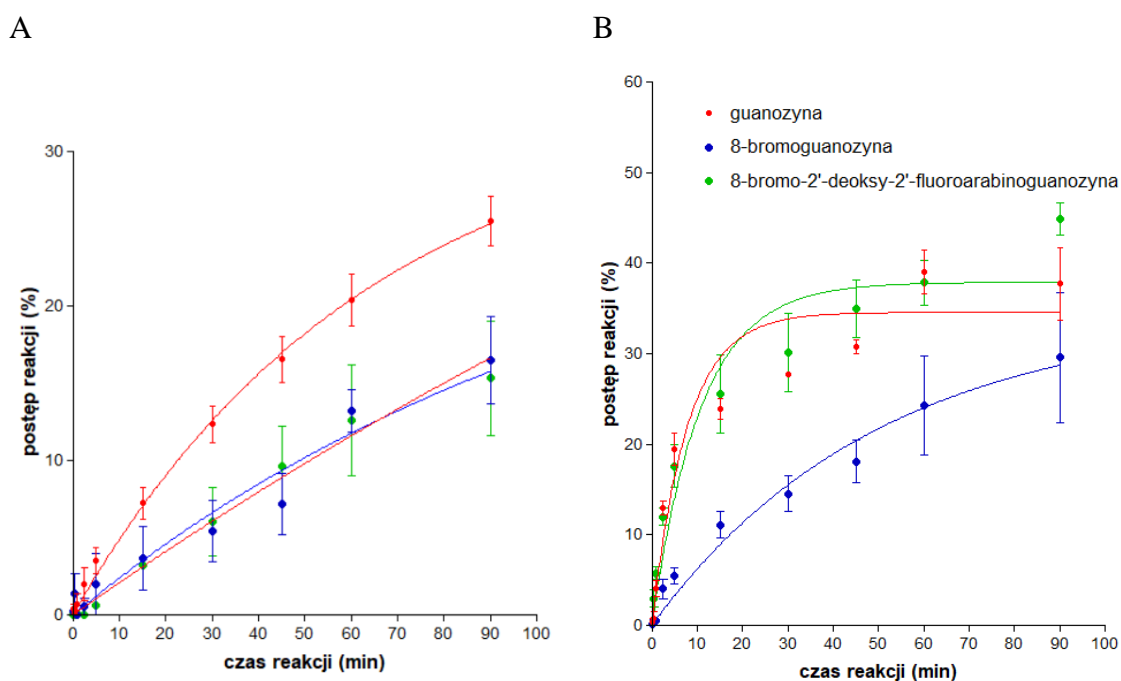
Na podstawie otrzymanych wyników zaobserwowałem, że wprowadzone analogi w różnym stopniu wpłynęły na reaktywności rybozomu HH0 (tabela 9). Można zauważyć, że we wszystkich przypadkach zanotowałem mniejsze wartości parametru k_{obs} w porównaniu z niemodyfikowanym wariantem (tabela 9), co oznacza obniżenie aktywności modyfikowanych rybozomów. Spośród wszystkich badanych modyfikacji pochodna 8-bromoarabinoguanozyny niemal całkowicie zahamowała aktywność katalityczną rybozomu ($k_{obs} = 0,002 \text{ min}^{-1}$). Przypuszczam, że pochodna ta uniemożliwia

przyjęcie przez centrum katalityczne aktywnej struktury. Niestety trudno jest jednoznacznie wyjaśnić, dlaczego tak się dzieje. Można przypuszczać, że zdeterminowana konformacja *syn* zasady w połączeniu z resztą arabinozy utrudnia stabilizujące oddziaływania z tym nukleozydem, przez co nie jest on zdolny do efektywnego katalizowania reakcji. Rybozym zawierający 8-bromo-2'-deoksyguanozynę w pozycji G12 również działa dużo wolniej $k_{\text{obs}} = 0,026 \text{ min}^{-1}$ w stosunku do niemodyfikowanego wariantu. Może to wynikać z wymuszonej konformacji *syn* oraz braku grupy 2'-hydroksylowej, która może brać udział w stabilizujących oddziaływaniach w aktywnej strukturze centrum katalitycznego (rysunek 34A, rozdział 7). Podobna sytuacja występuje dla rybozimu zawierającego 2-aminoadenozynę. W tym przypadku wartość parametru k_{obs} wynosi $0,032 \text{ min}^{-1}$, co oznacza obniżenie jego aktywności katalitycznej. Tutaj znaczne spowolnienie właściwości katalitycznych również można przypisać potencjalnemu silnemu oddziaływaniu zasady tego nukleozydu z jedną z reszt urydyny z centrum katalitycznym. Takie silne oddziaływania mogłyby utrudnić przyjęcie aktywnej struktury przez rybozym lub zablokować krawędź Watsona-Cricka nukleozydu, który bierze udział w katalizie.

Wprowadzenie pochodnych 8-bromoguanozyny, arabinoguanozyny lub 2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyny do cząsteczki rybozimu HH0 obniża jego aktywność o ponad połowę w stosunku do niemodyfikowanego rybozimu HH0. W przypadku 8-bromoguanozyny podobnie, jak dla analogów zawierających 8-bromoguaninę konformacja wiązania N-glikozydowego może powodować trudności w utworzeniu aktywnej struktury centrum katalitycznego. Natomiast w przypadku modyfikacji arabinozydem i 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydem odwrócona konfiguracja grupy 2'-hydroksylowej lub jej brak uniemożliwia stabilizujące oddziaływania z resztą adenozyne A9, co wpływa na aktywność rybozimu. Warianty rybozimu HH0, które zawierały 2'-deoksyguanozynę i 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozynę odznaczają się najmniejszym obniżeniem aktywności katalitycznej w porównaniu do wariantu bez modyfikacji (wartości parametru k_{obs} wynoszą odpowiednio: $0,057$ i $0,077 \text{ min}^{-1}$). Jest to o tyle ciekawe, że struktura krystalograficzna rybozimu opisana przez Monika Martick i Chi Young-In^{106,129} wskazuje na istotną rolę grupy 2'-hydroksylowej w jego aktywności, a obie modyfikacje, które użyłem nie zawierają tej grupy. Zaobserwowałem, że wariant rybozimu HH0 z 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyną charakteryzuje się największą aktywnością spośród wszystkich badanych modyfikacji w pozycji G12

($k_{\text{obs}} = 0,077 \text{ min}^{-1}$). Można przypuszczać, że konformacja tego analogu może być podobna do konformacji ganozyny w aktywnej strukturze rybozymu. Wprowadzenie do zasady podstawnika bromowego z pewnością wpływa nie tylko na konformację wiązania N-glikozydowego, ale także w pewnym stopniu na strukturę elektronową układu heterocyklicznego zasady. Pozwala to sądzić, że wymagana deprotonacja azotu N1 łatwiej zachodzi w pochodnych zawierających 8-bromoguaninę.

Na podstawie krzywych kinetycznych (rysunek 37) otrzymanych dla modelowych rybozymów HHA0 i HHC0 oraz ich modyfikowanych wariantów wyznaczyłem szybkość reakcji. W tabeli 10 zostały zebrane wartości parametru k_{obs} dla poszczególnych wariantów rybozymów HHA0 i HHC0.



Rysunek 37. Krzywe kinetyczne dla rybozymów (A) HHA0 i (B) HHC0 modyfikowanych w pozycji G12.

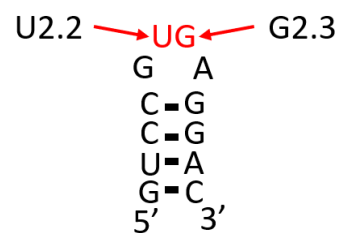
Tabela 10. Szybkość reakcji rybozymów HHA0 i HHC0 modyfikowanych w pozycji G12.		
Rybozym	Modyfikacja	$k_{\text{obs}} \text{ (min}^{-1}\text{)}$
HHA0	guanozyna	0,015
	8-bromoguanozyna	0,003
	8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna	0,008
HHC0	guanozyna	0,128
	8-bromoguanozyna	0,020
	8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna	0,093

Z otrzymanych danych wynika, że rybozomy HHA0 i HHC0 zawierające analogi 8-bromoguanozynę lub 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozynę odznaczają się mniejszą aktywnością katalityczną względem niemodyfikowanego wariantu (tabela 10). Co więcej, w obu rybozymach 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna powoduje większy spadek wartości parametru k_{obs} niż 8-bromoguanozyna (tabela 10). Ponadto, gdy porównamy szybkości reakcji rybozymów bez modyfikacji między sobą zauważymy, że wariant HHA0 odznaczał się blisko 10-krotnym obniżeniem aktywności w porównaniu do wariantu HHC0 ($k_{obs} = 0,015 \text{ min}^{-1}$ vs $k_{obs} = 0,128 \text{ min}^{-1}$). Oba rybozomy różnią się trypletem nukleotydów, po których następuje katalityczne cięcie. W przypadku rybozomu HHA0 jest to tryplet GUU, natomiast dla rybozomu HHC0 jest to AUC. Ta różnica najprawdopodobniej powoduje, że rybozym HHA0 w porównaniu do HHC0 działa znacznie wolniej. Podobną obserwację można poczynić, gdy przeanalizujemy wartości parametru k_{obs} dla obu rybozymów z analogami 8-bromoguanozyną lub 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyną. Gdy zestawimy szybkość reakcji (parametr k_{obs}) dla rybozymów HHA0 i HHC0 oraz porównamy je ze sobą, zaobserwujemy, że znacznie mniejsze wartości k_{obs} zanotowano dla wariantu HHA0. Z uzyskanych danych wynika również, że rybozomy HHA0 i HHC0 zawierające 8-bromoguanozynę działają znacznie wolniej. Szybkość ich działania zmniejszyła się o około 80% w stosunku do niemodyfikowanych wariantów. Dla rybozomu HHA0 modyfikowanego resztą 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyny parametr k_{obs} przyjmował wartość równą $0,008 \text{ min}^{-1}$, która jest o około połowę mniejsza względem niemodyfikowanego odpowiednika. Natomiast w przypadku wariantu HHC0 modyfikacja ta powoduje obniżenie aktywności rybozomu o 30% w odniesieniu do niemodyfikowanego wariantu.

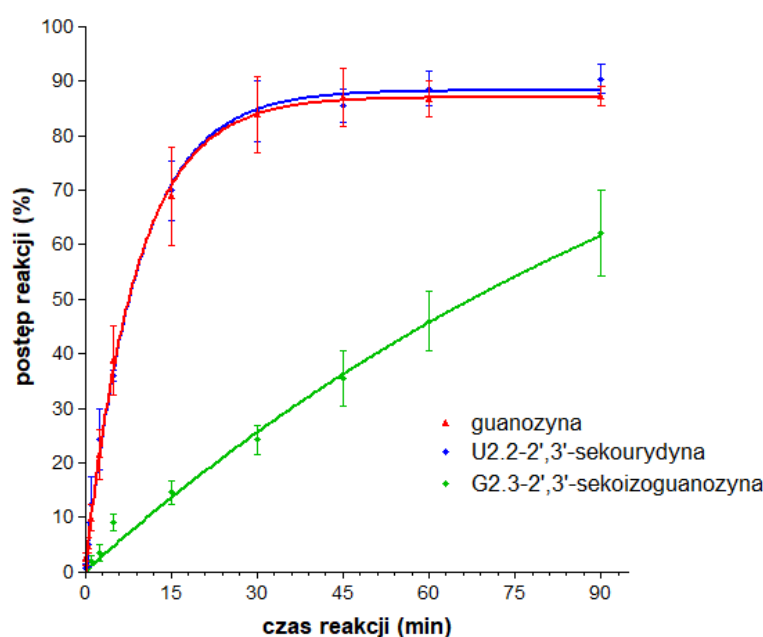
7.3. Badanie kinetyki reakcji dla rybozomu *hammerhead* modyfikowanego w pętli L2

Wiadomo, że w strukturze trzeciorzędowej rybozomu *hammerhead* istotną rolę dla jego aktywności odgrywają nie tylko oddziaływania w obrębie samego centrum katalitycznego, ale także oddziaływania między pętlą rybozomu i trzonem helisy I¹¹⁰. W związku z powyższym, w trakcie realizowania pracy doktorskiej postanowiłem sprawdzić, jak modyfikacje nukleotydów w pętli wpłyną na aktywność rybozomu HH0.

Postanowiłem wprowadzić do pętli 5'GUGA analogi tych nukleozydów, które znajdują się tam w wariancie niemodyfikowanym. Wybrałem modyfikacje UNA, ponieważ są to labilne konformacyjnie pochodne, które potencjalnie mogłyby ułatwić stabilizujące oddziaływania trzeciorzędowe. W moich badaniach modyfikowałem reszty urydyny U2.2 oraz guanozyny G2.3. Urydynę zastąpiłem 2',3'-sekourydyną, a guanozynę – 2',3'-sekoizoguanozyną (rysunek 38).



Rysunek 38. Helisa II z pętlą L2 z zaznaczonymi na czerwono miejscami modyfikacji rybozymu.



Rysunek 39. Krzywe kinetyczne dla rybozymu HH0 modyfikowanego w pętli L2.

W taki sam sposób, jak w badaniach rybozymów modyfikowanych w pozycjach G8 lub G12 (rozdziały 7.1 i 7.2, wyniki i dyskusja), dla wariantów rybozymów z modyfikowaną pętlą L2 również sprawdziłem ich aktywność katalityczną. Wyniki przeprowadzonych badań umożliwiły wyznaczenie krzywych kinetycznych (rysunek 39), na podstawie których wyznaczyłem parametry k_{obs} (tabela 11).

Wyznaczone szybkości reakcji dla trzech wariantów rybozymu HH0 wskazują, że modyfikacja urydyny U2.2 prawie nie wpływa na aktywność katalityczną rybozymu ($k_{obs} = 0,108 \text{ min}^{-1}$). Może to być spowodowane tym, że ta reszta nukleozydowa nie uczestniczy w żadnych oddziaływaniach stabilizujących strukturę aktywną rybozymu. Jednak, zamiana nukleozydu G2.3 na 2',3'-sekoizoguanozynę powoduje znaczne obniżenie

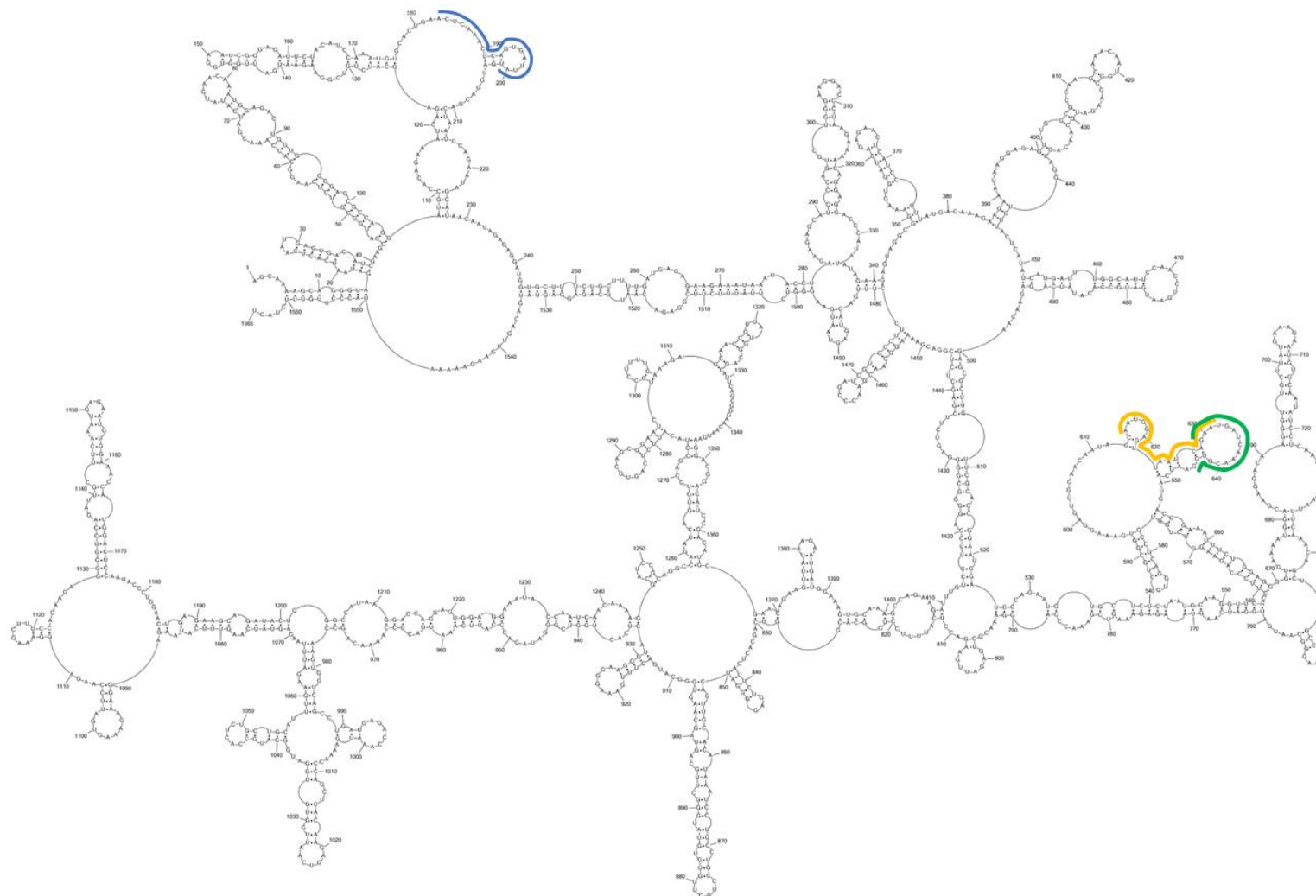
Tabela 11. Szybkość reakcji rybozomu HH0 modyfikowanego w pętli L2.	
Modyfikacja	k_{obs} (min^{-1})
brak modyfikacji	0,112
2',3'-sekourydyna w pozycji U2.2	0,108
2',3'-sekoizoguanozyna w pozycji G2.3	0,008

aktywności katalitycznej rybozomu, co wskazuje na jego istotną rolę w regulacji jego aktywności. Może to wynikać z tego, że labilna pochodna 2',3'-sekoizoguanozyny spowodowała znaczną destabilizację w pętli L2, co uniemożliwiło utworzenie prawidłowej struktury trzeciorzędowej lub też zmiana rozmieszczenia grup funkcyjnych zaburzyła możliwość prawidłowych oddziaływań trzeciorzędowych w strukturze rybozomu.

7.4 Badanie inhibicji namnażania wirusa grypy z użyciem różnych wariantów rybozomu *hammerhead*.

Wybrane rejony docelowe RNA, które miały być przecinane przez warianty rybozomu *hammerhead* to fragmenty 5 segmentu (+)RNA wirusa grypy. W strukturze drugorzędowej segmentu 5 RNA wirusowego fragmenty te są elementami konserwatywnych motywów strukturalnych istotnych dla cyklu replikacyjnego wirusa, natomiast miejsce cięcia znajduje się w sąsiedztwie rejonów jednoniciowych. W przypadku rybozomu HHC0 rejon docelowy cięcia jest jednoniciowy (rysunek 40).

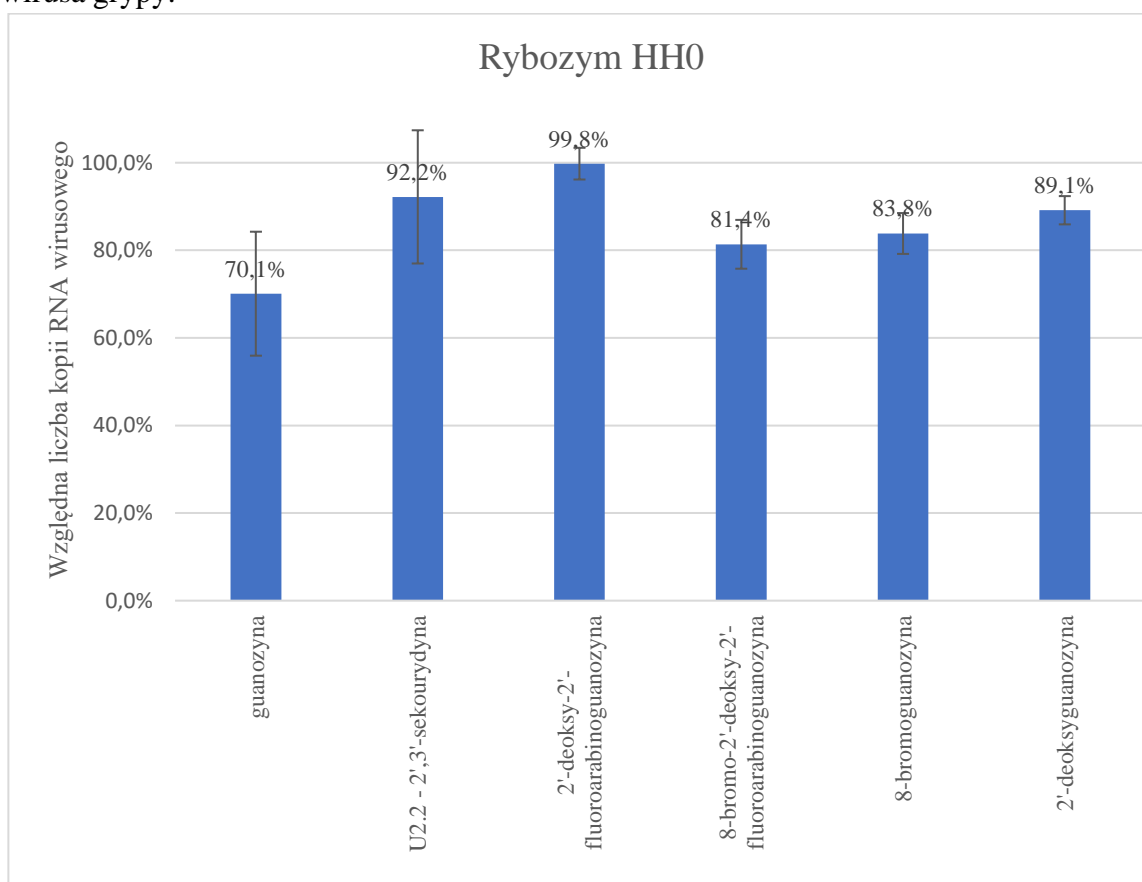
Zaprojektowane rybozomy zostały przetestowane pod kątem inhibicji namnażania wirusa grypy typu A przez dr Julitę Piasecką z Zakładu Genomiki Strukturalnej RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. W tych badaniach wykorzystano szczep A/California/04/2009 (H1N1) wirusa grypy oraz linię komórkową z nerki psa Madin-Darby'ego (MDCK, ang. *Madin-Darby canine kidney*). Podczas eksperymentu komórki MDCK transfekowano modelowymi rybozymami *hammerhead* o stężeniu 200 nM. Po 18 godzinach od transfekcji hodowle komórkową infekowano wirusem grypy A/California/04/2009 (H1N1) przy mianie wirusa $\text{MOI} = 0,01$ (ang. *multiplicity of infection*, tj. liczba cząstek wirusa przypadająca na jedną komórkę). Po 24 godzinach po infekcji oznaczana była względna liczba kopii wirusowego RNA metodą PCR w czasie rzeczywistym. Na tej podstawie oceniono potencjał hamowania namnażania wirusa grypy poprzez modelowe cząsteczki, czyli warianty rybozomu *hammerhead*.



Rysunek 40. Struktura drugorzędowa (+)RNA5 A/California/04/2009 (H1N1)¹³⁰ z zaznaczonymi rejonami na które nakierowane zostały rybozomy. Kolorami zaznaczono konserwatywne rejon wirusowego RNA, na które nakierowano badane rybozomy. Na niebiesko rejon działania rybozomu HH0, na żółto rejon działania rybozomu HHA0 i na zielono rejon działania rybozomu HHC0.

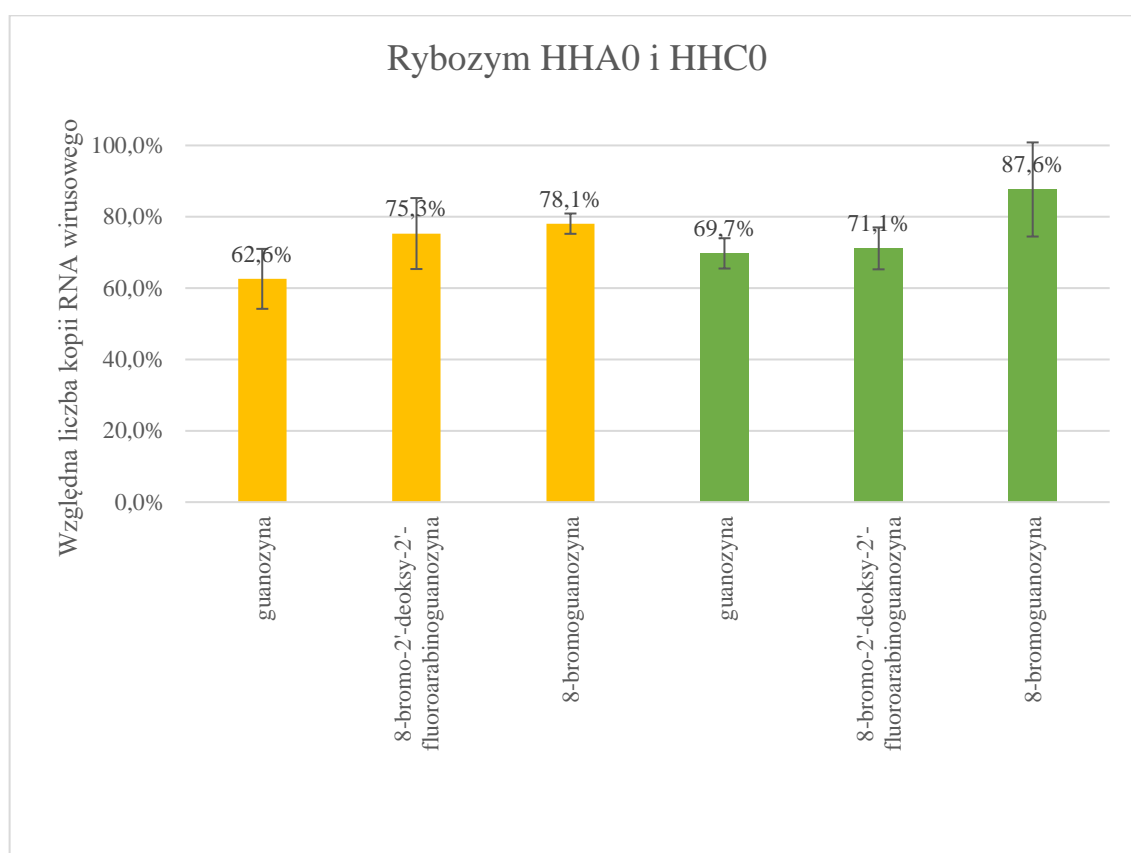
Początkowo, chcąc określić jak wybrane warianty rybozemu *hammerhead* sprawdzą się w warunkach komórkowych wybrałem pięć wariantów rybozemu HH0. Do pierwszych testów komórkowych użyto warianty rybozemu HH0 modyfikowane w pozycji G12, ponieważ te warianty w badaniach kinetyki reakcji były najbardziej zbliżone do działania niemodyfikowanego rybozemu. Dodatkowo, badaniom poddałem również wariant rybozemu HH0 modyfikowany 2',3'-sekourydyną w pętli L2.

Na podstawie otrzymanych wyników dla rybozemu HH0 stwierdzono, że wariant niemodyfikowany najefektywniej hamował namnażanie wirusa grypy na poziomie około 30% (rysunek 41). Do wariantów rybozemu HH0 wykazujących niższy stopień hamowania namnażania wirusa grypy należały te zawierające 8-bromoguanozynę lub 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozynę (inhibicja na poziomie odpowiednio 16,2% lub 18,6%). W przypadku rybozemu HH0 z modyfikacją w pętli L2 inhibicja namnażania wirusa grypy była nieznaczna (7,8%). Natomiast można zauważyć, że wariant zawierający pochodną 2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozynę właściwie nie hamował namnażania wirusa grypy.



Rysunek 41. Inhibicja namnażania wirusa grypy w zakażonej hodowli komórek MDCK z wykorzystaniem rybozymów HH0 modyfikowanych w pozycji G12. Wartość 100% przyjęto dla kontroli traktowanej lipofektaminą.

Do eksperymentów komórkowych wybrano również niemodyfikowane i modyfikowane warianty rybozymów HHA0 i HHC0. Wykorzystano warianty zawierające modyfikacje, które najlepiej sprawdziły się w przypadku rybozymu HH0, tj. 8-bromoguanozynę i 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozynę. Na rysunku 42 zaprezentowałem wyniki eksperymentów komórkowych otrzymane dla powyższych wariantów rybozymów HHA0 i HHC0. Podobnie, jak w przypadku rybozymu HH0, największym poziomem hamowania namnażania wirusa grypy odznaczały się niemodyfikowane warianty rybozymów HHA0 i HHC0 (inhibicja na poziomie odpowiednio 37,4% i 30,3%).



Rysunek 42. Inhibicja namnażania wirusa grypy w zakażonej hodowli komórek MDCK z wykorzystaniem rybozymów HHA0 (żółty) i HHC0 (zielony) modyfikowanych w pozycji G12. Wartość 100% przyjęto dla kontroli traktowanej lipofektaminą.

Warianty tych rybozymów zawierające modyfikacje w różnym stopniu powodowały inhibicję namnażania wirusa grypy. W przypadku rybozymu HHA0 zawierającego 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozynę w pozycji G12 poziom inhibicji zmniejszył się o 12,7% w stosunku do niemodyfikowanego rybozymu. Dla wariantu zawierającego 8-bromoguanozynę stopień inhibicji wynosił 21,9% (rysunek 42). Podobny efekt inhibicji występował w przypadku rybozymu HHC0. To znaczy poziom

hamowania namnażania wirusa grypy dla wariantów zawierających modyfikowane nukleozydy był niższy od wariantu niemodyfikowanego. Dla rybozemu HHC0 zawierającego 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozynę stopień inhibicji wyniósł 28,9%, a dla wariantu z pochodną 8-bromoguanozyną 12,4% (rysunek 42). Warto zwrócić uwagę, że w eksperymentach komórkowych zaobserwowano obniżenie inhibicji namnażania wirusa grypy dla modyfikowanych wariantów rybozymów względem niemodyfikowanego. A w badaniach opisanych w podrozdziale 7.2 obserwowano obniżenia aktywności katalitycznej dla tak modyfikowanych rybozymów. Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje można przypuszczać, że aktywność katalityczna modyfikowanych rybozymów w warunkach eksperymentów kinetycznych jest podobna do tej, którą zbadano w warunkach komórkowych.

Ogólnie można stwierdzić, że zastosowane warianty rybozymów mają potencjał hamowania namnażania wirusa grypy poprzez celowanie w RNA wirusowe. Jednak, niskie poziomy inhibicji wirusowego RNA w wyraźny sposób pokazują jak trudne i wymagające jest projektowanie i stosowanie katalitycznych kwasów nukleinowych w układach biologicznych. Na aktywność rybozymów wpływa szereg czynników, takich jak stężenie jonów czy pH. W warunkach komórkowych niestety eksperymentator nie ma większego wpływu na te czynniki, a dodatkowo pojawiają się także nowe, np. obecność biomolekuł takich jak białka lub inne kwasy nukleinowe, z którymi potencjalnie rybozym może oddziaływać. Ponadto, rybozimy zostały zaprojektowane w oparciu o znaną strukturę drugorzędową wirusowego RNA, która nie zakłada czwartorzędowego oddziaływania rybozimu z innymi kwasami nukleinowymi czy białkami. Ponadto, wybrane jednoniciowe regiony docelowe w wirusowym RNA mogą w warunkach komórkowych być niedostępne dla rybozimu ze względów sterycznych lub opłaszczenia ich przez białka. Nie bez znaczenia pozostają także tryplety nukleotydów, po których następuje cięcie wirusowego RNA i który rozpoznaje rybozym¹¹³⁻¹¹⁵. W przypadku badanych rybozymów tylko tryplet AUC, na który nakierowany jest rybozym HHC0 jest wskazywany jako najkorzystniejszy strukturalnie. Rybozym HH0 nakierowany na rozpoznanie trypletu CUC i rybozym HHA0 nakierowany na tryplet GUU nie posiadają znacznie większej aktywności od rybozimu HHC0, jak wynika z przeprowadzonych eksperymentów na linii komórkowej MD

IV PODSUMOWANIE

Struktura RNA jest zagadnieniem niezwykle istotnym dla rozwoju współczesnej chemii i biologii. Jej znajomość i zrozumienie zasad rządzących powstawaniem złożonych struktur RNA mogą być drogą do efektywnego projektowania leków i narzędzi terapeutycznych nakierowanych na kwasy nukleinowe. Ponadto, poznanie związku struktury i funkcji RNA oraz zależności między nimi pozwoli nie tylko zrozumieć naturalne procesy komórkowe, ale także projektować rybozomy, czy aptamery o ściśle określonych funkcjach i aktywności. Podejścia, które podjąłem w mojej pracy doktorskiej są krokiem w kierunku lepszego poznania molekularnych uwarunkowań zależności strukturalnych i funkcjonalnych badanych RNA.

Celem mojej rozprawy doktorskiej było zbadanie zależności między strukturą nukleozydu a strukturą kwasu nukleinowego, a także zbadanie wpływu zdefiniowanych konformacyjnie nukleozydów na aktywność funkcjonalnego RNA.

W ramach wykonanej pracy doktorskiej:

- * zaprojektowałem nową metodę syntezy 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydów purynowych,
- * zsyntetyzowałem nieopisaną dotąd w literaturze pochodną guanozyny: 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozynę i scharakteryzowałem ją pod kątem strukturalnym,
- * zbadałem trwałość termodynamiczną i wyznaczyłem parametry termodynamiczne dla modelowych oligorybonukleotydów o sekwencji samokomplementarnej oraz niesamokomplementarnej, które były modyfikowane zdeterminowanymi konformacyjnie nukleozydami,
- * zbadałem trwałość termodynamiczną i wyznaczyłem parametry termodynamiczne oligorybonukleotydów o zaprojektowanej strukturze spinki,
- * zanalizowałem zmiany w widmach NMR rejonu iminoprotonowego dla modyfikowanych oligorybonukleotydów o zaprojektowanej strukturze spinki,
- * zbadałem wpływ nukleozydów o zdeterminowanej konformacji na aktywność rybozymów *hammerhead*,
- * sprawdziłem wpływ modyfikowanych rybozymów *hammerhead* na inhibicję namnażania wirusa grypy.

Wykonane syntezy chemiczne pochodnych nukleozydowych o zdeterminowanej konformacji zaowocowały zaprojektowaniem przeze mnie nowej ścieżki syntezy 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydów purynowych oraz zsyntetyzowaniem nieopisaną

dotychczas w literaturze 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyny. Otrzymane analogi nukleozydów posłużyły mi do modyfikowania modelowych oligorybonukleotydów, które wykorzystywałem w dalszych badaniach.

Dzięki przeprowadzonym badaniom termodynamicznym mogłem ocenić, jaki jest wpływ określonej modyfikacji na stabilność termodynamiczną badanej struktury RNA (dupleksu i spinki). Wyznaczone parametry termodynamiczne pozwoliły określić wpływ modyfikowanych reszt guanozyny w pozycjach G4 lub G6 na trwałość oligorybonukleotydów o sekwencji samokomplementarnej z motywem 5'GAGU/3'UGAG. Ponadto, wykorzystując oligorybonukleotydy o sekwencji niesamokomplementarnej z motywem 5'GAGU/3'UGAG prześledziłem zmiany struktury spowodowane przez wprowadzanie zdeterminowanych konformacyjnie nukleozydów do pary G-U zamykającej tandemowe niesparowanie. W badaniach termodynamicznych określiłem również stabilność struktury spinki z modyfikacjami wprowadzonymi w jej trzonie w pozycjach G6 lub G4.

Badania NMR-owskie rejonu iminoprotonowego dla oligorybonukleotydów o strukturze spinki z pętlą UUCG dostarczyły informacji o zmianach strukturalnych i pokazały dynamiczny charakter tworzących się struktur. Wyniki otrzymane w tej analizie strukturalnej dobrze korelowały z danymi uzyskanymi w badaniach termodynamicznych, dlatego można stwierdzić, że eksperymenty NMR stanowiły w pewnym stopniu uzupełnienie metody topnienia UV dla wybranych modelowych oligorybonukleotydów.

Ostatni etap mojej pracy doktorskiej obejmował badania aktywności katalitycznej rybozymów *hammerhead* modyfikowanych nukleozydami o zdeterminowanej konformacji oraz eksperymenty komórkowe, w których sprawdzono wpływ wybranych modyfikowanych rybozymów na inhibicję namnażania wirusa grypy w liniach komórkowych MDCK. Wykonane badania pozwoliły sformułować wniosek, że wszystkie wprowadzone modyfikacje obniżały aktywność katalityczną rybozymu *hammerhead*. Ponadto, dzięki przeprowadzonym badaniom biologicznym sprawdzono, że modelowe rybozomy mają potencjał hamowania namnażania wirusa grypy poprzez celowanie w RNA wirusowe. Mimo, że testowane warianty okazały się nie być optymalnymi.

Podsumowując, połączenie syntezy chemicznej, technik spektroskopowych UV i NMR, metody elektroforetycznej oraz eksperymentów biologicznych pozwoliło na zbadanie struktury i w pewnym zakresie funkcji biologicznych zdeterminowanych

konformacyjnie kwasów nukleinowych. Badania wykonane w ramach tej pracy doktorskiej poszerzają wiedzę o właściwościach strukturalnych, termodynamicznych oraz w pewnym stopniu również biologicznych modelowych RNA.

V MATERIALY I METODY

1. Materiały

1.1. Odczynniki i rozpuszczalniki

Avantor (wcześniej POCh): kwas borowy, kwas octowy, kwas solny, metanol, dichlorometan, n-heksan, octan etylu, pirydyna, tetrahydrofuran, trietyloamina, dioksan, bezwodnik octowy, N,N'-dimetyloformamid (DMF), siarczan sodu, wodorowęglan sodu, 25% wodny roztwór amoniaku, 30% wodny roztwór amoniaku, chlorek sodu, acetal O,O'-dimetylowy N,N'-dimetyloformamidu, tetrahydrofuran (THF), wodorotlenek sodu.

Merck (wcześniej Sigma-Aldrich): 40% wodny roztwór metyloaminy, 4-dimetyloaminopirydyna (DMAP), sita molekularne 4 Å, tetrazol, trifluorowodorek trietyloaminy, błękit bromofenolowy, cyjanol ksylenowy, kakodylan sodu, kwas 2-[4-(2-hydroksyetyleno)-1piperazylo]-etanosulfonowy (HEPES), N,N,N',N'-tetrametylo-etylenodiamina (TEMED), nadsiarczan amonu (APS), octan amonu, orange G.

Bioshop: 40% roztwór akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (w/w), tri(hydroksymetylo)aminometan (Tris), sól sodowa kwasu etyleonodiaminotetraoctowego (EDTA), EDTA roztwór 0.5 M sterylny, octan sodu, mocznik.

GlenReaserch: amidofosforyny RNA i DNA.

1.2. Roztwory wodne

Roztwory buforów były przygotowywane przeze mnie, a wartości pH były ustalane pH-metrycznie z wykorzystaniem odpowiednich kwasów lub zasad.

- Bufor do topnień UV i widm CD: 1 M chlorek sodu, 20 mM kakodylan sodu, 0,5 mM EDTA; pH 7;
- Bufor do topnień UV oraz widm NMR: 80 mM chlorek sodu, 20 mM fosforan sodu, 0,05 mM EDTA; pH 6.01;
- 150 mM chlorek litu, 10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA; pH 6.8;
- 50 mM Tris-HCl; pH 7.5;
- 50 mM Tris-HCl, 10mM chlorek magnezu; pH 7.5;
- 50 mM Tris-HCl, 30mM chlorek magnezu; pH 7.5;

- 2 M octan trietyloamoniowy,
- 2% kwas trifluorooctowy,
- 10 mM wodorowęglan amonu,
- 10% wodorowęglan sodu,
- Wodoroortofosforan (V) sodu,
- Bufor 10 x TBE: 1 M Tris, 1 M kwas borowy, 10 mM Na₂EDTA; pH 8.3
- Bufor obciążający – denaturujący: 8 M mocznik; 0,2% (w/v) błękit bromofenolowy; 0,2% (w/v) cyjanol ksylenowy; 0,2% (w/v) oranż G;
- Bufor obciążający – niedenaturujący: 35% (w/v) glicerol, 0,2% (w/v) błękit bromofenolowy, 0,2% (w/v) cyjanol ksylenowy, 0,2% (w/v) oranż G;

1.3 Fazy rozwijające do analiz TLC

Używane w analizie TLC fazy rozwijające. Podano stosunek objętościowy rozpuszczalników.

- chlorek metylenu/metanol (95:5),
- chlorek metylenu/metanol (9:1),
- chlorek metylenu/metanol (8:2),
- acetonitryl/woda (9:1),
- heksan/octan etylu (1:1),
- heksan/aceton/trietyloamina (45:45:10),
- heksan/aceton/trietyloaminy (6:3:1),
- n-propanol/amoniak/woda (7:1:2),
- n-propanol/amoniak/woda (55:35:10),
- aceton/woda (6:4),
- aceton/woda (1:1).

1.4 Żele poliakrylamidowe

Żel 12% poliakrylamidowy denaturujący:

- 12% w/v akrylamid/N,N'-metylenobisakrylamid (29:1),
- 1x bufor TBE,

- 8 M mocznik,
- 0.6% (w/v) APS,
- 0.04% (v/v) TEMED,

Żel 12% poliakrylamidowy niedenaturujący:

- 12% w/v akrylamid/N,N'-metylenobisakrylamid (29:1),
- 1x bufor TBE,
- 0.6% (w/v) APS,
- 0.04% (v/v) TEMED,

1.5. Oligonukleotydy

Tabela O1. Oligonukleotydy samokomplementarne		
Nazwa	Sekwencja 5' - 3'	Modyfikacja użyta w miejscu X
T0	GACGAGUGUCA	brak
T1.4	GACXAGUGUCA	Guanozyna w serii LNA
T1.6	GACGAXUGUCA	
T2.4	GACXAGUGUCA	8-metyloguanozyna w serii LNA
T2.6	GACGAXUGUCA	
T3.4	GACXAGUGUCA	Arabinoguanozyna
T3.6	GACGAXUGUCA	
T4.4	GACXAGUGUCA	8-bromoarabinoguanozyna
T4.6	GACGAXUGUCA	
T5.4	GACXAGUGUCA	2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna
T5.6	GACGAXUGUCA	
T6.4	GACXAGUGUCA	8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna
T6.6	GACGAXUGUCA	
T7.4	GACXAGUGUCA	2'-deoksy-2'-fluoroguanozyna
T7.6	GACGAXUGUCA	
T8.4	GACXAGUGUCA	Izoinozyna
T8.6	GACGAXUGUCA	
T9.4	GACXAGUGUCA	Inozyna
T9.6	GACGAXUGUCA	
T10.4	GACXAGUGUCA	2-aminoadenozyna
T10.6	GACGAXUGUCA	

T11.4	GACXAGUGUCA	Purynorybozyd
T11.6	GACGAXUGUCA	
T12.4	GACXAGUGUCA	Guanozyna w serii UNA
T12.6	GACGAXUGUCA	
T13.4	GACXAGUGUCA	8-bromoguanozyna
T13.6	GACGAXUGUCA	
T14.4	GACXAGUGUCA	2-aminopuryna
T14.6	GACGAXUGUCA	
T15.4	GACXAGUGUCA	Adenozyna
T15.6	GACGAXUGUCA	
T16.4	GACXAGUGUCA	6-tioguanozyna
T16.6	GACGAXUGUCA	
T17.4	GACXAGUGUCA	2'-deoksy-2'-fluoro-2-aminoarabinoadenozyna
T17.6	GACGAXUGUCA	
T18.4	GACXAGUGUCA	2'-deoksyguanozyna
T18.6	GACGAXUGUCA	
T19.4	GACXAGUGUCA	8-bromo-2'-deoksyguanozyna
T19.6	GACGAXUGUCA	

Tabela O2. Oligonukleotydy niesamokomplementarne		
Nazwa	Sekwencja 5' - 3'	Modyfikacja użyta w miejscu X
1T0	GUCXAGUGGC	Guanozyna
2T0	GCCXAGUGAC	
1T1	GUCXAGUGGC	Guanozyna w serii LNA
2T1	GCCXAGUGAC	
1T2	GUCXAGUGGC	8-metyloguanozyna w serii LNA
2T2	GCCXAGUGAC	
1T3	GUCXAGUGGC	Arabinoguanozyna
2T3	GCCXAGUGAC	
1T4	GUCXAGUGGC	8-bromoarabinoguanozyna
2T4	GCCXAGUGAC	
1T5	GUCXAGUGGC	2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna
2T5	GCCXAGUGAC	
1T6	GUCXAGUGGC	8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna
2T6	GCCXAGUGAC	
1T7	GUCXAGUGGC	2'-deoksy-2'-fluoroguanozyna
2T7	GCCXAGUGAC	
1T8	GUCXAGUGGC	Izoinozyna
2T8	GCCXAGUGAC	
1T9	GUCXAGUGGC	Inozyna
2T9	GCCXAGUGAC	

1T10	GUCXAGUGGC	2-aminoadenozyna
2T10	GCCXAGUGAC	
1T11	GUCXAGUGGC	Purynorybozyd
2T11	GCCXAGUGAC	
1T12	GUCXAGUGGC	Guanozyna w serii UNA
2T12	GCCXAGUGAC	
1T13	GUCXAGUGGC	8-bromoguanozyna
2T13	GCCXAGUGAC	
1T14	GUCXAGUGGC	2-aminopuryna
2T14	GCCXAGUGAC	
1T15	GUCXAGUGGC	Adenozyna
2T15	GCCXAGUGAC	
1T16	GUCXAGUGGC	6-tioguanozyna
2T16	GCCXAGUGAC	
1T17	GUCXAGUGGC	2'-deoksy-2'-fluoro-2-aminoarabinoadenozyna
2T17	GCCXAGUGAC	
1T18	GUCXAGUGGC	2'-deoksyguanozyna
2T18	GCCXAGUGAC	
1T19	GUCXAGUGGC	8-bromo-2'-deoksyguanozyna
2T19	GCCXAGUGAC	

Tabela O3. Oligonukleotydy samokomplementarne „ze spinką”		
Nazwa	Sekwencja 5' - 3'	Modyfikacja w miejscu X
L0	GACXAGUGUCUUCGGACXAGUGUC	Guanozyna
L3.4	GACXAGUGUCUUCGGACXAGUGUC	Arabinoguanozyna
L3.6	GACGAXUGUCUUCGGACGAXUGUC	
L4.4	GACXAGUGUCUUCGGACXAGUGUC	8-bromoarabinoguanozyna
L4.6	GACGAXUGUCUUCGGACGAXUGUC	
L13.4	GACXAGUGUCUUCGGACXAGUGUC	8-bromoguanozyna
L13.6	GACGAXUGUCUUCGGACGAXUGUC	

Tabela O4. Oligonukleotydy rybozemu <i>hammerhead</i> i substratu		
Nazwa	Sekwencja 5' - 3'	Modyfikacja w miejscu X
S0	XACUCAAACUCAGUGAUUAU	5,6-karboksyfluoresceina
SA	XCAAUGGAGUUAUCAGAAU	
SC	XCAGAAUGAUCAAACGUGGA	

HH0	AUCACUCUGAUGAGUCCGUGAGG ACGAAAGUUUGAG	brak
HHA0	UUCUGAUUCUGAUGAGUCCGUGA GGACGAAACUCCAUI	
HHC0	CCACGUUUCUGAUGAGUCCGUGA GGACGAAAUCAUUCU	
HH3z	AUCACUCUGAUGAGUCCGUGAGG ACXAAAGUUUGAG	Arabinoguanozyna
HH3o	AUCACUCUGAUXAGUCCGUGAGG ACGAAAGUUUGAG	
HH4z	AUCACUCUGAUGAGUCCGUGAGG ACXAAAGUUUGAG	8-bromoarabinoguanozyna
HH4o	AUCACUCUGAUXAGUCCGUGAGG ACGAAAGUUUGAG	
HH5z	AUCACUCUGAUGAGUCCGUGAGG ACXAAAGUUUGAG	2'-deoksy-2'- fluoroarabinoguanozyna
HH5o	AUCACUCUGAUXAGUCCGUGAGG ACGAAAGUUUGAG	
HH6z	AUCACUCUGAUGAGUCCGUGAGG ACXAAAGUUUGAG	8-bromo-2'-deoksy-2'- fluoroarabinoguanozyna
HHA6z	UUCUGAUUCUGAUGAGUCCGUGA GGACXAAACUCCAUI	
HHC6z	CCACGUUUCUGAUGAGUCCGUGA GGACXAAAUCAUUCU	
HH6o	AUCACUCUGAUXAGUCCGUGAGG ACGAAAGUUUGAG	
HH10z	AUCACUCUGAUGAGUCCGUGAGG ACXAAAGUUUGAG	2-aminoadenozyna
HH10o	AUCACUCUGAUXAGUCCGUGAGG ACGAAAGUUUGAG	
HH13z	AUCACUCUGAUGAGUCCGUGAGG ACXAAAGUUUGAG	8-bromoguanozyna
HHA13z	UUCUGAUUCUGAUGAGUCCGUGA GGACXAAACUCCAUI	
HHC13z	CCACGUUUCUGAUGAGUCCGUGA GGACXAAAUCAUUCU	
HH13o	AUCACUCUGAUXAGUCCGUGAGG ACGAAAGUUUGAG	2'-deoksyguanozyna
HH18z	AUCACUCUGAUGAGUCCGUGAGG ACXAAAGUUUGAG	
HH18o	AUCACUCUGAUXAGUCCGUGAGG ACGAAAGUUUGAG	

HH19z	AUCACUCUGAUGAGUCCGUGAGG ACXAAAGUUUGAG	8-bromo-2'-deoksyguanozyna
HH19o	AUCACUCUGAUXAGUCCGUGAGG ACGAAAGUUUGAG	
HHcU7	AUCACUCUGAXGAGUCCGUGAGG ACGAAAGUUUGAG	Urydyna w serii UNA
HH2.3	AUCACUCUGAUGAGUCCGUXAGG ACGAAAGUUUGAG	Izoguanozyna w serii UNA
HH2.2	AUCACUCUGAUGAGUCCGXGAGG ACGAAAGUUUGAG	Urydyna w serii UNA
HHZ1	AUCACUCUGAUGAGUCCGYGAGG ACXAAAGUUUGAG	X = 8-bromoguanozyna Y = urydyna w serii UNA

1.6. Aparatura i oprogramowanie stosowane podczas prowadzenia badań

Aparatura:

- blok grzejny Grant QBD2,
- komputerowy skaner FLA-5100 (PhosphorImager) FujiFilm,
- próżniowy koncentrator stołowy CentriVap Labconco,
- spektrometr Bruker AVANCE III 700 MHz,
- spektrofotometr UV-VIS JASCO V-650 z termoprogramatorem,
- spektrofotometr UV-VIS JASCO 815,
- spektrometr masowy MALDI-TOF Bruker Autoflex,
- syntetyzer MerMade 12 BioAutomation Corporation,
- termowytrząsarka Comfort Eppendorf,
- wirówka MiniSpin®Eppendorf,
- wirówka 5430R Eppendorf,
- aparat do elektroforezy z zasilaczem EV233 Consort,

Programy:

- ChemSketch,
- MeltWin 3.5,
- Mutli Gauge V3.0,
- GraphPad Prism 3.0,
- Peak Scanner,
- RNAStructure 5.6,
- TopSpin 4.0 Bruker .

2. Metody

2.4. Techniki ogólne

2.4.1. Chromatografia cienkowarstwowa i kolumnowa

Postęp reakcji chemicznych monitorowałem z wykorzystaniem technik chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Chromatogramy rozwijałem na płytkach szklanych pokrytych 0,25mm warstwą żelu krzemionkowego 60 F₂₅₄ lub silanizowanego żelu krzemionkowego (RP TLC) (MERCK). Obraz na płytkach obserwowałem w świetle UV ($\lambda=254$ nm) lub wywoływałem 10% roztworem kwasu siarkowego (IV) w etanolu i przez wygrzewanie na płycie grzejnej.

Rozdziały chromatograficzne prowadziłem techniką *flash-chromatography*. W tym celu używałem żel krzemionkowy 60 H (MERCK).

2.4.2. Spektroskopia NMR i spektrometria mas

Widma magnetycznego rezonansu magnetycznego wykonałem w Pracowni NMR w Instytucie Chemii Bioorganicznej w Poznaniu na spektrometrach firmy Bruker Avance o częstościach 400, 500 i 700 MHz. Przesunięcia chemiczne podano w ppm, a sprzężenia w Hz. Przesunięcia chemiczne podano względem:

- TMS, dla widm ¹H i ¹³C;
- H₃PO₄ w D₂O, dla widm ³¹P;
- F₃CCOOH, dla widm ¹⁹F;

Wszystkie próbki przygotowano przez rozpuszczenie około 10 mg związku w deuterowanych rozpuszczalnikach dmso-*d*6 lub CD₃CN.

Widma wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HRMS) pochodnych nukleozydów techniką elektrorozpylania (ESI) oraz widma masowe oligonukleotydów techniką MALDI-TOF zostały wykonane w Pracowni Spektrometrii Mas w Instytucie Chemii Bioorganicznej i Europejskim Centrum Bioinformatyki i Genomiki w Poznaniu.

Próbki pochodnych nukleozydów rozpuszczano w metanolu. Próbki oligonukleotydów przygotowano przez rozpuszczenie oligonukleotydu w wodzie. Przy pomiarach MALDI-TOF stosowano kwas 3-hydroksypikolinowy jako matrycę.

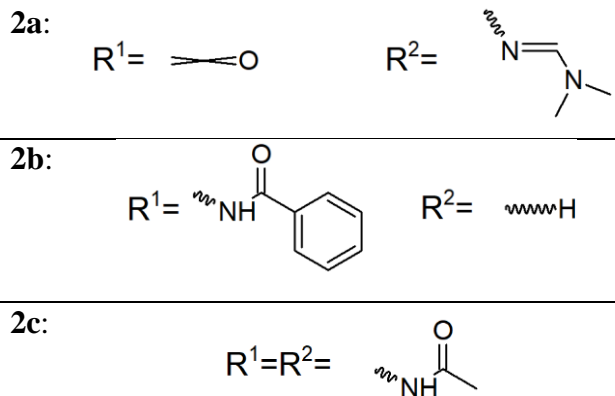
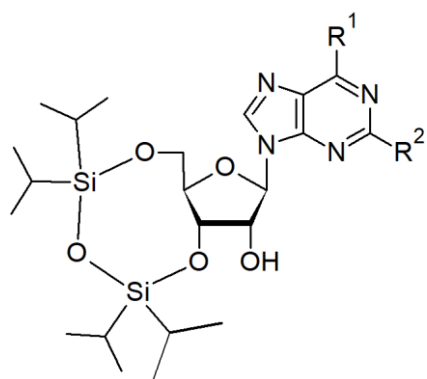
2.4.3. Pomiary rentgenowskie i metody obliczeniowe

Pomiary intensywności wiązek dyfrakcyjnych dla monokryształu związku (**4d**) wykonane zostały w temperaturze 130 K na dyfraktometrze SuperNova (Oxford Diffraction) wyposażonym w kamerę CCD typu ATLAS oraz lampę miedziową ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) z mikroogniskowaniem. Problem fazowy rozwiązano metodami bezpośrednimi przy użyciu programu SHELXT 2014/7¹³¹ i strukturę udokładniono metodą najmniejszych kwadratów przy użyciu programu SHELXL 2014/7¹³². Położenia atomów wodoru związanych z atomami węgla wyznaczono na podstawie obliczeń geometrycznych, natomiast położenia atomów wodoru związanych z atomami azotu oraz tlenu zostały zlokalizowane na różnicowych mapach gęstości elektronowej. Struktura absolutna związku została potwierdzona na podstawie wartości parametru Flacka¹³³.

2.5. Synteza analogów 2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydów puryn

Syntezę pochodnych wybranych nukleozydów purynowych: guanozyny, adenozyny, 2-aminoadenozyny oraz 8-bromoguanozyny opisałem w poniższych podrozdziałach stosując opis ogólny dla etapów syntezy ponieważ etapy syntetyczne były wspólne dla wszystkich wybranych analogów. Schemat ścieżki syntetycznej został przedstawiony na rysunku 24 (rozdział 1.2, Wyniki i dyskusja).

2.5.1. Ogólna procedura syntezy N-blokowanych 3',5'-O-(tetraizopropylodisiloksan-1,3-dylo)purynorybozydów



Zablokowany na grupie egzoaminowej nukleozyd (**1**) (1 ekwiwalent) zawiesiłem w bezwodnej pirydynie i wysuszyłem na wyparce próżniowej poprzez dwukrotne jej współodparowanie. Do wysuszonej pochodnej (**1**) w pirydynie (5ml py/ 1mmol substratu) dodałem kroplami 1,3-dichlorek 1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksanu (1,1 ekwiwalenta), zawiesinę mieszałem na mieszadle magnetycznym przez 3 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie roztwór stawał się klarowny. Po tym czasie mieszaninę przerobiłem z wodnym nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (1:1, V/V), całość ekstrahowałem trzema porcjami chlorku metylenu. Połączoną fazę organiczną suszyłem bezwodnym siarczanem sodu i odparowałem do powstania białej piany. Wydajność wyniosła około 100%.

*N*²-(dimetyloaminometyleno)-3',5'-O-(tetraizopropylodisiloksan-1,3-dylo)guanozyna (**2a**).

¹H NMR (400 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: 11.34 (s, 1H, NH), 8.54 (s, 1H, CH dmm), 7.85 (s, 1H, H-8), 5.79 (d, *J*_{HH} = 3.92 Hz, 1H, H1'), 5.68 (s, 1H, 2'OH), 4.36 (m, 2H, H3', H2'), 4.09-3.91 (m, 3H, H5', H5'', H4'), 3.14 (s, 3H, CH₃ dmm), 3.02 (s, 3H, CH₃ dmm), 0.99-1.04 (m, 28H, (iPr)₄);

¹³C NMR (100 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm : 157.9, 157.5, 157.4, 149.3, 135.4, 119.7, 88.1, 81.0, 73.8, 69.7, 60.7, 17.3, 17.1, 17.1, 16.9, 16.8, 16.8, 16.7, 12.8, 12.4, 12.3, 12.0;

HRMS (ESI): obliczono dla C₂₅H₄₄N₆O₆Si₂ [M+H]⁺ 581.2934; znaleziono 581.2932;

N⁶-benzoilo-3',5'-O-(tetraizopropylodisiloksan-1,3-diyl)adenozyna (2b)

¹H NMR (400 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: 11.24 (s, 1H, NH), 8.67 (s, 1H, H-2), 8.53 (s, 1H, H8), 8.06 - 7.53 (5H, H-Ar), 6.01 (d, 1H, H1'), 5.68 (d, 1H, 2'OH), 4.84-4.81 (m, 1H, H2'), 4.65, (m, 1H, H3') 4.09-3.93 (m, 3H, H4', H5', H5''), 1.06 - 0.94 (m, 28H, (iPr)₄);

¹³C NMR (100 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: 165.7, 151.4, 150.5, 143.1, 133.4, 132.4, 128.5, 128.4, 128.2, 127.4, 126.0, 89.5, 81.0, 73.4, 69.9, 60.7, 54.9, 17.3, 17.2, 17.2, 17.1, 17.0, 16.9, 16.8, 12.7, 12.4, 12.3, 12.1;

HRMS (ESI): obliczono dla C₂₉H₄₃N₅O₆Si₂ [M+H]⁺ 614.2825; znaleziono 614.2831;

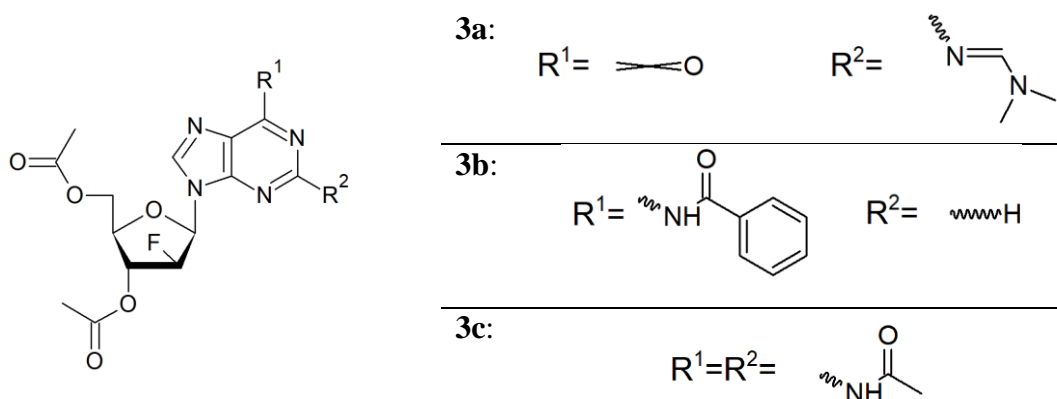
N²,N⁶-diacetylo-2-amino-3',5'-O-(tetraizopropylodisiloksan-1,3-diyl)adenozyna (2c)

¹H NMR (400 MHz, dms_o-d₆): δ 10.56 (s, 1H, NH), 10.30 (s, 1H, NH), 8.32 (s, 1H, H8), 5.89 (s, 1H, H1'), 5.59 (s, 1H, 2'OH), 4.55-4.50 (m, 2H, H2', H3'), 4.09-3.92 (m, 3H, H4', H5', H5''), 2.31 (s, 3H, Ac CH₃), 2.22 (s, 3H, Ac CH₃), 1.05-0.85 (m, (iPr)₄);

¹³C NMR (176 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: 169.9, 152.7, 152.4, 150.2, 141.3, 120.3, 89.1, 81.9, 73.9, 70.6, 61.5, 25.1, 25.0, 17.8, 17.7, 17.6, 17.6, 17.5, 17.4, 17.4, 13.2, 12.9, 12.7, 12.5;

HRMS (ESI): obliczono dla C₂₆H₄₄N₆O₇Si₂ [M-H]⁻ 607.2737; znaleziono 607.2747.

2.5.2. Ogólna procedura syntezy N-blokowanych 3',5'-di-O-acetylo-2'-deoksy-2'-fluoropurynoarabinozydów



W pierwszym etapie a) N-blokowany purynowy nukleozyd 3',5'-O-(tetraizopropylodisiloksan-1,3-dyloowy) (**2**) (1 ekwiwalent) rozpuściłem w bezwodnym dichlorometanie (6ml DCM / 1mmol substratu) z dodatkiem pirydyny (0,2ml py/ 1mmol substratu) i 4-dimetyloaminopyridyny (DMAP) (5 ekwiwalentów). Mieszaninę ochłodziłem w łaźni lodowej w przeciągu 30min, cały czas mieszając. Następnie dodałem przez septę kroplami bezwodnik trifluorometylosulfonowy (7 ekwiwalentów) w przeciągu 15 min. Po dodaniu bezwodnika pozwoliłem mieszaninie osiągnąć temperaturę pokojową i pozostawiłem ją na 2 godziny aż do zakończenia reakcji. Po tym czasie do reakcji dodałem wodny roztwór wodorowęglanu sodu (1:1, V/V) i ekstrahowałem trzema porcjami chlorku metylenu. Fazy organiczne przemyłem nasyconym roztworem dwuzasadowego fosforanu sodu a następnie wysuszyłem bezwodnym siarczanem sodu i odparowałem. W drugim etapie b) całą pozostałość rozpuściłem w 1 molowym roztworze fluorowodoru trietyloaminy w pirydynie (4 ekwiwalenty) i dodałem bezwodnik octowy (8 ekwiwalentów). Mieszaninę pozostawiłem w zamkniętym plastikowym naczyniu na 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę przerobiłem w układzie wodnym roztworu wodorowęglanu sodu z chlorkiem metylenu, przemywając warstwę wodną dwiema porcjami chlorku metylenu. Fazę organiczną wysuszyłem bezwodnym siarczanem sodu i odparowałem do sucha. W ten sposób otrzymałem 3',5'-di-O-acetylo-2'-O-triflatową pochodną (**2.2**). W ostatnim kroku c) rozpuściłem otrzymaną pochodną w bezwodnym tetrahydrofuranie (5 ml THF / 1mmol) i dodałem 1 M roztwór fluorowodoru trietyloaminy (7 ekwiwalentów). Mieszaninę w plastikowym pojemniku pozostawiłem na 64 godziny

w 37°C. Po tym czasie sygnał ^{19}F NMR $\delta = -74.57$ ppm zanikł i jednocześnie powstał sygnał o przesunięciu -198.43 ppm, który pochodził od produktu reakcji. Reakcję zneutralizowałem wodnym roztworem węgla sodu i ekstrahowałem trzema porcjami chlorku metylenu. Fazę organiczną wysuszyłem bezwodnym siarczanem sodu i odparowałem do sucha.

3',5'-di-O-acetylo-N²-(dimetylaminometyleno)-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna

(3a)

^1H NMR (500 MHz, dms o -d $_6$), δ , ppm: 11.44 (s, 1H, NH), 8.62 (s, 1H, CH dmm), 7.87 (d, 1H, H8), 6.34 (dd, 1H, H1', $J_{\text{HF}} = 15.18$ Hz), 5.74 (m, 1H, H2', $J_{\text{HF}} = 19.30$ Hz), 5.56 (m, 1H, H3', $J_{\text{HF}} = -51.20$ Hz), 4.41-4.23 (m, 3H, H5', H5'', H4'), 3.18 (s, 3H, CH $_3$ dmm), 3.05 (s, 3H, CH $_3$ dmm), 2.15 (s, 3H, CH $_3$ Ac), 2.03 (s, 3H, CH $_3$ Ac);

^{13}C NMR (125 MHz, dms o -d $_6$), δ , ppm: 170.6, 170.3, 158.5, 158.0, 150.1, 138.1, 119.7, 93.8, 92.2, 81.9, 81.8, 77.8, 75.7, 75.5, 63.4, 41.1, 40.5-39.5, 35.2, 21.1, 20.9, 17.8, 13.1;

^{19}F NMR (470 MHz, dms o -d $_6$), δ , ppm: -198.43 (ddd, $J_{\text{HF}} = -51.58$ Hz);

HRMS (ESI): obliczono dla C $_{17}$ H $_{21}$ FN $_6$ O $_6$ [M+H] $^+$ 425.1579; znaleziono 425.1573;

3',5'-di-O-acetylo-N⁶-benzoilo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoadenozyna (3b)

^1H NMR (500 MHz, dms o -d $_6$), δ , ppm: 11.27 (s, 1H, NH), 8.81 (s, 1H, H2), 8.56 (s, 1H, H8), 8.06-7.54 (5H, H-Ar), 6.64 (dd, 1H, H1', $J_{\text{HF}} = 15.18$ Hz), 5.71-5.57 (m, 2H), 4.44-4.33 (m, 3H), 2.16 (s, 3H, CH $_3$ Ac), 2.05 (s, 3H, CH $_3$ Ac);

^{13}C NMR (125 MHz, dms o -d $_6$), δ , ppm: 170.2, 169.6, 152.0, 151.9, 150.6, 143.2, 143.2, 133.2, 132.5, 128.5, 128.5, 93.7, 91.8, 82.0, 81.8, 78.2, 78.1, 75.4, 75.1, 63.0, 20.6, 20.5;

^{19}F NMR (470 MHz, dms o -d $_6$), δ , ppm: -197.90 (ddd, $J_{\text{HF}} = -51.74$ Hz);

HRMS (ESI): obliczono dla C $_{21}$ H $_{20}$ FN $_5$ O $_6$ [M+H] $^+$ 458.1470; znaleziono 458.1453;

N²,N⁶-diacetylo-3',5'-di-O-acetylo-2-amino-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoadenozyna (3c)

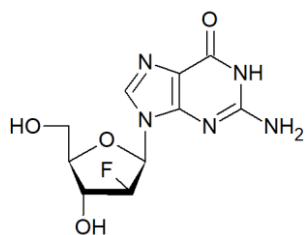
^1H NMR (500 MHz, dms o -d $_6$), δ , ppm: 10.43 (s, 1H, NH), 8.36 (s, 1H, H8), 6.44 (dd, 1H, H1', $J_{\text{HF}} = 16.73$ Hz, $J_{\text{HH}} = 3.96$ Hz), 5.65-5.51 (m, 2H), 4.41-4.32 (m, 4H), 2.32 (s, 3H, NAc CH $_3$), 2.23 (s, 3H, NAc CH $_3$), 2.14 (s, 3H, OAc CH $_3$), 2.04 (s, 3H, OAc CH $_3$);

^{13}C NMR (125 MHz, dms o -d $_6$), δ , ppm: 170.7, 169.9, 152.9, 152.8, 142.4, 119.5, 94.0, 92.5, 82.2, 82.1, 78.8, 75.9, 75.7, 63.6, 25.1, 25.1, 21.1, 21.0, 21.0, 20.7, 19.0, 17.8, 13.1;

^{19}F NMR (470 MHz, dms o -d $_6$), δ , ppm: -197.75 (ddd, $J_{\text{HF}} = -50.92$ Hz);

HRMS (ESI): obliczono dla C $_{18}$ H $_{21}$ FN $_6$ O $_7$ [M+H] $^+$ 453.1529; znaleziono 453.1514.

2.5.3. Synteza 2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyny



Pochodną (**3a**) rozpuściłem w metanolu (5 ml / 1mmol substratu) i dodałem roztwór 25% amoniaku w wodzie (5 ml / 1mmol substratu). Mieszaninę reakcyjną zamknąłem w szczelnym naczyniu i pozostawiłem na 16 godzin w 55°C. Po tym czasie mieszaninę ochłodziłem w -20°C przez 30 minut, a następnie odparowałem dwukrotnie do sucha z izopropanolem. Wydajność ostatnich etapów syntezy wyniosła około 60%.

2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna (4a)

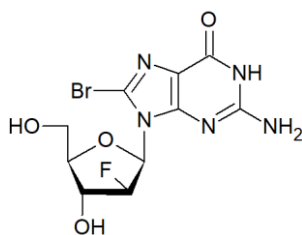
¹H NMR (500 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: 10.94 (s, 1H, NH), 7.77 (s, 1H, H8), 6.65 (s, 1H), 6.13 (dd, 1H, H1', $J_{HF} = 16.19$ Hz), 5.10 (m, 2H, H2', $J_{HF} = -52.45$ Hz, 2'OH), 4.36 (dt, 1H, H3'), 3.80 (m, 1H, H4'), 3.40 (m, 2H, H5', H5'');

¹³C NMR (176 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: 172.0, 157.1, 154.5, 151.3, 136.3, 136.2, 116.4, 96.1, 95.0, 84.1, 84.1, 81.7, 81.6, 73.2, 73.1, 60.9, 40.3-39.6, 23.0;

¹⁹F NMR (376 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: -198.09 (ddd, 1F, $J_{HF} = -52.40$ Hz);

HRMS (ESI): obliczono dla C₁₀H₁₂FN₅O₄ [M+H]⁺ 286.0946; znaleziono 286.0941.

2.5.4. Synteza 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyny



Pochodną (**4a**) zawiesiłem w wodzie i intensywnie mieszałem. Kroplami dodawałem świeżo przygotowaną wodę bromową (5 mmoli bromu / 1 ml wody), aż do momentu, w którym ustąpiło odbarwienie się roztworu. Biały osad produktu (**4d**) odsączyłem i przemyłem dwa razy zimną wodą oraz zimnym acetonem. Osad suszyłem na powietrzu. Wydajność po osuszeniu wyniosła 72%.

8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna (4d)

¹H NMR (500 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: 10.83 (s, 1H, NH), 6.52 (s, 1H, 2'OH), 6.27 (dd, 1H, H1', J_{HF} = 16.19 Hz), 5.23 (dt, 1H, H2', J_{HF} = -52.45 Hz), 4.68 (dt, 1H, H3'), 3.78-3.71 (m, 3H, H4', H5', H5'');

¹³C NMR (125 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: 155.5, 153.6, 152.4, 119.7, 117.0, 97.4, 95.5, 82.2, 82.1, 82.1, 81.9, 73.6, 73.4, 61.5;

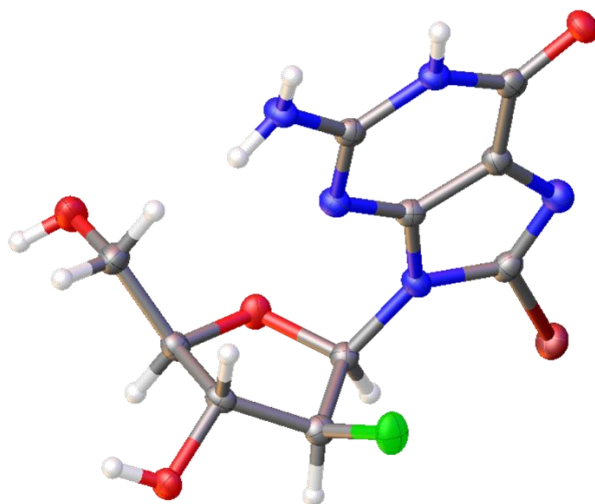
¹⁹F NMR (376 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: -197.05 (ddd, J_{HF} = -54.17 Hz);

HRMS (ESI): obliczono dla C₁₀H₁₁BrFN₅O₄ [M+H]⁺ 364.0051; znaleziono 364.0055.

Krystalizacja 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyny (4d)

Otrzymany związek został rozpuszczony w wodzie w temperaturze około 80°C i pozostawiony do krystalizacji w temperaturze pokojowej. Po upływie siedmiu dni w roztworze pojawiły się bezbarwne kryształy o pokroju igieł. Strukturę krystaliczną otrzymanych kryształów określiła dr Agnieszka Czapik z Zakładu Stereochemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

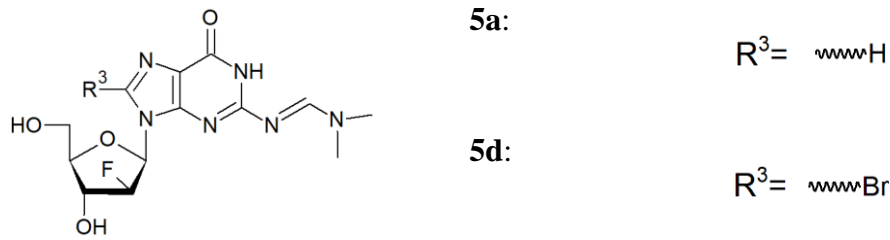
Tabela K1. Wybrane dane krystalograficzne oraz informacje dotyczące rentgenowskiej analizy strukturalnej.	
Układ krystalograficzny, grupa przestrzenna	rombowy, $P2_12_12_1$
a [Å]	5.24343 (9)
b [Å]	12.9845 (2)
c [Å]	18.3755 (3)
V [Å ³]	1251.07 (4)
Liczba refleksów zmierzonych, niezależnych, obserwowanych [$I > 2\sigma(I)$]	8033, 2289, 2194
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$, $wR(F^2)$, S	0.022, 0.055, 1.07
Parametr Flacka	-0.049 (10)



Rysunek K1. Struktura cząsteczki 8-bromo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyny w kryształach.

Tabela K2. Wartości kątów torsyjnych w cząsteczce 4d w kryształach.					
θ_0	θ_1	θ_2	θ_3	θ_4	χ
26.2 (3)	-24.8 (3)	14.1 (4)	3.0 (3)	-19.0 (3)	59.3 (4)

2.5.5. Ogólna procedura blokowania grupy egzoaminowej N² puryn



Odblokowany nukleozyd (**4a**) lub (**4d**) odparowałem dwukrotnie z metanolem. Następnie substrat zawiesiłem w metanolu (5 ml / 1 mmol) i dodałem acetal dimetylowy N,N-dimetyloformamidu (5 ekwiwalentów). Zawiesinę mieszałem przez 6 godzin w temperaturze 50°C. Biały osad produktu (**5a**) lub (**5d**) odsączyłem i suszyłem na powietrzu.

*N*²-(dimethylaminometyleno)-2'-deoxy-2'-fluoroarabinoguanosyna (**5a**)

¹H NMR (500 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: 8.59 (s, 1H, CH dmm), 7.89 (d, 1H, H8), 6.29 (dd, 1H, H1', $J_{HF} = 15.69$ Hz), 5.16 (dt, 1H, H2', $J_{HF} = -52.55$ Hz), 4.41 (dt, 1H, H3', $J_{HF} = 19.11$ Hz), 4.09 (m, 1H, H4'), 3.63 (m, 2H, H5', H5''), 3.16 (s, 3H, CH₃ dmm), 3.03 (s, 3H, CH₃ dmm);

¹³C NMR (125 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: 162.8, 151.7, 135.2, 116.7, 96.5, 95.0, 84.0, 84.0, 81.7, 81.5, 73.4, 73.2, 61.0, 36.3, 31.2;

¹⁹F NMR (376 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: -197.27 (ddd, $J_{HF} = -52.45$ Hz);

HRMS (ESI): obliczone dla C₁₃H₁₇FN₆O₄ [M+H]⁺ 341.1368; znaleziono 341.1366;

*N*²-(dimethylaminometyleno)-8-bromo-2'-deoxy-2'-fluoroarabinoguanosine (**5d**)

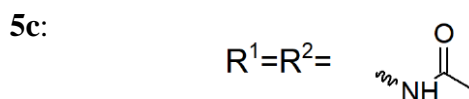
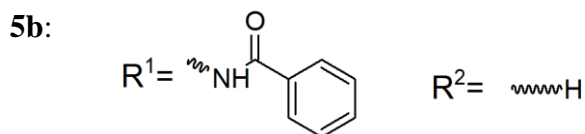
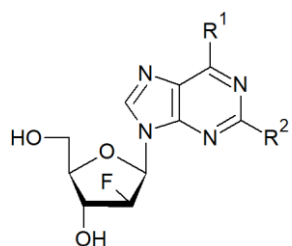
¹H NMR (500 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: 11.51 (s, 1H, NH), 8.60 (s, 1H, CH dmm), 6.39 (dd, 1H, H-1', $J_{H-H} = 6.70$ Hz, $J_{H-F} = 9.40$ Hz), 5.93 (s, 1H, 3'-OH) 5.30 (dt, 1H, H-2', $J_{H2'-F} = -54.68$ Hz), 4.89 (m, 1H, H-3'), 4.77 (m, 1H, H-4'), 3.72 (m, 3H, H-5', H5'', 5'-OH), 3.16 (s, 3H, CH₃ dmm), 3.04 (s, 3H, CH₃ dmm);

¹³C NMR (125 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: 158.9, 158.6, 158.0, 157.8, 157.3, 156.9, 156.9, 151.8, 151.7, 121.8, 120.3, 97.5, 96.0, 82.5, 82.3, 81.8, 81.7, 76.8, 75.3, 73.7, 73.5, 61.2, 41.3- 39.4, 35.1, 35.1;

¹⁹F NMR (470 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: -197.13 (ddd, 1F, $J_{H2'-F} = -55.17$ Hz);

HRMS (ESI): obliczone dla C₁₃H₁₆BrFN₆O₄ [M+H]⁺ 419.0473; znaleziono 419.0463.

2.5.6. Selektywne odblokowanie grup hydroksylowych N-blokowanych 5',3'-di-O-acetylo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinozydów puryn



N⁶-benzoilo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoadenozyna

Produkt poprzedniej reakcji (**3b**) rozpuściłem w metanolu z 5% trietyloaminy (5 ml / 1 mmol substratu). Mieszaninę reakcyjną pozostawiłem na 2 godziny w temperaturze pokojowej. Mieszaninę odparowałem na wyparce próżniowej. Wydajność wyniosła 59%.

N⁶-benzoilo-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoadenozyna (**5b**)

¹H NMR (500 MHz dms_o-d₆), δ, ppm: 11.25 (s, 1H, NH), 8.77, 8.60, 8.06-7.54 (m, Bz-Ar), 6.57 (dd, 1H, $J_{H1'-F} = 13.5$ Hz, $J_{H1'-H2'} = 4.70$ Hz), 6.02 (d, 3'-OH), 5.32 (dt, 1H, H-2', $J_{H2'-F} = -52.64$ Hz), 4.52-4.48 (m, 1H, H-3'), 3.91-3.88 (m, 1H, H-4'), 3.74-3.64 (m, 2H, H-5', H-5'');

¹³C NMR (125 MHz dms_o-d₆), δ, ppm: 167.9, 165.7, 158.1, 152.0, 150.5, 144.8, 143.0, 143.0, 135.5, 135.4, 134.3, 133.3, 132.5, 131.2, 129.7, 129.7, 128.6, 128.5, 128.3, 128.3, 128.2, 127.8, 127.7, 127.5, 126.7, 125.1, 113.1, 113.2, 96.2, 94.6, 85.5, 81.7, 81.6, 81.6, 81.5, 73.6, 73.4, 63.4, 55.0, 39.5;

¹⁹F NMR (470 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: -197.70 (ddd, 1F, $J_{H-F} = 16.64$ Hz, $J_{H2'-F} = -50.34$ Hz);

HRMS (ESI): obliczone dla C₁₇H₁₆FN₅O₄ [M+H]⁺ 374.1259; znalezione 374.1252.

N²,N⁶-diacetylo-2-amino-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoadenozyna

Produkt poprzedniej reakcji (**3c**) rozpuściłem w etanolu (5 ml/ 1mmol substratu), a następnie ochłodziłem w łaźni lodowej. Po 15 minutach dodałem 2M wodorotlenku sodu (5 ml/ 1mmol). Po 10 minutach mieszaninę zneutralizowałem na pirydyniowej formie żywicy DOWEX 50 (10 ml/ 1 mmol). Żywicę przemyłem wodą i cały roztwór odparowałem do sucha. Wydajność wyniosła 42%.

N²,N⁶-diacetylo-2-amino-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoadenozyna (5c).

¹H NMR (400 MHz, dms^o-d₆), δ, ppm: 10.60, 10.41 (2xs, 2H, NH), 8.40 (1H, H-8), 6.38 (dd, 1H, H-1', J_{H1'-F} = 14.38 Hz, J_{H1'-H2'} = 4.36 Hz), 6.00 (d, 1H, 3'-OH), 5.27 (dt, 1H, H-2', J_{H-F} = -52.51 Hz), 5.08 (m, 1H, H-3'), 4.53-4.49 (m, 1H, H-4'), 3.87-3.67 (m, 3H, 5'-OH, H-5', H-5''), 2.32 (s, 3H, Ac CH₃), 2.23 (s, 3H, Ac CH₃);

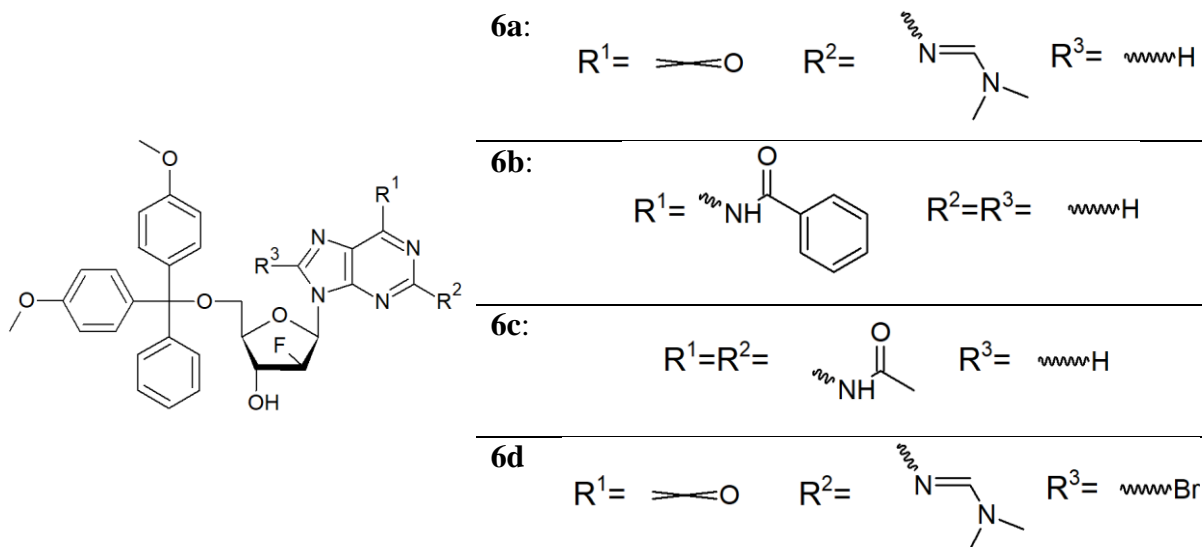
¹³C NMR (100 MHz, dms^o-d₆), δ, ppm: 170.6, 170.0, 150.3, 119.5, 94.0, 92.5, 82.2, 82.1, 78.8, 75.9, 75.7, 63.6, 40.4-39.4, 21.1, 21.0;

¹⁹F NMR (376 MHz, dms^o-d₆): δ -198.05 (ddd, 1F, J_{F-H2'} = -52.10 Hz, J_{F-H} = 16.09 Hz);

HRMS (ESI): obliczone dla C₁₄H₁₇FN₆O₅ [M+H]⁺ 369.1317; znalezienie 369.1318.

2.6. Ogólna procedura syntezy amidofosforynów nukleozydów

2.6.1. Funkcjonalizacja grupy 5'-hydroksylowej blokadą 4,4'-dimetoksytrytylową



Substrat (**5**) odparowałem dwukrotnie z bezwodną pirydyną w celu usunięcia resztek wody. Następnie związek (**5**) rozpuściłem w pirydynie (5 ml / 1 mmol substratu). Do mieszaniny dodawałem porcjami chlorek 4,4'-dimetoksytrytylu (1.1 ekwiwalenta) i mieszałem całość przez 3 godziny. Po zakończeniu reakcji do roztworu dodawałem wodny roztwór wodorowęglanu sodu i ekstrahowałem trzema porcjami chlorku metylenu. Fazę organiczną suszyłem bezwodnym siarczanem sodu i odparowałem do sucha. Produkt oczyściłem na kolumnie silikażelowej stosując jako eluent chlorek metylenu z gradientem stężenia metanolu 0-7%. Wydajności wyniosły: (**6a**) 71%, (**6b**) 70%, (**6c**) 73%, (**6d**) 70%.

5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-N²-(dimetylaminometyleno)-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna (6a)

¹H NMR (500 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: 11.37 (s, 1H, NH), 8.53 (s, 1H, CH dmm), 7.92 (d, 1H, H8), 7.74-6.83 (Ar-DMT), 6.84 (dd, 1H, H1', $J_{HF} = 16.39$ Hz), 6.12 (s, 1H, 3'OH), 5.19 (dt, 1H, H2', $J_{HF} = -52.19$ Hz), 4.43 (m, 1H, H3'), 3.99 (m, 1H, H4'), 3.71 (s, 6H, CH₃-DMT), 3.32-3.20 (m, 2H, H5', H5''), 3.10 (s, 3H, CH₃ dmm), 3.04 (s, 3H, CH₃ dmm);

¹³C NMR (125 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: 163.0, 158.6, 158.1, 158.0, 150.3, 145.2, 137.6, 137.6, 135.9, 135.8, 130.1, 128.3, 128.1, 127.2, 119.3, 113.6, 96.4, 94.9, 86.0, 82.2, 82.1, 81.6, 81.5, 74.3, 74.1, 63.8, 55.5, 41.2, 40.2, 40.1, 40.0, 39.9, 39.8, 39.7, 39.6, 39.4, 39.2, 36.3, 35.2, 31.3;

¹⁹F NMR (470 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: -197.28 (ddd, $J_{HF} = -53.34$ Hz);

HRMS (ESI): obliczono dla $C_{34}H_{35}FN_6O_6$ $[M+H]^+$ 643.2675; znaleziono 643.2676;

N⁶-benzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoadenozyna (6b)

¹H NMR (500 MHz dms_o-d₆), δ, ppm: 11.27 (s, 1H, NH), 8.03-6.83 (m, Bz-Ar, DMT-Ar), 6.61 (dd, 1H, $J_{HF} = 13.9$ Hz), 6.04 (d, 3'OH), 5.32 (dt, 1H, H2', $J_{HF} = -52.44$ Hz), 4.57-4.51 (m, 1H, H3'), 4.07 (m, 1H, H4'), 3.72 (s, 6H, CH₃-DMT), 3.41-3.37, 3.28-3.26 (m, 2H, H5', H5'');

¹³C NMR (125 MHz dms_o-d₆), δ, ppm: 167.9, 165.7, 158.1, 151.9, 150.5, 144.7, 142.9, 135.5, 135.4, 134.3, 133.3, 132.5, 131.2, 129.7, 129.7, 128.5, 128.5, 128.3, 128.2, 127.8, 127.7, 127.4, 126.7, 125.1, 113.2, 96.3, 94.4, 85.6, 81.7, 81.7, 81.5, 73.7, 73.5, 63.4, 55.0, 39.5;

¹⁹F NMR (470 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: -197.68 (ddd, $J_{HF} = -53.14$ Hz);

HRMS (ESI): obliczone dla $C_{38}H_{34}FN_5O_6$ $[M+H]^+$ 676.2566; znaleziono 676.2572;

N²,N⁶-diacetylo-2-amino-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoadenozyna (6c)

¹H NMR (400 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: 10.60, 10.35 (2xs, 2H, NH), 8.22 (1H, H8), 7.38-6.79 (m, 9H, Ar-DMT), 6.43 (dd, 1H, H1', $J_{HF} = 13.36$ Hz), 5.96 (d, 1H, 3'OH), 5.27 (dt, 1H, H2', $J_{HF} = -52.47$ Hz), 4.65 (m, 1H, H3'), 4.04 (m, 1H, H4'), 3.72 (s, 6H, CH₃-DMT), 3.48-3.44, 3.24-3.21 (m, 2H, H5', H5''), 2.32 (s, 3H, Ac CH₃), 2.20 (s, 3H, Ac CH₃);

¹³C NMR (100 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: 162.8, 158.4, 157.9, 157.8, 150.1, 145.0, 135.7, 135.7, 129.9, 128.1, 127.9, 127.0, 119.1, 113.4, 96.2, 94.7, 85.8, 82.0, 81.9, 81.4, 81.3, 74.1, 73.9, 63.6, 55.3, 41.0-39.0, 36.1, 35.0, 31.1;

¹⁹F NMR (376 MHz, dms_o-d₆): δ -198.05 (ddd, $J_{HF} = -52.10$ Hz);

HRMS (ESI): obliczone dla $C_{35}H_{35}FN_6O_7$ $[M+H]^+$ 671.2624; znaleziono 671.2634;

8-bromo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-N²-(dimetylaminometyleno)-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna (6d)

¹H NMR (400 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: 11.54 (s, 1H, NH), 8.23 (s, 1H, CH dmm), 7.35-6.77 (m, Ar-DMT), 6.48 (dd, 1H, H1', $J_{HF} = 10.42$ Hz), 5.97 (s, 1H, 3'OH), 5.34 (dt, 1H, H2'), 4.72-4.65 (m, 1H, H3'), 3.96 (m, 1H, H4'), 3.72 (s, 6H, CH₃-DMT), 3.55 (m, 1H, H5''), 3.24-3.17 (m, 1H, H5'), 3.00 (s, 3H, CH₃ dmm), 2.98 (s, 3H, CH₃ dmm);

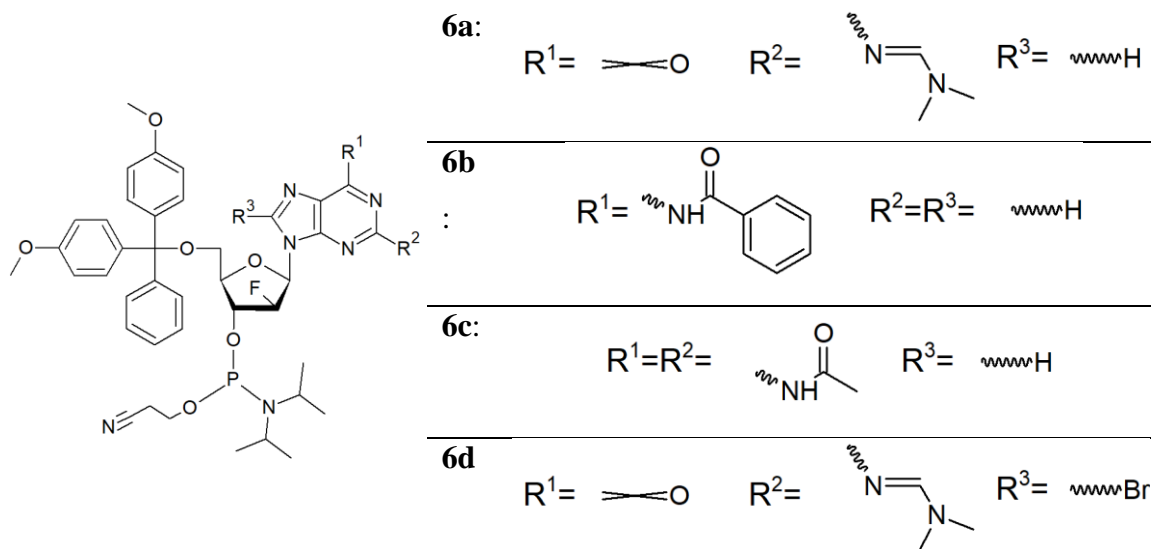
MATERIAŁY I METODY

¹³C NMR (100 MHz, dms_o-d₆), δ, ppm: 158.5, 158.4, 158.0, 157.5, 156.8, 151.5, 145.2, 135.9, 135.8, 130.1, 130.0, 128.2, 128.1, 127.1, 121.8, 120.5, 113.5, 113.5, 97.4, 95.8, 85.9, 82.2, 82.1, 79.9, 79.8, 74.5, 74.4, 64.2, 55.5, 55.5, 49.1, 41.2, 40.6-39.5, 35.1;

¹⁹F NMR (376 MHz, dms_o-d₆): δ -197.31 (ddd, $J_{HF} = -52.28$ Hz);

HRMS (ESI): obliczone dla C₃₄H₃₄BrFN₆O₆ [M+H]⁺ 721.1780; znalezione 721.1773.

2.6.2. Synteza blokowanych amidofosforynów nukleozydów



Blokowany nukleozyd (**6**) (1 ekwiwalent) oraz tetrazol (1 ekwiwalent) suszyłem przez 8 godzin pod próżnią. Następnie substraty rozpuściłem w bezwodnym acetonitrylu (5 ml/ 1 mmol substratu) i dodałem N,N,N',N'-tetraizopropylfosforynoamid 2-cyanoetylu (1,1 ekwiwalenta). Mieszaninę mieszałem przez 10 godzin na mieszadło magnetycznym. Po zejściu reakcji dodałem do mieszaniny reakcyjnej wodny roztwór wodorowęglanu i chlorek metylenu z dodatkiem 1% trietyloaminy i ekstrahowałem fazę wodną dwukrotnie chlorkiem metylenu. Połączone fazy organiczne wysuszyłem bezwodnym siarczanem sodu i odparowałem. Produkt (**7**) oczyściłem na kolumnie silikażelowej. Jako eluentu użyłem heksanu z gradientem octanu etylu (do 90% octanu etylu) z 1% trietyloaminy. Oczyszczony amidofosforyn liofilizowałem z benzenu. Wydajności wyniosły: (**7a**) 86%, (**7b**) 80%, (**7c**) 85%, (**7d**) 90%.

3'-O-[2-cyanoetoksy(diizopropylamino)fosfino]-5'-O-(dimetoksytrytylo)-N²-(dimetylaminometyleno)-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna (7a**)**

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN-d₃), δ, ppm: 9.49 (s, 1H, NH), 8.60 (s, 1H, CH dmm), 7.70 (s, 1H, H8), 7.47-6.84 (13H, Ar-DMT), 6.34 (dd, 1H, H1'), 5.23 (m, 1H, H2'), 4.80-4.65 (m, 1H, H3'), 4.15 (m, 1H, H4'), 3.76 (s, 6H, CH₃-DMT), 3.67-3.60 (m, 4H, O-CH₂ CEO, 2x CH iPr), 3.40-3.36 (m, 2H, H5', H5''), 3.10 (s, 3H, CH₃ dmm), 3.05 (s, 3H, CH₃ dmm), 2.62 (t, 1H, CH₂ CEO), 2.52 (t, 1H, CH₂ CEO), 1.18-1.07 (13H, CH₃ iPr);

¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN-d₃), δ, ppm: 159.7, 159.3, 159.3, 158.8, 158.7, 158.6, 151.3, 151.2, 146.0, 145.9, 138.1, 138.1, 138.0, 138.0, 136.7, 136.7, 131.0, 131.0, 130.9, 129.3,

129.0, 128.9, 128.8, 127.9, 127.9, 120.4, 120.4, 119.4, 119.3, 118.3, 114.1, 96.7, 96.6, 96.6, 96.6, 94.8, 94.7, 94.7, 94.7, 87.1, 87.1, 83.2, 83.1, 83.1, 83.0, 82.9, 82.9, 82.8, 82.8, 82.7, 77.8, 77.6, 77.5, 77.3, 77.0, 76.8, 76.7, 76.6, 63.9, 63.7, 59.9, 59.8, 59.8, 59.6, 59.2, 59.1, 55.9, 55.9, 46.0, 45.9, 44.3, 44.2, 44.2, 44.1, 41.7, 35.3, 24.9, 24.9, 24.9, 24.8, 24.8, 24.7, 23.2, 23.1, 23.1, 23.1, 21.0, 20.9, 20.9, 20.9, 20.6, 20.5, 1.3;

¹⁹F NMR (470 MHz, CD₃CN-d₃), δ, ppm: -197.17 (dddd, $J_{HF} = -52.46$ Hz, $J_{HF} = 18.83$ Hz, $J_{PF} = 78,49$ Hz);

³¹P NMR (162 MHz CD₃CN-d₃): δ, ppm: 151.27, 150.82;

HRMS (ESI): obliczono dla C₄₃H₅₂FN₈O₇P [M+H]⁺ 843.3753; znaleziono 843.3741;

N⁶-benzoilo-3'-O-[2-cyjanoetoksy(diizopropylamino)fosfino]-5'-O-(dimetoksytrytylo)-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoadenozyna (7b)

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN-d₃), δ, ppm: 9.51 (s, 1H, NH), 8.67-8.66 (1H, H₂), 8.29-8.27 (1H, H₈), 8.03-6.85 (18H, Bz-Ar, DMT-Ar), 6.61-6.57 (m, 1H, H_{1'}), 5.47-5.32 (m, 1H, H_{2'}), 4.93-4.82 (m, 1H, H_{3'}), 4.27-4.25 (m, 1H, H_{4'}), 4.14-3.63 (m, 4H, H_{5'}, H_{5''}), 3.77 (s, 6H, CH₃-DMT), 2.66 (t, 1H, CH₂ CEO), 2.56 (t, 1H, CH₂ CEO), 1.26-1.07 (13H, CH₃ iPr);

¹³C NMR (125 MHz, CD₃CN-d₃), δ, ppm: 159.3, 159.3, 145.5, 145.5, 143.2, 136.3, 136.3, 136.3, 133.1, 130.6, 129.2, 128.7, 128.4, 117.9, 113.6, 96.2, 96.2, 96.1, 94.7, 94.7, 94.5, 86.8, 83.2, 83.0, 82.9, 82.8, 82.7, 82.5, 77.1, 77.0, 76.9, 76.8, 76.3, 76.2, 76.1, 76.0, 63.5, 63.3, 59.5, 59.4, 59.3, 59.2, 55.5, 55.5, 45.6, 45.5, 43.8, 43.8, 43.7, 43.7, 24.5, 24.4, 24.4, 24.4, 24.4, 24.3, 22.8, 22.7, 22.7, 22.7, 20.6, 20.5, 20.5, 1.4, 1.2, 1.1-0.4;

¹⁹F NMR (470 MHz, CD₃CN-d₃), δ, ppm: -197.12 (dddd, 1F, $J_{HF} = -51.78$ Hz, $J_{HF} = 17.52$ Hz, $J_{PF} = 96,71$ Hz);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃CN-d₃), δ, ppm: 151.03, 150.95;

HRMS (ESI): obliczono dla C₄₃H₅₂FN₈O₇P [M+H]⁺ 876.3655; znaleziono 876.3641;

N²,N⁶-diacetylo-2-amino-3'-O-[2-cyjanoetoksy(diizopropylamino)fosfino]-5'-O-(dimetoksytrytylo)-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoadenozyna (7c)

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN-d₃), δ, ppm: 8.74, 8.64 (2xs, 2H, NH), 8.07 (m, 1H, H₈), 7.43-6.78 (14H, Ar-DMT), 6.41-6.36 (m, 1H, H_{1'}), 5.43-5.25 (m, 1H, H_{2'}), 5.01-4.83 (m, 1H, H_{3'}), 4.19 (m, 1H, H_{4'}), 4.14-3.80 (m, 2H, H_{5'}, H_{5''}), 3.74 (s, 6H, CH₃-DMT), 3.68-3.37 (m, 4H, O-CH₂ CEO, 2x CH iPr), 3.37 (m, 2H, H_{5'}, H_{5''}), 2.75 (t, 1H, CH₂ CEO), 2.63 (t, 1H, CH₂ CEO), 2.31 (1H, CH₃ Ac), 2.16 (1H, CH₃ Ac), 1.24-1.07 (12H, CH₃ iPr);

¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN-d₃), δ, ppm: 171.0, 159.6, 159.6, 159.6, 153.0, 150.6, 146.0, 136.8, 136.7, 136.7, 136.7, 131.1, 131.0, 130.9, 129.0, 128.9, 128.7, 127.8, 119.3, 118.3, 113.9, 87.1, 83.6, 83.4, 83.3, 83.2, 83.1, 64.1, 59.7, 59.7, 59.6, 59.5, 59.1, 59.1, 55.8, 45.9, 44.2, 44.2, 44.1, 44.1, 25.8, 25.3, 24.9, 24.8, 24.8, 24.8, 24.7, 24.7, 23.1, 23.1, 23.1, 23.1, 20.9, 1.9, 1.7, 1.5, 1.3, 1.1, 0.9, 0.7;

¹⁹F NMR (376 MHz, CD₃CN-d₃), δ, ppm: -197.79 - -198.16 (m);

³¹P NMR (162 MHz, CD₃CN-d₃), δ, ppm: 151.12, 150.96;

HRMS (ESI): obliczono dla C₄₃H₅₂FN₈O₇P [M+H]⁺ 871.3703; znaleziono 871.3711;

8-bromo-3'-O-[2-cyanoetoksy(diizopropylamino)fosfino]-5'-O-(dimetoksytrytylo)-N²-(dimetylaminometyleno)-2'-deoksy-2'-fluoroarabinoguanozyna (7d)

¹H NMR (500 MHz CD₃CN-d₃), δ, ppm: 9.77 (s, 1H, NH), 7.41-6.72 (14H, Ar-DMT), 6.52-6.47 (m, 1H, H1'), 5.51-5.35 (m, 1H, H2'), 5.25-5.02 (m, 1H, H3'), 4.15 (m, 1H, H4'), 3.75 (s, 6H, CH₃-DMT), 3.72-3.50 (m, 4H, O-CH₂ CEO, 2x CH iPr), 3.37 (m, 2H, H5', H5''), 3.09 (s, 3H, CH₃ dmm), 3.04 (s, 3H, CH₃ dmm), 2.62 (t, 1H, CH₂ CEO), 2.52 (t, 1H, CH₂ CEO), 1.18-1.07 (12H, CH₃ iPr);

¹³C NMR (400 MHz, CD₃CN-d₃), δ, ppm: 159.6, 159.5, 158.6, 158.5, 158.1, 158.0, 157.5, 152.5, 152.5, 146.0, 145.9, 136.7, 136.6, 136.5, 136.5, 131.0, 130.9, 130.8, 129.3, 128.9, 128.8, 128.8, 128.7, 127.8, 127.7, 122.6, 121.6, 119.3, 119.2, 118.3, 114.0, 114.0, 96.8, 95.3, 87.1, 87.0, 83.7, 83.5, 83.4, 83.3, 80.2, 80.1, 80.1, 80.1, 77.3, 77.2, 77.0, 64.6, 64.3, 60.0, 59.9, 59.6, 59.4, 55.9, 55.9, 44.4, 44.3, 44.2, 44.1, 41.8, 41.8, 35.4, 24.9, 24.8, 24.5, 24.5, 20.9, 20.8, 1.8, 1.6, 1.5, 1.3, 1.1, 1.0, 0.8;

¹⁹F NMR (470 MHz, CD₃CN-d₃), δ, ppm: -197.77 - -197.97 (m);

³¹P NMR (202 MHz, CD₃CN-d₃), δ, ppm: 152.21, 151.22;

HRMS (ESI): obliczono dla [M+H]⁺ 921.2858; znaleziono 921.2865.

2.7. Synteza oligonukleotydów

Oligorybonukleotydy wykorzystane w badaniach syntezowałem na aparacie MerMade 12 na podłożu stałym CPG (ang. *controled pore glass*) z zastosowaniem metody amidofosforynowej. Dostępne handlowo amidofosforyny RNA i DNA oraz przygotowane w Zakładzie Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych amidofosforyny modyfikowanych nukleozydów zawierały klasyczne grupy blokujące (zasadolabilne, 2-cyanoetylową). Grupy 2'-hydroksylowe amidofosforynów RNA zawierały blokadę *tert*-butylodimetylosililową.

2.7.1. Standardowa procedura odblokowania i oczyszczania trytyl-OFF

Do podłoża z przyłączonym oligorybonukleotydem dodałem 0,5 ml etanolu i 1,5 ml 30% roztworu wodnego amoniaku. Całość inkubowałem w temperaturze 55°C przez 16 godzin. Próbki następnie schładzałem w -20°C przez 20 minut, a roztwór oddzielałem od podłoża poprzez filtrowanie i dwukrotne przemycie złoży 0,5 ml wody, przesącz odparowałem do sucha. Do suchych próbek dodałem 30 µl N,N-dimetyloformamidu i 270 µl trifluorowodoru trietyloamoniowy. Mieszaninę inkubowałem przez 2 godziny w temperaturze 55°C. Po tym czasie dodałem do próbek 4 ml n-butanolu i strącałem przez godzinę w temperaturze -20°C. Po strącaniu zawiesinę wirowałem 10 minut w temperaturze 4°C przy 7000 rpm, supernatant oddzieliłem, a osad osuszyłem pod próżnią. W kolejnym etapie odblokowane oligorybonukleotydy odsalałem na kolumnkach zawierających silanizowane podłoże C18 (Sep-pak®). Kolumnki były przemycie przed nałożeniem oligorybonukleotydów kolejno: 10 ml metanolu, 10 ml acetonitrylu i 10 ml 10 mM roztworu wodorowęglanu amonu. Następnie osady oligorybonukleotydów były rozpuszczane w 10 ml 10 mM roztworu wodorowęglanu amonu i całość była наносzona na przygotowaną kolumnkę. Roztwory były zbierane w trzech frakcjach. Pierwsza podczas nakładania na kolumnkę, druga po przemyciu kolumnki 10 ml 10 mM roztworu wodorowęglanu amonu i trzecia – frakcja po przemyciu kolumnki 5 ml 30% wodnego roztworu acetonitrylu zawierająca odsolony oligorybonukleotyd. Każdą z frakcji sprawdzano na obecność oligorybonukleotydów na płycie TLC lub Nanodropie. Frakcję zawierającą oligorybonukleotyd (trzecią frakcję) odparowano do sucha.

2.7.2. Standardowa procedura odblokowania i oczyszczania trytyl-ON

Oligorybonukleotydy zsyntetyzowane metodą trytyl-ON były oczyszczane i odblokowywane według standardowej procedury Glen-Pak®. Do podłoża z przyłączonym oligorybonukleotydem dodałem 2 ml AMA (ang. *amonia methylamine*, 30% roztwór wodny amoniaku/ 40% roztwór wodny metyloaminy, v/v, 1/1) i inkubowałem roztwór w temperaturze 65°C przez 10 min. Próbkę następnie schładzałem w -20°C przez 20 minut, a roztwór oddzielałem od podłoża poprzez filtrowanie i dwukrotne przemycie złoża 0,5 ml wody, przesącz odparowałem do sucha. Do suchych próbek dodałem 115 µl DMF, po rozpuszczeniu się osadu dodałem 60 µl trietyloaminy, a następnie 75 µl trifluorowodoru trietyloamoniowy. Mieszaninę inkubowałem w 65°C przez 2 godziny. Po tym czasie do roztworu dodałem 1,75 ml Quenching Buffer. Powstały roztwór z oligomerem nanosiłem na przemytą wcześniej kolumnkę Glen-Pak RNA-trytyl-ON. Kolumnkę przed naniesieniem roztworu z oligomerem przemywałem 0,5 ml acetonitrylu i 1 ml 2 M octanu trietyloamoniowego. Po naniesieniu oligonukleotydu w roztworze na kolumnkę do oczyszczania metodą trytyl-ON, przemyłem kolumnkę 1 ml roztworu 2 M octanu trimetyloamoniowego z 10% acetonitrylu, a następnie 1 ml wody. W kolejnym kroku kolumnkę przemyłem 2 ml 2% roztworu kwasu trifluorooctowego i 2 ml wody. Oczyszczony oligonukleotyd wymyłem z kolumnki 1 ml 1 M wodorowęglanu amonu z 30% acetonitrylu.

2.7.3. Rozdział oligonukleotydów po odblokowaniu

Krótkie oligonukleotydy (poniżej 20 nukleotydów) rozdzielałem na płytach TLC. Suchą próbkę oligonukleotydu rozpuszczałem w 120 µl wody i nakładałem na płytki TLC (20x10 cm) w celu oczyszczenia związków. Faza rozwijająca miała następujący skład: 55% n-propanolu, 35% 25% roztworu amoniaku, 10% wody. Prążki zawierające oligorybonukleotydy były wizualizowane z użyciem lampy UV₂₅₄ i wyskrobane z płytki. Silikażel z oczyszczanym oligonukleotydem eluowałem trzy razy 3 ml wody, a połączone frakcje odparowywałem. Wysuszone próbki rozpuszczałem w 200 µl wody i przenosiłem je do probówek na 1,5 ml, następnie przemywałem probówki jeszcze dwukrotnie 200 µl wody do otrzymania 600 µl roztworu oczyszczonego oligorybonukleotydu.

Długie oligonukleotydy (powyżej 20 nukleotydów) po odsoleniu były rozdzielane na 12% żelu poliakrylamidowym z 8 M mocznikiem. Po wycięciu prążków zawierających

oczyszczany oligorybonukleotyd żel zalewałem roztworem 300 mM octanu sodu i wytrząsałem go w temperaturze 10°C przez 3 godziny. Po tym czasie roztwór oddzielałem od żelu i zalewałem go nową porcją roztworu do elucji. Roztwór z wyeluowanym oligonukleotydem zalewałem dwukrotnym nadmiarem objętościowym etanolu i strącałem w -20°C przez 16 godzin.

2.7.4. Odsalanie oligonukleotydów

Odsalanie roztworów zawierających oligonukleotyd prowadziłem na trzy różne sposoby. W zależności od dalszego przeznaczenia oligonukleotydu.

Pierwsza metoda, którą stosowałem dla krótkich oligomerów (poniżej 20 nukleotydów) polega na wykorzystaniu kolumnienek Sep-Pak, a metodę tą opisałem w „Standardowej procedurze odblokowania i oczyszczania trytyl-OFF”. Metodę tą stosowałem dla oligonukleotydów przeznaczonych do eksperymentów wyznaczania parametrów termodynamicznych.

Długie oligomery (powyżej 20 nukleotydów) odsalałem na kolumnienkach NAP. Kolumnienki te zawierają mikroporowate złożo, które umożliwia pozbycie się niepożądanych składników na zasadzie chromatografii wykluczenia. Przed przystąpieniem do oczyszczania kolumnienkę przemywałem 20 ml demineralizowanej wody. Następnie nakładałem rozpuszczoną w 0,5 ml wody próbę zawierającą oligonukleotyd i wymywałem go z kolumnienki przy pomocy wody zbierając frakcje po 1 ml. Metodę tą stosowałem dla oligonukleotydów przeznaczonych do eksperymentów wyznaczania stałej szybkości działania rybozomu *hammerhead*.

Dla oligonukleotydów użytych do wykonania widm NMR istotne było pozbycie się jonów amonowych. W celu pozbycia się soli amonowych z próbek oligorybonukleotydów wykorzystałem filtry do wirowania AMICON®. Roztwór oligorybonukleotydu zwirowałem na filtrze w temperaturze 25°C przy obrotach 7000 rpm przez 25 min. Następnie do pozostałości dodawałem demineralizowaną wodę i powtarzałem wirowanie dwukrotnie. Pozostały na filtrze roztwór z oligorybonukleotydem rozcieńczano buforem litowym (150 mM chlorku litu, 50 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA; pH 6.8) i podgrzewano go do 80°C przez 5 minut, a następnie zwirowano w temperaturze 25°C przy obrotach 7000 rpm przez 25 min. Następnie do pozostałości na filtrze dodałem ten sam bufor

i powtórzyłem całość dwa razy. W celu pozbycia się soli litowych roztwór oligomeru został przesączony na filtrach AMICON® trzy razy z użyciem wody.

2.7.5. Oznaczanie stężenia oligonukleotydów

Stężenia oligorybonukleotydów były sprawdzane poprzez pomiar absorbancji w temperaturze 80°C przy długości fali 260 nm. Następnie wartość absorbancji była przeliczana na stężenie na podstawie prawa Lamberta-Beera przy zastosowaniu współczynników ekstynkcji dla danego oligorybonukleotydu. Współczynniki ekstynkcji były obliczane przy pomocy kalkulatora OligoAnalyzer (eu.idtdna.com/calc/analyzer). Przy obliczaniu współczynników ekstynkcji pominięto wprowadzane modyfikacje. Przyjęto, że w miejscu modyfikowanego nukleozydu znajduje się reszta guanozyny.

2.8. Otrzymywanie parametrów termodynamicznych

Pomiary stabilność termodynamicznej oligonukleotydów wykonałem przy użyciu spektrofotometru UV-VIS JASCO V-650 z termoprogramatorem. Określone ilości oligonukleotydu odparowywano do sucha, następnie rozpuszczano w buforze do topnień. Przed pomiarem próbkę podgrzewano do 90°C przez 1 minutę, a następnie zwirowywano i ochładzano do temperatury pokojowej.

Do wyznaczenia parametrów termodynamicznych dla oligonukleotydów niezbędna jest znajomość przebiegu tak zwanej krzywej topnienia. W tym celu dla każdego badanego oligomeru prowadziłem pomiar absorbancji wraz ze wzrastającą temperaturą. Pomiary przeprowadzałem dla każdego oligomeru w dziewięciu różnych stężeniach, w zakresie od 10^{-3} do 10^{-6} M, w świetle UV przy długości fali $\lambda = 260$ nm. Zakres temperatury pojedynczego eksperymentu wynosił od 5 do 90°C, natomiast szybkość zmiany temperatury wynosiła 1°C/min. Wartość absorbancji próbek mierzona była co pół minuty. Dane uzyskane w wyniku pomiarów poddawałem dalszej analizie w programie MeltWin 3.5.

2.9. Otrzymywanie parametru kinetycznego dla rybozomu *hammerhead*

Odpowiednie ilości rybozomu *hammerhead* oraz substratu znakowanego fluoresceiną na 5' końcu rozpuszczałem w buforze 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 i podgrzewałem do 95°C przez 1 minutę, następnie do próbki zawierającej rybozym dodawałem bufor z jonami magnezu do osiągnięcia 5 mM stężenia tych jonów. Roztwory rybozomu i substratu pozostawiałem na 20 minut w celu schłodzenia do temperatury pokojowej. Po tym czasie rozpoczynałem przeprowadzanie reakcji przez zmieszanie obu roztworów do końcowej objętości 30 μ l, tak aby osiągnąć pożądaną proporcję molową między reagentami. Reakcję prowadziłem w temperaturze pokojowej. Następnie z mieszaniny reakcyjnej pobierałem 3 μ l, przenosiłem do nowej próbki i zatrzymywałem reakcję przez dodanie 17 μ l buforu zawierającego 5 mM cytrynianu sodu, 200 mM EDTA, 8 M mocznik, pH 5 i schłodzenie próbki na suchym lodzie. Reakcję zatrzymywałem w następujących punktach czasowych: 0; 0,5; 1; 2,5; 5; 15; 30; 45; 60 i 90 min. Miejsce cięcia rybozomu identyfikowano z wykorzystaniem niespecyficznej hydrolizy substratu przy pomocy jonów magnezu. W tym celu 1 μ l znakowanego fluorescencyjnie substratu podgrzewano z 2 μ l 20 mM chlorku magnezu, 3 μ l formamidu i 2 μ l wody przez 15 minut w 95°C. Tak przygotowana próba stanowiła kontrolę. Następnie wszystkie otrzymane próby (mieszaniny reakcyjne oraz kontrole) nanosiłem na 12% denaturujący żel poliakrylamidowy i prowadziłem rozdzielanie elektroforetyczne przy mocy prądu 30 W przez minimum 2 godziny. Wynik rozdzielania wizualizowałem na skanerze żeli firmy FujiFilm. Uzyskany obraz analizowałem przy pomocy programu Mutli Gauge V3.0, natomiast do obliczenia parametrów kinetycznych wykorzystałem program Prism 3.0. W celu dopasowania punktów eksperymentalnych do krzywej stosowałem wzór funkcji $f = 1 - e^{-kt}$, a parametr szybkości reakcji otrzymałem przez odpowiednie przekształcenie tego wzoru.

2.10. Inhibicja namnażania wirusa grypy z wykorzystaniem rybozomu *hammerhead*.

Przygotowanie wirusa grypy szczepu A/California/04/2009 (H1N1), hodowle komórek MDCK oraz przeprowadzenie testów inhibicji namnażania wirusa grypy przy użyciu modyfikowanych rybozomów *hammerhead* wykonywała dr Julita Piasecka

z Zakładu Genomiki Strukturalnej RNA w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

Wybrane rybozomy wykorzystano do transfekcji komórek MDCK, którą przeprowadzono przy użyciu odczynnika Lipofectamine 2000. Końcowe stężenie rybozymów wynosiło 200 nM. Po 12 godzinach inkubacji medium transfekcyjne zastąpiono standardowym medium hodowlanym. Po upływie 18 godzin od transfekcji hodowlę komórkową zakażano wirusem grypy przy $MOI = 0,01$. Komórki inkubowano w roztworze wirusa rozcieńczonego w medium infekcyjnym przez 1 godzinę na delikatnie kołyszącej się platformie w temperaturze pokojowej. Następnie, supernatant usunięto i komórki utrzymywano w medium postinfekcyjnym przez 24 godziny w atmosferze 5% CO_2 i temperaturze $33^{\circ}C$. Następnie wykonywano izolację całkowitego RNA.

Całkowity RNA z hodowli komórkowej MDCK izolowano metodą Chomczyńskiego-Sacchi z wykorzystaniem Trizolu. Odwrotną transkrypcję przeprowadzono za pomocą specyficznego startera i odwrotnej transkryptazy SuperScript III według procedury producenta (Invitrogen). Powstałe cDNA wykorzystano jako matrycę w kolejnym etapie tj. reakcji PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR, ang. *real-time PCR*) z wykorzystaniem sond fluorescencyjnych typu TaqMan. Analiza ilościowa pozwoliła na porównanie ilości kopii wirusowego RNA w próbach traktowanych rybozymem względem prób kontrolnych traktowanych wyłącznie lipofektaminą.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Bloomfield, V. A., Crothers, D. M. & Tinoco, I. *Nucleic Acids: Structures, Properties and Functions*. (University Science Books, 2000).
2. Blackburn, G. M. & Gait, M. J. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. (Oxford University Press, 1990).
3. Sokoloski, J. E., Godfrey, S. A., Dombrowski, S. E. & Bevilacqua, P. C. Prevalence of syn nucleobases in the active sites of functional RNAs. *RNA* **17**, 1775–1787 (2011).
4. Karplus, M. Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *J. Chem. Phys.* **30**, 11–15 (1959).
5. Kilpatrick, J. E., Pitzer, K. S. & Spitzer, R. The thermodynamics and molecular structure of cyclopentane. *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 2483–2488 (1947).
6. Altona, C. & Sundaralingam, M. Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides. New description using the concept of pseudorotation. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 8205–8212 (1972).
7. Altona, C. & Sundaralingam, M. Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides. Improved method for the interpretation of proton magnetic resonance coupling constants. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 233–2344 (1973).
8. Gautheret, D., Konings, D. & Gutell, R. R. G·U base pairing motifs in ribosomal RNA. *RNA* **1**, 807–814 (1995).
9. Varani, G. & McClain, W. H. The G·U wobble base pair: A fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems. *EMBO Rep.* **1**, 18–23 (2000).
10. Berger, K. D., Kennedy, S. D. & Turner, D. H. Nuclear magnetic resonance reveals that GU base pairs flanking internal loops can adopt diverse structures. *Biochemistry* **58**, 1094–1108 (2019).
11. Berger, K. D. *et al.* Surprising sequence effects on GU closure of symmetric 2 × 2 nucleotide RNA internal loops. *Biochemistry* **57**, 2121–2131 (2018).
12. Peritz, A. E., Turner, D. H., Kierzek, R. & Sugimoto, N. Thermodynamic study of internal loops in oligoribonucleotides: symmetric loops are more stable than asymmetric loops. *Biochemistry* **30**, 6428–6436 (1991).
13. SantaLucia, J., Turner, D. H. & Kierzek, R. Stabilities of consecutive A·C, C·C, G·G, U·C, and U·U mismatches in RNA internal loops: Evidence for stable hydrogen-bonded U·U and C·C⁺ pairs. *Biochemistry* **30**, 8242–8251 (1991).
14. Kierzek, R., Burkard, M. E. & Turner, D. H. Thermodynamics of single mismatches in RNA duplexes. *Biochemistry* **38**, 14214–14223 (1999).
15. Davis, A. R. & Znosko, B. M. Thermodynamic Characterization of Single Mismatches Found in Naturally Occurring RNA. *Biochemistry* **46**, 13425–13436 (2007).
16. Leonard, G. A. *et al.* Crystal and molecular structure of r(CGCGAAUUAGCG): an RNA duplex containing two G(anti)·A(anti) base pairs. *Structure* **2**, 483–494 (1994).

BIBLIOGRAFIA

17. Correll, C. C., Freeborn, B., Moore, P. B. & Steitz, T. A. Metals, motifs, and recognition in the crystal structure of a 5S rRNA domain. *Cell* **91**, 705–712 (1997).
18. Pan, B., Mitra, S. N. & Sundaralingam, M. Crystal structure of an RNA 16-mer duplex R(GCAGAGUUAAAUCUGC)₂ with nonadjacent G(Syn)·A+(Anti) mispairs. *Biochemistry* **38**, 2826–2831 (1999).
19. Davis, A. R., Kirkpatrick, C. C. & Znosko, B. M. Structural characterization of naturally occurring RNA single mismatches. *Nucleic Acids Res.* **39**, 1081–1094 (2011).
20. Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M. & Turner, D. H. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* **288**, 911–940 (1999).
21. Aviñó, A., Eritja, R., González, C. & Gargallo, R. Fundamental aspects of the nucleic acid i-motif structures. *R. Soc. Chem. Adv.* **4**, 26956–26980 (2014).
22. Zeraati, M. *et al.* I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells. *Nat. Chem.* **10**, 631–637 (2018).
23. Macaya, R. F., Schultze, P., Smith, F. W., Roe, J. A. & Feigon, J. Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 3745–3749 (1993).
24. Kotkowiak, W., Czapik, T. & Pasternak, A. Novel isoguanine derivative of unlocked nucleic acid—Investigations of thermodynamics and biological potential of modified thrombin binding aptamer. *PLoS One* **13**, (2018).
25. Avino, A., Fabrega, C., Tintore, M. & Eritja, R. Thrombin binding aptamer, more than a simple aptamer: Chemically modified derivatives and biomedical applications. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 2036–2047 (2012).
26. Spiegel, J., Adhikari, S. & Balasubramanian, S. The structure and function of DNA G-quadruplexes. *Trends Chem.* **2**, 123–136 (2020).
27. Moye, A. L. *et al.* Telomeric G-quadruplexes are a substrate and site of localization for human telomerase. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
28. Martín-Pintado, N. *et al.* Dramatic effect of furanose C2' substitution on structure and stability: directing the folding of the human telomeric quadruplex with a single fluorine atom. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 5344–5347 (2013).
29. Christiansen, M. E. & Znosko, B. M. Thermodynamic characterization of the complete set of sequence symmetric tandem mismatches in RNA and an improved model for predicting the free energy contribution of sequence asymmetric tandem mismatches. *Biochemistry* **47**, 4329–4336 (2008).
30. Gutell, R. R. Collection of small subunit (16S- and 16S-like) ribosomal RNA structures: 1994. *Nucleic Acids Res.* **22**, 3502–3507 (1994).
31. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905–920 (2000).
32. Gutell, R. R., Gray, M. W. & Schnare, M. N. A compilation of large subunit (23S and 23S-like) ribosomal RNA structures: 1993. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3055–3074 (1993).

BIBLIOGRAFIA

33. Gutell, R. R. & Woese, C. R. Higher order structural elements in ribosomal RNAs: Pseudo-knots and the use of noncanonical pairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 663–667 (1990).
34. Shi, P. Y., Brinton, M. A., Veal, J. M., Zhong, Y. Y. & Wilson, W. D. Evidence for the existence of a pseudoknot structure at the 3' terminus of the flavivirus genomic RNA. *Biochemistry* **35**, 4222–4230 (1996).
35. DeNap, J. C. B., Thomas, J. R., Musk, D. J. & Hergenrother, P. J. Combating drug-resistant bacteria: Small molecule mimics of plasmid incompatibility as antiplasmid compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15402–15404 (2004).
36. Sobczak, K., de Mezer, M., Michlewski, G., Krol, J. & Krzyzosiak, W. J. RNA structure of trinucleotide repeats associated with human neurological diseases. *Nucleic Acids Res.* **31**, 5469–5482 (2003).
37. Zhang, J., Zhang, G., Guo, R., Shapiro, B. A. & Simon, A. E. A pseudoknot in a preactive form of a viral RNA is part of a structural switch activating minus-strand synthesis. *J. Virol.* **80**, 9181–9191 (2006).
38. Christiansen, M. E. & Znosko, B. M. Thermodynamic characterization of tandem mismatches found in naturally occurring RNA. *Nucleic Acids Res.* **37**, 4696–4706 (2009).
39. Wright, D. J., Rice, J. L., Yanker, D. M. & Znosko, B. M. Nearest neighbor parameters for inosine·uridine pairs in RNA duplexes. *Biochemistry* **46**, 4625–4634 (2007).
40. Siegfried, N. A., Metzger, S. L. & Bevilacqua, P. C. Folding cooperativity in RNA and DNA is dependent on position in the helix. *Biochemistry* **46**, 172–181 (2007).
41. Longfellow, C. E., Kierzek, R. & Turner, D. H. Thermodynamic and spectroscopic study of bulge loops in oligoribonucleotides. *Biochemistry* **29**, 278–285 (1990).
42. Badhwar, J., Karri, S., Cass, C. K., Wunderlich, E. L. & Znosko, B. M. Thermodynamic characterization of RNA duplexes containing naturally occurring 1 × 2 nucleotide internal loops. *Biochemistry* **46**, 14715–14724 (2007).
43. Mathews, D. H. Revolutions in RNA secondary structure prediction. *Journal of Molecular Biology* **359**, 526–532 (2006).
44. Kennedy, S. D., Kierzek, R. & Turner, D. H. Novel conformation of an RNA structural switch. *Biochemistry* **51**, 9257–9259 (2012).
45. Hammond, N. B., Tolbert, B. S., Kierzek, R., Turner, D. H. & Kennedy, S. D. RNA internal loops with tandem AG pairs: The structure of the 5'GAGU/3'UGAG loop can be dramatically different from others, including 5'AAGU/3'UGAA. *Biochemistry* **49**, 5817–5827 (2010).
46. Sripakdeevong, P. *et al.* Structure determination of noncanonical RNA motifs guided by 1 H NMR chemical shifts. *Nat. Methods* **11**, 413–416 (2014).
47. Spasic, A. *et al.* Molecular dynamics correctly models the unusual major conformation of the GAGU RNA internal loop and with NMR reveals an unusual minor conformation. *RNA* **24**, 656–672 (2018).
48. Boccaletto, P. *et al.* MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Res.* **46**, D303–D307 (2018).

BIBLIOGRAFIA

49. The RNA Modification Database. Dostępne na: <https://mods.rna.albany.edu/>. (Data dostępu: 16. września 2019r).
50. Devi, G., Yuan, Z., Lu, Y., Zhao, Y. & Chen, G. Incorporation of thio-pseudoisocytosine into triplex-forming peptide nucleic acids for enhanced recognition of RNA duplexes. *Nucleic Acids Res.* **42**, 4008–4018 (2014).
51. Toh, D. F. K. *et al.* Incorporating a guanidine-modified cytosine base into triplex-forming PNAs for the recognition of a C-G pyrimidine-purine inversion site of an RNA duplex. *Nucleic Acids Res.* **44**, 9071–9082 (2016).
52. Gyi, J. I. *et al.* The solution structure of a DNA·RNA duplex containing 5-propynyl U and C; comparison with 5-Me modifications. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2683–2693 (2003).
53. Freier, S. The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure-stability studies on chemically-modified DNA:RNA duplexes. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4429–4443 (1997).
54. Ziomek, K., Kierzek, E., Biała, E. & Kierzek, R. The thermal stability of RNA duplexes containing modified base pairs placed at internal and terminal positions of the oligoribonucleotides. *Biophys. Chem.* **97**, 233–241 (2002).
55. Thibaudeau, C., Plavec, J., Garg, N., Papchikhin, A. & Chattopadhyaya, J. How does the electronegativity of the substituent dictate the strength of the gauche effect? *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 4038–4043 (1994).
56. Sági, J. *et al.* Base-modified oligodeoxynucleotides. I. effect of 5-alkyl, 5-(1-alkenyl) and 5-(1-alkynyl) substitution of the pyrimidines on duplex stability and hydrophobicity. *Tetrahedron Lett.* **34**, 2191–2194 (1993).
57. Znosko, B. M., Barnes, T. W., Krugh, T. R. & Turner, D. H. NMR studies of DNA single strands and DNA:RNA hybrids with and without 1-propynylation at C5 of oligopyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6090–6097 (2003).
58. Buhr, C. A., Wagner, R. W., Grant, D. & Froehler, B. C. Oligodeoxynucleotides containing C-7 propyne analogs of 7-deaza-2'-deoxyguanosine and 7-deaza-2'-deoxyadenosine. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2974–2980 (1996).
59. Seela, F. & Thomas, H. Duplex Stabilization of DNA: Oligonucleotides containing 7-substituted 7-deazaadenines. *Helv. Chim. Acta* **78**, 94–108 (1995).
60. Tavale, S. S. & Sobell, H. M. Crystal and molecular structure of 8-bromoguanosine and 8-bromoadenosine, two purine nucleosides in the syn conformation. *J. Mol. Biol.* **48**, 109–123 (1970).
61. Pless, R., Dudycz, L., Stolarski, R. & Shugar, D. Purine nucleosides and nucleotides unequivocally in the syn conformation: Guanosine and 5'-GMP with 8-tert-butyl and 8-(α -hydroxyisopropyl) substituents. *Z. Naturforsch* **33**, 902–907 (1978).
62. Chen, L. S. & Sheppard, T. L. Synthesis and hybridization properties of RNA containing 8-chloroadenosine. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **21**, 599–617 (2002).
63. Proctor, D. J. *et al.* Folding thermodynamics and kinetics of YNMG RNA hairpins: Specific incorporation of 8-bromoguanosine leads to stabilization by enhancement of the folding rate. *Biochemistry* **43**, 14004–14014 (2004).

BIBLIOGRAFIA

64. Proctor, D. J., Kierzek, E., Kierzek, R. & Bevilacqua, P. C. Restricting the conformational heterogeneity of RNA by specific incorporation of 8-bromoguanosine. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 2390–2391 (2003).
65. Yajima, R., Proctor, D. J., Kierzek, R., Kierzek, E. & Bevilacqua, P. C. A conformationally restricted guanosine analog reveals the catalytic relevance of three structures of an RNA enzyme. *Chem. Biol.* **14**, 23–30 (2007).
66. Hoshika, S. *et al.* Hachimoji DNA and RNA: A genetic system with eight building blocks. *Science* **363**, 884–887 (2019).
67. Obika, S. *et al.* 2'-O,4'-C-methylene bridged nucleic acid (2',4'-BNA): synthesis and triplex-forming properties. *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 1001–1011 (2001).
68. Koshkin, A. A. *et al.* LNA (locked nucleic acid): An RNA mimic forming exceedingly stable LNA:LNA duplexes. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 13252–13253 (1998).
69. Owczarzy, R., You, Y., Groth, C. L. & Tataurov, A. V. Stability and mismatch discrimination of locked nucleic acid-DNA duplexes. *Biochemistry* **50**, 9352–9367 (2011).
70. Kierzek, E. *et al.* The influence of locked nucleic acid residues on the thermodynamic properties of 2'-O-methyl RNA/RNA heteroduplexes. *Nucleic Acids Res.* **33**, 5082–93 (2005).
71. Morita, K. *et al.* 2'-O, 4'-C-Ethylene-bridged nucleic acids (ENA) with nuclease-resistance and high affinity for RNA. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1**, 241–242 (2001).
72. Rahman, S. M. A. *et al.* Highly stable pyrimidine-motif triplex formation at physiological pH values by a bridged nucleic acid analogue. *Angew. Chemie Int. Ed.* **46**, 4306–4309 (2007).
73. Obika, S., Morio, K. I., Hari, Y. & Imanishi, T. Facile synthesis and conformation of 3'-O,4'-C-methyleneribonucleosides. *Chem. Commun.* 2423–2424 (1999). doi:10.1039/a907218g
74. Osaki, T. *et al.* Development of a novel nucleoside analogue with S-type sugar conformation: 2'-deoxy-trans-3',4'-bridged nucleic acids. *Tetrahedron* **63**, 8977–8986 (2007).
75. Kodama, T. *et al.* Design, synthesis, and evaluation of a novel bridged nucleic acid, 2',5'-BNAON, with S-type sugar conformation fixed by N-O linkage. *Tetrahedron* **65**, 2116–2123 (2009).
76. Martín-Pintado, N. *et al.* The solution structure of double helical arabino nucleic acids (ANA and 2'F-ANA): effect of arabinoses in duplex-hairpin interconversion. *Nucleic Acids Res.* **40**, 9329–9339 (2012).
77. Anzahaee, M. Y., Watts, J. K., Alla, N. R., Nicholson, A. W. & Damha, M. J. Energetically Important C–H···F–C Pseudohydrogen Bonding in Water: Evidence and Application to Rational Design of Oligonucleotides with High Binding Affinity. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 728–731 (2011).
78. Kruger, K. *et al.* Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena. *Cell* **31**, 147–157 (1982).

BIBLIOGRAFIA

79. Cech, T. R. Self-splicing of group I introns. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 543–568 (1990).
80. Weinberg, Z. *et al.* New classes of self-cleaving ribozymes revealed by comparative genomics analysis. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 606–610 (2015).
81. Ren, A. *et al.* Pistol ribozyme adopts a pseudoknot fold facilitating site-specific in-line cleavage. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 702–708 (2016).
82. Harris, K. A., Lünse, C. E., Li, S., Brewer, K. I. & Breaker, R. R. Biochemical analysis of pistol self-cleaving ribozymes. *RNA* **21**, 1852–8 (2015).
83. Zaher, H. S. & Unrau, P. J. Selection of an improved RNA polymerase ribozyme with superior extension and fidelity. *RNA* **13**, 1017–26 (2007).
84. Johnston, W. K., Unrau, P. J., Lawrence, M. S., Glasner, M. E. & Bartel, D. P. RNA-catalyzed RNA polymerization: Accurate and general RNA-templated primer extension. *Science* **292**, 1319–1325 (2001).
85. Green, R. & Lorsch, J. R. The path to perdition is paved with protons. *Cell* (2002). doi:10.1016/S0092-8674(02)00965-0
86. Fedor, M. J. & Williamson, J. R. The catalytic diversity of RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 399–412 (2005).
87. Osborne, S. E. & Ellington, A. D. Nucleic acid selection and the challenge of combinatorial chemistry. *Chem. Rev.* **97**, 349–370 (1997).
88. Tucker, B. J. & Breaker, R. R. Riboswitches as versatile gene control elements. *Current Opinion in Structural Biology* **15**, 342–348 (2005).
89. Jiang, F., Kumar, R. A., Jones, R. A. & Patel, D. J. Structural basis of RNA folding and recognition in an AMP-RNA aptamer complex. *Nature* **382**, 183–186 (1996).
90. Dieckmann, T., Suzuki, E., Nakamura, G. K. & Feigon, J. Solution structure of an ATP-binding RNA aptamer reveals a novel fold. *RNA* **2**, 628–40 (1996).
91. Dieckmann, T., Butcher, S. E., Sassanfar, M., Szostak, J. W. & Feigon, J. Mutant ATP-binding RNA aptamers reveal the structural basis for ligand binding. *J. Mol. Biol.* **273**, 467–478 (1997).
92. Sassanfar, M. & Szostak, J. W. An RNA motif that binds ATP. *Nature* **364**, 550–553 (1993).
93. Flinders, J. *et al.* Recognition of planar and nonplanar ligands in the malachite green-RNA aptamer complex. *Chembiochem* **5**, 62–72 (2004).
94. Jenison, R. D., Gill, S. C., Pardi, A. & Polisky, B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* **263**, 1425–1429 (1994).
95. Zimmermann, G. R., Wick, C. L., Shields, T. P., Jenison, R. D. & Pardi, A. Molecular interactions and metal binding in the theophylline-binding core of an RNA aptamer. *RNA* **6**, 659–67 (2000).
96. Batey, R. T., Gilbert, S. D. & Montange, R. K. Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature* **432**, 411–415 (2004).
97. Smith, K. D. *et al.* Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1218–1223 (2009).

BIBLIOGRAFIA

98. Smith, K. D., Lipchock, S. V., Livingston, A. L., Shanahan, C. A. & Strobel, S. A. Structural and biochemical determinants of ligand binding by the c-di-GMP riboswitch. *Biochemistry* **49**, 7351–7359 (2010).
99. Julien, K. R., Sumita, M., Chen, P. H., Laird-Offringa, I. A. & Hoogstraten, C. G. Conformationally restricted nucleotides as a probe of structure function relationships in RNA. *RNA* **14**, 1632–1643 (2008).
100. Forster, A. C. & Symons, R. H. Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell* **49**, 211–220 (1987).
101. Epstein, L. M. & Gall, J. G. Self-cleaving transcripts of satellite DNA from the newt. *Cell* **48**, 535–543 (1987).
102. Martick, M., Horan, L. H., Noller, H. F. & Scott, W. G. A discontinuous hammerhead ribozyme embedded in a mammalian messenger RNA. *Nature* **454**, 899–902 (2008).
103. De La Peña, M. & García-Robles, I. Intronic hammerhead ribozymes are ultraconserved in the human genome. *EMBO Rep.* **11**, 711–716 (2010).
104. De La Peña, M. & García-Robles, I. Ubiquitous presence of the hammerhead ribozyme motif along the tree of life. *RNA* **16**, 1943–1950 (2010).
105. Perreault, J. *et al.* Identification of hammerhead ribozymes in all domains of life reveals novel structural variations. *PLoS Comput. Biol.* **7**, e1002031 (2011).
106. Martick, M. & Scott, W. G. Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell* **126**, 309–320 (2006).
107. De la Peña, M., Gago, S. & Flores, R. Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. *EMBO J.* **22**, 5561–5570 (2003).
108. Saksmerprome, V., Roychowdhury-Saha, M., Jayasena, S., Khvorova, A. & Burke, D. H. Artificial tertiary motifs stabilize trans-cleaving hammerhead ribozymes under conditions of submillimolar divalent ions and high temperatures. *RNA* **10**, 1916–1924 (2004).
109. Carbonell, A., Flores, R. & Gago, S. Trans-cleaving hammerhead ribozymes with tertiary stabilizing motifs: In vitro and in vivo activity against a structured viroid RNA. *Nucleic Acids Res.* **39**, 2432–2444 (2011).
110. Przybilski, R. & Hammann, C. The hammerhead ribozyme structure brought in line. *ChemBioChem* **7**, 1641–1644 (2006).
111. O'Rourke, S. M., Estell, W. & Scott, W. G. Minimal hammerhead ribozymes with uncompromised catalytic activity. *J. Mol. Biol.* **427**, 2340–2347 (2015).
112. Blount, K. F. & Uhlenbeck, O. C. The structure-function dilemma of the hammerhead ribozyme. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**, 415–440 (2005).
113. Nelson, J. A. & Uhlenbeck, O. C. Minimal and extended hammerheads utilize a similar dynamic reaction mechanism for catalysis. *RNA* **14**, 43–54 (2008).
114. Tuschl, T., Ng, M. M. P., Pieken, W., Benseler, F. & Eckstein, F. Importance of exocyclic base functional groups of central core guanosines for hammerhead ribozyme activity. *Biochemistry* **32**, 11658–11668 (1993).
115. Uesugi, S., Miki, H., Ikehara, M., Iwahashi, H. & Kyogoku, Y. A linear relationship

BIBLIOGRAFIA

- between electronegativity of 2'-substituents and conformation of adenine nucleosides. *Tetrahedron Lett.* **20**, 4073–4076 (1979).
116. Plavec, J., Thibaudeau, C. & Chattopadhyaya, J. How does the 2'-hydroxy group drive the pseudorotational equilibrium in nucleoside and nucleotide by the tuning of the 3'-gauche effect? *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 6558–6560 (1994).
117. Howell, Henry G.; Brodfuehrer, Paul R.; Benigni, Daniel A.; Sapino, C. J. . *Antiviral Nucleosides. A stereospecific, total synthesis of 2'-fluoro-2'-deoxy-b-D-arabinofuranosyl nucleosides.* *J. Org. Chem* **53**, (1988).
118. Tann, C. H., Brodfuehrer, P. R., Brundidge, S. P., Sapino, C. & Howell, H. G. Fluorocarbohydrates in synthesis. An efficient synthesis of 1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)-5-iodouracil (β -FIAU) and 1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)thymine (β -FMAU). *J. Org. Chem.* **50**, 3644–3647 (1985).
119. Reichman, U., Watanabe, K. A. & Fox, J. J. A practical synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-D-arabinofuranose derivatives. *Carbohydr. Res.* **42**, 233–40 (1975).
120. Pankiewicz, K. W., Krzeminski, J. & Watanabe, K. A. Synthesis of 2'- β -fluoro- and 3'- α -fluoro-substituted guanine nucleosides. Effects of sugar conformational shifts on nucleophilic displacement of the 2'-hydroxy and 3'-hydroxy group with DAST. *Nat. Acad. Sci. U.S.A* **57**, 7315–7321 (1992).
121. Pankiewicz, K. W., Krzeminski, J., Ciszewski, L. A., Ren, W. Y. & Watanabe, K. A. A synthesis of 9-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)adenine and hypoxanthine. An effect of C3'-endo to C2'-endo conformational shift on the reaction course of 2'-hydroxyl group with DAST. *J. Org. Chem.* **57**, 553–559 (1992).
122. Markiewicz, W. T., Biała, E. & Kierzek, R. Application of the tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl group in the chemical synthesis of oligoribonucleotides. *Bull. Polish Acad. Sci.* **32**, 11–12 (1984).
123. Gładysz, M., Andrałojć, W., Czapik, T., Gdaniec, Z. & Kierzek, R. Thermodynamic and structural contributions of the 6-thioguanosine residue to helical properties of RNA. *Sci. Rep.* **9**, 4385 (2019).
124. Fürtig, B., Richter, C., Wöhnert, J. & Schwalbe, H. NMR spectroscopy of RNA. *ChemBioChem* **4**, 936–962 (2003).
125. Citti, L. & Rainaldi, G. Synthetic hammerhead ribozymes as therapeutic tools to control disease genes. *Curr. Gene Ther.* **5**, 11–24 (2012).
126. Fedoruk-Wyszomirska, A. *et al.* Inhibition of HIV-1 gp41 expression with hammerhead ribozymes. *Biochem. J.* **471**, 53–66 (2015).
127. Belter, A. *et al.* Inhibition of MIR-21 in glioma cells using catalytic nucleic acids. *Sci. Rep.* **6**, 24516 (2016).
128. Hendrix, D. K., Brenner, S. E. & Holbrook, S. R. RNA structural motifs: building blocks of a modular biomolecule. *Q. Rev. Biophys.* **38**, 221–243 (2005).
129. Chi, Y. I. *et al.* Capturing hammerhead ribozyme structures in action by modulating general base catalysis. *PLoS Biol.* **6**, 2060–2068 (2008).

BIBLIOGRAFIA

130. Piasecka, J. *et al.* RNA secondary structure motifs of the influenza A virus as targets for siRNA-mediated RNA interference. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **19**, 627–642 (2020).
131. Sheldrick, G. M. SHELXT - Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **71**, 3–8 (2015).
132. Sheldrick, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **71**, 3–8 (2015).
133. Parsons, S., Flack, H. D. & Wagner, T. Use of intensity quotients and differences in absolute structure refinement. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* **69**, 249–259 (2013).

DOROBEK NAUKOWY

Publikacje:

Gładysz M., Andrałójć W., Czapik T., Gdaniec Z., Kierzek R. Thermodynamic and structural contributions of the 6-thioguanosine residue to helical properties of RNA
Scientific Reports 9, 4385 (2019)

Kotkowiak W., Czapik T., Pasternak A. Novel isoguanosine derivative of unlocked nucleic acid – Investigations of thermodynamics and biological potential of modified thrombin binding aptamer *PLoS ONE* 13(5) (2018)

Szabat M., Pedzinski T., Czapik T., Kierzek E., Kierzek R. Structural aspects of the antiparallel and parallel duplexes formed by DNA, 2'-O-methyl RNA and RNA oligonucleotides *PLoS ONE* 10(11) (2015)

Doniesienia konferencyjne

Czapik Tomasz, Kierzek Ryszard “Modified hammerhead ribozyme with guanosine derivatives”

6th European Chemical Biology Symposium Madryt (Hiszpania) 3-5 kwietnia 2019r.

Czapik Tomasz “Chemical modifications of hammerhead ribozyme”

Konferencja Poznańskiego Konsorcjum RNA – KNOW Obrzycko 24-26 września 2018r.

Czapik Tomasz, Kierzek Ryszard „Influence of conformationally restricted nucleosides on model RNAs structure”

23rd Annual RNA meeting Berkeley (Kalifornia, USA) 29 maja - 3 czerwca 2018r.

Czapik Tomasz “From *North to South* through *syn* and *anti* conformationally restricted nucleosides in model functional RNAs”

Konferencja Poznańskiego Konsorcjum RNA – KNOW Obrzycko 27-29 września 2017r.

Czapik Tomasz, Gładysz Michał, Kierzek Ryszard „2'-deoksy-2'-fluoroarabinonukleozydy – synteza konformacyjnie zdefiniowanych analogów guanozyny.”

59 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Poznań 19-23 września 2016r.

Czapik Tomasz, Szabat Marta, Kierzek Ryszard „New approach in synthesis of 2'-fluoro-2'-deoxyarabinoguanosine as conformationally defined nucleoside for RNA structure and function study.”

Symbioza V. Międzyuczelniane Sympozjum Biotechnologiczne. Warszawa 22-24 kwietnia 2016r.

Projekty badawcze

MAESTRO NCN – „Strukturalnie zdefiniowane oligonukleotydy. Badania struktury oraz uwarunkowań strukturalnych oddziaływań i funkcji RNA” – wykonawca (2014-2019)

SONATA NCN – „Nowe 3,8-dipodstawione analogi nukleozydów purynowych o potencjalnym zastosowaniu w badaniach strukturalnych i aktywności biologicznej kwasów nukleinowych” – wykonawca (2015)

Grant badawczy służący rozwojowi młodych naukowców IChB PAN 2017 – „Wpływ modyfikacji nukleozydów purynowych na strukturę i termodynamikę modelowych RNA” – kierownik

Grant badawczy służący rozwojowi młodych naukowców IChB PAN 2018 – „Badanie wpływu konformacyjnie zdeterminowanych nukleotydów na aktywność rybozomu typu hammerhead, jako narzędzia biotechnologiczne inibicji namnażania wirusa grypy” – kierownik