

Uniwersytet Warszawski

Wydział Chemii



**Marzena Jankowska - Anyszka**

**Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych  
w związku z ubieganiem się o nadanie stopnia doktora habilitowanego**

Warszawa, wrzesień 2012

## SPIS TREŚCI

1. Imię i nazwisko	str. 2
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe	str. 2
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	str. 2
4. Podsumowanie bibliometryczne dorobku naukowego	str. 2
5. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)	str. 3
5.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	str. 3
5.2. Publikacje tworzące jednotematyczny cykl publikacji	str. 3
5.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	str. 4
6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	str. 18

## 1. IMIĘ I NAZWISKO

Marzena Jankowska-Anyszka

## 2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE – Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA, ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

doktor nauk chemicznych, Warszawa, 12.04.2000

tytuł rozprawy: Synteza, badania fizykochemiczne i biologiczne analogów 5'-końca mRNA i U snRNA

promotor: prof. dr hab. Andrzej Temeriusz

## 3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

1988 – 2000 Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, samodzielny pracownik inżynieryjno-techniczny

2000 – Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, adiunkt

## 4. PODSUMOWANIE BIBLIOMETRYCZNE DOROBKU NAUKOWEGO

(według bazy Journal Citation Report):

Sumaryczna liczba publikacji	44
W tym po uzyskaniu stopnia doktora	27
Sumaryczny Impact Factor <small>według roku opublikowania</small>	181
W tym po uzyskaniu stopnia doktora	102
Sumaryczna liczba cytowań (bez autocytowań)	951
Indeks Hirscha	16

Jednotematyczny cykl publikacji obejmuje 8 prac opublikowanych w czasopiśmie z bazy Journal Citation Report o sumarycznym IF 33.

## 5. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 r. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.)

### 5.1 Tytuł osiągnięcia naukowego:

Synteza analogów końca 5' mRNA kluczowych w badaniach nad mechanizmami procesów ekspresji genów u eukariotów

### 5.2 Publikacje tworzące jednotematyczny cykl publikacji opublikowane w czasopismach z bazy Journal Citation Reports

(gwiazdką oznaczono autorstwo korespondencyjne habilitantki):

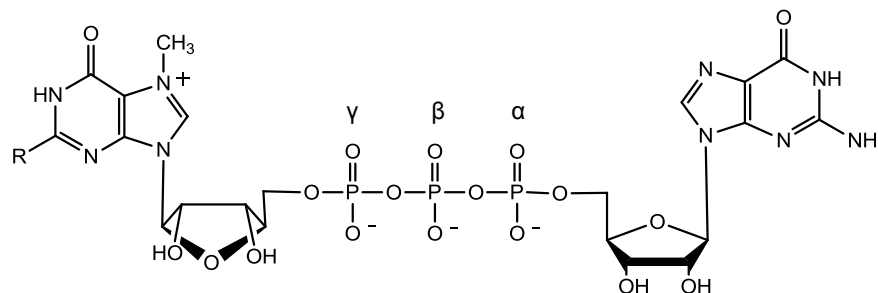
- H1. Worch R, **Jankowska-Anyszka M**, Niedzwiecka A, Stepinski J, Mazza C, Darzynkiewicz E, Cusack S, Stolarski R. (2009): Diverse role of three tyrosines in binding of the RNA 5' cap to the human nuclear Cap Binding Complex, *Journal of Molecular Biology* 385, 618-627. IF 3.871
- H2. Benarroch D, **Jankowska-Anyszka M**, Stepinski J, Darzynkiewicz E, Shuman S. (2010): Cap analog substrates reveal three clades of cap guanine-N2 methyltransferases with distinct methyl acceptor specificities, *RNA* 16 (1): 211-220. IF 6.051
- H3. **Jankowska-Anyszka M.\***, Piecyk K., Samonina-Kosicka J. (2011): Synthesis of a new class of ribose functionalized dinucleotide cap analogues for biophysical studies on interaction of cap-binding proteins with the 5' end of mRNA, *Organic and Biomolecular Chemistry* (15): 5564-5572. IF 3.696
- H4. **Jankowska-Anyszka M.\***, Piecyk K. (2011): Dinucleotide cap analogue affinity resins for purification of proteins that specifically recognize the 5' end of mRNA, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 21 (20): 6131-6134. IF 2.554
- H5. Liu W.Z., **Jankowska-Anyszka M.**, Piecyk K., Dickson L., Wallace A., Niedzwiecka A., Stepinski J., Stolarski R., Darzynkiewicz E., Kieft J., Zhao R., Jones D.N.M., Davis R.E. (2011): Structural basis for nematode eIF4E binding an m(2,2,7)G-Cap and its implications for translation initiation, *Nucleic Acids Research* 39 (20): 8820-8832. IF 8.026
- H6. Piecyk K., Davis R.E., **Jankowska-Anyszka M.\*** (2012): 5'-Terminal chemical capping of spliced leader RNAs, *Tetrahedron Letters* 53: 4843-4847. IF 2.683
- H7. Piecyk K., Davis R.E., **Jankowska-Anyszka M.\*** (2012): Synthesis of <sup>13</sup>C- and <sup>14</sup>C-labeled dinucleotide mRNA cap analogues for structural and biochemical studies, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 22: 4391-4395. IF 2.554
- H8. Piecyk K., Davis R.E., **Jankowska-Anyszka M.\*** (2012): Synthesis of N<sup>2</sup>-modified 7-methylguanosine 5'-monophosphates as nematode translation inhibitors, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 20: 4781-4789. IF 2.921

### 5.3 Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

(numery prac z literą H odnoszą się do spisu publikacji na str. 3, zaś cytowane prace oznaczone literą D odnoszą się do spisu publikacji na str. 25, stanowiących dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora)

#### Ogólne przedstawienie tematyki i głównego celu prac

Transkrypty polimerazy RNA II organizmów eukariotycznych: mRNA (informacyjny RNA) i U snRNA (małe jądrowe RNA bogate w urydynę), posiadają na swoim końcu 5' charakterystyczną strukturę zwaną kapem. Tworzy ją 7-metyloguanozyna połączona nietypowym dla kwasów nukleinowych wiązaniem 5',5'-trifosforanowym z pierwszym transkrybowanym nukleotydem ( $m^7GpppN$ , gdzie N - dowolny nukleotyd; monometyloguanozyno kap, w skrócie MMG kap). Dość szczególny przypadek stanowi mRNA nicieni, między innymi *Caenorhabditis elegans* czy glisty świńskiej *Ascaris suum*. Ponad 70% populacji ich cząsteczek posiada na swoim końcu 5' hipermetylowaną wersję kapu, zawierającą  $N^2,N^2,7$ -trimetyloguanozynę ( $m_3^{2,2,7}GpppN$ , gdzie N - dowolny nukleotyd; trimetyloguanozyno kap, w skrócie TMG kap).



R=NH<sub>2</sub>, monometyloguanozyno kap, MMG

R=N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, trimetyloguanozyno kap, TMG

**Rys. 1** Struktura 5' końca mRNA (kapu)

Struktura MMG kapu powstaje w jądrze komórkowym na wczesnym etapie transkrypcji w wyniku trzech następujących po sobie reakcji enzymatycznych: usunięcia 5'-końcowego  $\gamma$ -fosforanu oligonukleotydu, przeniesienia GMP z GTP z utworzeniem wiązania 5',5'-trifosforanowego i transferu grupy metylowej katalizowanego przez (guanino-7) metylotransferazę. Powstała struktura MMG kapu pełni wiele ważnych funkcji na różnych etapach ekspresji genów, które realizowane są poprzez jej oddziaływanie z odpowiednimi białkami. W jądrze komórkowym kap rozpoznawany jest przez białkowy kompleks CBC (ang. cap-binding complex) i

poprzez to oddziaływanie bierze udział w dojrzewaniu pre-RNA aktywując splicing pre-mRNA oraz wspomagając tworzenie końca 3' mRNA. Kompleks kap-CBC bierze również udział w nukleocytoplazmatycznym transporcie małych, jądrowych snRNA klasy U. Ich cząsteczki ulegają w cytoplazmie hipermetylacji w obrębie kapu w wyniku której, na końcu 5' tworzy się trimetyloguanozyno kap. TMG kap jest czynnikiem sygnałnym dla importu dojądrowego kompleksów rybonukleoproteinowych U snRNP (U snRNA+białka), które biorą następnie udział w procesie splicingu pre-mRNA.

W przypadku mRNA, ich 5'-końcowa struktura MMG kapu jest rozpoznawana w cytoplazmie na wczesnym etapie inicjacji translacji przez białko eIF4E (ang. eukaryotic initiation factor 4E) i poprzez to oddziaływanie mRNA włączany jest do kompleksu inicjującego, powstanie którego jest niezbędne do biosyntezy łańcucha polipeptydowego. Etap ten, z racji na niewielką zawartość białka eIF4E w komórkach, limituje szybkość całego procesu translacji, przez co jest dogodnym punktem działania mechanizmów regulacyjnych. Kolejną istotną funkcją kapu jest ochrona mRNA przez okres całego jego życia w komórce przed 5'-egzonukleolityczną degradacją. Oczywiście jest, że z racji na rolę i udział w kontroli różnych procesów składających się na ekspresję informacji genetycznej, los tej struktury musi podlegać ścisłej kontroli. W komórkach eukariotycznych istnieją dwie główne drogi degradacji mRNA (w kierunku 5' do 3' i odwrotnie), podczas których kap usuwany jest w wyniku działania odpowiednich enzymów: DcpS (degradacja w kierunku 3' do 5', enzym hydrolizuje wiązanie 5',5'-trifosforanowe między  $\beta$  i  $\gamma$  fosforanem) i Dcp1/Dcp2 (degradacja w kierunku 5' do 3', enzym Dcp2 hydrolizuje wiązanie między  $\alpha$  i  $\beta$  fosforanem).

Od momentu odkrycia struktury kapu w drugiej połowie lat 70 podejmowane są liczne badania mające na celu poznanie molekularnego mechanizmu procesów z jego udziałem i wykorzystania tej wiedzy w celach terapeutycznych. Związane jest to z faktem onkogennej transformacji wielu typów komórek, w których występuje nadekspresja czynnika inicjującego eIF4E i uznania tego białka za dobry cel dla projektowania leków przeciwnowotworowych. Istotnym aspektem badań jest więc poszukiwanie analogów kapu będących efektywnymi inhibitorami translacji.

W prowadzonych badaniach intensywnie wykorzystywane są syntetyczne analogi końca 5' mRNA. W początkowym okresie były to najprostsze analogi mononukleotydydowe: 7-metyloguanozyno-5'-monofosforan, w skrócie  $m^7GMP$ , 7-metyloguanozyno-5'-difosforan, w skrócie  $m^7GDP$  czy 7-metyloguanozyno-5'-trifosforan, w skrócie  $m^7GTP$ . Wraz z postępem badań rozpoczęto syntezę związków coraz bardziej rozbudowanych np. dinukleotydydów takich jak  $P^1$ -7-metyloguanozyno- $P^3$ -guanozyno-5',5'-trifosforan, w skrócie  $m^7GpppG$  oraz analogów mono- i dinukleotydydowych zmodyfikowanych w obrębie poszczególnych fragmentów struktury. Związki takie służą do charakterystyki kompleksów białko-kap metodami: strukturalnymi (krystalografia rentgenowska, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego), biofizycznymi (wygaszanie wewnętrznej fluorescencji białka pod wpływem wiązania analogów kapu, izotermiczne miareczkowanie

kalorymetryczne białka) oraz do wyjaśniania roli biologicznej tych oddziaływań metodami z zakresu biologii molekularnej (*in vitro* i *in vivo*). Przykłady różnych syntetycznych analogów kapu zaprojektowanych i otrzymanych przeze mnie pod kątem takich właśnie badań oraz ich zastosowanie opisane zostanie w dalszej części autoreferatu (pkt. 6).

W oparciu o interdyscyplinarne badania angażujące chemików, biofizyków i biologów molekularnych udało się znacznie pogłębić stan wiedzy dotyczący procesów ekspresji genów i mechanizmów ich regulacji. Jednocześnie na przestrzeni ostatnich lat odkryte zostały liczne nowe białka wiążące kap. Do najważniejszych z nich należą izoformy eukariotycznego czynnika inicjującego translację eIF4E, w tym między innymi występujące w organizmach nicieni, które wykazują zróżnicowaną specyficzność wobec struktury MMG i TMG kapu. Dla podkreślenia faktu, że część izoform białka eIF4E (np. IFE-3 i IFE-4 w nicieniach *Caenorhabditis elegans*) wiąże tylko strukturę MMG kapu, zaś część (np. IFE-1, IFE-2, IFE-5 w *C. elegans* lub eIF4E-3 w *A. suum*) wiąże zarówno MMG jak i TMG kap, faktory te określone zostały mianem białek o podwójnej specyficzności. Przyczyny takiej zróżnicowanej selektywności izoform stanowią zagadkę biorąc pod uwagę, że wszystkie wykryte izoformy wykazują znaczny stopień homologii z ludzkim i mysim białkiem eIF4E oraz między sobą, nie posiadając zarazem systematycznych różnic w sekwencjach aminokwasów istotnych dla oddziaływania z kapem. Zarazem w oparciu o różnego typu badania wiadomo, że struktura TMG kapu jest znacznie gorzej rozpoznawana przez białko eIF4E wyższych eukariotów.

Innymi nowoodkrytymi białkami są m.in. (guanino-N<sup>2</sup>) metylotransferazy odpowiedzialne za metylowanie egzocyklicznej grupy aminowej podczas syntezy TMG kapu, które zostały wyizolowane i wstępnie scharakteryzowane w wielu organizmach oraz enzymy degradujące kap (DcpS) występujące w nicieniach, o odmiennej specyficzności substratowej niż w innych eukariotach.

Z punktu widzenia chemika organika projektowanie i tworzenie nowych syntetycznych analogów kapu jest nierozzerwalnie połączone z wynikami dotychczasowych badań. Wyłaniające się nowe pytania dotyczące podstaw zróżnicowanej specyficzności izoform białka eIF4E z nicieni, czy mechanizmu działania (guanino-N<sup>2</sup>) metylotransferaz, stały się inspiracją do zaprojektowania i syntezy narzędzi chemicznych umożliwiających przeprowadzenie badań z udziałem wyżej wymienionych mało poznanych białek, a zmierzających do poznania ich działania i regulacji.

### **Ogólne uwagi o syntezie analogów kapu**

Od momentu otrzymania najprostszych mononukleotydowych analogów kapu (m.in. m<sup>7</sup>GMP) w latach siedemdziesiątych zeszłego stulecia metody syntezy analogów tak mono- jak i dinukleotydowych rozwijały się. Pozostaje jednak ciągle aktualne, że obok metod uniwersalnych, które można zastosować w odniesieniu do

różnych nukleozydów czy nukleotydów (np. fosforylacja nukleozydów w pozycji 5' metodą Yoshikawy), istnieje spora grupa metod, które działają lepiej, gorzej lub wcale, w odniesieniu do konkretnych związków (np. jest wiele metod otrzymywania 5'-trifosforanów nukleozydów, ale żadna z nich nie ma charakteru uniwersalnego). Ze względu na to, testowanie różnych metod lub praca nad ich, niekiedy znaczną, modyfikacją, jest więc koniecznością.

Kolejnym problemem jest rozpuszczalność nukleotydów: z reguły dobra w wodzie, natomiast zła w rozpuszczalnikach organicznych. Większość reakcji stosowanych w przypadku otrzymywania analogów kapu jest prowadzona w rozpuszczalnikach organicznych (często bezwodnych), co wymaga czasochłonnych zabiegów przeprowadzania substratów nukleotydu w sole organiczne. Stosuje się sole amoniowe utworzone w reakcji z aminami trzeciorzędowymi takimi jak tri-*n*-oktyloamina, tri-*n*-butyloamina lub trietyloamina. Czynnikiem, który dodatkowo negatywnie wpływa na rozpuszczalność jest obecność w strukturze kapu grupy metylowej w pozycji 7 guanozyny, powodującej wygenerowanie dodatniego ładunku w pierścieniu imidazolowym guaniny, zmniejszającego rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych. Kolejną trudnością do przewyciężenia jest zmniejszona trwałość związków zawierających 7-metyloguaninę. Wiadomo, że pierścień imidazolowy tego związku w środowisku alkalicznym ulega degradacji, natomiast w środowisku kwaśnym rozpada się wiązanie N-glikozydowe łączące zasadę azotową z cukrem. Stwarza to zatem spore ograniczenie w doborze grup zabezpieczających, środowiska reakcji, a także warunków rozdziału i oczyszczania produktów.

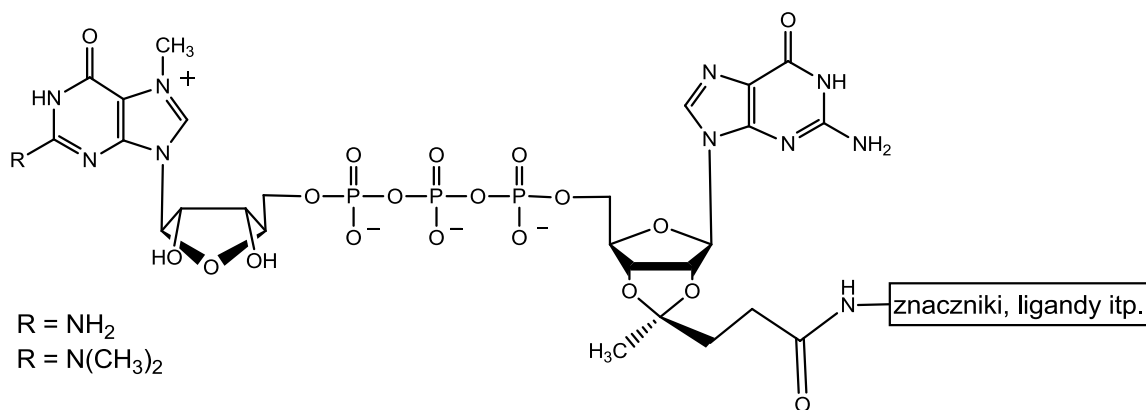
Izolowanie i oczyszczanie związków pośrednich, jak i finalnych, w przypadku syntezy analogów kapu jest zazwyczaj czasochłonne i kłopotliwe. W wyniku reakcji uzyskiwane są złożone mieszaniny związków, często o dość podobnych właściwościach fizykochemicznych, co uniemożliwia zastosowanie prostych metod wyodrębniania produktu, tj. wytrącanie, krystalizacja czy ekstrakcja. Wydzielenie pożądanego związku z mieszaniny wymaga prawie zawsze zastosowania metod chromatograficznych: chromatografii adsorbcyjnej na silica żelu w przypadku pochodnych nukleotydu, a w przypadku nukleotydów chromatografii jonowymiennej na złożach typu DEAE-Sephadex. Jednak uzyskane w ten sposób produkty często nie wykazują pożądanego stopnia czystości i należy je poddać dodatkowemu oczyszczeniu, najczęściej przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), w układzie faz odwróconych lub jonowymiennej. Ważnym czynnikiem w przypadku metod chromatograficznych jest dobór odpowiednich eleuentów, tak aby związek był otrzymany w postaci soli, których nadmiar można łatwo usunąć z roztworu po rozdziale. Z tego powodu najczęściej stosowane są bufony oparte o wodorowęglan trietyloamoniowy, wodorowęglan amonu czy octan amonu, których łatwo można się pozbyć na drodze destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem, zatężania na wyparce lub liofilizacji. W przypadku związków posiadających 7-metyloguanozynę należy zawsze podjąć działania zabezpieczające przed jej rozkładem np. kontrolować stopień alkalizowania roztworu i temperaturę podczas zatężania. Końcowe produkty reakcji przeprowadza się w sole sodowe, poddaje



finalnej identyfikacji (metodą wysokorozdzielczej spektrometrii mas, oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego  $^1\text{H}$  i  $^{31}\text{P}$ ), a następnie w takiej postaci wykorzystuje do badań biofizycznych i biologicznych.

### Omówienie celów szczegółowych i osiągniętych wyników

W ostatnich latach obserwowane jest wzrastające znaczenie różnych technik biofizycznych w badaniach natury i charakterystyki (m.in. termodynamicznej, kinetycznej) oddziaływań białko-ligand w roztworze. Część metod, które można byłoby zastosować również do badania kompleksów białek wiążących kap ze strukturami końca 5' mRNA, wymagałoby specjalnie zaprojektowanych analogów kapu, posiadających dołączone odpowiednie znaczniki (np. spinowe do spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego lub fluorescencyjne ułatwiające detekcję) lub linkery umożliwiające ich immobilizację na określonym podłożu (np. na powierzchni sensora do powierzchniowego rezonansu plazmonowego SPR). Wychodząc naprzeciw takim potrzebom, postanowiłam zaprojektować i opracować metodę syntezy nowego typu dinukleotydowych analogów kapu, posiadających, użyteczne z punktu widzenia dalszych badań, znaczniki lub linkery.



**Rys. 2** Dinukleotydowe analogi kapu funkcjonalizowane w obrębie rybozy

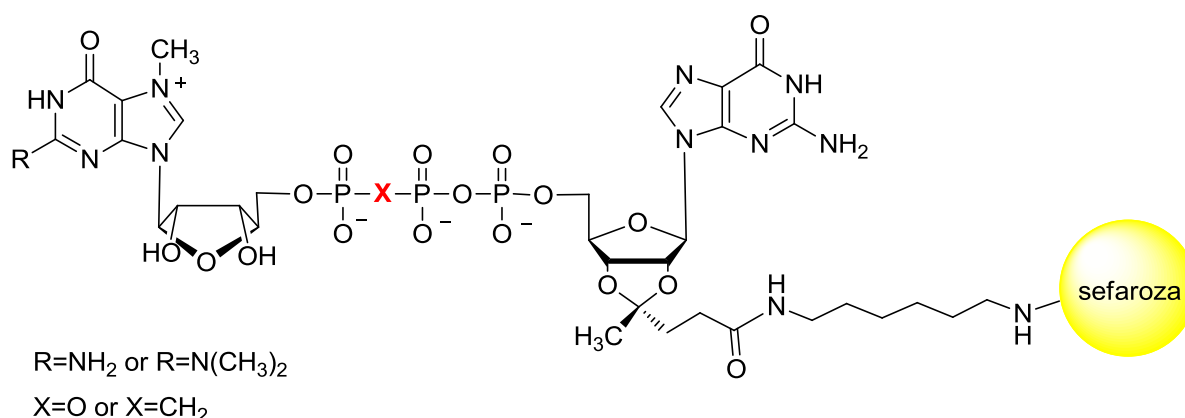
Na podstawie dotychczasowych wyników badań, jako miejsce funkcjonalizacji dinukleotydowego kapu, wybrałam, najmniej zaangażowany w oddziaływanie z białkami, cukier drugiej zasady. Biorąc pod uwagę fakt, że obecny w cukrach, m.in. w rybozie, 2',3'-*cis* diol chętnie tworzy ugrupowanie acetalowe, postanowiłam wykorzystać do cyklizacji kwas lewulinowy, posiadający obok grupy karbonylowej koniecznej do utworzenia acetalu, również grupę karboksylową, której obecność umożliwiałaby dołączenie do dinukleotydu kolejnej cząsteczki odpowiedniego znacznika (Rys. 2). Praca [H3] przedstawia syntezę pierwszych dinukleotydowych analogów kapu z dołączonymi, w obrębie cukru, ligandami i znacznikami. Opisane zostały wydajne metody: funkcjonalizacji guanozyny na drodze reakcji rybozy z lewulinianem etylu, jej przekształcenia w 5'-monofosforan (oznaczany skrótowo jako

LewGMP) a następnie sprzęgania go z drugim nukleotydem ( $m^7\text{GDP}$  lub  $m_3^{2,2,7}\text{GDP}$ ) prowadzące do utworzenia wiązania 5',5'-trifosforanowego i otrzymania dinukleotydocowych analogów MMG i TMG kapu funkcjonalizowanych kwasem lewulinowym ( $m^7\text{GpppG}_{\text{Lew}}$ ,  $m_3^{2,2,7}\text{GpppG}_{\text{Lew}}$ ). W przypadku analogu MMG kapu ( $m^7\text{GpppG}_{\text{Lew}}$ ) zaprezentowano cztery drogi syntezy o porównywalnej wydajności różniące się strategią (aktywacja  $m^7\text{GDP}$  i sprzęganie z LewGMP lub odwrotnie) i warunkami reakcji sprzęgania (w środowisku wodnym lub bezwodnym). W przypadku analogu TMG kapu ( $m_3^{2,2,7}\text{GpppG}_{\text{Lew}}$ ) pokazano, że tylko jedna z dróg (aktywacja LewGMP i sprzęganie z  $m_3^{2,2,7}\text{GDP}$  w środowisku bezwodnym) prowadzi do uzyskania związku z satysfakcjonującą wydajnością. Jednocześnie metoda ta wydaje się również najbardziej uniwersalna, ponieważ wymaga opracowania warunków aktywacji tylko raz, dla LewGMP (co wymagało przeprowadzenia dodatkowych badań, ponieważ związek może potencjalnie ulegać aktywacji nie tylko w obrębie fosforanu, ale też wolnej grupy karboksylowej). W pracy opisano również dołączanie do grupy karboksylowej otrzymanych dinukleotydocowych analogów MMG i TMG kapu ( $m^7\text{GpppG}_{\text{Lew}}$ ,  $m_3^{2,2,7}\text{GpppG}_{\text{Lew}}$ ) kolejnych cząsteczek posiadających grupę aminową, które wybrano pod kątem potencjalnego zastosowania w różnych technikach badawczych. Związkami tymi była: etylenodiamina (wprowadzona do analogu grupa aminowa może być wykorzystana bądź do dalszych reakcji chemicznych bądź bezpośrednio np. do immobilizacji analogu kapu na powierzchni złoża, chipa itp), pochodna biotyny (tworzy kompleksy z awidyną i streptawidyną, co jest wykorzystywane powszechnie w wielu technikach) i 4-amino TEMPO (stabilny rodnik umożliwiający zastosowanie spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego). Warto również podkreślić, że zaproponowana przeze mnie metoda funkcjonalizacji dinukleotydocowych analogów kapu ma charakter uniwersalny i umożliwia w zależności od potrzeb, przyłączenie różnych innych związków (np. znaczników fluorescencyjnych).

Analog monometyloguanozyno kapu sfunkcjonalizowany kwasem lewulinowym z dołączoną etylenodiaminą ( $m^7\text{GpppG}_{\text{Lew-EDA}}$ ), otrzymany przeze mnie przedstawioną powyżej metodą, został wykorzystany do badania oddziaływania z jądrowym kompleksem wiążącym kap CBC metodą powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR) [H1]. Białko to będące heterodimerem rozpoznaje, podobnie jak jego cytoplazmatyczny odpowiednik, faktor eIF4E, monometyloguanozyno kap i poprzez to oddziaływanie odgrywa rolę w wielu procesach ekspresji genów (m.in. w splicingu pre-mRNA, poliadenylacji końca 3' mRNA, transporcie mRNA i U snRNA do cytoplazmy). Biofizyczne podstawy molekularnego mechanizmu rozpoznania kapu przez to białko były celem badań prowadzonych w zespole prof. dr hab. R. Stolarskiego (Zakład Biofizyki, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski). Zakup aparatu Biacore do Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie otworzył możliwość wykorzystania techniki SPR i podjęcia wspólnych badań, podczas których miałam możliwość wykorzystania swoich doświadczeń w pracy na podobnym urządzeniu, zdobytych podczas stażu w laboratorium prof. Roberta Rhoadsa (Louisiana State University Health Science Center, Shreveport,

USA). W przypadku białka CBC konieczne było przygotowanie dinukleotyduowego analogu kapu do immobilizacji na sensorze z racji na fakt, że białko to wymaga do efektywnego wiązania obecności również drugiej zasady kapu [D10]. Zostało to osiągnięte poprzez opisaną powyżej funkcjonalizację dinukleotydu kwasem lewulinowym, a następnie przyłączenie etylenodiaminy, której wolna grupa aminowa została wykorzystana do immobilizacji na powierzchni sensora w postaci karboksymetylowanego dekstranu. Po opracowaniu i optymalizacji warunków immobilizacji otrzymanego związku, zostały przeprowadzone badania wiązania analogu kapu przez białko CBC oraz jego mutanty posiadające zmienioną sekwencję aminokwasową (tyrozyny, kluczowe dla oddziaływań kation- $\pi$  z 7-metyloguanozyną kapu, zastąpione alaniną lub fenyloalaniną). Uzyskane wyniki umożliwiły analizę kinetyki tworzenia kompleksu białko-kap, przyczyniły się do wyjaśnienia roli poszczególnych tyrozyn w oddziaływaniu z kapem i doprowadziły do zaproponowania modelu wiązania mRNA zakończonych kapem z CBC.

Ideę analogów kapu funkcjonalizowanych kwasem lewulinowym umożliwiającą przyłączenie dodatkowych cząsteczek o określonych właściwościach, wykorzystałam również do stworzenia nowej klasy złożeń do chromatografii powinowactwa opartej o dinukleotyduowe analogi kapu. Chromatografia powinowactwa, wykorzystująca fakt specyficznego rozpoznawania i wiązania kapu przez eIF4E, stosowana jest od lat do izolacji i oczyszczania białek wiążących kap. Złoża z dołączonym analogiem mononukleotyduowym:  $m^7GTP$  lub  $m_3^{2,2,7}GTP$ , jak to przedstawię w punkcie 6 autoreferatu, są niezastąpionym do chwili obecnej narzędziem do charakterystyki wiązania kapu. Stosowane do tej pory złoża oparte o mononukleotyduowe analogi, mogą być jednak niewystarczające, zwłaszcza w przypadku izolowania białek, które silnie oddziałują z drugą zasadą kapu. Przykładem takiego białka preferującego dinukleotydy w stosunku do mononukleotyduów jest jądrowy kompleks wiążący kap (CBC). Do izolacji i poszukiwania nowych białek o takiej charakterystyce opracowałam strategię immobilizacji dinukleotyduowych analogów kapu [H4].



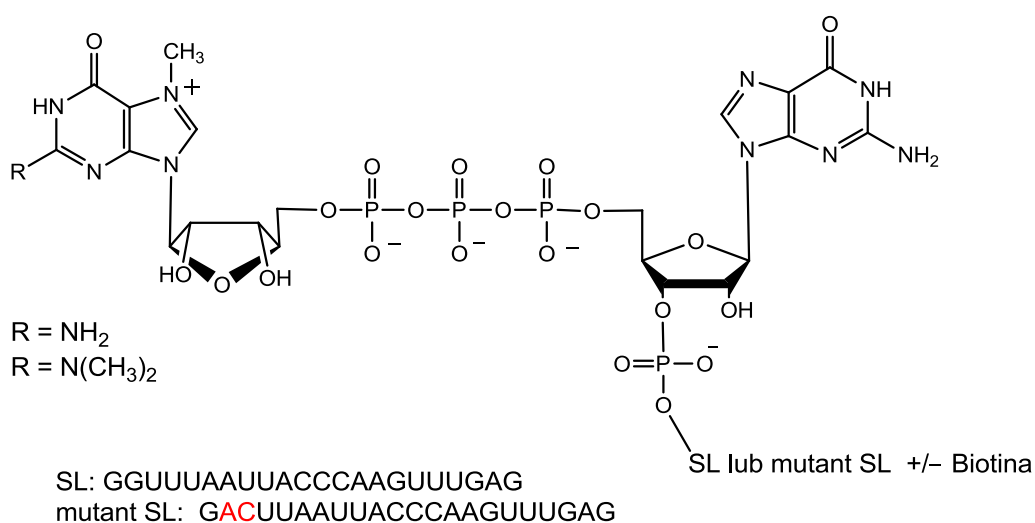
**Rys. 3** Złoża do chromatografii powinowactwa oparte o dinukleotyduowe analogi kapu

Polega ona na funkcjonalizacji dinukleotydu w obrębie cukru drugiej zasady kwasem lewulinowym oraz wykorzystaniu obecnej grupy karboksylowej do przyłączenia do sześciowęglowego linkera dołączonego do powierzchni złoża (Rys. 3). Linker taki został zastosowany w celu zwiększenia odległości ligandu od złoża i zapewnienia swobodnego dostępu potencjalnych białek. W ten sposób przygotowano złoża z analogami MMG i TMG kapu:  $m^7GpppG-$  i  $m_3^{2,2,7}GpppG-$  Sefarozę oraz ich odpowiedniki posiadające mostkową grupę metylenową w łańcuchu 5',5'-trifosforanowym pomiędzy  $\beta$  i  $\gamma$  fosforanem. Celem tej ostatniej modyfikacji było zwiększenie odporności ligandu na hydrolizę enzymami degradującymi kap typu DcpS. Wydaje się to celowe w sytuacji stosowania złóż powinowactwa do izolacji lub poszukiwania białek z ekstraktów komórkowych, w których mogą występować takie enzymy. Warto podkreślić, że są to pierwsze złoża oparte o strukturę dinukleotydu, obejmujące tak mono- jak i trimetyloguanozyno kap, oraz dodatkowo zawierające modyfikację mostkową uodporniającą je na enzymatyczną hydrolizę. W pracy pokazane zostało również zastosowanie zsyntetyzowanych złóż powinowactwa do oczyszczania izoformy IFE-5 z nicieni *C. elegans*, charakteryzującej się rozpoznawaniem MMG i TMG kapu.

Trimetyloguanozyno kap (TMG kap), który występuje na końcu 5' większości cząsteczek mRNA obecnych w organizmach nicieni tj. *Caenorhabditis elegans* czy *Ascaris suum*, dodawany jest do mRNA na drodze *trans*-splicingu wraz z 22-nukleotydowym odcinkiem liderowym SL (tzw. spliced leader) o zakonserwowanej sekwencji nukleotydowej. Jak pokazano w pracach [D6], [D13], [D17], odcinek SL w zdecydowany sposób podnosi wydajność translacji *in vitro* oraz *in vivo* mRNA zakończonych TMG kapem (TMG-SL-mRNA), nie mając praktycznie wpływu na mRNA zakończone MMG kapem. Synergistyczne współdziałanie TMG kapu i odcinka liderowego nazwane zostało „efektem SL”. Niewykluczone, że w organizmach nicieni, oprócz białek zaadoptowanych do współdziałania z mRNA zakończonymi TMG kapem (tj. izoformy faktora eIF4E *C. elegans* opisane w pracach [D1], [D2], eIF4E-3 z *A. suum* [D6], enzymy DcpS z *C. elegans* i *A. suum* [D5]) obecne są również białka pośredniczące w synergistycznym działaniu TMG kapu i odcinka liderowego. Narzędziem, które umożliwiłoby poszukiwanie takich białek, byłoby złożo do chromatografii powinowactwa posiadające jako ligand 22-nukleotydowy odcinek SL zakończony TMG kapem. Postanowiłam do tego celu wykorzystać handlowy oligonukleotyd z dołączoną na końcu 3' biotyną, której obecność umożliwi immobilizację analogu na powierzchni funkcjonalizowanej streptawidyną (Rys. 4). Taki oligonukleotyd będzie można wykorzystać również w innych badaniach, np. nad oddziaływaniem z izoformami białka eIF4E metodą SPR.

Synteza oligonukleotydów posiadających na końcu 5' strukturę kapu od lat stwarza problemy chemikom i do tej pory brak jest uniwersalnej, wydajnej metody uzyskiwania takich związków. Pomimo doniesień o syntezie oligonukleotydów zakończonych kapem z wykorzystaniem reakcji kapowania w fazie stałej lub sprzęgania w roztworze, dotyczą one przede wszystkim analogów MMG kapu, czasem wręcz o uproszczonej strukturze (mostek 5',5'-difosforanowy w miejsce,

mniej trwałego, trifosforanowego). Co więcej, używane były krótkie oligonukleotydy (maksymalnie do kilkunastu nukleotydów), a w przypadku syntezy dłuższych odcinków nie prezentowano oczyszczania finalnych produktów, co jest kluczowe w przypadku ich zastosowania do dalszych badań. Z racji na niewielkie różnice właściwości fizykochemicznych oligonukleotydów bez i z kapem, ich rozdział i oczyszczenie jest niebanalnym problemem. Postawiony cel otrzymania oligonukleotydów o długości 22 zasad posiadających na końcu 5' strukturę MMG jak również TMG kapu, stanowił więc nie lada wyzwanie. Przeprowadzone badania opisane w pracy [H6] polegały na doborze odpowiedniej metody sprzęgania w roztworze i optymalizacji jej warunków co zaowocowało znacznym uproszczeniem procedury wydzielenia produktów z mieszanin reakcyjnych. Opracowane zostały również warunki oczyszczania finalnych produktów z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii w układzie faz odwróconych z tworzeniem par jonowych (IP-RP HPLC). Oprócz oligonukleotydów posiadających na końcu 3' biotynę a na końcu 5' odpowiednie kapy ( $m^7$ GpppG,  $m_3^{2,2,7}$ GpppG oraz GpppG) uzyskałam również serię trzech związków opartych na 22-nukleotydowym łańcuchu bez biotyny do badań strukturalnych kap-SL oraz jego kompleksu z białkiem eIF4E (Rys. 4). Badania takie wymagają miligramowych ilości odpowiednich oligonukleotydów zakończonych kapem, których nie można uzyskać na drodze np. transkrypcji *in vitro*.



**Rys. 4** Odcinki liderowe (SL) RNA zakończone MMG i TMG kapem

Z przeprowadzonych badań nad rolą odcinka SL wynika, że do wydajnej translacji mRNA zakończonych TMG kapem konieczna jest obecność konkretnej sekwencji nukleotydów oraz prawdopodobnie elementu strukturalnego w postaci niewielkiej pętli w bezpośrednim sąsiedztwie struktury kapu [D17]. W celu potwierdzenia tworzenia pętli w odcinku SL i jej roli, kluczowe stało się uzyskanie

również oligonukleotydów zakończonych odpowiednimi kapami z wprowadzonymi mutacjami, zaburzającymi tworzenie potencjalnej pętli. Synteza serii sześciu związków zawierających oligonukleotydy o sekwencji z dwoma zmienionymi zasadami, posiadających odpowiednie kapy ( $m^7\text{GpppG}$ ,  $m_3^{2,2,7}\text{GpppG}$  oraz  $\text{GpppG}$ ), zakończone lub nie 3' biotyną (Rys. 4), okazała się znacznie trudniejsza. Zmiana tylko dwóch zasad w 22-nukleotydowym łańcuchu spowodowała znaczny spadek wydajności reakcji sprzęgania, jak też duże kłopoty z ich oczyszczeniem. W pracy zostały przedyskutowane prawdopodobne przyczyny takiej sytuacji.

Podsumowując, uzyskałam dwanaście nowych związków, oligonukleotydowych analogów MMG i TMG kapu, po raz pierwszy o tak długim łańcuchu. Stanowią one kluczowe narzędzia do badań różnymi metodami (SPR, wygaszanie fluorescencji, ITC, NMR, krystalografia, eksperymenty typu „pull down”) nad wyjaśnieniem mechanizmu translacji mRNA zakończonych TMG kapem w organizmach nicieni i poszukiwaniem nieznanymi białek zaangażowanych w oddziaływanie z tymi RNA. Eksperymenty te są prowadzone aktualnie w laboratorium dr Richarda Davisa (University of Colorado School of Medicine, USA).

Jeden z uzyskanych związków (TMG-SL) został wykorzystany wraz z innymi zsyntetyzowanymi przeze mnie analogami ( $m_3^{2,2,7}\text{GTP}$ ,  $m_3^{2,2,7}\text{GpppG}$ ) do badań oddziaływania tych struktur z białkiem eIF4E-3 z *A. suum* techniką NMR, a wyniki tych badań zostały opisane w pracy [H5]. Porównanie widm trzech kompleksów sugeruje, że odcinek SL oddziałuje z białkiem eIF4E-3, a wiązanie TMG-SL może mieć wpływ na strukturę i oddziaływanie wewnątrz kieszeni wiążącej białka, co z kolei może indukować dalsze zmiany konformacyjne białka konieczne do jego współdziałania z pozostałymi czynnikami podczas inicjacji translacji. W pracy tej dotyczącej badań nad oddziaływaniem białka eIF4E-3 z TMG kapem prowadzonych w ramach współpracy z dr Richardem Davisem, zaprezentowano również: 1) wyniki ilościowe dotyczące oddziaływania białka z różnymi analogami kapu uzyskane przeze mnie metodą wygaszania fluorescencji białka w wyniku miareczkowania analogami kapu (we współpracy z dr Anną Niedźwiecką ze Środowiskowego Laboratorium Fizyki Biologicznej, Instytut Fizyki PAN, która opracowała tę metodę) oraz metodą izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego z użyciem przygotowanych przeze mnie odpowiednich analogów kapów (m.in.  $m_3^{2,2,7}\text{GTP}$ ,  $m_3^{2,2,7}\text{GpppG}$ ), 2) porównanie powinowactwa białek eIF4E-3 z *A. suum* i ludzkiego eIF4E w oparciu o chromatografię powinowactwa z użyciem otrzymanych przeze mnie  $m^7\text{GTP}$ - i  $m_3^{2,2,7}\text{GTP}$ -Sefarozy oraz 3) pierwszą strukturę krystalograficzną białka eIF4E w kompleksie z analogiem mononukleotydowym TMG kapu ( $m_3^{2,2,7}\text{GTP}$ ).

W celu weryfikacji wcześniej stawianej hipotezy [D1], że zawada steryczna związana z obecnością dwóch grup metylowych w obrębie egzocyklicznej grupy aminowej pierwszej guanozyny w TMG kapie ( $m_3^{2,2,7}\text{GpppG}$ ) odpowiada za zredukowane powinowactwo faktora eIF4E wyższych eukariotów do tej struktury, został zsyntetyzowany, według metodologii przedstawionej w pracy [H8], analog posiadający w pozycji N<sup>2</sup> duży podstawnik benzylowy ( $\text{bzI}^2m^7\text{GMP}$ ). Został on wykorzystany do określenia powinowactwa obu białek (eIF4E-3 z *A. suum* i ludzkiego

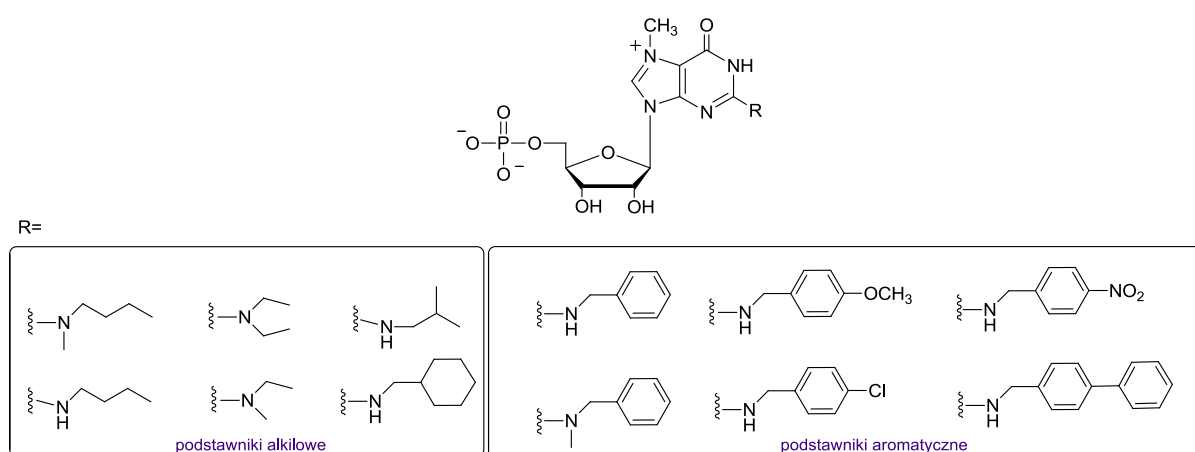
eIF4E) metodą ITC oraz jako kompetycyjny inhibitor translacji *in vitro* w układzie bezkomórkowym z *A. suum* i w lizacie retikulocytów króliczych [H5]. Badania te ujawniły, że oba białka wykazują 10-krotny wzrost powinowactwa do analogu  $\text{bzI}^2\text{m}^7\text{GMP}$  w porównaniu do  $\text{m}^7\text{GMP}$ , co sugeruje że zawada przestrzenna wokół egzocyklicznej grupy aminowej nie wyklucza wiązania kapu. Co ciekawe, analog ten okazał się skuteczniejszym inhibitorem translacji w ekstrakcie z *A. suum* niż  $\text{m}^7\text{GTP}$ , który silnie hamuje translację w różnych układach translacyjnych.

Kolejnymi narzędziami przygotowanymi z myślą o zastosowaniu w badaniach zmierzających do wyjaśnienia molekularnych mechanizmów regulujących metabolizm mRNA zakończonych MMG i TMG kapem są dinukleotydy analogi  $\text{m}^7\text{GpppG}$ ,  $\text{m}_3^{2,2,7}\text{GpppG}$  znakowane izotopami  $^{13}\text{C}$  i  $^{14}\text{C}$  [H7]. Analogi takie będą niezwykle użyteczne w badaniach oddziaływania obu kapów z białkami (m.in. izoform białka eIF4E wykazujących podwójną specyficzność) metodą NMR, do monitorowania przebiegu chemicznych i enzymatycznych reakcji z udziałem kapu oraz do uzyskiwania metodą transkrypcji *in vitro* RNA posiadających w obrębie kapu radioizotop. Opracowana została metoda specyficznego znakowania izotopem  $^{13}\text{C}$  trimetyloguanozyno kapu w obrębie trzech grup metylowych guanozyny oraz izotopem  $^{14}\text{C}$  w grupie N7-metylowej TMG kapu. W przypadku monometyloguanozyno kapu znakowanie oboma izotopami węgla obejmowało grupę metylową w pozycji N7. Opracowane metody znakowania uwzględniają konieczność minimalizowania ilości etapów syntezy z użyciem radioaktywnych związków oraz optymalizację poszczególnych etapów syntezy z użyciem kosztownych znakowanych reagentów (jodek metylu znakowany  $^{13}\text{C}$  i  $^{14}\text{C}$ ). W pracy [H7] pokazano ponadto zastosowanie otrzymanych analogów znakowanych izotopem  $^{14}\text{C}$  do monitorowania reakcji enzymatycznej degradacji kapu.

Wyniki badań z użyciem analogu  $\text{bzI}^2\text{m}^7\text{GMP}$  [H5] pokazujące, że wprowadzenie podstawnika w pozycję N<sup>2</sup> 7-metylo GMP prowadzi do znacznego wzrostu właściwości inhibitorowych, przewyższającego działanie  $\text{m}^7\text{GTP}$ , w bezkomórkowym ekstrakcie z *A. suum*, stały się punktem wyjścia do poszukiwania kolejnych inhibitorów translacji. Pasożytnicze nicienie stanowią poważny problem zdrowotny i ekonomiczny (Światowa Organizacja Zdrowia WHO ocenia, że zainfekowanych jest nimi około 3 miliardy ludzi, w tym przez glisty *Ascaris* około miliarda) i jednocześnie obserwowane jest coraz większe uodpornienie na stosowane do tej pory leki. Idea poszukiwania nowych rozwiązań w terapii wydaje się więc w pełni uzasadniona. Taką szansę mogłyby stanowić inhibitory translacji w postaci analogów kapu, biorąc pod uwagę, że różnica w strukturze kapów występujących w mRNA człowieka i nicieni stwarza możliwość na selektywne hamowanie ekspresji genów tylko u pasożyta.

Analogi kapu z modyfikacjami w obrębie egzocyklicznej grupy aminowej guanozyny nie były do tej pory intensywnie eksplorowane w związku z trudnościami syntetycznymi w uzyskiwaniu tego typu związków. Przez lata N<sup>2</sup>-monometylo- i

$N^2,N^2$ -dimetyloguanoza były otrzymywane zmodyfikowaną i dopracowaną przeze mnie metodą Yamazaki. Niestety metoda ta nie mogła być dalej stosowana, ponieważ przestał być dostępny handlowy substrat wyjściowy tzw. AICA rybozyd (5-amino-1- $\beta$ -D-rybofuranozyl-4-imidazokarboksyamid). Kłopoty z otrzymywaniem  $N^2,N^2$ -dimetyloguanozy zmusiły mnie do poszukiwania alternatywnej drogi otrzymywania tego, kluczowego z punktu widzenia syntezy analogów TMG kapu, związku. W literaturze opisanych jest kilka metod syntezy mono- i dimetyloguanozyny, jednak w większości są to metody wieloetapowe, żmudne i czasochłonne, prowadzące do uzyskania pożądaných produktów z niewielkimi końcowymi wydajnościami rzędu kilku, maksimum kilkunastu procent. Biorąc pod uwagę, że oba związki, w przypadku badań związanych ze strukturą i funkcją kapu, nie są bezpośrednio obiektami badań, a stanowią jedynie substraty wyjściowe do kolejnych etapów syntezy różnych analogów, istniejące metody w swojej oryginalnej formie były mało przydatne. Z racji na możliwość wprowadzenia w pozycję  $N^2$  innych podstawników poza metylowymi, wybrałam metodę opierającą się na diazowaniu uprzednio zabezpieczonej guanozyny (w postaci 2',3',5'-tri-O-acetylo-O<sup>6</sup>-[2-(4-nitrofenylo)etylo] guanozyny), następnie wprowadzeniu fluoru i w końcu substytucji nukleofilowej z użyciem odpowiedniej aminy. Metoda ta wymagała wprowadzenia licznych modyfikacji, ponieważ jak się okazało, prowadziła do uzyskania finalnego produktu ze skrajnie niską wydajnością. Intensywne badania dotyczące przede wszystkim izolacji i oczyszczania produktu reakcji Mitsunobu (wprowadzenie zabezpieczenia w pozycję O6 guanozyny), reakcji diazowania i fluorowania przy użyciu różnych odczynników i sposobu skutecznego usuwania grup ochronnych oraz oczyszczania finalnego produktu, opisane w pracy [H8], doprowadziły do opracowania metody umożliwiającej otrzymywanie  $N^2,N^2$ -dimetyloguanozy z wysoką wydajnością (rzędu 70% w stosunku do wyjściowej guanozyny) przy jednoczesnym skróceniu i znacznym uproszczeniu procedury.



**Rys. 5** Mononukleotydowe  $N^2$ -pochodne trimetyloguanozyny kapu

Miało to fundamentalne znaczenie dla syntezy analogów TMG kapu (m.in.  $m_3^{2,2,7}$ GTP,  $m_3^{2,2,7}$ GpppG) kluczowych dla badań opisanych w tej części autoreferatu oraz dalej w pkt. 6.



Opracowana metoda syntezy została wykorzystana do uzyskania serii czternastu nowych analogów  $m^7GMP$  posiadających w pozycji  $N^2$  jeden lub dwa podstawniki (Rys. 5), różniące się charakterem (alifatyczne, aromatyczne, cykliczne), stopniem rozgałęzienia łańcucha, gęstością elektronową pierścienia aromatycznego (obecność różnych podstawników w pierścieniu benzenowym) [H8]. Związki te zostały przebadane pod kątem hamowania translacji w bezkomórkowym ekstrakcie z *A. suum*. Wszystkie analogi będące  $N^2$ -monopodstawionymi pochodnymi  $m^7GMP$  okazały się skutecznymi inhibitorami o  $IC_{50}$  zbliżonym do  $m^7GTP$ . Jeden z nich,  $N^2$ -(4-metoksy)benzyl-7-metyloguanozyno-5'-monofosforan, charakteryzował się najskuteczniejszym, bo 7-krotnie silniejszym niż  $m^7GTP$ , działaniem. Uzyskane wyniki są zachęcające, zwłaszcza biorąc pod uwagę fakt obecności w badanych związkach tylko jednego fosforanu, co w przypadku układów translacyjnych odnoszących się do innych organizmów, nie jest wystarczające do osiągnięcia istotnego poziomu inhibicji, a co jest bardzo korzystne z punktu transportu analogu przez błonę komórkową (mniejszy ładunek ujemny).

Opracowanie metody wydajnego otrzymywania pochodnych  $N^2$  guanozyny umożliwiło też zaprojektowanie i przygotowanie serii mono- i dinukleotydowych analogów do badań enzymów uczestniczących w powstawaniu TMG kapu, guanino- $N^2$  metylotransferaz (w skrócie Tgs, ang. trimethylguanosine synthase) [H2]. Wstępne badania przeprowadzone przez zespół prof. Stewarda Shumana (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Nowy Jork) dotyczące nowoodkrytych enzymów Tgs: ludzkiego, drożdżowego, wirusowego (mimiowirus) oraz pierwotniaka lamblii, wskazywały, że tworzą one dwie osobne funkcjonalne klasy w zależności od finalnego produktu reakcji ( $N^2,7$ -dimetylo lub  $N^2,N^2,7$ -trimetyloguanozyno kap). W celu scharakteryzowania specyficzności substratowej a przez to lepszego zrozumienia działania enzymów Tgs, konieczne było zbadanie osobno pierwszej i drugiej reakcji metylacji w obrębie egzocyklicznej grupy aminowej. Umożliwiły to odpowiednio zaprojektowane analogi kapu (5'-mono-, di- i trifosforany oraz dinukleotydy z mostkiem tri- oraz tetrafosforanowym) posiadające jedną (w pozycji 7 lub  $N^2$ ), dwie (w pozycji N7 i  $N^2$ ) lub trzy (w pozycji N7,  $N^2$  i  $N^2$ ) grupy metylowe. W przypadku analogów dinukleotydowych przygotowałam również takie różniące się drugą zasadą. Wyniki badań z użyciem otrzymanych analogów wykazały, że ludzki enzym Tgs przeprowadza kolejno dwie odrębne reakcje metylacji, zaś pozostałe badane enzymy są zdolne tylko do przeprowadzenia pierwszej reakcji metylacji. Określono również wpływ liczby fosforanów, podstawnika w pozycji 7 (brak, metyl, etyl lub benzyl) oraz drugiej zasady (G, A, C, 2'-deoxyG, 2'-O-metyloG), na aktywność enzymów. Stwierdzono, że najbardziej kluczowym i koniecznym warunkiem aktywności metylotransferazowej jest obecność podstawnika w pozycji 7.

## Podsumowanie

Najważniejszymi osiągnięciami wynikającymi z badań opisanych w jednotematycznym cyklu publikacji jest zaprojektowanie, opracowanie metod syntezy i otrzymanie szeregu nowych klas związków nukleotydowych takich jak:

- dinukleotydowe analogi kapu funkcjonalizowane w obrębie cukru drugiej zasady lewulinianem umożliwiającym przyłączenie różnych markerów, sond czy linkerów w miejscu najmniej zaangażowanym w oddziaływanie z białkiem. Zaproponowany sposób funkcjonalizacji jest uniwersalny i może być wykorzystany do otrzymywania wielu innych analogów kapu, tak mono-, di- jak i oligonukleotydowych [H3],
- złoza do chromatografii powinowactwa oparte o analogi dinukleotydowe mono- i trimetyloguanozyno kapu, w tym również takie o zwiększonej odporności na hydrolizę enzymami degradującymi kap [H4],
- oligonukleotydy o długości 22 zasad z dołączonym na końcu 5' mono- lub trimetyloguanozynokapem [H6],
- dinukleotydowe analogi mono- i trimetyloguanozyno kapu znakowane izotopami  $^{13}\text{C}$  i  $^{14}\text{C}$  [H7],
- mononukleotydowe analogi trimetyloguanozyno kapu posiadające w pozycji  $\text{N}^2$  jeden lub dwa podstawniki o różnym charakterze [H8].

Ponadto opracowana metoda wydajnego otrzymywania pochodnych  $\text{N}^2$  guanozyny [H8] umożliwiła zaprojektowanie i uzyskanie serii dinukleotydowych analogów trimetyloguanozyno kapu, posiadających jedną, dwie lub trzy grupy metylowe w różnych kombinacjach (pozycja  $\text{N}^2$  i  $\text{N}^7$ ) [H2] oraz syntezę wszystkich związków wymienionych powyżej, w których występuje  $\text{N}^2, \text{N}^7, 7$ -trimetyloguanozyna.

Otrzymane związki stanowią niezastąpione narzędzia do badań białek wiążących kap, w tym przede wszystkim izoform faktora eIF4E o tzw. podwójnej specyficzności oraz mechanizmów różnych procesów z ich udziałem. Należy tu wymienić przede wszystkim możliwość analizy oddziaływań białko-kap lub białko-kapowane RNA różnymi technikami biofizycznymi takimi jak: powierzchniowy rezonans plazmonowy, wygaszanie fluorescencji, spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego czy spektroskopia rezonansu magnetycznego. Innymi istotnymi aspektami zastosowania uzyskanych związków jest możliwość poszukiwania nowych białek rozpoznających MMG lub TMG kap, monitorowanie przebiegu chemicznych i enzymatycznych reakcji z udziałem kapu lub wykorzystanie ich w technikach biologii molekularnej lub biochemii (np. „pull down”, hamowanie translacji *in vitro*, synteza *in vitro* transkryptów RNA).

Do najważniejszych rezultatów dotychczas przeprowadzonych badań z użyciem zsyntetyzowanych związków należy:

- poznanie kinetyki wiązania kapu przez jądrowy kompleksu CBC i zaproponowanie modelu wiązania mRNA zakończonego MMG kapem przez CBC [H1],
- określenie istotnej roli odcinka liderowego SL i TMG kapu w oddziaływaniu z białkiem o podwójnej specyficzności eIF4E-3 z *A. suum* [H5],
- wyznaczenie struktury krystalograficznej eIF4E-3 w kompleksie z trimetyloguanozyno kapem, ilościowe scharakteryzowanie tego oddziaływania oraz uzyskanie nowych danych dotyczących wpływu zawady przestrzennej w pozycji N<sup>2</sup> na wiązanie TMG kapu przez białko [H5],
- ustalenie, że wszystkie związki będące N<sup>2</sup>-monopodstawionymi pochodnymi m<sup>7</sup>GMP są skutecznymi inhibitorami translacji w pasożytniczym nicieniu *A. suum*, a jeden ze związków wykazuje nawet siedmiokrotnie silniejsze właściwości niż m<sup>7</sup>GTP [H8],
- wykazanie zróżnicowanej specyficzności substratowej guanino-N2 metylotransferaz z różnych organizmów [H2].

Rezultaty te przybliżają nas do poznania adaptacji białek eIF4E nicieni do współdziałania z cząsteczkami mRNA zakończonymi MMG lub TMG kapem podczas inicjacji translacji, mechanizmu enzymatycznego powstawania TMG kapu a także wiązania kapu przez białko CBC. Uzyskane wyniki stwarzają również szansę na wykorzystanie tej wiedzy w celach terapeutycznych (m.in. leki przeciw pasożytnicze). Należy podkreślić, że opisane analogi końca 5' mRNA, chociaż zaprojektowane i zsyntetyzowane z myślą o konkretnych zastosowaniach, mają charakter uniwersalny i mogą zostać wykorzystane w innych badaniach nad mechanizmami procesów ekspresji genów w organizmach eukariotycznych.

## 6. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO - BADAWCZYCH

*(numery prac z literą D odnoszą się do spisu publikacji na str. 25, stanowiących dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora, zaś literą M – do prac stanowiących dorobek przed uzyskaniem stopnia doktora na str. 27)*

Moje główne zainteresowania naukowe związane są ze strukturą końca 5' transkryptów polimerazy II i rolą jaką odgrywa kap w różnych procesach ekspresji genów. Poza głównym nurtem, opisanym w poprzednim punkcie, koncentrującym się na projektowaniu i opracowywaniu metod syntezy nowych związków nukleotydowych, istotną część mojej działalności naukowej stanowią interdyscyplinarne badania we współpracy z ośrodkami zarówno krajowymi jak i zagranicznymi, zapoczątkowane w Polsce i inspirowane przez prof. dr hab. Edwarda

Darżynkiewicza (Zakład Biofizyki, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski). Opierają się one na ścisłym współdziałaniu chemików, biofizyków i biologów molekularnych, co w moim przypadku zaowocowało nie tylko rozwojem warsztatu w zakresie syntezy analogów kapu, ale również nabyciem doświadczenia pozachemicznego.

W początkowym okresie moja aktywność naukowa skoncentrowana była na syntezie stosunkowo prostych mono- i dinukleotydowych analogów kapu, posiadających określone modyfikacje w poszczególnych miejscach struktury. Powstały wtedy analogi mononukleotydowe różniące się ilością grup fosforanowych, podstawnikiem w pozycji N7 guaniny i ilością grup metylowych w obrębie zasady [M1], [M2]. Otrzymałam również analogi dinukleotydowe różniące się modyfikacjami pierwszej zasady, ilością fosforanów w mostku 5',5' oraz drugą zasadą [M4], [M7]. Związki te zostały poddane wyczerpującej charakterystyce fizykochemicznej, poprzez określenie m.in. ich dynamicznych równowag konformacyjnych [M1], [M4], [M7], [M11] oraz właściwości spektralnych w zakresie widm absorpcji (UV) i emisji (fluorescencji) [M5], [M7]. Analogi te były również obiektami badań biofizycznych dotyczących między- i wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań warstwowych między zasadami kapu i pierścieniem indolowym tryptofanu w centrum aktywnym eIF4E [M6], [M8], [M11], [M14], [M16], prowadzonych w grupie prof. dr hab. Ryszarda Stolarskiego (Zakład Biofizyki, Wydział Fizyki Uniwersytet Warszawski) oraz prof. dr hab. Zbigniewa Wieczorka (Katedra Fizyki i Biofizyki, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski).

Zsyntetyzowane analogi kapu zostały także wykorzystane w badaniach biologicznych [M3], [M9], [M13], [M15], [M17], z których przywołam tylko te, w których mój udział był znaczny. Zmodyfikowane analogi kapu zostały użyte do określenia ich zdolności do hamowania inicjacji translacji w systemie *in vitro* z retikulocytów króliczych. Badania te zostały zrealizowane we współpracy z zespołem prof. Roberta Rhoadsa z Louisiana State University Health Science Center w Shreveport, USA, gdzie zostały przeprowadzone, w znacznej części przeze mnie, w trakcie stażu naukowego. W oparciu o uzyskane dane zweryfikowano wcześniejsze ustalenia oraz określono dalsze korelacje między strukturą kapu a jego aktywnością w procesie inicjacji translacji [M15]. Praca opisująca powyższe badania pozostaje do dziś najbardziej wyczerpującą jeśli chodzi o katalog przebadanych związków.

Drugim zagadnieniem syntetycznym, któremu poświęciłam czas w swojej działalności naukowej było tworzenie złożeń do chromatografii powinowactwa opartych o mononukleotydowe analogi kapu, przyłączone w sposób analogiczny jak w powszechnie stosowanym złożu handlowym, m<sup>7</sup>GTP-Sefarozie 4B (dołączony P<sup>3</sup>-4-aminofenylo-P<sup>1</sup>-7-metyloguanozyno- 5'-trifosforan, w skrócie określony jako ester *p*-aminofenylowy m<sup>7</sup>GTP). Zmodyfikowana metoda zapewniająca kontrolowanie stopnia podstawienia nośnika ligandem umożliwiła otrzymanie m.in. m<sup>7</sup>GTP-Sefarozy [M2]. Złoże to okazało się bardziej skuteczne i wydajne w izolowaniu eIF4E niż złoże handlowe i w związku z tym było chętnie wykorzystywane do izolacji i oczyszczania białek wiążących kap (np. [M3]). Zsyntetyzowałam również m<sub>3</sub><sup>2,2,7</sup>GTP-Sefarozę [M2] umożliwiającą poszukiwanie potencjalnego białka wiążącego trimetyloguanozyno kap

w organizmach nicieni. Jak już wspomniałam w pkt. 5.3 taka hipermetylowaną postać kapu występuje na końcu 5' większości cząsteczek mRNA nicieni tj. *Caenorhabditis elegans* czy *Ascaris suum*. Z badań nad białkiem wiążącym regularny MMG kap, faktorem eIF4E, wynikało, że jest ono niezdolne do rozpoznawania i wiązania TMG kapu, co z kolei sugerowało, że być może w organizmach nicieni istnieje odmienne białko wiążące jego hipermetylowaną formę. Badania nad poszukiwaniem takich białek zostały podjęte we współpracy z prof. Robertem Rhoadsem (Louisiana State University Health Science Center, Shreveport, USA) i przeprowadzone zostały w trakcie moich staży w jego laboratorium. Doprowadziły one do wyizolowania i jednocześnie otrzymania drogą nadekspresji pięciu izoform białka eIF4E i dokonania wstępnej oceny ich powinowactwa do obu występujących w mRNA nicieni struktur kapu (MMG i TMG kapu) [M12], [M18]. Rezultaty badań wykazały, że wszystkie izoformy, nazwane IFE-1, IFE-2 itd, rozpoznają MMG kap, a trzy spośród nich (IFE-1, IFE-2 i IFE-5) rozpoznają i wiążą również TMG kap. Należy podkreślić, że był to pierwszy opisany przypadek występowania białek eIF4E wykazujących powinowactwo do trimetyloguanozyno kapu.

Wykrycie w nicieniach *Caenorhabditis elegans* pierwszych białek eIF4E rozpoznających obok MMG kapu także TMG kap oraz stwierdzenie ich zróżnicowanej specyficzności wobec obu struktur, skierowało moje zainteresowania w dalszej działalności naukowej po uzyskaniu stopnia doktora, na badania zmierzające do wyjaśnienia fenomenu białek o tzw. podwójnej specyficzności i syntezę związków dedykowanych tym badaniom.

Pierwsze, podjęte we współpracy z zespołem prof. Roberta Rhoadsa, badania dotyczyły podstaw strukturalnych różnic w wiązaniu obu kapów przez białka IFE *C. elegans*. Porównanie sekwencji dwóch białek: białka IFE-3 (rozpoznaje wyłącznie MMG kap) oraz IFE-5 (rozpoznaje MMG i TMG kap) oraz modelowanie homologiczne pozwoliło na wytypowanie sekwencji mogących odgrywać rolę w rozpoznawaniu TMG kapu [D1]. Odpowiednie mutanty białka (wprowadzone zmiany sekwencji aminokwasowej mające potencjalnie doprowadzić do uzyskania białka wykazującego specyficzność tylko wobec MMG kapu) przetestowano pod kątem rozpoznawania struktury MMG i TMG kapu. W oparciu o uzyskane rezultaty przedstawiliśmy model mogący wyjaśnić przyczynę zróżnicowanej specyficzności izoform. Zakładał on istnienie zawady sterycznej w kieszeni wiążącej izoformy IFE-3 utrudniającej dostęp  $m_3^{2,2,7}$ GTP (wynikającej z węższej i płytszej kieszeni wiążącej białka IFE-3 niż w IFE-5) oraz występowanie w obu białkach czynnika warunkującego skuteczniejsze wiązanie  $m^7$ GTP niż  $m_3^{2,2,7}$ GTP (utworzenie wiązania wodorowego z egzocykliczną grupą aminową guanozyny).

W celu opisu ilościowego powinowactwa izoform białka eIF4E z *C. elegans* do MMG i TMG kapu podjęłam współpracę z biofizykami pod kierownictwem prof. dr hab. Ryszarda Stolarskiego (Zakład Biofizyki, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski) oraz prof. dr hab. Zbigniewa Wieczorka (Katedra Fizyki i Biofizyki, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski). Wybraliśmy trzy izoformy (IFE-3, -4, -5), jako reprezentantów trzech klas, na które można podzielić izoformy białka eIF4E w *C. elegans*, biorąc pod uwagę strukturę pierwszorzędową,

specyficzność wiązania struktur kapu oraz niezbędność poszczególnych izoform do przeżycia nicieni. Białka te stały się przedmiotem badań metodami spektroskopowymi oraz modelowania homologicznego w oparciu o strukturę białka mysiego eIF4E w kompleksie z m<sup>7</sup>GDP [D2]. Wyznaczone metodą wygaszania fluorescencji białka podczas miareczkowania analogami MMG i TMG kapu, stałe asocjacji białko-kap, potwierdziły jakościowe dane dotyczące specyficzności izoform względem obu kapów uzyskane metodą chromatografii powinowactwa.

Warto zaznaczyć, że wykrycie izoform białka eIF4E w nicieniach posiadających zróżnicowaną specyficzność wobec struktur kapu zapoczątkowało poszukiwania podobnych białek w innych organizmach. Przykładem mogą być badania dotyczące *Leishmanii*, pasożytniczego pierwotniaka z grupy wiciowców odpowiedzialnego za przenoszenie groźnych chorób tzw. leiszmanioz, w których wykryto i scharakteryzowano białko IF4E-1 [D7].

Do wszystkich opisanych badań kluczowymi narzędziami były złoża do chromatografii powinowactwa z dołączonymi mononukleotydami: m<sup>7</sup>GTP i m<sub>3</sub><sup>2,2,7</sup>GTP. Warto podkreślić, że złoża te wykazują bardzo ograniczoną trwałość (nawet podczas przechowywania w 4°C), w związku z czym syntetyzowałam je na bieżąco, każdorazowo, gdy były potrzebne do badań.

Substratem do syntezy analogów TMG kapu, w tym również ligandów do złóż powinowactwa, jest N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>-dimetyloguanozyna. Opracowywana metoda syntezy mono- i dimetyloguanozyny, opisana w poprzednim punkcie autoreferatu [H8], umożliwiła przygotowanie szeregu analogów MMG i TMG kapu (m.in. m<sub>2</sub><sup>2,7</sup>Guo, m<sub>3</sub><sup>2,2,7</sup>Guo, m<sub>2</sub><sup>2,7</sup>GMP, et<sup>2</sup>m<sup>7</sup>GMP, m<sub>3</sub><sup>2,2,7</sup>GMP, m<sub>2</sub><sup>2,7</sup>GDP, m<sub>3</sub><sup>2,2,7</sup>GDP, m<sub>2</sub><sup>2,7</sup>GTP, m<sub>3</sub><sup>2,2,7</sup>GTP, m<sub>2</sub><sup>2,7</sup>GpppG, m<sub>3</sub><sup>2,2,7</sup>GpppG/A, m<sub>2</sub><sup>2,7</sup>GppppG, m<sub>3</sub><sup>2,2,7</sup>GppppG, m<sup>2</sup>bz<sup>7</sup>GppppG), kluczowych z punktu widzenia różnych badań biofizycznych i biochemicznych, z których wymienię najważniejsze:

- seria modyfikowanych strukturalnie mono- i dinukleotydowych analogów kapu została wykorzystana do wyznaczenia stałych asocjacji z mysim faktorem eIF4E opracowaną przez biofizyków z Zakładu Biofizyki, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski (dr Anna Niedźwiecka i prof. dr hab. Ryszard Stolarski) metodą synchronizowanego w czasie miareczkowania fluorescencyjnego białka analogami kapu [D3]. Uzyskane stałe K<sub>as</sub> umożliwiły określenie wpływu poszczególnych elementów strukturalnych kapu na powinowactwo do białka eIF4E. Umożliwiły również oszacowanie, w oparciu o znaną strukturę krystalograficzną eIF4E-m<sup>7</sup>GDP, wkładów do energii swobodnej Gibbsa ze strony różnych oddziaływań niekowalencyjnych pomiędzy poszczególnymi elementami strukturalnymi kapu a białkiem i zaproponowanie dwustopniowego modelu wiązania kapu przez białko.
- podobne badania w roztworze zostały przeprowadzone dla ludzkiego jądrowego kompleksu wiążącego kap (CBC, ang. cap-binding complex) [D9]. Wyznaczone stałe asocjacji CBC z serią zmodyfikowanych strukturalnie analogów kapu ujawniły zdecydowane różnice między białkami eIF4E i CBC. Uzyskane dane pozwoliły potwierdzić oraz uszczegółwić model wiązania CBC-kap zaproponowany w oparciu o dane krystalograficzne.

- analogi kapu: nukleozydowe, mono- di- i trifosforanowe oraz dinukleotydydowe, zostały wykorzystane do systematycznych badań nad kinetyką rozpadu pierścienia imidazolowego 7-metyloguanozyny w środowisku alkalicznym [D12], co umożliwiło określenie wpływu poszczególnych elementów strukturalnych na szybkość rozpadu.
- dinukleotydydowe analogi kapu zostały przebadane we współpracy z prof. Robertem Rhoadsem pod kątem zastosowania do syntezy *in vitro* kapowanych transkryptów mRNA charakteryzujących się wysoką wydajnością translacji [D4]. Transkrypty takie są szeroko stosowane w badaniach nad mechanizmami translacji, splicingu czy transportu RNA w komórce. Dla wszystkich analogów (stosując m<sup>7</sup>GpppG jako związek odniesienia) określono: powinowactwo do czynnika inicjującego translację eIF4E, zdolność analogu do hamowania translacji *in vitro*, wydajność włączania analogów do transkryptów podczas *in vitro* transkrypcji, stopień inkorporacji analogu do transkryptu w poprawnej orientacji oraz wydajność translacji *in vitro* mRNA z wbudowanymi na końcu 5' poszczególnymi analogami kapu. Zaobserwowano m.in. pozytywny wpływ grupy metylowej w pozycji N<sup>2</sup> w związkach m<sub>2</sub><sup>2,7</sup>GpppG, m<sub>2</sub><sup>2,7</sup>GppppG, m<sup>2</sup>bzl<sup>7</sup>GppppG na wszystkie pięć parametrów, przy czym szczególnie interesujący okazał się ostatni z wymienionych związków, dla którego zanotowano jedną z najwyższych wyznaczonych dotychczas wydajności translacji *in vitro* mRNA zakończonego kapem przy jednoczesnej bardzo wysokiej wydajności kapowania, wbudowywaniu w większości poprawnej orientacji i silnym hamowaniu translacji *in vitro*. Co również ważne, z punktu zastosowania analogów TMG kapu do tworzenia transkryptów użytecznych w badaniach nad U snRNA i translacją mRNA nicieni, kap ten wbudowywany jest do RNA znacznie wydajniej niż MMG kap i przeważająco w poprawnej orientacji.
- dinukleotydydowe analogi MMG i TMG kapu wykorzystano jako modelowe substraty do badania specyficzności i kinetyki hydrolizy kapu przez enzym dekapujący DcpS z *C. elegans* [D18].

Istotną część mojej działalności naukowej po uzyskaniu stopnia doktora jest związana z rozpoczętą w tym okresie współpracą z dr Richardem Davisem (początkowo: Department of Biology, City University of New York, USA, później: Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Colorado School of Medicine, USA), który zajmuje się badaniem mechanizmów ekspresji genów w organizmach nicieni. Ten typ organizmów tkankowych, do których należą m.in. *Caenorhabditis elegans* i *Ascaris suum*, charakteryzuje się występowaniem *trans*-splicingu jako mechanizmu dojrzewania RNA. W wyniku *trans*-splicingu znaczna część mRNA (50-90%) nabywa na końcu 5' oligonukleotydydowy odcinek, tzw. spliced leader (SL), a wraz z nim, nietypowy dla mRNA, trimetyloguanozyno kap (TMG kap). Szerokie spektrum badań prowadzonych przez dr Davisa ma na celu poznanie funkcjonalnego znaczenia *trans*-splicingu i adaptacji mechanizmów ekspresji genów w odniesieniu do puli mRNA dojrzających na drodze *trans*-splicingu, a więc

posiadających strukturę TMG kapu), ze szczególnym uwzględnieniem struktury i funkcji białek rozpoznających kap w procesach translacji, transportu, degradacji kapu itp. Nawiązana współpraca opiera się na połączeniu doświadczenia i narzędzi biochemicznych rozwiniętych przez dr Davisa (m.in. technika wprowadzania *in vivo* transkryptów do embrionów glisty świńskiej, opracowywanie systemu bezkomórkowego z embrionów *A. suum* do badania *in vitro* translacji, niedostępnego dla *C. elegans*) oraz mojego doświadczenia w zakresie syntezy analogów kapu (zwłaszcza kluczowych w kontekście tych badań analogów TMG kapu) i innych narzędzi chemicznych (np. złoża powinowactwa).

Najważniejszymi dokonaniem bazującymi na przygotowanych analogach kapu było:

- wykrycie w ekstrakcie z komórek *Ascaris* aktywności enzymatycznej analogicznej do wykazywanej przez enzymy degradujące kap (DcpS i Dcp1/Dcp2) w wyższych eukariontach i zbadanie ich specyficzności w stosunku do obu struktur kapu (MMG i TMG kapu) [D5]. W oparciu o przygotowany zestaw mono- i dinukleotydowych analogów kapu określono specyficzność substratową *C. elegans* DcpS, stwierdzając że hydrolizuje on dinukleotydowe analogi MMG jak i TMG kapu. Niezależnie scharakteryzowano wiązanie obu analogów wykorzystując przygotowane złoża do chromatografii powinowactwa:  $m^7GTP$ - i  $m_3^{2,2,7}GTP$ -Sefarozę i porównano je z innymi białkami. Doświadczenia te potwierdziły, że DcpS nicieni, w przeciwieństwie do białka ludzkiego, rozpoznaje struktury obu kapów.
- wykorzystanie dinukleotydowych analogów kapu do przygotowania transkryptów RNA o różnych sekwencjach, posiadających lub nie odcinek SL i zakończonych MMG lub TMG kapem. Dysponowanie takimi transkryptami umożliwiło:
  - dokonanie charakterystyki opracowanego w zespole dr Davisa bezkomórkowego systemu translacyjnego z *A. suum* (pierwszego i jedyne dla nicieni) [D6]. Wykazano, że system ten odtwarza wszystkie cechy translacji *in vivo* w nicieniach. Posiadanie takiego systemu umożliwiło przeprowadzenie wielu badań (w tym opisanych w kolejnych wspólnych publikacjach) nad translacją w nicieniach *A. suum*, których nie można było przeprowadzić w przypadku *C. elegans* z powodu braku bezkomórkowego systemu translacyjnego.
  - przeprowadzenie badań translacji *in vivo* w *A. suum*, w których określono wpływ rodzaju kapu, obecności odcinka SL, ogona poliadenylowego poly(A) oraz sekwencji pomiędzy odcinkiem SL i kodonem startu na poziom translacji *in vivo* [D13]. Okazało się, że chociaż w większości cząsteczek mRNA nicieni obecny jest na końcu 5' TMG kap, to jego obecność (bez odcinka SL) nie wzmacnia translacji tak bardzo jak to ma miejsce dla MMG kapu. Dopiero synergistyczne współdziałanie TMG i SL powoduje, że zakończone TMG kapem mRNA ulegają wydajnej translacji.
  - stwierdzenie, że do wydajnej translacji (badania w systemie bezkomórkowym z *A. suum*) mRNA zakończonych TMG kapem konieczna jest obecność



specyficznej sekwencji w obrębie odcinka SL [D17]. Badania z użyciem kapowanych transkryptów z wprowadzonymi mutacjami w określonych miejscach, doprowadziły do zaproponowania, że sekwencja ta tworzy drugorzędową strukturę pętli, przyległą do struktury TMG kapu, która wydaje się mieć istotne znaczenie dla wydajnej translacji, ale tylko w przypadku mRNA zakończonych TMG kapem i tylko w organizmach nicieni.

- wykorzystanie do badania procesu translacji mRNA w nicieniach złożeń do chromatografii powinowactwa ( $m^7GTP$ - i  $m_3^{2,2,7}GTP$ -Sefaroza) oraz mononukleotydowych analogów MMG i TMG kapu. Podobnie jak wcześniej w organizmie *C. elegans*, udało się otrzymać rekombinacyjne białko eIF4E występujące w *A. suum* [D6], które oznaczono symbolem eIF4E-3. W oparciu o chromatografię powinowactwa  $m^7GTP$ - i  $m_3^{2,2,7}GTP$ -Sefarozy i zastosowanie odpowiednich mononukleotydów jako inhibitorów wiązania do złożeń w niezależnym eksperymencie stwierdzono, że białko eIF4E-3 wiąże obie struktury kapu, tzn. MMG i TMG kap. Pokazano również, że białko eIF4E-3 bierze udział w translacji obu typów mRNA (zakończonych MMG i TMG kapem).
- przeprowadzenie podobnych eksperymentów w przypadku pasożytniczego płazińca, przywry *Schistosoma mansoni* [D16], które doprowadziły do wykrycia obecności tylko jednej izoformy o sekwencji bardziej różniącej się od ludzkiego białka eIF4E niż w przypadku poznanych wcześniej białek z *C. elegans* i *A. suum*. Wykorzystując złoża do chromatografii powinowactwa stwierdzono, że białko wiąże struktury tak MMG jak i TMG kapu. Badania ilościowe powinowactwa białka za pomocą miareczkowania fluorescencyjnego analogami kapów ujawniło, że białko wiąże MMG kap z podobną stałą jak inne białka z wyższych eukariontów, natomiast wiązanie TMG kapu jest ok. 5 razy słabsze. Ponadto przygotowane mono- i dinukleotydowe analogi wykorzystano do: wyznaczenia parametrów termodynamicznych oddziaływania białka z MMG i TMG kapem metodą izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego (ITC), uzyskania kryształów białka w kompleksie z MMG kapem co umożliwiło wyznaczenie struktury rentgenograficznej oraz do przygotowania kompleksów białka eIF4E z różnymi analogami, dla których zarejestrowano i porównano widma NMR. Z uzyskanych danych wynika, że zdolność do wiązania obu struktur kapu przez białko eIF4E z *S. mansoni* nie jest rezultatem zasadniczych różnic w mechanizmie wiązania, a prawdopodobnie związana jest z wewnętrzną giętkością białka i zmianami konformacyjnymi odgrywającymi rolę w wiązaniu TMG kapu.

Poza tematyką związaną z rolą struktur końca 5' mRNA w procesach ekspresji genów, w ostatnich latach rozpoczęłam współpracę z prof. dr hab. Ewą Bulską (Pracownia Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej, Wydział Chemii Uniwersytet Warszawski) w zakresie zastosowania nowej metodyki pomiarowej do identyfikacji połączeń metali z białkami wchodzącymi w skład płynów ustrojowych człowieka. Metodyka ta obejmuje rozdzielanie białek metodą elektroforezy żelowej, a następnie detekcję metalu techniką LA ICP MS (ablacja laserowa połączona ze

spektrometrią mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej). Opracowanie odpowiednich procedur rozdzielania białek za pomocą elektroforezy żelowej, będące moim udziałem, w celu przeprowadzenia mikropróbkowania żelu w układzie LA ICP MS, przyczyniło się do realizacji dwóch projektów w ramach prac doktorskich oraz wchodzi w zakres przygotowywanych aktualnie publikacji. Uzyskane rezultaty wskazują na możliwość zastosowania tej metodyki m.in. do monitorowania chemioterapii preparatami opartymi o platynę.

**Publikacje stanowiące dorobek naukowy (poza cyklem publikacji wymienionym w pkt. 5) po uzyskaniu stopnia doktora opublikowane w czasopismach z bazy Journal Citation Reports i wymienione w bazie Web of Knowledge:**

- D1. Miyoshi H., Dwyer D.S., Keiper B.D., Jankowska-Anyszka M., Darzynkiewicz E. and Rhoads R.E. (2002): Discrimination between mono- and trimethylated cap structures by two isoforms of *Caenorhabditis elegans* eIF4E, **The EMBO Journal** 21, 4680-4690.
- D2. Stachelska A., Wieczorek Z., Ruszczyńska K., Stolarski R., Pietrzak M., Lamphear B.J., Rhoads R.E., Darzynkiewicz E. and Jankowska-Anyszka M. (2002): Interaction of three *Caenorhabditis elegans* isoforms of translation factor eIF4E with mono- and trimethylated mRNA 5' cap analogues, **Acta Biochimica Polonica** 49, 671-682.
- D3. Niedźwiecka A., Marcotrigiano J., Stępiński J., Jankowska-Anyszka M., Wystouch-Cieszyńska, Dadlez M., Gingras A-C., Mak P., Darzynkiewicz E., Sonenberg N., Burley S. and Stolarski R. (2002): Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins, **Journal of Molecular Biology** 319, 615-635.
- D4. Grudzien E., Stepinski J., Jankowska-Anyszka M., Stolarski R., Darzynkiewicz E., Rhoads R.E. (2004): Novel cap analogs for in vitro synthesis of mRNAs with high translational efficiency, **RNA** 10, 1479-1487.
- D5. Cohen L.S., Mikhli C., Friedman C., Jankowska-Anyszka M., Stepinski J., Darzynkiewicz E., Davis R.E. (2004): Nematode M(7)GpppG and m(3)(2,2,7)GpppGdecapping: activities in *Ascaris* embryos and characterization of *C. elegans* scavenger DcpS, **RNA** 10, 1609-1624.
- D6. Lall S., Friedman C.C., Jankowska-Anyszka M., Stepinski J., Darzynkiewicz E., Davis R.E. (2004): Contribution of trans-splicing, 5' leader length, cap-poly(A) synergism, and initiation factors to nematode translation in an *Ascaris suum* embryo cell-free system, **The Journal of Biological Chemistry** 279, 45573-45585.
- D7. Yoffe Y., Zuberek J., Lewdorowicz M., Zeira Z., Keasar C., Orr-Dahan I., Jankowska-Anyszka M., Stepinski J., Darzynkiewicz E., Shapira M. (2004): Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*, **RNA** 10, 1764-1775.
- D8. Worch R., Niedźwiecka A., Stepinski J., Jankowska-Anyszka M., Mazza C., Darzynkiewicz E., Cusack S., Stolarski R. (2005): Significance of the first transcribed nucleoside of capped RNA for ligand-induced folding of the cap-binding complex, **Journal of Physics: Condensed Matter** 17, S1495-S1503.
- D9. Worch R., Niedźwiecka A., Stepinski J., Mazza C., Jankowska-Anyszka M., Darzynkiewicz E., Cusack S., Stolarski R. (2005): Specificity of recognition of mRNA 5' cap by human nuclear cap-binding complex, **RNA** 11, 1355-1363.

- D10. Worch R., Stepinski J., Niedzwiecka A., Jankowska-Anyszka M., Mazza C., Cusack S., Stolarski R., Darzynkiewicz E. (2005): Novel way of capping mRNA trimer and studies of its interaction with human nuclear cap-binding complex, ***Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*** 24, (5-7): 1131-1134.
- D11. Jankowska-Anyszka M., Nogalski M., Darzynkiewicz E. (2005): New affinity resin for purification of cap-binding proteins, ***Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*** 24, (5-7): 503-506.
- D12. Stachelska A., Wieczorek Z., Stepinski J., Jankowska-Anyszka M., Lonnberg H.L., Darzynkiewicz E. (2006): Kinetics of the imidazolium ring-opening of mRNA 5'-cap analogs in aqueous alkali, ***Collection of Czechoslovak Chemical Communications*** 71 (4): 567-578.
- D13. Cheng G.F., Cohen L., Mikhli C., Jankowska-Anyszka M., Stepinski J., Darzynkiewicz E., Davis R.E. (2007): In vivo translation and stability of trans-spliced mRNAs in nematode embryos, ***Molecular & Biochemical Parasitology*** 153 (2): 95-106.
- D14. Darzynkiewicz Z.M., Bojarska E., Stepinski J., Jemielity J., Jankowska-Anyszka M., Davis R.E., Darzynkiewicz E. (2007): Affinity of dinucleotide cap analogues for human decapping scavenger (hDcpS), ***Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*** 26 (10-12): 1349-1352.
- D15. Wierchowski J., Pietrzak M., Stepinski J., Jemielity J., Kalek M., Bojarska E., Jankowska-Anyszka M., Davis R.E., Darzynkiewicz E. (2007): Kinetics of *C. elegans* DcpS cap hydrolysis studied by fluorescence spectroscopy, ***Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*** 26 (10-12): 1211-1215.
- D16. Liu W.Z., Zhao R., McFarland C., Kieft J., Niedzwiecka A., Jankowska-Anyszka M., Stepinski J., Darzynkiewicz E., Jones D.N.M., Davis R.E. (2009): Structural Insights into Parasite eIF4E Binding Specificity for m(7)G and m(2,2,7)G mRNA Caps, *Journal of Biological Chemistry* 284 (45): 31336-31349.
- D17. Wallace A., Filbin M.E., Veo B., McFarland C., Stepinski J., Jankowska-Anyszka M., Darzynkiewicz E., Davis R.E. (2010): The Nematode Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E/G Complex Works with a trans-Spliced Leader Stem-Loop To Enable Efficient Translation of Trimethylguanosine-Capped RNAs, ***Molecular and Cellular Biology*** 30 (8), 1958-1970.
- D18. Wypijewska A., Bojarska E., Stepinski J., Jankowska-Anyszka M., Jemielity J., Davis R.E., Darzynkiewicz E. (2010): Structural requirements for *Caenorhabditis elegans* DcpS substrates based on fluorescence and HPLC enzyme kinetic studies, ***FEBS Journal*** 277 (14), 3003-3013.

#### Publikacje przeglądowe w książkach i monografiach:

- D19. Jankowska-Anyszka M., Darzynkiewicz E. (2000): Struktura i funkcja końca 5' (kapu) mRNA i U snRNA, w „Na pograniczu chemii i biologii”, Tom IV, str. 143-179, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań
- D20. Stępiński J., Jankowska-Anyszka M., Darzynkiewicz E. (2002): Synteza ważnych biologicznie dinukleotydów z wiązaniem 5',5'-oligofosforanowym, w „Na pograniczu chemii i biologii”, Tom V, str. 105-138, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań
- D21. Jankowska-Anyszka M., Karczmarczyk M., Bulska E. (2012): Elektroforeza żelowa: podstawy i zastosowanie do badania połączeń platyny z białkami, w monografii „Analityka platynowców”, Wydawnictwo Malamut, ISBN 978-83-934442-1-2, w druku

**Publikacje stanowiące dorobek naukowy przed uzyskaniu stopnia doktora  
opublikowane w czasopismach z bazy Journal Citation Reports**

- M1. Jankowska M., Stępiński J., Stolarski R., Temeriusz A., Darzynkiewicz E. (1993): Synthesis and properties of new NH<sub>2</sub> and N7 substituted GMP and GTP 5'-mRNA cap analogues, **Collection of Czechoslovak Chemical Communications** 58, 138-141.
- M2. Jankowska M., Temeriusz A., Stolarski R., Darzynkiewicz E. (1993): Synthesis of m<sub>2</sub><sup>2,7</sup>GTP- and m<sub>3</sub><sup>2,2,7</sup>GTP-Sepharose 4B: new affinity resin for isolation of Cap Binding Proteins, **Collection of Czechoslovak Chemical Communications** 58, 132-137.
- M3. Izaurralde E., Lewis J., McGuigan C., Jankowska M., Darzynkiewicz E., Mattaj I.W. (1994): A nuclear Cap Binding Protein Complex involved in pre-mRNA splicing, **Cell** 78, 657-668.
- M4. Stępiński J., Bretner M., Jankowska M., Felczak K., Stolarski R., Wieczorek Z., Cai A.-L., Rhoads R.E., Temeriusz A., Haber D., Darzynkiewicz E. (1995): Synthesis and properties of P<sup>1</sup>,P<sup>2</sup> -, P<sup>1</sup>,P<sup>3</sup> -, P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup> - dinucleoside di-, tri- and tetraphosphate mRNA 5'-cap analogues, **Nucleosides & Nucleotides** 14, 717-721.
- M5. Wieczorek Z., Stępiński J., Jankowska M., Lonnberg H. (1995): Fluorescence and absorption spectroscopic properties of RNA 5'-cap analogues derived from 7-methyl-, N<sup>2</sup>,7-dimethyl- and N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>,7-trimethylguanosines, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 28,57-63.
- M6. Stolarski R., Sitek A., Stępiński J., Jankowska M., Oksman P., Temeriusz A., Darzynkiewicz E., Lonnberg H., Shugar D. (1996): <sup>1</sup>H-NMR studies on association of mRNA cap-analogues with tryptophan-containing peptides, **Biochimica et Biophysica Acta** 1293,97-105.
- M7. Jankowska M., Stępiński J., Stolarski R., Wieczorek Z., Temeriusz A., Haber D., Darzynkiewicz E. (1996): <sup>1</sup>H-NMR and fluorescence studies of new mRNA 5'-cap analogues, **Collection of Czechoslovak Chemical Communications** 61, 197- 202.
- M8. Stolarski R., Zdanowski K., Chlebicka L., Wieczorek Z., Sitek A., Stępiński J., Jankowska M., Mattinen J., Temeriusz A., Darzynkiewicz E. (1996): Inter- and intramolecular stacking of mRNA cap-analogues - relevance to initiation translation, **Collection of Czechoslovak Chemical Communications** 61, 217-221.
- M9. Bojarska E., Stępiński J., Guranowski A., Starzyńska E., Chlebicka L., Jankowska M., Darzynkiewicz E. (1996): Hydrolytic susceptibilities of modified 5'-mRNA cap analogues to the yellow lupin Ap<sub>3</sub>A and Ap<sub>4</sub>A hydrolases, **Collection of Czechoslovak Chemical Communications** 61, 192- 196.
- M10. Maroney P.A., Yu Y.-T., Jankowska M., Nielsen T.W. (1996): Direct analysis of nematode *cis*- and *trans*- spliceosomes: A functional role for U5 snRNA in spliced leader addition *trans*-splicing and the identification of novel SmsnRNPs, **RNA** 2, 735-745.
- M11. Wieczorek, Z., Zdanowski K., Chlebicka L. Stępiński J., Jankowska M., Kierdaszuk B., Temeriusz A., Darzynkiewicz E., Stolarski R. (1997): Fluorescence and NMR studies of intramolecular stacking of mRNA cap-analogues, **Biochimica et Biophysica Acta** 1354, 145-152.
- M12. Jankowska-Anyszka M., Lamphear B.J., Aamondt E.J., Harrington T., Darzynkiewicz E., Stolarski R., Rhoads R.E. (1998): Multiple isoforms of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in *Caenorhabditis elegans* can distinguish between mono- and trimethylated mRNA cap structures, **The Journal of Biological Chemistry** 273, 10538-10542.

- M13. Lampio A., Ahola T., Darzynkiewicz E., Stępiński J., Jankowska-Anyszka M., Kääriäinen L. (1999): Guanosine nucleotide analogs as inhibitors of alphavirus mRNA capping enzyme, **Antiviral Research** 42, 35-46.
- M14. Wieczorek Z., Niedźwiecka-Kornaś A., Chlebicka L., Jankowska M., Kiraga K., Stępiński J., Dadlez M., Drabent R., Darzynkiewicz E., Stolarski R. (1999): Fluorescence studies on association of human translation initiation factor eIF4E with mRNA cap-analogues, **Zeitschrift für Naturforschung**. 54c, 278-284.
- M15. Cai A., Jankowska-Anyszka M., Centers A., Chlebicka L., Stępiński J., Stolarski R., Darzynkiewicz E., Rhoads R. E. (1999): Quantitative assessment of mRNA cap analogues as inhibitors of in vitro translation, **Biochemistry** 38, 8538-8547.
- M16. Niedźwiecka-Kornaś A., Przedmojski R., Balaspiri L., Stępiński J., Jankowska M., Lonnberg H., Darzynkiewicz E., Stolarski R. (1999): Studies on association of mRNA cap-analogues with a synthetic dodecapeptide DGIEPMWEDEKN, **Nucleosides & Nucleotides** 18, 1105-1106.
- M17. Bojarska E., Kraciuk R., Wierzchowski J., Wieczorek Z., Stępiński J., Jankowska M., Starzyńska E., Guranowski A., Darzynkiewicz E. (1999): Hydrolysis of some mRNA 5'-cap analogs catalyzed by the human Fhit protein and lupin ApppA hydrolases, **Nucleosides & Nucleotides** 18, 1125-1126.
- M18. Keiper B. D., Lamphear B.J., Deshpande A.M., Jankowska-Anyszka M., Aamodt E.J., Blumenthal T.E., Rhoads R.E. (2000): Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*, **The Journal of Biological Chemistry** 275(14), 10590-10596.

Wawrzona, 24.09.2012

*M. Jankowska-Anyszka*