

Popularnonaukowy opis badań

Nukleotydy są organicznymi molekułami występującymi w komórkach żywych organizmów. Są nośnikami informacji genetycznej, dostarczają energii komórce i można je znaleźć w kofaktorach, a cykliczne odmiany nukleotydów uczestniczą w sygnalizacji komórkowej. Poziom nukleotydów w komórce jest ściśle regulowany przez enzymy z grupy fosfohydrolaz włączając w to pirofosfatazy oraz nukleazy. Dysfunkcje tych enzymów mogą prowadzić zarówno do niedoboru kluczowych nukleotydów, jak i do nagromadzenia ich w stężeniach toksycznych, a w konsekwencji do rozwoju stanów patologicznych. Jednym z kluczowych elementów regulacji puli nukleotydów jest kontrola ich stopnia fosforylacji. Ważną klasą enzymów zaangażowanych w ten proces są pirofosfatazy katalizujące reakcje hydrolizy wiązania pirofosforanowego występującego w nukleotydach. Zaburzenia aktywności pirofosfataz powiązane z rozwojem chorób nowotworowych czy nerwowo-mięśniowych i zidentyfikowano je jako cele terapeutyczne dla tych chorób. Od wielu lat na świecie prowadzone są badania nad poznaniem struktur i mechanizmów działania pirofosfataz istotnych w kontekście medycznym oraz poszukiwane są małowcząsteczkowe ligandy modulujące ich aktywność, które mogą być pomocne w zrozumieniu mechanizmów odpowiedzialnych za regulację aktywności pirofosfataz, jak i dać początek nowym terapiom. Od ponad dwóch dekad rozwijane są wysokoprzepustowe metody przesiewowe (ang. *High-Throughput Screening*, HTS), które są stosowane jako standardowe techniki poszukiwania leków w przemyśle farmaceutycznym oraz jako metody do identyfikacji małowcząsteczkowych związków oddziałujących z badanym celem.

W ramach Projektu wytworzyłem narzędzia badawcze (tzw. sondy molekularne) w oparciu o chemicznie modyfikowane nukleotydy zawierające ugrupowanie **fluorofosforanowe**. Opracowałem trzy wydajne metody syntezy nukleotydów i oligonukleotydów znakowanych grupą **fluorofosforanową** w pozycji 5'. Obecność atomu fluoru w cząsteczce nukleotydu okazała się korzystna z dwóch powodów. Po pierwsze związki te można było zastosować jako sondy molekularne w badaniach ^{19}F NMR. Po drugie fluoromonofosforany nukleotydów były podatne na hydrolizę enzymatyczną z uwolnieniem jonów fluorkowych. Fakt ten wykorzystałem do opracowania wysokoprzepustowego badania przesiewowego, gdzie substratem jest fluorofosforanowy analog nukleotydu, a detekcja postępu reakcji enzymatycznej odbywa się poprzez zastosowanie sondy fluorogenicznej selektywnie reagującej z jonami fluorkowymi. Metodę HTS zastosowałem do zbadania trzech enzymów z grupy pirofosfataz. Nieprawidłowe działanie tych enzymów jest skorelowane z różnymi schorzeniami jak np. rdzeniowa atrofia mięśniowa (ang. *spinal muscular atrophy*, SMA), a związki hamujące aktywność enzymatyczną są identyfikowane jako terapeutyki. Dzięki opracowanej metodzie HTS wykonałem badania przesiewowe ponad 140 różnych, chemicznie modyfikowanych nukleotydów, co pozwoliło na identyfikację wielu silnych inhibitorów jak i rzuciło nowe światło na biologiczną rolę tych enzymów w degradacji mRNA. Innym aspektem mojego projektu doktorskiego było wykorzystanie fluorofosforylowanych oligonukleotydów jako sond molekularnych do badania zmian konformacyjnych i oddziaływań tych cząsteczek. Metodę ^{19}F NMR zastosowałem w badaniach stabilności tworzenia się podwójnych nici DNA, do wykrywania niekomplementarności w nici hybrydującej, do monitorowania tworzenia się i rozplatania nici pod wpływem temperatury oraz zmian pH oraz do badania oddziaływań białko-ligand. Mam nadzieję, że znakowane fluorofosforanem nukleotydy mogłyby w przyszłości posłużyć do wysokoprzepustowego poszukiwania ligandów wiążących struktury G-kwadrupeksów lub i-motywów metodami ^{19}F NMR.