

Specyficzność względem 5' końca mRNA białek z rodziny eIF4E z różnych organizmów

AUTOREFERAT

Joanna Maria Żuberek

Zakład Biofizyki, Wydział Fizyki  
Uniwersytetu Warszawskiego

Warszawa, 2017

## Spis treści

|  |    |
|--|----|
| 1. Imię i Nazwisko .....   | 2  |
| 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.....   | 2  |
| 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....   | 2  |
| 4. Bibliometryczne podsumowanie dorobku naukowego.....   | 2  |
| 5. Osiągnięcie wynikające 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.): ..... | 3  |
| 5.1 Ogólne przedstawienie tematyki i głównego celu pracy .....   | 4  |
| 5.2 Prezentacja osiągnięcia naukowego .....  | 8  |
| 6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.....   | 19 |
| 6.1. Omówienie działalności badawczej przed i po uzyskaniu stopnia doktora .....   | 19 |
| 6.2 Publikacje stanowiące pozostały dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora .....   | 24 |
| 6.2.1. Publikacje z listy filadelfijskiej.....   | 24 |
| 6.2.2. Artykuły w wydawnictwach spoza listy filadelfijskiej .....  | 26 |
| 6.3 Publikacje stanowiące pozostały dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora .....   | 28 |
| 6.3.1. Publikacje z listy filadelfijskiej.....   | 28 |
| 6.3.2. Artykuły w wydawnictwach spoza listy filadelfijskiej .....  | 29 |
| 7. Działalność na rzecz rozwijania nowej infrastruktury naukowo-badawczej w Zakładzie Biofizyki oraz nowe inicjatywy w procesie dydaktycznym .....   | 30 |
| 8. Literatura .....  | 31 |

## 1. Imię i Nazwisko

Joanna Maria Żuberek

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

**06.2005 - doktor nauk fizycznych w zakresie fizyki** (z wyróżnieniem), Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski. Tytuł rozprawy: *Molekularne mechanizmy regulacji biosyntezy białka - rola fosforylacji inicjacyjnego faktora translacyjnego eIF4E w oparciu o badania biochemiczne i biofizyczne*, promotor dr hab. Edward Darżynkiewicz, prof. UW

**09.1999 - magister fizyki, specjalność biofizyka**, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski. Tytuł pracy: *Mechanizm działania kinazy tymidynowej za pomocą metod emisyjnych i kinetyki enzymatycznej*, dr hab. Borys Kierdaszuk

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>09.2017-09.2018</b>  | Adiunkt, Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski                                 |
| <b>02.2016-09.2017</b>  | Adiunkt, Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski                                 |
| <b>03.2009-02.2016</b>  | Adiunkt mianowany, Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski                       |
| <b>03.2006-02.2009</b>  | Adiunkt kontraktowy, Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski                     |
| <b>12.2004 -02.2006</b> | Starszy referent inżynierjno-techniczny, Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski |
| <b>10.1999-09.2004</b>  | Studia doktoranckie na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego   |

w okresach od 12.2013 do 06.2014 oraz od 02.2017 do 06.2017 przebywałam na urlopie macierzyńskim, oraz od 06.2017 do 02.2018 przebywam na urlopie rodzicielskim.

## 4. Bibliometryczne podsumowanie dorobku naukowego

z dnia 13.11.2017 według Web of Science

Indeks Hirscha - 16

Sumaryczna liczba cytowań / bez autocytowań - 767/601

Sumaryczny Impact Factor wg roku opublikowania – 164,241

Liczba oryginalnych publikacji - 44

Liczba publikacji konferencyjnych - 23

5. Osiągnięcie wynikające 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.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

**Specyficzność względem 5' końca mRNA białek z rodziny eIF4E z różnych organizmów**

b) Autorzy, tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa,

Gwiazdką oznaczono autorstwo korespondencyjne habilitantki. Kursywą oznaczono autorów, którzy wykonywali badania pod bezpośrednią opieką naukową habilitantki.

(H2. DK – magistrantka; H5. DK – doktorantka; H6. AK – magistrantka/doktorantka; H8. AS – pracownik inżynierjno-techniczny)

- H1.** Yoffe Y, **Zuberek J.**, Lerer A., Lewdorowicz M., Stepinski J., Altmann M., Darzynkiewicz, E., Shapira, M. Binding Specificities and Potential Roles of Isoforms of Eukaryotic Initiation Factor 4E in Leishmania. 2006 *Eukaryotic Cell* 5: 1969-1979 IF=4,303/Cyt. 29
- H2.** **Zuberek J.**, Kubacka D., Jablonowska A., Jemielity J., Stepinski J., Sonenberg N., Darzynkiewicz. E. Weak binding affinity of human 4EHP for mRNA cap analogs. 2007 *RNA* 13: 691-697 IF=5,111/Cyt. 24
- H3.** Freire E.R., Vashisht A.A., Malvezzi A.M., **Zuberek J.**, Langousis G., Saada E.A., Nascimento J de F., Stepinski J., Darzynkiewicz E., Hill K., De Melo Neto O.P., Wohlschlegel J.A., Sturm N.R., Campbell D.A. eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in Trypanosoma brucei. 2014 *RNA* 20: 1272-1286 IF=4,622/Cyt. 12
- H4.** Freire E.R., Malvezzi A.M., Vashisht A.A., **Zuberek J.**, Saada E.A., Langousis G., Nascimento J.D.F., Moura D., Darzynkiewicz E., Hill K., de Melo Neto O.P., Wohlschlegel J.A., Sturm N.R., Campbell D.A. Trypanosoma brucei translation initiation factor homolog EIF4E6 forms a tripartite cytosolic complex with EIF4G5 and a capping enzyme homolog. 2014 *Eukaryotic Cell* 13: 896-908 IF=3,179/Cyt. 10
- H5.** Kubacka D., Miguel R.N., Minshall N., Darzynkiewicz E. Standart N., **Zuberek J.\*** Distinct Features of Cap Binding by eIF4E1b Proteins. 2015 *Journal Molecular Biology*. 427: 387-405 IF=4,333/Cyt. 2
- H6.** Kropiwnicka A., Kuchta K., Lukaszewicz M., Kowalska J., Jemielity J., Ginalski K., Darzynkiewicz E., **Zuberek J.\*** Five eIF4E isoforms from Arabidopsis thaliana are characterized by distinct features of cap analogs binding. 2015 *Biochemical Biophysical Research Communication* 456: 47-52 IF=2,297/Cyt. 4
- H7.** **Zuberek J.\***, Kuchta K., Hernandez G., Sonenberg N., Ginalski K. Diverse cap-binding properties of Drosophila eIF4E isoforms. 2016 *Biochimica et Biophysica Acta, Proteins and Proteomics* 1864: 1292-1303 IF=3,016/Cyt. 0
- H8.** **Zuberek J.\***, Stelmachowska A. Tryptophan Residues from Cap Binding Slot in eIF4E Family Members: Their Contributions to Near-UV Circular Dichroism Spectra. 2017 *Journal Physical Chemistry and Biophysics* 7: 250

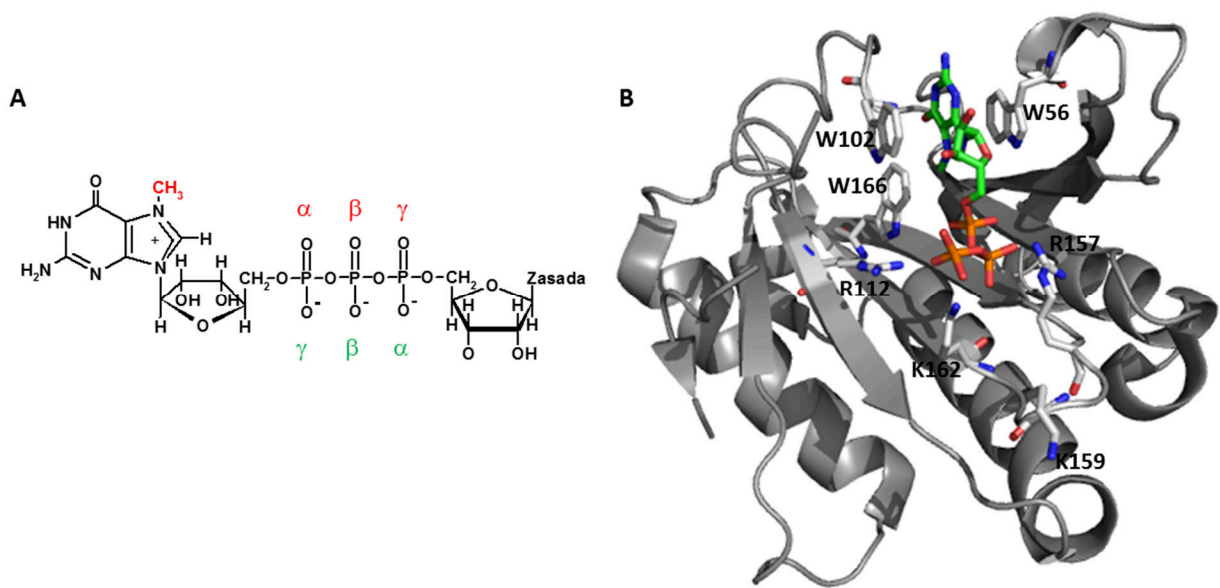
c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

### 5.1 Ogólne przedstawienie tematyki i głównego celu pracy

Eukariotyczne mRNA posiadają na swoim końcu 5' strukturę składającą się z 7-metyloguanozyny połączonej nietypowym wiązaniem 5'-5' trifosforanowym z pierwszym transkrybowanym nukleotydem ( $m^7GpppN$ , gdzie N-dowolny nukleotydyd) zwaną kapem (Rysunek 1A) [1]. Odgrywa ona kluczową rolę na wszystkich etapach metabolizmu mRNA w komórce, począwszy od splicingu mRNA [2,3], poprzez jego eksport z jądra do cytoplazmy [4,5], następnie przez inicjację i inhibicję translacji [6–8], aż po degradację mRNA w komórce [9,10].

Na wszystkich tych etapach ze strukturą kapu oddziałują różnego typu białka wiążące. Wspólnym strukturalnym motywem białek wiążących kap jest tworzenie trójwarstwowego układu tzw. kanapkowego *stackingu*, w którym pierścień 7-metyloguaniny kapu interkaluje pomiędzy dwa pierścienie aromatyczne [11–14] lub pierścień aromatyczny i inny aminokwas stabilizujący wiązanie [15–17].

Do grupy tych białek należy eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E – eIF4E, niewielkie (około 25 kDa) monomeryczne białko o wysoce homologicznej, począwszy od drożdży aż po człowieka, sekwencji i strukturze posiadającej charakterystyczny motyw o topologii:  $\beta 1\beta 2\alpha 1\beta 3\beta 4\alpha 2\beta 5\beta 6\alpha 3\beta 7\alpha 4\beta 8$ , tworzący strukturę określaną jako zaciśnięta dłoń (*ang. cupped hand*) [11]. Wiązanie 7-metyloguaniny kapu u białek eIF4E realizowane jest poprzez oddziaływanie warstwowe typu kation- $\pi$  z pierścieniami indolowymi dwóch reszt tryptofanowych. W przypadku białka ludzkiego są to Trp56 i Trp102. Dodatkowo pierścień zasady stabilizowany jest przez trzy wiązania wodorowe pomiędzy N(1)H i grupą aminową 7-metyloguaniny a grupą karboksylową kwasu glutaminowego (Glu103 u człowieka) oraz pomiędzy atomem tlenu w pozycji szóstej  $m^7Gua$  a grupą amidową tryptofanu odpowiadającemu ludzkiemu Trp102, jak również przez oddziaływanie van der Waalsa grupy metylenowej  $m^7Gua$  z trzecim tryptofanem znajdującym się w szczelinie wiążącej kap (Trp166 w białku ludzkim). Ujemnie naładowane grupy fosforanowe kapu stabilizowane są poprzez wiązania wodorowe resztami zasadowymi, które znajdują się u wejścia do szczeliny wiążącej kap. U białka ludzkiego są to Arg112, Arg157, Lys159, Lys162 i Lys206 (Rysunek 1B)[18,19].

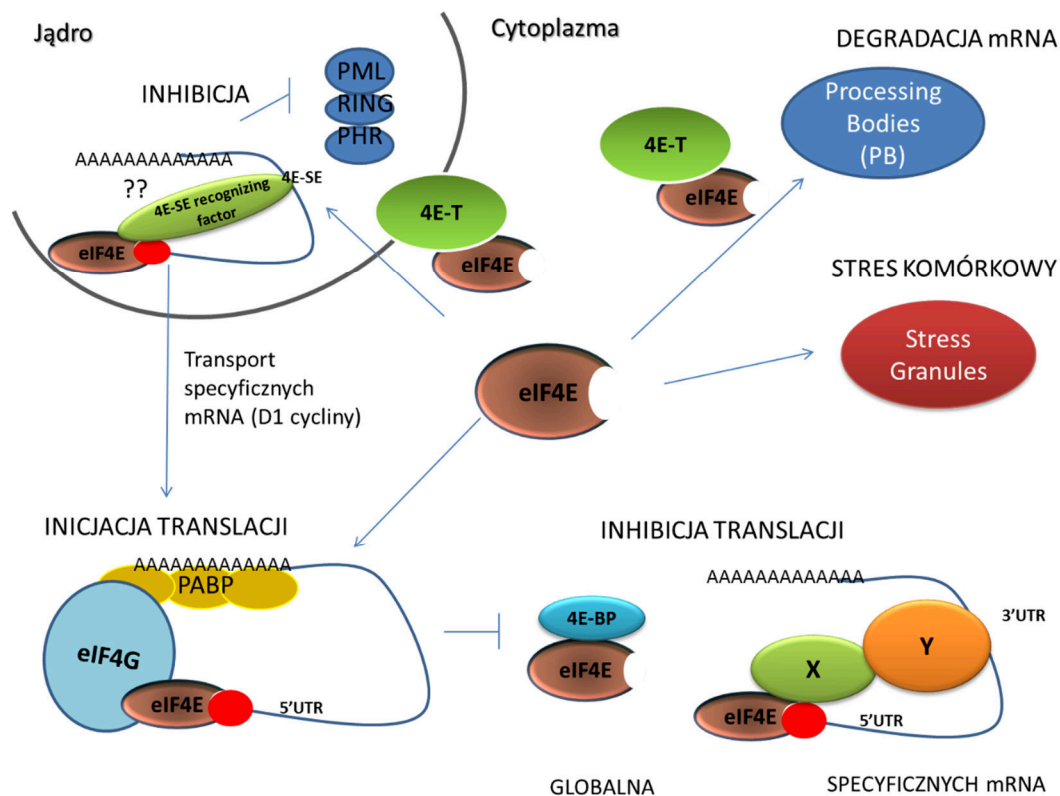


**Rysunek 1.** (A) Struktura chemiczna analogu kapu 5' końca mRNA. Na rysunku kolorem czerwonym zaznaczono przyjętą nomenklaturę numeracji grup fosforanowych dla mononukleotydowych analogów kapu a kolorem zielonym dla dinukleotydowych. (B) Struktura krystalograficzna kompleksu ludzkiego eIF4E z analogiem kapu m<sup>7</sup>GTP (PDB: 1IPC, [19]). Analog kapu m<sup>7</sup>GTP zaznaczono w postaci kulek, zaś w postaci pałeczek reszty aminokwasów biorące udział w bezpośrednim wiązaniu kapu.

### Funkcje białka eIF4E w komórce

Wydaje się, że wszystkie funkcje, jakie eIF4E pełni w komórce, związane są z obecnością w tym czynniku dwóch miejsc wiązania [20], jednego dla kapu znajdującego się we wklęsłej części powierzchni białka, w wąskiej szczelinie hydrofobowej, a drugiego dla szerokiej klasy białek oddziaływujących z 4E znajdującego się na wypukłej części powierzchni białka, w rejonie o charakterze hydrofobowo-kwasowym [21–24].

Kluczową rolę eIF4E w komórce jest jego udział w tworzeniu kompleksu inicjacyjnego 48S w procesie syntezy białka [6,25]. Wiązanie eIF4E z kapem oraz białkiem eIF4G, które stanowi niejako „rusztowanie” dla innych czynników kompleksu, jest etapem limitującym proces inicjacji translacji. Oddziaływanie eIF4E z eIF4G jest globalnie regulowane przez tzw. białka wiążące 4E (4E-BP), które konkurują z eIF4G o wspólne miejsce wiązania na eIF4E tym samym hamując proces inicjacji translacji. Represja procesu inicjacji translacji, w której bierze udział eIF4E zachodzi również lokalnie dla wybranych mRNA w danych stadiach rozwoju organizmów. Obserwowany jest tutaj głównie mechanizm hamowania translacji zależny od sekwencji 3'UTR mRNA. Białko eIF4E oddziaływujące z kapem danego mRNA wiązane jest przez specyficznego partnera białkowego, który bezpośrednio lub za pośrednictwem innych białek wiąże specyficzną sekwencję w 3'UTR danego mRNA, co uniemożliwia utworzenie kompleksu inicjacyjnego (Rysunek 2) [7].



**Rysunek 2.** Schemat przedstawiający udział białka eIF4E w procesach metabolizmu mRNA w komórce [6,20,22,26].

eIF4E jest również zaangażowane w transport z jądra do cytoplazmy wybranych mRNA posiadający w 3' UTR tzw. element wrażliwy na eIF4E – 4E-SE, po którym eIF4E rozpoznaje mRNA [5,20]. eIF4E znajduje się również cytoplazmatycznych granulach zwanych *Processing Bodies* (P-Body), związanych z degradacją mRNA, jak i w granulkach stresu (SG). W transporcie eIF4E zarówno do jądra, jak i do P-body pośredniczy białko 4E-Transporter (4E-T) [27,28] (Rysunek 2).

### Rodzina białek eIF4E

Początkowo eIF4E uważano za pojedyncze białko nienależące do żadnej rodziny, ze względu na to, że w wyniku izolacji białka z komórek ssaków metodą chromatografii powinowactwa otrzymywano wyłącznie pojedynczy polipeptyd o masie około 25 kDa [29]. Gdy 15 lat po odkryciu eIF4E ukazała się praca Browning i współpracowników prezentująca zaskakujące odkrycie, iż u pszenicy występują dwie izoformy eIF4E (nazwane eIF4E i eIF(iso)4E) [30], założono, iż taka anomalia ograniczona jest wyłącznie do roślin okrytonasiennych [31,32]. Zwłaszcza, że w tym czasie zidentyfikowano i potwierdzono analizą Southern obecność tylko jednej jego kopii genu eIF4E u *Sacharomyces cerevisiae* [33]. Ponadto ssacze eIF4E było zdolne do funkcjonalnego zastąpienia drożdżowego eIF4E w komórkach drożdży pozbawianych endogennego eIF4E, co potwierdzało funkcjonalne i strukturalne podobieństwo tych białek [33]. Jednakże 11 lat później ukazały się jednocześnie trzy prace, pokazujące iż białko eIF4E jest jednak członkiem większej rodziny białek. Wykazano obecność trzech izoform białka eIF4E u nicienia *Caenorhabditis elegans*, obecność drugiej izoformy eIF4E nazwanej 4EHP u człowieka [34], oraz obecność trzeciej izoformy eIF4E u roślin – nCBP [35]. Od tej pory ilość prac dotycząca obecności i roli izoform eIF4E w danym organizmie rosta lawinowo [36–40]. W roku 2005 ukazała się bioinformatyczna



praca z laboratorium prof. Rosmery Jagus przedstawiająca filogenetyczną analizę rodziny białek eIF4E u organizmów eukariotycznych wykonaną na podstawie analizy zdeponowanych w Genebank sekwencji. Pod względem taksonomicznym członków rodziny białek eIF4E można podzielić na 8 podgrup, a te, z wyjątkiem podgrupy 8 obejmującej nietypowe eIF4E z pierwotniaków, pogrupować w obręb trzech klas strukturalnych. Pokazano, że u członków rodziny eIF4E występuje charakterystyczny konserwowany środkowy i C-końcowy region sekwencji – nazwany rdzeniem, który charakteryzuje się zachowanym wzorem odnośnie pozycji aminokwasów aromatycznych Trp, Phe i His w sekwencji: H(x5)W(x2)W(x8–12)W(x9)F(x5)FW(x20)F(x7)W(x10)W(x9–12)W(x34–35)W(x32–34)H.

Analiza obecności zachowanych tryptofanów u zidentyfikowanych izoform eIF4E ujawniła, że u pewnych podgrup taksonomicznych, u eIF4E w pozycjach odpowiadających Trp43 i Trp56 ludzkiego eIF4E-1a występują inne aminokwasy. Cecha ta stała się jednym z głównych wyznaczników charakteryzujących trzy klasy strukturalne u białek z rodziny eIF4E. U członków Klasy I pozycjach odpowiadającym Trp43 i Trp56 ludzkiego eIF4E-1a zawsze występuje tryptofan. Klasa ta obejmuje wszystkie znane eIF4E pełniące rolę głównych czynników translacyjnych (nazywane obecnie często eIF4E-1 lub eIF4E-1a), zidentyfikowane u zwierząt, roślin i grzybów. U wielu organizmów zaobserwowano duplikację genu eIF4E-1, i tak np. u ssaków występują dwie izoformy zaliczane do Klasy I, u ryby słodkowodnej *Danio rerio* trzy, a u nicienia *C. elegans* cztery. U członków zaliczanych do Klasy II w pozycji odpowiadającej Trp43 występuje tyrozyna, fenyloalanina lub leucyna, zaś w pozycji odpowiadającej Trp56 występuje tyrozyna bądź fenyloalanina. U większości organizmów w obrębie tej klasy występuje tylko jedna izoforma eIF4E (eIF4E-2), z wyjątkiem płazów i ryb kostnoszkieletowych. Członkowie Klasy II wykazują około 30-35 % identyczności członkami Klasy I danej rodziny. Izofomy eIF4E (eIF4E-3) zaliczane do Klasy III identyfikowano tylko u zwierząt, szczególnie u strunowców, sporadycznie znajdujące się u pewnych rodzajów parzydełkowców, mięczaków, owadów czy pajęczaków. W izoformach tej klasy obserwowano wyłącznie podstawienie Trp56 na cysteinę lub tyrozynę i wykazują one około 25-30-% identyczności sekwencji z członkami Klasy I danej rodziny.

### Potencjalna rola izoform eIF4E – cel naukowy pracy

Identyfikacja poszczególnych członków rodziny eIF4E w danym organizmie postawiła kolejne, do tej pory wciąż otwarte pytanie, jaka jest potencjalna rola izoform eIF4E w danym organizmie. Dlaczego u jednych organizmów występuje wielokrotna duplikacja genu eIF4E a u innych nie? Obecnie najwięcej o roli izoform eIF4E wiadomo u nicienia *C. elegans* [36,41–44], sporo jednak też wiadomo o roli eIF4E-2 (4EHP) i eIF4E-3 u ssaków. U ssaków izoforma eIF4E-2 pełni prawdopodobnie rolę inhibitora translacji. Zaobserwowano, iż u myszy podczas dojrzewania oocytów mIF4E-2 wiąże czynnik transkrypcyjny Prep1, co powoduje zahamowanie translacji mRNA genu homeotycznego *Hoxb4* [45], oraz, że wraz białkiem GIGYF2 oraz białkiem zawierającym motyw palca cynkowego - ZNF598 jest składnikiem kompleksu hamującego translację mRNA podczas rozwoju embrionu [46]. Translacyjna regulacja genów homeotycznych z udziałem izoformy eIF4E z Klasy II zaobserwowana została również u *Drosophila melanogaster*. Podczas rozwoju embrionu d4EHP (deIF4E-8) w kompleksie z odpowiednimi partnerami białkowymi hamuje miejscowo translację mRNA *caudal* i mRNA *hunchback*, które to czynniki są odpowiedzialne za prawidłowe formowanie osi przednio-tylnej embrionu muszki owocowej [47,48]. Obecność 4EHP zaobserwowano również w kompleksie wyciszającym translację mRNA za pośrednictwem miRNA [49] Ostatnie badania sugerują alternatywną do inhibitora translacji rolę eIF4E-2. Pokazują one, że w komórkach ludzkich w warunkach ekstremalnego braku tlenu (*hypoxia*) izoforma ta używana jest w procesie alternatywnej inicjacji translacji zależnej od kapu [50–52]. Przeprowadzone ostatnio badania nad izoformą eIF4E-3 z Klasy III u myszy sugerują, iż izoforma ta może działać jako tkankowo-specyficzny supresor nowotworowy [17].



Zrozumienie fizjologicznej roli poszczególnych członków rodzin eIF4E ma więc niezwykle istotne znaczenie w rozumieniu podstawowych molekularnych procesów komórkowych. Wyjaśnienie roli białek eIF4E w dojrzewaniu i różnicowaniu komórek, rozwoju embrionu, czy transformacji nowotworowej może mieć istotne implikacje w poszukiwaniu nowych strategii terapeutycznych. Wyjaśnienie roli poszczególnych członków rodzin eIF4E nie jest jednak możliwe bez identyfikacji podobieństw i różnic w molekularnym mechanizmie rozpoznania struktury 5' końca mRNA wpływających na różną aktywność i rolę poszczególnych izoform eIF4E w obrębie rodziny w danym organizmie, jak również między poszczególnymi organizmami.

## 5.2 Prezentacja osiągnięcia naukowego

Prezentowane osiągnięcie naukowe „*Specyficzność względem 5' końca mRNA białek z rodziny eIF4E z różnych organizmów*” oparte jest na badaniach porównawczych rodzin białek eIF4E: u człowieka jako przedstawiciela ssaków, u żaby szponiastej (*Xenopus laevis*) - jako przedstawiciela płazów, u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) przedstawiciela owadów i modelowego organizmu, u rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) jako przedstawiciela roślin okrytonasiennych, oraz eIF4E z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jako przedstawiciela grzybów, a zarazem modelowego organizmu. Badania wzbogacono również o nietypową rodzinę białek eIF4E z pasożytniczych pierwotniaków. Przedstawione wyniki opierają się głównie na równowagowych stałych asocjacji ( $K_{as}$ ) wyznaczonych dla badanych białek eIF4E w kompleksie z szeregiem analogów kapu metodą miareczkowania fluorescencyjnego, analizie sekwencyjno-strukturalnej wspartej przez modelowanie homologiczne dla nierozwiązanych struktur, jak również na zmianach struktury III-rzędowej i otoczenia tryptofanów rejestrowanych w widmach dichroizmu kołowego w zakresie bliskiego nadfioletu (near-UV CD).

### A. Zróżnicowanie powinowactwa do kapu wśród „kanonicznych” czynników translacyjnych eIF4E z różnych organizmów

W inicjacji translacji u organizmów eukariotycznych występują pewne różnice między innymi np. w procesie formowania kompleksu preincyjnego i regulacji aktywności poszczególnych jego komponentów w tym w szczególności eIF4F. U roślin obecne są dwa odrębne kompleksy eIF4F: kompleks eIF4F składający się z eIF4E i eIF4G oraz kompleks eIF(iso)4F składający się z eIF(iso)4E i eIF(iso)4G [30–32,53], które, jak wskazują badania, są preferencyjnie wykorzystywane do translacji pewnej grupy specyficznych mRNA. Do tej pory u roślin nie zidentyfikowano homologów białek 4E-BP regulujących dostępność eIF4E dla formowania kompleksu eIF4F [53]. W tym kontekście istotne jest pytanie, jaka jest różnica w powinowactwie czynników translacyjnych eIF4E u różnych organizmów i jakie elementy sekwencyjno-strukturalne są tym związane. Czy zmiany w molekularnym mechanizmie wiązania kapu u eIF4E z danego organizmu przekładają się na różnice w tworzeniu i mechanizmach oddziaływania pomiędzy poszczególnymi partnerami kompleksu preincyjnego w procesie inicjacji translacji.

Wyznaczone w tych samych warunkach z izoterm z miareczkowania fluorescencyjnego stałe asocjacji kanonicznych czynników eIF4E z szeregiem analogów kapu w pracach: **H2, H5, H6, H7, H8** pokazują, że zachodzące sekwencyjno-strukturalne zmiany ewolucyjne w kanonicznych czynnikach eIF4E są głównie ukierunkowane na zwiększenie powinowactwa eIF4E do kapu. Kanoniczne ludzkie czy mysie eIF4E wiąże  $m^7GTP$  ponad 10-razy silniej niż jego odpowiednik z muszki owocowej, roślin, czy drożdży, natomiast już tylko 1,5 razy silniej niż eIF4E płazów (Tabela 1). Wykazaliśmy (**H6-H8**), że istotną

tutaj rolę odgrywają zmiany w sieci oddziaływań elektrostatycznych stabilizujących wiązanie łańcucha fosforanowego kapu w szczeliny wiążącej kap, a w szczególności wyraźnie słabszej stabilizacji  $\gamma$ -fosforanu w przypadku eIF4E-1 oraz  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -fosforanu kapu u AtelF4E i yeIF4E. W odróżnieniu od ssaczych eIF4E, gdzie grupa  $\beta$ -fosforanowa kapu stabilizowana jest przez dwa wiązania wodorowe z łańcuchem bocznym Arg157 i Lys162, w przypadku białek z eIF4E z rzodkiewnika pospolitego i z drożdży  $\beta$ -fosforan stabilizowany jest tylko przez jedno wiązanie wodorowe z Arg157 u yeIF4E oraz Arg178 lub Arg183 u AtelF4E. Przeprowadzone w pracy **H7** porównanie sekwencji oraz modelowanie homologiczne wykazało, że główną przyczyną słabszego wiązania  $\gamma$ -fosforanu u eIF4E bezkręgowców, roślin i grzybów jest brak dodatkowej  $\alpha$ -helisy występującej za  $\beta$ 4-nicią. Tworzy ją ciąg aminokwasów KQRRS z dużymi grupami bocznymi występujący wyłącznie u kręgowców. Dodatkowa  $\alpha$ -helisa przesuwana sąsiadującą z nią przestrzenią pętli  $\beta$ 5 $\beta$ 6 w stronę szczeliny wiążącej kap, co umożliwia stabilizację  $\gamma$ - i  $\delta$ -fosforanu kapu przez Lys159 u kręgowców. Zaobserwowaliśmy (**H5-H7 oraz dane niepublikowane dla eIF4E z *S. cerevisiae***), że u wszystkich badanych kanonicznych eIF4E obecność drugiej zasady w analogu kapu powoduje destabilizację wiązania, jednakże koszt energetyczny związany z obecnością drugiej zasady dla białka drożdżowego i roślinnego jest o ponad połowę mniejszy niż w przypadku eIF4E kręgowców. U żadnej z izoform nie zaobserwowano tworzenia się kontaktów stabilizujących drugą zasadę kapu, a słabsza destabilizacja wiązania dinukleotydowego analogu kapu w porównaniu z jego mononukleotydowym odpowiednikiem u yeF4E i AtelF4E wynika najprawdopodobniej z braku kontaktów pomiędzy  $\gamma$ -fosforanem kapu a grupami bocznymi dodatnio naładowanych aminokwasów u yeF4E i AtelF4E znajdujących się u wejścia do szczeliny wiążącej kap, które nie są destabilizowane przez obecność labilnej drugiej zasady kapu. Przeprowadzona w pracach **H5-H8** analiza specyficzności badanych kanonicznych eIF4E z różnych organizmów wobec metylacji guanozyny kapu w pozycji N7, wskazuje, że również u białek eIF4E z kręgowców nastąpiły zmiany sekwencyjno-strukturalne prowadzące do wyselekcjonowania najbardziej optymalnego ułożenia pierścieni indolowych Trp oraz N7-metyloguaniny kapu dla oddziaływania kation- $\pi$ .

Przeprowadzona w pracy **H6** analiza porównawcza izoform czynników translacyjnych 4E u roślin nieoczekiwanie pokazała, że drugi z czynników eIF(iso)4E pojawiający się ewolucyjnie dopiero u roślin okrytonasiennych, wykazuje bardzo niskie powinowactwo do analogów kapu. AtelF(iso)4E wiąże 10-rzy słabiej m<sup>7</sup>GpppG niż AtelF4E, a m<sup>7</sup>GTP 5-rzy słabiej. Analiza wymodelowanych struktur wskazuje, iż główną przyczyną niskiego powinowactwa do kapu eIF(iso)4E jest skrócenie o 6 aminokwasów pętli występującej pomiędzy  $\beta$ 7-nicią a  $\beta$ 8-nicią. Skrócenie pętli skutkuje niemożliwością utworzenia  $\alpha$ -helisy tworzącej domykającą krawędź szczeliny wiążącej kap u innych eIF4E.

Podsumowując wszystkie zidentyfikowane sekwencyjno-strukturalne różnice pomiędzy kanonicznymi eIF4E z badanych organizmów wskazują one, iż po związaniu kapu u bezkręgowców, roślin i owadów struktura eIF4E pozostaje bardziej „otwarta” niż u eIF4E kręgowców. Domknięcie struktury eIF4E może następować w wyniku oddziaływania z białkami wiążącymi 4E (4E-BP), a typ zachodzących zmian strukturalnych wywołujących domknięcie szczeliny wiążącej kap i zwiększające powinowactwo eIF4E do kapu uzależnione jest od partnera białkowego, a tym samym od procesu, w którym w danym momencie uczestniczy eIF4E w komórce.

## **B. Zróżnicowanie powinowactwa do kapu wśród izoform eIF4E z Klasy I oraz identyfikacja zmian sekwencyjno-strukturalnych z tym związanych**

W badaniach nad członkami rodzin eIF4E nadal obowiązuje postawiona w 2005 roku przez Hernandeza i Vazquez-Pianola [54] hipoteza, że tylko jeden z członków rodziny eIF4E pełni rolę głównego czynnika translacyjnego występując we wszystkich tkankach organizmu i podlegając ciągłej ekspresji we

wszystkich stadiach rozwoju i życia organizmu, a pozostałe czynniki są wyłącznie zaangażowane w specyficzne procesy regulacji ekspresji genów występujących np. na danym etapie rozwoju. Kolejnym więc pytaniem, jakie sobie zadałam, było czy potencjalna różna rola fizjologiczna członków rodziny eIF4E w obrębie tej samej klasy strukturalnej odzwierciedlona jest też w ich różnej specyficzności do analogów kapu. Jeśli tak, to jakie zmiany występują w molekularnym mechanizmie wiązania kapu u tych izoform oraz, jakie zmiany sekwencyjno-strukturalne są z tym związane. Czy ma to znaczenie dla wyboru partnerów białkowych, z którymi będzie oddziaływać dana izoforma eIF4E?

U kręgowców w Klasie I oprócz kanonicznego eIF4E (zwanego obecnie eIF4E-1a) występuje izoforma eIF4E-1b, której ekspresja jest ograniczona do jajników, oocytów i wczesnej embriogenezy [55]. U ssaków jej rola jest nieznana, natomiast u żaby szponiastej zidentyfikowano ją jako składnik kompleksu CPEB mRNP hamującego translację matczynej mRNA w oocytach [56]. U muszki owocowej występuje, aż sześć genów kodujących siedem izoform eIF4E zaliczanych do Klasy I, przy czym poza delF4E-1, który jest głównym czynnikiem translacyjnym, znana jest tylko rola delF4E-3, której obecność jest wymagana do prawidłowego przebiegu spermatogenezy (**D16**). U *A. thaliana* występują cztery izoformy eIF4E zaliczane do Klasy I, gdzie obecność izoform eIF4E-1b i eIF4E-1c związana jest z podwójną duplikacją genu *eIF4E* [57].

Wszystkie izoformy eIF4E z Klasy I u człowieka, muszki owocowej i rzodkiewnika pospolitego posiadają wytypowane jako kluczowe dla wiązania kapu aminokwasy, jednak ich specyficzność wobec kapu, jak pokazują badania przeprowadzone w pracach **H5-H7**, jest bardzo zróżnicowana (Tabela 1).

**Tabela 1.** Równowagowe stałe asocjacji dla kompleksów eIF4E należących do Klasy I z analogiem kapu  $m^7GTP$  wyznaczone metodą miareczkowania fluorescencyjnego.

| Klasa eIF4E      | <i>H. sapiens</i> (H2, H5, H7, H8) |  | <i>D. melanogaster</i> (H7) |  | <i>A. thaliana</i> (H6) |  |
|------------------|------------------------------------|--|-----------------------------|--|-------------------------|--|
|                  | Nazwa eIF4E                        | $K_{as}$ [ $\mu M^{-1}$ ] dla $m^7GTP$ | Nazwa eIF4E                 | $K_{as}$ [ $\mu M^{-1}$ ] dla $m^7GTP$ | Nazwa eIF4E             | $K_{as}$ [ $\mu M^{-1}$ ] dla $m^7GTP$ |
| <b>Klasa I</b>   | helF4E-1a*                         | $70,1 \pm 1,2$                         | delF4E-1*                   | $8,94 \pm 0,27$                        | AtelF4E*                | $5,79 \pm 0,13$                        |
|                  | helF4E-1b                          | $22,0 \pm 1,4$                         | delF4E-2                    | $8,47 \pm 0,28$                        | AtelF4E-1b              | $3,12 \pm 0,06$                        |
|                  |                                    |  | delF4E-3                    | $19,29 \pm 0,52$                       | AtelF4E-1c              | $5,72 \pm 0,10$                        |
|                  |                                    |  | delF4E-4                    | $2,16 \pm 0,07$                        | AtelF(iso)4E*           | $1,07 \pm 0,05$                        |
|                  |                                    |  | delF4E-5                    | $17,9 \pm 1,4$                         |                         |  |
|                  |                                    |  | delF4E-7                    | $5,3 \pm 0,1$                          |                         |  |
| <b>Klasa II</b>  | helF4E-2 (h4EHP)                   | $0,70 \pm 0,04$                        | delF4E-8 (d4EHP)            | $2,89 \pm 0,12$                        | nCBP                    | $0,68 \pm 0,01$                        |
| <b>Klasa III</b> | helF4E-3                           | $5,5 \pm 0,2$                          | nie występuje               |  | nie występuje           |  |

\*kanoniczne eIF4E

Pomimo iż sekwencje ludzkich izoform eIF4E-1a i eIF4E-1b są identyczne w 61 %, a zmiany w sekwencji dotyczą głównie N-końcowego fragmentu białek, izoforma helF4E-1b wykazuje 2-3-krotnie niższe powinowactwo do mononukleotydowych analogów kapu i około 1,5-raza niższe powinowactwo do dinukleotydowych analogów kapu niż helF4E-1a (**H5**). Przeprowadzone w pracy **H5** badania z wykorzystaniem serii analogów kapu z różnymi podstawnikami w pozycji N7-guaniny wykazały istotną różnicę budowie hydrofobowej kieszeni wiążącej 7-metyloguaninę kapu u tych dwóch białek. Wskazuje na to np. 5-krotnie wyższe powinowactwo helF4E-1b do GTP i 3-krotne dla  $bn^7GDP$ , w porównaniu z

heIF4E-1a, świadczące o nieoptymalnym ułożeniu pierścieni aromatycznych w układzie trójwarstwowym dla oddziaływania kation- $\pi$ . Dużą labilność samej hydrofobowej kieszeni potwierdza natomiast wysokie powinowactwo do analogów kapu posiadających duże podstawniki w pozycji N7-guaniny jak np. grupa benzylowa. Analogiczną labilność hydrofobowej kieszeni wiążącej kap zaobserwowaliśmy również dla izoformy eIF4E-1b z *X. laevis* (**H5**). Przeprowadzone w pracy **H5** modelowanie homologiczne struktury XeIF4E-1b wskazuje, iż obecność seryny i argininy białek eIF4E-1b w pozycjach odpowiadających Glu105 i Lys106 u heIF4E-1a może bezpośrednio wpływać na zmianę orientacji Trp102, a obecność alaniny w pozycji Ser199 na jego orientację przez zmianę orientacji His200. Udział Trp56 w oddziaływaniu warstwowym jest prawdopodobnie osłabiony przez zmianę jego otoczenia, a w szczególności zmianę pozycji Phe28 wynikającą z obecności u eIF4E-1b w pozycjach 86 i 87 dwóch seryn, a nie metioniny i proliny, jak u heIF4E-1a. Prawdopodobnie większa labilność kieszeni hydrofobowej wiążącej kap u eIF4E-1b może być związana z potencjalnie odmiennym stopniem metylacji kapu u matczynej mRNA w oocytach i jajach [58–60].

Zupełnie odmienny typ zmian w powinowactwie do kapu zaobserwowaliśmy u blisko spokrewnionych członków Klasy I eIF4E u *A. thaliana* (**H6**). AtelF4E-1b i AtelF4E-1c wykazują 56% i 57% identyczność sekwencji z sekwencją AtelF4E, a zmiany w sekwencji występują przede wszystkim w N-końcowej części białka oraz obejmują aminokwasy związane z oddziaływaniem eIF4E z białkiem eIF4G. Identyczność sekwencji pomiędzy izoformami AtelF4E-1b i AtelF4E-1c wynosi natomiast 95%. Wyznaczone równowagowe stałe asocjacji ( $K_{as}$ ) dla kompleksów izoformy AtelF4E-1c z szeregiem analogów kapu są porównywalne z ze stałymi otrzymanymi dla kanonicznego AtelF4E, natomiast w przypadku izoformy AtelF4E-1b są one około 2-krotnie niższe, z wyjątkiem stałej dla  $m^7GMP$ , która jest porównywalna u AtelF4E-1c i AtelF4E-1b, a zarazem 2,5-razy niższa niż dla AtelF4E. Wyniki te sugerują, że główne zmiany pomiędzy tymi izoformami dotyczą tworzonej sieci oddziaływań pomiędzy łańcuchem fosforanowym kapu a dodatkowo naładowanymi aminokwasami w szczelinie wiążącej kap. 5% różnica identyczności sekwencji pomiędzy AtelF4E-1c i AtelF4E-1b pochodzi głównie od zmian aminokwasów zlokalizowanych w pobliżu szczeliny wiążącej kap. Na podstawie analizy porównawczej wymodelowanych struktur izoform eIF4E wytypowaliśmy, iż zamiana hydrofobowej Phe147 i Thr145 występującej u AtelF4E-1c na metioninę i serynę u AtelF4E-1b może powodować słabszą stabilizację łańcucha bocznego Arg188 (odpowiednik Lys162 u heIF4E1a), przez co słabsze jest wiązanie  $\beta$ - i  $\gamma$ -fosforanu kapu u AtelF4E-1b. Rola izoform AtelF4E-1c i AtelF4E-1b dotychczas nie została wyjaśniona, jednakże izoformy te oddziałują z roślinnymi eIF4G i są zdolne do funkcjonalnego zastąpienia drożdżowego eIF4E w komórkach drożdży, co świadczy o tym, że mogą one pełnić rolę specyficznych czynników translacyjnych [57].

Izoformy eIF4E Klasy I z muszki owocowej, badane w pracy **H7**, wykazują zróżnicowane zmiany w tworzeniu kontaktów molekularnych ze strukturą kapu. Izoformą wykazującą najwyższe powinowactwo do kapu jest izoforma delF4E-3. Zmiany sekwencyjno-strukturalne, które nastąpiły w przypadku tej izoformy, wyselekcjonowały w szczególności kontakty stabilizujące wiązanie  $\alpha$ -fosforanu kapu, a osłabiły tworzone kontakty pomiędzy dodatkowo naładowanymi grupami bocznymi aminokwasów w szczelinie wiążącej kap a  $\beta$ -,  $\gamma$ -fosforanem kapu. Wyznaczona równowagowa stała asocjacji dla kompleksu delF4E-3 z  $m^7GMP$  jest nawet 3,6 razy wyższa niż dla ludzkiego eIF4E-1a. Niestety przeprowadzona w pracy analiza sekwencyjno-strukturalna nie dała nam jednoznacznej odpowiedzi, jakie zmiany są odpowiedzialne za tak silną stabilizację  $\alpha$ -fosforanu kapu u delF4E-3. Przeprowadzona dla delF4E-3 analiza pozwoliła nam natomiast na zidentyfikowanie, nietypowego dla białek z rodziny eIF4E, wiązania drugiej zasady poprzez oddziaływania warstwowe z pierścieniem His234. Analogiczną stabilizację drugiej zasady zidentyfikowaliśmy u delF4E-5, gdzie w oddziaływaniu warstwowym może brać udział Phe222. Stabilizacja drugiej zasady kapu jest natomiast charakterystyczna dla innego białka wiążącego kap – jądrowego kompleksu wiążącego kap (CBC) [12]. Znacząco wyższe powinowactwo delF4E-3 do kapu prawdopodobnie pozwala mu wygrywać

konkurencję z delF4E-1 w wiązaniu kapu mRNA ulegających translacji w jądrach podczas spermatogenezy, a ze względu na to, że ekspresja delF4E-3 u muszki owocowej ograniczona jest wyłącznie do jąder i występuje na wczesnych etapach spermatogenezy, nie będzie ona zaburzać innych procesów inicjacji translacji, których udział bierze delF4E-1 (**D16**). U izoformy delF4E-5 zaobserwowaliśmy silniejsze wiązanie  $\alpha$ -fosforanu kapu w porównaniu z kanonicznym czynnikiem delF4E-1, ale brak destabilizacji wiązania dalszych fosforanów jak to miało miejsce w przypadku delF4E-3. W przypadku izoformy delF4E-7 analiza zmian entalpi swobodnej wiązania ( $\Delta\Delta G^\circ$ ) poszczególnych elementów strukturalnych kapu wskazuje, że na każdym etapie wiązania kapu nastąpiły niewielkie zmiany w kontaktach molekularnych. Natomiast przeprowadzone analizy sekwencyjno-strukturalne pokazały, że nieustrukturyzowany bardzo długi 249 aminokwasowy N-koniec występujący u tej izoformy nie wpływa na wiązanie kapu. W przypadku izoformy delF4E-4, najslabiej wiążącej kap, zmiany sekwencyjno-strukturalne doprowadziły do destabilizacji trójczłonowego oddziaływania warstwowego typu kation- $\pi$  pomiędzy pierścieniami indolowymi Trp a 7-metyloguaniną kapu, wynikającego np. ze zwiększonej labilności reszt Trp i nie domknięcia się struktury eIF4E po związaniu kapu. Potwierdza to zaobserwowane 2-krotne zwiększenie powinowactwa delF4E-4 do kapu gdy występuje ono w kompleksie z 13-aminokwasowym fragmentem eIF4G. Kooperatywności wiązania nie zaobserwowaliśmy dla innych przebadanych izoform eIF4E z muszki owocowej i człowieka (**H7**). Sugeruje to, że dla fizjologicznej roli delF4E-4 oddziaływanie z partnerami białkowymi będzie miało istotne znaczenie.

Podsumowując, otrzymane wyniki w pracach **H5-H7** pokazują, iż pojedyncze zmiany aminokwasów w sekwencji izoform eIF4E w otoczeniu szczeliny wiążącej kap, wpływają bezpośrednio lub pośrednio na położenie aminokwasów biorących bezpośredni udział w wiązaniu kapu i powodują zróżnicowane powinowactwo członków Klasy I rodzin eIF4E do struktury końca 5' mRNA. Zaobserwowane różnice w molekularnym mechanizmie wiązania kapu dotyczą wszystkich jego elementów: stabilizacji 7-metyloguanozyny poprzez oddziaływanie warstwowe z pierścieniami indolowymi tryptofanów, wiązania łańcucha fosforanowego czy drugiej zasady kapu. Identyfikacja zmian sekwencyjnych i strukturalnych u izoform odpowiedzialnych za różne ich powinowactwo do kapu nie byłaby jednak możliwa bez uprzedniego wyznaczenia stałych asocjacji dla ich kompleksów szeregiem modyfikowanych analogów kapu i scharakteryzowaniu różnic w powinowactwie do poszczególnych jego elementów strukturalnych.

Warto również podkreślić, że zidentyfikowane różnice w molekularnym mechanizmie wiązania kapu u członków rodzin eIF4E z Klasy I znajdują swoje odzwierciedlenie w pełnionej przez nie funkcji w komórce, co potwierdzają te nieliczne przypadki izoform eIF4E Klasy I, których funkcję zidentyfikowano.

### C. Wpływ zmian układu aminokwasów w „kanapkowym stackingu” u eIF4E na powinowactwo do kapu

U białek z rodziny eIF4E klasyfikowanych do Klasy II i III następuje zmiana układu pierścieni aromatycznych w tzw. trójskładnikowym „kanapkowym stackingu” wiążącym kap, gdzie u izoform należących do Klasy II nastąpiło podstawienie tryptofanu z pozycji 56 przez aminokwas aromatyczny tyrozynę bądź fenyloalaninę, natomiast u izoform zaliczanych do Klasy III w pozycji 56 występuje aminokwas niearomatyczny cysteina bądź aminokwas aromatyczny tyrozyna. Pierwszym pytaniem, jakie zadałam sobie przystępując do analizy izoform eIF4E z Klasy II i III z wybranych organizmów, było, jak ta zmiana wpływa na specyficzność wiązania kapu przez te izoformy eIF4E oraz czy ma ona przełożenie na analogiczne substytucje Trp56 w ludzkim białku eIF4E-1a – kanonicznym czynniku inicjacji translacji.

W pracach **H2** i **H8** zostały zaprezentowane wyniki otrzymane dla szeregu tryptofanowych mutantów *helF4E-1a*. Konstrukty ekspresyjne dla badanych mutantów zostały uzyskane poprzez metodę mutagenazy ukierunkowanej przez oligonukleotyd z wykorzystaniem PCR, a następnie białka były uzyskiwane metodą nadekspresji w komórkach *E. coli* i oczyszczane z ciałek inkluzyjnych. Badania oddziaływań mutantów z analogami kapu przeprowadzone metodą miareczkowania fluorescencyjnego, przedstawione poglądowo w tabeli 2, pokazały, iż kluczowym tryptofanem z układu pierścieni aromatycznych biorących udział w *stackingu* u *helF4E-1a* jest Trp102. Jego podstawienie przez inny aminokwas aromatyczny osłabia wiązanie białka do  $m^7GTP$  ponad 10-krotnie. Co ciekawe badania te pokazały, iż najbardziej efektywnym układem pierścieni aromatycznych dla *helF4E-1a* jest układ Tyr56/Trp102, a nie występujący naturalnie układ Trp56/Trp102.

**Tabela 2** Równowagowe stałe asocjacji dla kompleksów mutantów ludzkiego *eIF4E*, w obrębie aminokwasów aromatycznych biorących udział w *stackingu*  $m^7Gua$  kapu, z analogiem kapu  $m^7GTP$

| Konfiguracja układu warstwowego  | Trp               | Tyr          | Phe         | Cys         | Ala         |
|--|-------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| $K_{as}$ [ $\mu M^{-1}$ ] dla kompleksu z mutantów <i>helF4E-1a</i> z $m^7GTP$ (Klasa I) |                   |              |             |             |             |
| [X] - 56<br><i>m<sup>7</sup>Gua</i><br>[Trp] - 102                                       |                   | 108,9 ± 7,8  | 27,4 ± 2,9  | 0,31 ± 0,03 | 0,21 ± 0,0  |
| [Trp] - 56<br><i>m<sup>7</sup>Gua</i><br>[X] - 102                                       | <b>70,1 ± 1,2</b> | 7,07 ± 0,39  | 2,44 ± 0,10 | ---         | 0,15 ± 0,01 |
| [X] - 56<br><i>m<sup>7</sup>Gua</i><br>[X] - 102   |                   | 12,33 ± 0,35 | 1,18 ± 0,10 | ---         | nie wiąże   |

W świetle uzyskanych w pracach **H2** i **H8** wyników ewolucyjne postawienie w miejscu Trp56 innego aminokwasu aromatycznego u izoform z Klasy II i III nie musi w bezpośrednio oznaczać słabszego wiązania kapu przez te izoformy. Zamiana jednak Trp56 na niearomatyczny aminokwas cysteinę lub alaninę u *helF4E-1a*, burząca trójskładnikowy *stacking*, znacząco osłabia wiązanie kapu, co jest zgodne ze wcześniej prezentowanymi wynikami braku zdolności wiązania się do  $m^7GDP$ -Sepaharose analogicznych mutantów, gdzie tryptofany zostały zastąpione przez leucyny [13,61,62]. Badania biologiczne [39] pokazały jednak, że mysie *eIF4E3*, u którego w miejscu odpowiadającym Trp56 występuje cysteina, jest zdolne wiązać się do  $m^7GTP$ -Sepaharozu.

Przeprowadzone badania oddziaływań ludzkich *eIF4E* z Klasy II- *helF4E-2* (W->Y) oraz Klasy III – *helF4E-3* (W->C) z analogami kapu, przedstawione w pracach **H1** i **H8**, pokazały, iż analogiczne substytucje w kanapkowym układzie warstwowym u *helF4E-1a*, nie odzwierciedlają bezpośrednio molekularnego mechanizmu wiązania kapu u tych izoform. Ludzka izoforma *eIF4E-2* mająca zachowany układ pierścieni aromatycznych wiąże  $m^7GTP$  100-krotnie słabiej niż *helF4E-1a* i około 10-razy słabiej niż *eIF4E-3* posiadająca tylko jeden tryptofan oddziaływujący warstwą z  $m^7Gua$ . Dla obu izoform zachowane są trzy charakterystyczne elementy wiązania kapu przez białka *eIF4E*:

- (i) specyficzność wobec metylacji guaniny w pozycji N7,
- (ii) stabilizacja wiązania kapu wraz z wydłużaniem łańcucha fosforanowego poprzez oddziaływania elektrostatyczne
- (iii) destabilizacja wiązania kapu poprzez obecność drugiej zasady.

Jednakże analiza zmian energii swobodnej Gibbsa ( $\Delta\Delta G^\circ$ ) pokazała o wiele słabszą selektywność h<sub>el</sub>F4E-2 względem metylacji guaniny w pozycji N7. Analogiczną słabą selektywność wobec m<sup>7</sup>Gua wykazuje nCBP - izoforma eIF4E z rzodkiewnika pospolitego zaliczana do Klasy II (**H6**), co ciekawe deIF4E-8 izoforma z Klasy II u muszki owocowej (**H7**) tej cechy nie wykazuje. Porównawcza analiza sekwencyjno-strukturalna tych trzech białek przeprowadzona w pracach **H6** i **H7** pokazała, że w labilna pętla  $\beta$ 1 $\beta$ 2, na której znajduje się Trp 56, przypadku izoform z Klasy II jest o kilka aminokwasów dłuższa (h<sub>el</sub>F4E-2- 5 aa, nCBP i deIF4E-8 – 3 aa), niż w przypadku eIF4E z Klasy I. Może to prowadzić do niekorzystnego energetycznie ustawiania reszty tyrozyny dla oddziaływania kation- $\pi$ , tym bardziej, że w strukturze h<sub>el</sub>F4E-2 [63] i modelowanej strukturze nCBP (**H6**) w obrębie wspomnianej pętli tworzy się nowa krótka  $\alpha$ -helisa usztywniająca pętlę. Przeprowadzone modelowanie homologiczne nie wykazało natomiast tworzenia się analogicznej helisy u deIF4E-8. Istotną różnicą w molekularnym mechanizmie wiązania kapu u izoform eIF4E z Klasy II, którą wykazały badania oddziaływań z analogami kapu o różnej długości łańcucha fosforanowego (**H2**, **H6** i **H7**), jest mniejszy udział oddziaływań elektrostatycznych stabilizujących wiązanie grup fosforanowych kapu. Jak pokazuje analiza strukturalna jest to związane z innym układem sieci aminokwasów z dodatnio naładowanymi grupami bocznymi w szczelinie wiążącej kap u tych białek.

Podsumowując, uzyskane wyniki w pracach **H2**, **H6**, **H7** pokazują, iż kluczowym aminokwasem aromatycznym dla wiązania m<sup>7</sup>Gua kapu u białek z rodziny eIF4E poprzez oddziaływania warstwowe jest tryptofan odpowiadający Trp102 według numeracji dla białka ludzkiego, zaś obecność innego aminokwasu w pozycji odpowiadającej Trp56 w ludzkim eIF4E u izoform eIF4E z klasy II i III nie jest wyłączną przyczyną obserwowanych zmian w ich powinowactwie do kapu 5' mRNA.

#### D. **Obraz zmian konformacyjnych i otoczenia tryptofanów eIF4E wiążących kap w widmach CD w zakresie bliskiego nadfioletu**

Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD) od lat stosowana jest do badań struktur białek w roztworze i ich zmian np. wyniku oddziaływania z ligandami. W przypadku gdy powszechnie stosowana spektroskopia CD w zakresie dalekiego nadfioletu daje informację o zawartości struktur II rzędowych w białku i ich zmianach w wyniku różnych procesów [64], to o wiele rzadziej wykorzystywana spektroskopia CD w zakresie bliskiego nadfioletu daje informację o strukturze trzeciorzędowej białka [64,65]. Sygnały w widmie CD rejestrowane w zakresie 250-320 nm pochodzą od przejść elektronowych aminokwasów aromatycznych, których symetria zostanie zburzona przez oddziaływanie z otoczeniem. Kształt oraz intensywność sygnałów CD jest zatem charakterystyczną i indywidualną cechą białka i zależy między innymi od ilości aminokwasów aromatycznych w białku, ich przestrzennego ułożenia i odległości od sąsiadujących aminokwasów, w szczególności innych aminokwasów aromatycznych i polarnych, czy np. ich uczestnictwa w tworzeniu wiązań wodorowych [65].

Ewolucyjne zachowanie w sekwencji białek z rodziny eIF4E występujących u *Metazoa*, *Viridiplantae* i *Fungi* 8 tryptofanów w charakterystycznym modzie sekwencji wytyczonym również przez obecność zachowanych fenyloalanin i histydyn [66], bezpośredni udział trzech tryptofanów w wiązaniu kapu oraz ich specyficzne substytucje u białek eIF4E z Klasy II i III zrodziły pytanie czy spektroskopia CD w zakresie bliskiego nadfioletu mogłaby być użyteczną metodą śledzenia zmian otoczenia tryptofanów u eIF4E i różnic występujących w ich oddziaływaniu z kapem. Owocem tego jest praca **H8**.

Przeprowadzone w pracy **H8** badania pokazały, że widmo CD h<sub>el</sub>F4E-1a w zakresie bliskiego nadfioletu jest typowym widmem obserwowanym dla modelowych pochodnych tryptofanu imitujących obecność tryptofanu w wiązaniu peptydowym oraz białek tryptofanowych zaliczanych do



typu I, gdzie pasma CD pochodzą od przejścia elektronowego  ${}^1L_b$  w tryptofanie. Jest ono zdominowane przez dwa pasma związane z przejściem ze stanu podstawowego do różnych poziomów oscylacyjnych stanu wzbudzonego, dodatnie pasmo CD z maksimum przy 291 nm odpowiada przejściu 0-0, a pasmo z maksimum przy 284 nm przejściu  $0 + 847 \text{ cm}^{-1}$ . Zachowanie powyższego profilu widma CD zaobserwowałam u wszystkich przebadanych w pracy **H8** kanonicznych czynników eIF4E z innych organizmów, jak i u ludzkich izoform eIF4E z wyjątkiem heIF4E-3, gdzie na pasmo Trp pochodzące od przejścia typu  ${}^1L_b$  0-0, nakłada się szerokie pasmo pochodzące od tyrozyn i fenyloalanin. Tak bardzo „prosty” profil widma CD w zakresie bliskiego UV jest bardzo rzadko spotykany u białek, u których występuje więcej niż jedna cząsteczka tryptofanu i świadczy to o tym, że dla większości tryptofanów eIF4E pasma CD pochodzą od przejść  ${}^1L_b$  o podobnej energii. Zaobserwowana zachowawczość profilu widma CD w zakresie bliskiego UV u eIF4E jest więc kolejną cechą podkreślającą strukturalną zachowawczość tej rodziny białek.

Biorąc pod uwagę zachowawczość profilu widma CD, przypisanie wkładu od poszczególnych tryptofanów w obserwowane pasma CD dałoby głębszy wgląd w molekularny mechanizm strukturalnego i funkcjonalnego znaczenia ewolucyjnego zachowania tryptofanów u eIF4E, a także obserwację zmian konformacyjnych tryptofanów biorących udział w wiązaniu kapu i ich subtelnym różnic u poszczególnych białek z rodziny eIF4E. Przypisanie sygnałów od poszczególnych tryptofanów można uzyskać analizując widma CD dla mutantów, u których poszczególne tryptofany zamienione są na niearomatyczny aminokwas np. alaninę lub inny aminokwas aromatyczny np. fenyloalaninę, którego wprowadzenie w mniejszym stopniu może zaburzać strukturę przestrzenną białka. U eIF4E tylko Trp56 i Trp102, znajdują się na ruchomych pętlach, zaś pozostałe sześć tryptofanów umiejscowione jest w obszarze struktur II rzędowych, co spowodowało, że uzyskane mutanty heIF4E-1a posiadające w pozycjach 43, 46, 73, 113, 130 i 166 zamiast tryptofanu alaninę bądź fenyloalaninę wykazywały znaczącą tendencję do agregacji, co uniemożliwiło wykonanie wiarygodnych widm CD dla tych białek. Widma CD wykonane dla pojedynczych i podwójnych mutantów eIF4E, gdzie Trp56 lub/i Trp102 zamienione zostały na Ala, Tyr lub Phe, pokazały, że dla formy białka apo wkład do obserwowanych pasm CD daje tylko Trp102. Natomiast brak wkładu od Trp56 do widma CD, co świadczy o jego dużej swobodzie rotacyjnej u białka w formie apo.

Szeroka gama mutantów heIF4E-1a w pozycji 56 lub/i 102 wiążących i niewiążących koniec 5' mRNA pozwoliła na identyfikację zmian sygnałów CD od poszczególnych tryptofanów następującą po wiązaniu analogów kapu. W dzikim białku heIF4E-1a po wiązaniu kapu pojawiają się dwa dodatkowe pasma CD, pierwsze ujemne w zakresie 295-330 nm z minimum w 297 nm i drugie dodatnie w zakresie 255-270 nm maksimum 262 nm. Pasma te zidentyfikowałam jako pasma związane z przejściami  ${}^1L_a$  Trp. W przypadku pasm CD pochodzącymi od przejść  ${}^1L_b$  tryptofanu po wiązaniu kapu następuje wzrost intensywności pasma 284 nm, zaś intensywność pasma 291 nm pozostaje bez zmian. Profil widma CD heIF4E-1a po wiązaniu kapu zmienia się z Typu I na Typ III. Przeprowadzona analiza widm CD mutantów w kompleksie z analogami kapu wykazała, że:

- (i) wyniku wiązania kapu następują lokalne zmiany struktury eIF4E wpływające na zmiany konformacyjne lub otoczenia pozostałych zachowanych tryptofanów niebiorących udziału w bezpośrednim wiązaniu kapu, które dają ujemny sygnał CD od przejść  ${}^1L_b$ . Zmiany te są również związane ze zmianą położenia Trp56 i Trp102 czy podstawionych w tych pozycjach innych aminokwasów aromatycznych na skutek wiązania kapu, prowadzące do zajścia sprzężenia typu dipol-dipol między orbitalami stanów wzbudzonych aminokwasów aromatycznych w pozycji 56 lub 102 a innych Trp eIF4E.
- (ii) wyniku oddziaływania Trp56 z kapem, w widmie CD kompleksu pojawia się dodany sygnał CD od przejść  ${}^1L_b$  oraz dodany sygnał od przejścia  ${}^1L_a$  w zakresie 295-310 nm,

- (iii) wyniku oddziaływania Trp102 z kapem, w widmie CD kompleksu pojawia się ujemny sygnał od przejścia  $^1L_a$  w zakresie 295-330 nm oraz dodatni sygnał związany z przejściem  $^1L_b$  ( $0+847\text{cm}^{-1}$ ), ale tylko w obecności aminokwasu aromatycznego w pozycji 56, co jest najprawdopodobniej związane ze sprzężeniem typu dipol-dipol między orbitalami stanów wzbudzonych Trp102 i aminokwasu aromatycznego w pozycji 56.

Przypisane poszczególnym tryptofanom zamiany obserwowane w widmach CD mutantów hElF4E-1a w wyniku oddziaływania z kapem znalazły swoje odzwierciedlenie w widmach kompleksów ludzkich izoform eIF4E. U izoformy eIF4E-3 (W56->C, u hElF4E-3 to Cys69) zaobserwowaliśmy brak sygnałów związanych z Trp56 lub obecnością aminokwasu aromatycznego w tej pozycji, a tylko sygnał związany z Trp102 (u hElF4E-3 to Trp115). W widmie CD kompleksu drożdżowego eIF4E z  $m^7\text{GTP}$  zaobserwowaliśmy natomiast tylko sygnały pochodzące od Trp56 (u yElF4E to Trp58), a brak sygnału od Trp102 (u yElF4E to Trp104), co jest związane z odwrotną orientacją Trp58 u yElF4E w układzie trójwarstwowym, co potwierdza struktura NMR tego kompleksu [67].

Podsumowując, zaprezentowana w pracy **H8** analiza sygnałów CD eIF4E w formie apo i w kompleksie z analogami kapu pokazuje, że CD w zakresie bliskiego UV jest bardzo użyteczną metodą do analizy zmian układu pierścieni aminokwasów aromatycznych biorących udział w tworzeniu trójwarstwowego układu kanapkowego „stackingu” wiążącego 7-metyloguaninę kapu u białek eIF4E wynikających z lokalnych zmian strukturalnych i sekwencyjnych u tych białek, czy też wymuszanych przez wprowadzenie innych grup funkcyjnych w pozycję N7 guanozyny w nowych wariantach analogu kapu, obecnie szeroko testowanych jako potencjalne inhibitory eIF4E w komórkach nowotworowych [68–71].

Drugą zaletą, jaką niesie spektroskopia CD w zakresie bliskiego UV dla białek eIF4E, a którą udało mi się wykazać w pracy **H8**, jest zastosowanie tej metody do wyznaczania stałych wiązania z rejestrowanych zmian eliptyczności białka w funkcji stężenia ligandu. Uzyskane w pracy stałe asocjacji z analizy izoterm z miareczkowania hElF4E-1a czterema analogami kapu dla zmian eliptyczności w zakresie pasma CD 295-330 nm są zgodne ze stałymi uzyskanymi w tych samych warunkach z miareczkowań fluorescencyjnych.

## E. Specyficzność wiązania kapu i potencjalna rola białek eIF4E u Trypanosomatydów

W odróżnieniu od białek z rodziny eIF4E występujących u organizmów z królestwa zwierząt, roślin zielonych i grzybów u pewnych pierwotniaków występują nietypowe izoformy eIF4E, które trudno zakwalifikować do jednej z trzech zdefiniowanych grup strukturalnych ze względu na rozległe przypadkowe wtrącenia ciągów aminokwasów w zdefiniowanym rdzeniu strukturalnym eIF4E [66]. Bardzo ciekawą rodzinę stanowią tutaj pasożytnicze pierwotniaki z rodziny *Trypanosomatidae*, w obręb której wchodzi rodzaj *Leishmania* i *Trypanosoma*, które migrując pomiędzy swoim owadziwym wektorem a ssaczym gospodarzem wywołują u ludzi i zwierząt domowych groźne choroby pasożytnicze. Na przykład *Trypanosoma brucei* wywołuje śpiączkę afrykańską, a ponad 20 gatunków z rodzaju *Leishmania* chorobę zwaną leiszmaniozą, której najcięższa odmiana tzw. trzewna (znanej też pod nazwą kala-azar) przypadku nieleczenia jest śmiertelna w 95% procentach. Rodzina ta jest również interesująca ze względu na występowanie u niej nietypowych cech molekularnych związanych z ekspresją genów [72]. Geny kodujące białka są zorganizowane w duże jednostki transkrypcyjne, z których powstaje polycystronowy pre-mRNA, który ulega dalszej obróbce do monocystronowych mRNA poprzez *trans*-splicing i polyadentylację [73]. Podczas *trans*-slicingu do 5' końca powstających mRNA dołączany jest 39 nukleotydowy *Spliced Leader* (SL RNA) posiadający na swoim 5' końcu unikalną nie występującą u innych eukariotów strukturę kapu:  $m^7\text{Gpppm}_3^{6,6,2}\text{Apm}^2\text{Apm}^2\text{Cpm}_2^{3,2}\text{U}$  zwaną

**kapem-4** [74,75]. Celem publikacji **H1** wykonanej we współpracy z grupą chemiczną profesora Darżynkiewicza i grupą profesor Michal Shapira z Ben Gurion University of the Negev oraz **H3 i H4** wykonanych we współpracy z profesorem Davidem Campbell z University of California at Los Angeles było otrzymanie i charakterystyka specyficzności do kapu izoform eIF4E występujących *Leishmania major* i *Trypanosoma brucei*. Jak i określenie potencjalnej roli biologicznej tych białek. Dużym problemem w leczeniu chorób wywoływanych przez te pasożytnicze pierwotniaki jest ograniczona liczba leków, z których większość jest toksyczna i przy ich stosowaniu wymaga jest hospitalizacja. Dlatego prace te, jak wiele innych badań biologicznych nad tymi organizmami, jest również ukierunkowana na wytypowanie potencjalnych celów terapeutycznych, w tym przypadku związanych ze specyficznością izoform eIF4E do kapu-4.

W pracy **H1** na podstawie analizy homologicznej sekwencji w genomie *L. major* zidentyfikowano cztery izoformy eIF4E oznaczone Leish4E-1, Leish4E-2, Leish4E-3 i Leish4E-4, które wykazują bardzo niski stopień homologii sekwencji w stosunku do eIF4E z drożdży czy wyższych organizmów eukariotycznych. Zastosowane w pracy metody przewidywania struktury 3D pokazują, iż pomimo niskiej homologii, struktury izoform eIF4E z *Leishmanii* posiadają one charakterystyczny dla białek eIF4E  $\alpha/\beta$  „fold”, jednak dla samego motywu wiążącego kap obserwowane są pewne różnice. Charakterystyczny układ trzech tryptofanów (Trp56, Trp102 i Trp166 według numeracji dla białka ludzkiego) biorących udział w wiązaniu kapu zachowany jest tylko u izoform Leish4E-1 i Leish4E-2. U izoformy Leish4E-4 w pozycji odpowiadającej Trp56 występuje tyrozyna, zaś u izoformy Leish4E-3 niearomatyczny aminokwas – metionina. Z klasycznego układu aminokwasów zasadowych znajdujących się u wejścia do szczeliny wiążącej kap, i oddziaływanymi z łańcuchem fosforanowym kapu, u wszystkich izoform zachowana jest tylko arginina odpowiadająca Arg157 białka ludzkiego. Do tej pory, pomimo ciągłych prac, nie udało się uzyskać dla żadnej z izoform struktury krystalograficznej, która by zweryfikowała nasze przewidywania z modelowania.

Przeprowadzone badania oddziaływań izoform eIF4E z *Leishmanii* z kapem-4 i jego intermediatami oraz innymi analogami kapu, metodą miareczkowania fluorescencyjnego, z optymalizowaną przeze mnie do tych białek, wykazały ich zróżnicowaną specyficzność wobec modyfikowanych analogów kapu. Pokazały, że tak jak u innych białek z rodziny eIF4E, występuje u nich wyraźna specyficzność wobec metylacji pierścienia guaniny kapu w pozycji N7, oraz charakterystyczna destabilizacja wiązania kapu w wyniku dodania do  $m^7GTP$  drugiej zasady. Chociaż u izoform Leish4E-1 i Leish4E-2, na co wskazuje analiza zmian energii swobodnej Gibbsa ( $\Delta\Delta G^\circ$ ), najprawdopodobniej następuje wiązanie drugiej zasady, tak jak u izoform deIF4E-3 i deIF4E-5 z muszki owocowej (**H7**).

Bardzo ciekawym a zarazem zaskakującym wynikiem jest ponad 100-krotnie słabsze powinowactwo izoform eIF4E z *L. major* nie tylko do  $m^7GTP$ , czego się spodziewano, ale również do kapu-4, występującego wyłącznie u pierwotniaków z rzędu *Kinetoplastida*, w porównaniu do mysiego eIF4E. Przeprowadzone przeze mnie badania porównawcze dla białka mysiego oraz Leish4E-1 izolowanych zarówno z frakcji rozpuszczalnej jak i ciałek inkluzyjnych, a nie zamieszczone w omawianej pracy, pokazały jednoznacznie, że sposób oczyszczania białka nie ma wpływu na uzyskane i prezentowane w pracy stałe asocjacji. Również wyniki przeprowadzonego w pracy **H1** eksperymentu pokazujące, że żadna z izoform Leish4E nie jest zdolna do funkcjonalnego zastąpienia drożdżowego eIF4E w komórkach drożdży pozbawianych endogennego eIF4E potwierdza strukturalną i funkcjonalną odmienność tych izoform.

Wśród izoform eIF4E z *Leishmanii* wyraźną preferencję do kapu-4 wykazuje tylko izoforma Leish4E-2. Stała asocjacji dla kompleksów  $m^7GTP$  i kapu 4 z izoformami Leish4E-1 oraz Leish4E-4 są porównywalne. Leish4E-3 jest natomiast izoformą, która wykazuje wyraźną preferencję dla wiązania  $m^7GTP$ , a destabilizacja wiązania wynikająca z obecności drugiej zasady, czy też metylacji zasad i cukrów obecnych w kapie-4 jest analogiczna jak w białku mysim. Izoformą najsilniej wiążącą

modyfikowane analogi kapu jest izoforma Leish4E-4, u której występuje podstawienie Trp56 na Tyr. Również Leish4E-3, u której występuje podstawienie Trp56 na Met wiąże m<sup>7</sup>GTP 2-krotnie oraz 10-krotnie silniej niż Leish4E-1 i Leish4E-2, u których zachowany jest układ dwóch Trp oddziaływujących warstwowo z N7-guaniną kapu. Wyniki te, w odniesieniu do wcześniej omówionych wyników dla ludzkich izoform eIF4E i mutantów hEIF4E-1a (**H2**, **H8**) po raz kolejny pokazują, że oddziaływania warstwowe 7-metyloguaniny kapu między dwoma aminokwasami aromatycznymi nie są konieczne, ani wystarczające do efektywnego wiązania kapu przez izoformy eIF4E, a o specyficzności oddziaływania decydują również lokalne zmiany strukturalne i podstawienia aminokwasowe.

Badania powinowactwa izoform Leish4E do kapu wraz z przeprowadzoną analizą dystrybucji izoform we frakcjach polisomów oraz eksperymentami typu „pull-down” badającymi oddziaływanie białek eIF4E z *Leishmanii* z ludzkim białkiem 4E-BP1 pozwoliło na wytypowanie dwóch potencjalnych kandydatów Leish4E-1 i Leish4E-4 na potencjalne czynniki translacyjne u *L. major*. Dalsze badania nad Leish4E-1 i Leish4E-4 we współpracy z profesorem Michal Shapira (**D6**), pokazały że izoforma Leish4E-4 jest czynnikiem translacyjnym u formy promastigota.

W przypadku izoform eIF4E *T. brucei*, w związku z zaproszeniem profesora Davida Campbella do współpracy, charakteryzowałam powinowactwo dwóch nowo odkrytych przez jego zespół izoform eIF4E oznaczonych jako TbEIF4E-5 i TbEIF4E-6 przedstawione w pracach **H3** i **H4**. Analiza filogenetyczna oraz homologii sekwencji pokazała znacznie bliższą homologię pomiędzy tymi białkami niż z innymi izoformami TbEIF4E, wcześniej już zidentyfikowanymi i scharakteryzowanymi [76]. U obu białek wiązanie kapu realizowane jest przez nietypowy układ aminokwasów aromatycznych biorących udział w oddziaływaniach warstwowych, gdzie zamianie na inny aminokwas ulega również Trp102, a nie jak u dotychczas badanych izoform Trp56. U izoformy TbEIF4E-5 jest to układ Trp/Tyr, a u TbEIF4E-6 Phe/Phe. Z pozostałych konserwowanych tryptofanów w sekwencji eIF4E u obu izoform zachowany jest Trp43 i Trp166 oraz u TbEIF4E-5 również Trp73. Tak jak u scharakteryzowanych wcześniej eIF4E obie izoformy wykazują wyraźną specyficzność wobec metylacji pierścienia guaniny kapu w pozycji N7, oraz charakterystyczną destabilizację wiązania kapu w wyniku dodania do m<sup>7</sup>GTP drugiej zasady. Natomiast nie wykazują preferencji do wiązania kapu-4. Stałe asocjacji wyznaczone dla kompleksów tych białek z m<sup>7</sup>GTP i kapem-4 są bardzo podobne, chociaż TbEIF4E-5 wiąże oba ligandy około 4 razy silniej niż TbEIF4E-6. Uzyskane stałe asocjacji są w tym samym zakresie, co stałe uzyskane dla Leish4E-4 i Leish4E-1, co stanowi kolejne potwierdzenie jak bardzo odrębną rodzinę stanowią eIF4E z *Trypanosomatidae*.

Badania biologiczne zaprezentowane w pracach **H3** i **H4** pokazały ponadto, iż występowanie obu białek TbEIF4E-5 i TbEIF4E-6 ograniczone jest wyłącznie do cytoplazmy i ich obecność wpływa na mobilność komórki, a w przypadku TbEIF4E-6 również na przyłączanie wici u wiciowej postaci pierwotniaka. Oba białka oddziałują z wybranymi homologami TBEIF4G w większych kompleksach białkowych związanych z posttranskrypcyjną regulacją ekspresji genu. TbEIF4E-6 oddziałuje z TbEIF4G-5 będącym w kompleksie z białkiem nazwanym TBG5-IP posiadającym dwie domeny o przewidywanej strukturze drugorzędowej, która występuje u enzymów związanych z biosyntezą kapu mRNA. Natomiast TbEIF4E-5 oddziałuje z TbEIF4G-1 i TbEIF4G-2 tworząc kompleksy analogiczne do kompleksów eIF4F.

### Podsumowanie:

Najważniejszymi osiągnięciami wynikającymi z zaprezentowanych badań zamieszczonych w przedstawionych pracach (**H1-H8**) jest:

- Przeprowadzenie charakterystyki powinowactwa do końca 5' mRNA białek z rodziny eIF4E z siedmiu organizmów. Identyfikacja zmian sekwencyjno-strukturalnych mających wpływ na zróżnicowanie powinowactwa wśród białek z rodziny eIF4E do kapu w obrębie danego organizmu, jak i pomiędzy białkami eIF4E należącymi do danej Klasy, a pochodzącymi z różnych organizmów. Pokazanie, iż zmiany te nie należą wyłącznie do tzw. „kanonicznego motywu” aminokwasów wiążących kap. Identyfikacja związków pomiędzy powinowactwem izoform eIF4E do kapu, a pełnioną przez nie funkcją w organizmie.
- Pokazanie, na podstawie badań powinowactwa do struktury kapu tryptofanowych mutantów eIF4E, iż kluczowym tryptofanem dla formowania efektywnego układu tzw. „kanapkowego stakingu” wiążącego kap u eIF4E, jest tryptofan odpowiadający Trp102 w ludzkim eIF4E-1a. Natomiast występująca u izoform eIF4E z Klasy II i III ewolucyjna zmiana Trp56 na inny aminokwas nie oznacza bezpośredniego wzrostu czy osłabienia wiązania kapu, gdyż na efektywny udział aminokwasu aromatycznego w tej pozycji w oddziaływaniu warstwowym mają również wpływ lokalne zmiany sekwencyjno-strukturalne obecne u danej izoformy eIF4E.
- Pokazanie, że w przypadku białek eIF4E, metoda dichroizmu kołowego w bliskim nadfiolecie (near-UV CD) jest precyzyjną, szybką i tanią metodą pozwalającą na badanie lokalnych zmian konformacyjnych w roztworze konserwowanych tryptofanów wynikających z ewolucyjnych zmian sekwencyjno-strukturalnych obecnych u izoform eIF4E, jak i zmian powstających wyniku tworzenia przez nie kompleksów z analogami kapu.

## 6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

### 6.1. Omówienie działalności badawczej przed i po uzyskaniu stopnia doktora

Moje główne zainteresowania naukowo-badawcze przed i po uzyskaniu stopnia doktora są ściśle związane z tematyką przedstawioną w zaprezentowanym osiągnięciu naukowym i dotyczą badań nad mysim i ludzkim kanonicznym czynnikiem eIF4E (eIF4E-1a). Badania prowadzone są w dwóch aspektach: z jednej strony dotyczą regulacji aktywności eIF4E-1a w komórce poprzez fosforylację oraz oddziaływanie z białkami wiążącymi 4E, z drugiej zaś wpływu modyfikacji chemicznych analogów kapu, o potencjalnym zastosowaniu aplikacyjnym, na wiązanie z eIF4E. Te dwie pozornie odrębne ścieżki badań łączy protoonkogenny charakter eIF4E i wytyczone cele terapeutyczne uderzające w fosforylację eIF4E, oddziaływanie z białkami wiążącymi 4E (4E-BP), oraz hamowanie aktywności eIF4E przez modyfikowane analogi kapu, czy szczepionki na bazie mRNA o wydłużonym czasie życia w komórce i zwiększonym poziomie translacji [77,78].

Przed uzyskaniem stopnia doktora główną tematyką prowadzonych przez ze mnie badań było badanie wpływu fosforylacji seryny 209 u ssaczy eIF4E na powinowactwo białka do analogów kapu. Wykorzystując, na ówczesne czasy, nowatorską technikę ligacji białek za pośrednictwem intein (*ang. Intein-mediated Protein Ligation, IPL*) [79,80] udało mi się uzyskać mysie eIF4E selektywnie fosforylowane na serynie 209 z połączenia fragmentu białka eIF4E(28-204) i z syntetycznym peptydem odpowiadającym końcu białka eIF4E (205-217) i zawierającego fosfoserynę. (**M1**). Przeprowadzone, metodą miareczkowania fluorescencyjnego, badania powinowactwa analogów kapu do

fosforylowanego eIF4E, jak i szeregu mutantów melF4E-1a, w których seryna 209 została zastąpiona przez aminokwasy posiadające łańcuch boczny: i) dodatnio naładowany – lizynę, ii) ujemnie naładowany – kwas glutaminowy oraz iii) neutralny - alaninę, pokazały, iż fosforylacja eIF4E powoduje osłabienie wiązania kapu poprzez elektrostatyczne odpychanie pomiędzy ujemnie naładowaną grupą fosforanową fosfoseryny a łańcuchem fosforanowym kapu (**M1, M3, M5**). Niezwykle ważną rolę w wyjaśnieniu mechanizmu osłabienia wiązania odegrały tutaj badania z nietypowymi analogami kapu o zwiększonej liczbie, aż do sześciu, grup fosforanowych w łańcuchu (**M3, M5, M13**). Uzyskane wyniki były sprzeczne z funkcjonującą w literaturze hipotezą postawioną na podstawie struktury krystalograficznej kompleksu eIF4E-m<sup>7</sup>GDP, iż fosforylacja eIF4E powinna zwiększać powinowactwo do kapu w wyniku tworzenia mostku solnego pomiędzy fosfoseryną 209 a lizyną 159 zamykającego kap w szczelinie wiążącej jak klamra (tzw. *clamping model*). Przeprowadzona w pracy **M5** analiza zmian entalpii swobodnej Gibbsa ( $\Delta\Delta G^\circ$ ) wyznaczonych z równowagowych stałych asocjacji dla kompleksów mutantu melF4E posiadającego w pozycji 159 alaninę zamiast lizyny jak i jego ufosforylowanego odpowiednika z szeregiem analogów kapu, pokazały, że obecność lizyny 159 ma dodatni wpływ na wiązanie kapu, niezależny jednak od obecności fosfoseryny, co jednoznacznie wyklucza możliwość tworzenia mostka solnego. Tworzenie mostka solnego wykluczają również wyniki kalkulacji stanów protonacyjnych wybranych aminokwasów eIF4E, w tym lizyny 159 i fosfoseryny 209, przeprowadzone metodą Monte-Carlo w pracy **D5**.

Po uzyskaniu stopnia doktora mój udział w badaniach nad regulacją aktywności eIF4E dotyczy głównie oddziaływań z białkami wiążącymi eIF4E (**H7, D6, D16, D18**). We współpracy dr Greco Hernandezem (*obecnie National Institute of Cancer, Meksyk*) w pracy **D16**, dotyczącej roli izoformy eIF4E-3 z muszki owocowej w komórce podczas spermatogenezy, pokazaliśmy, że izoforma ta oddziałuje zarówno z białkiem eIF4G (eIF4G-1) jak i jego izoformą eIF4G-2, która jest kluczowym regulatorem inicjacji translacji podczas mejozy spermatocytów. W pracy **H7** przeprowadziliśmy natomiast charakterystykę oddziaływań izoform delF4E z 13 aminokwasowym fragmentem peptydowym białka delF4G w kompleksach dwu i trójskładnikowych z analogiem kapu. Wyłącznie dla izoformy delF4E-4 zaobserwowaliśmy kooperatywność w tworzeniu kompleksu delF4G-delF4E-4-kap. Również dla izoformy delF4E-4 zaobserwowaliśmy najwyższą stałą wiązania peptydu delF4G, co może wynikać, jak pokazuje wymodelowana struktura kompleksu, ze zamiany jednego z zachowanych u eIF4E aminokwasów wiążących kanoniczny motyw wiązania (C-motyw - YXXXLL) białek 4E-BP. Zamiana u delF4E-4 metioniny na kwas glutaminowy powoduje, że izoforma ta może tworzyć dodatkowe wiązania z konserwowanymi lizynami znajdującymi się w C-motywie białek 4E-BP.

W tym temacie współpracuję również z grupą profesora Ryszarda Stolarskiego, a w szczególności z dr Anną Modrak, nad badaniami mechanizmu oddziaływania ludzkiego eIF4E-1a z jednym z białek wiążących 4E - białkiem 4E-BP1. W pracy **D18** pokazaliśmy, że ludzkie białko 4E-BP1 wyraźnie preferuje wiązanie się do eIF4E będącego w kompleksie z mRNA, a z drugiej strony jego wiązanie ułatwia dysocjację eIF4E od kapu.

Pod koniec swoich studiów doktoranckich rozpoczęłam intensywną współpracę z chemiczną częścią Zespołu prof. dr hab. Edwarda Darżynkiewicza. Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam ją już we ścisłej współpracy z dr hab. Jackiem Jemielity i dr Joanną Kowalską w projektach dotyczących chemicznej modyfikacji analogów kapu, które będą charakteryzowały się niezwykłą użytecznością w badaniu procesów metabolizmu mRNA oraz znajdą zastosowanie aplikacyjne w metodach biologii molekularnej i biotechnologii czy badaniach strukturalnych oraz mogą mieć w przyszłości istotne znaczenie medyczne, w szczególności w terapii nowotworów, w których obserwuje się nadekspresję białka eIF4E [77,81,82]. Wkład do tych projektów z mojej strony obejmuje przede wszystkim wyznaczenie stałych asocjacji dla kompleksów mysiego eIF4E-1a z nowo syntetyzowanymi analogami kapu metodą miareczkowania fluorescencyjnego, analizie wpływu wprowadzonych modyfikacji

struktury kapu na mechanizm oddziaływania białko-kapu na poziomie molekularnym i próbie powiązania zidentyfikowanych zmian z obserwowanymi biologicznymi właściwościami modyfikowanych analogów.

Pierwszą grupą badanych przeze mnie związków były dinukleotydowe analogi kapu, z różną ilością grup fosforanowych, posiadające modyfikacje w pierścieniu rybozy 7- metyloguanozyny w pozycji C2' i C3' nazwane Anti-Reverse Cap Analogs – ARCA (**M2, M13, D1, D28**). Wprowadzenie grupy metylowej w jednej z wymienionych pozycji lub usunięcie grupy hydroksylowej zapewniają 100% wprowadzenie analogu kapu do łańcucha mRNA syntetyzowanego w procesie transkrypcji *in vitro* we właściwej orientacji, podczas gdy niemodyfikowany analog kapu - m<sup>7</sup>GpppG wbudowywany jest do mRNA w około 30 % w odwrotnej orientacji - Gpppm<sup>7</sup>G-mRNA ([83,84], **M2**). Przeprowadzone w pracy **M2** badania pokazały, że modyfikacje rybozy nie wpływają na powinowactwo eIF4E do analogów kapu, zaś wydłużenie łańcucha fosforanowego znacząco zwiększa ich powinowactwo do czynnika 4E, co również przekłada się na efektywniejszą inhibicję translacji *in vitro* przez analogi tetra- i pento-fosforanowe w porównaniu z m<sup>7</sup>GpppG. mRNA kappowane analogami typu ARCA ulega 2-krotnie efektywniejszej translacji. Jednakże w przypadku translacji *in vitro* nie zaobserwowano pozytywnego wpływu wydłużania łańcucha fosforanowego kapu na wzrost efektywności prawdopodobnie ze względu na to, iż białko eIF4E oddziałuje tutaj również z dalszym łańcuchem mRNA i z innymi czynnikami translacyjnymi, a nie tylko samą z strukturą kapu. Wybrane związki typu ARCA znalazły komercyjne zastosowanie w systemach transkrypcji *in vitro* z zastosowaniem polimeraz fagowych.

Kolejną grupę badanych związków stanowią mono- i dinukleotydowe analogi kapu z modyfikacjami w obrębie łańcucha fosforanowego obejmującą trzy podgrupy analogów. Pierwszą podgrupę stanowią analogi, w których mostkowy atom tlenu został zastąpiony grupą -CH<sub>2</sub> (**D9, D22, D29, D36**), bądź -NH (**D12, D33**), -CCl<sub>2</sub> lub -CF<sub>2</sub> (**D25**). Drugą podgrupę stanowią analogi, w których niemostkowy atom tlenu został zastąpiony przez atom siarki (S), selenu (Se) czy grupę boranową (BH<sub>3</sub>) (**D3, D4, D7, D8, D10, D11, D20, D22, D23, D27, D30, D34, D35, D37, D38**). Trzecią podgrupę stanowią analogi posiadające oba typy modyfikacji jednocześnie (**D23**). Celem wprowadzonych modyfikacji było uzyskanie analogów kapu o zwiększonym powinowactwie do eIF4E, opornych na degradację przez enzymy dekapujące m.in. DcpS czy Dcp1/Dcp2 [9,85]. Analogi kapu o wysokim powinowactwie do eIF4E oraz odporne na hydrolizę przez pyrofosfoatazy, (w tym enzym DcpS) mogłyby być potencjalnie dobrymi inhibitorami translacji w komórkach nowotworów, u których występuje nadekspresja białka eIF4E [81,82,86]. Natomiast analogi kapu odporne na działanie enzymu Dcp1/Dcp2 po w budowaniu do mRNA mogłyby wydłużać jego czas życia w komórce i służyć do projektowania terapeutycznych mRNA [87,88].

Z szeregu zaprojektowanych i przebadanych przez nas związków posiadających podstawienie tlenu mostkowego w łańcuchu fosforanowym kapu, najbardziej obiecującą grupą związków wydają się być analogi z modyfikacją -CCl<sub>2</sub> (**D25**). W porównaniu do analogów z modyfikacją metylenobisfosfonianową (-CH<sub>2</sub>), które charakteryzują się znacząco niższym powinowactwem do eIF4E w porównaniu do standardowych analogów kapu (**D9, D22, D29, D36**), czy analogami posiadającymi resztę imidofosforanową (-NH), która nie powoduje znaczącej zmiany w wiązaniu się analogu do eIF4E (**D12, D33**), analogi zawierające modyfikację dihalogenometylenobisfosfonianową charakteryzują się zwiększonym powinowactwem do eIF4E. Przeprowadzone w pracy (**D25**) badania sugerują, że jedną z przyczyn może być wysoka elektroujemność atomów chloru i fluoru, co powoduje zwiększenie efektu elektrostatycznego oddziaływania pomiędzy łańcuchem fosforanowym kapu a dodatnio naładowanymi resztami lizyn i arginin eIF4E. Uzyskane w pracy (**D25**) struktury kompleksów eIF4E z m<sup>7</sup>GppppG i m<sub>2</sub><sup>7,2'</sup>O GppCl<sub>2</sub>ppG pokazały również znacząco różną konformację tetrafosforanowego łańcucha u m<sub>2</sub><sup>7,2'</sup>O GppCl<sub>2</sub>ppG. β-fosforan m<sub>2</sub><sup>7,2'</sup>O GppCl<sub>2</sub>ppG skierowany jest na zewnątrz szczeliny wiążącej kap i tworzy kontakty z Lys159, a nie z Lys162, jak ma to miejsce w kompleksie z m<sup>7</sup>GppppG. Pokazaliśmy również, że badane analogi -CCl<sub>2</sub> są efektywniejszymi inhibitorami translacji, ulegają



bardzo słabej hydrolizie przez ludzki enzym DspS, jak również wprowadzenie ich do transkryptu mRNA wydłuża jego czas życia w komórce poprzez zwiększenie oporności na hydrolizę przez kompleks enzymatyczny Dcp1/Dcp2. Również dla transkryptów mRNA kapowanych modyfikowanymi analogami –  $\text{CCl}_2$  typu ARCA zauważyliśmy znaczące zwiększenie efektywności translacji zarówno *in vitro* w lizacie z retikulocytów królika (RRL) jak i również *in vivo* w komórkach HeLa. Pomimo, słabszego wiązania się analogów metylenobisfosfonianowych do eIF4E, wynikającej najprawdopodobniej z podniesienie wartości  $\text{pK}_a$  sąsiadującej z grupą  $\text{CH}_2$  grupy fosforanowej i niemożliwością utworzenia przez nią wiązań wodorowych (**D25**), analogi te, jak i analogi z modyfikacją imidofosforanową, znalazły ogromne zastosowanie w badaniach nad ścieżkami degradacji mRNA, ze względu na ich oporność na hydrolizę przez enzymy dekapujące [89–92].

Przeprowadzone badania nad drugą podgrupą związków, analogami tio-, borano- i selenofosforanowymi pokazały, iż są to związki o ogromnym potencjale aplikacyjnym m.in. w terapii nowotworowej czy w otrzymywaniu stabilnych mRNA do zastosowań terapii genowej (patenty: P1, P2, 95-97). Występujące u tych związków podstawienie niemoistkowego atomu tlenu heteroatomem tworzy centrum stereogeniczne i powyższe związki otrzymuje się postaci diastereoizomerów (**m.in. D3**). Powinowactwo tych związków do eIF4E, niezależnie od miejsca wprowadzonej modyfikacji, jest porównywalne, a w przypadku niektórych analogów nawet kilkukrotnie wyższe, niż analogów niemodyfikowanych. Co ciekawe dla modyfikacji pozycjach  $\beta$  i  $\gamma$  zaobserwowano znaczące różnice, nawet trzykrotne, w powinowactwie diastereoizomerów do eIF4E. Jest to najprawdopodobniej związane orientacją modyfikowanej grupy fosforanowej i możliwością tworzenia przez nią wiązań wodorowych w resztami bocznymi aminokwasów w szczeliny wiążącej kap eIF4E (**D4, D7, D8, D10, D20**). Analogi tio- i boranofosforanowe charakteryzują się natomiast odmienną podatnością na działanie enzymu DcpS. W przypadku tiofosforanów oba diastereoisomery  $\gamma$ -S są odporne na działanie enzymu DcpS (**D4, D7, D20**), natomiast w przypadku boranofosforanów, otrzymane wyniki były zaskakujące (**D20**). Z analogów  $\gamma$ -BH<sub>3</sub>, po których się spodziewano, że będą odporne na hydrolizę przez DcpS, hydrolizie nie ulega tylko izomer  $S_p$ , natomiast wysoką oporność (80-90 %) na hydrolizę wykazują oba diastereoizomery  $\beta$ -BH<sub>3</sub>. Niehydrolizowalne analogi boranofosforanowe mają jednak około 2-,3-krotnie niższe powinowactwo do DcpS w porównaniu z analogami  $\gamma$ -S. Również nie wszystkie modyfikowane analogi w pozycji  $\beta$  typu ARCA po w budowaniu do mRNA wydłużają jego czas życia w komórce spowalniając jego rozkład w kierunku 5'-3'. Na wydłużanie czasu życia mRNA z przyłączonym modyfikowanym kapem wpływają między innymi: efektywność włączania danego analogu do kapu, powinowactwo do eIF4E, oraz podatność na hydrolizę przez kompleks enzymatyczny Dcp1/Dcp2. Obiecującymi analogami, które wykazują bardzo słabą (10-20%) podatność na hydrolizę przez Dcp1/Dcp2 okazały się tutaj analogi:  $m_2^{7,2'0}\text{GppspG-D2}$ ,  $m_2^{7,2'0}\text{GppspG-D4}$ ,  $m_2^{7,2'0}\text{GppspG-D1D2}$ ,  $m_2^{7,2'0}\text{Gpp}_{\text{BH}_3}\text{pG-D2}$ ,  $m^7\text{Gpp}_{\text{BH}_3}\text{pm}^7\text{G}$ . Jednak w pracach nad zastosowaniem mRNA w terapii genowej obiecujące wydają się być analogi  $m_2^{7,2'0}\text{GppspG-D1}$  i  $m_2^{7,2'0}\text{Gpp}_{\text{BH}_3}\text{pG-D1}$  ([93], **D20**). mRNA zakończone tymi analogami wprowadzone do ludzkich niedojrzałych komórek dendrytycznych (hiDC) wykazują większą stabilność i ulegają efektywniejszej translacji. W przypadku transkryptów mRNA zakończonych  $m_2^{7,2'0}\text{GppspG-D1}$ , przeprowadzone badania w laboratorium prof. Sahina z Uniwersytetu Jana Gutenberga, wykazały wyraźną stymulację syntezy białka antygeny w komórkach niedojrzałych DC przez te transkrypty, po wstrzyknięciu ich do węzłów chłonnych myszy. Stymulacja syntezy białka antygeny powoduje natomiast zwiększenie produkcji specyficznych wobec antygeny limfocytów T aktywując układ immunologiczny u myszy [93]. Prace nad szczepionkami antynowotworowymi opartymi na bazie tych mRNA są daleko zaawansowane [98].

Pobocznym aspektem moich badań biofizycznych nad białkami z rodziny eIF4E stał się problem, czy wybór metody ekspresji i izolacji zastosowany przez ze mnie w przypadku tych białek nie wpływa na ich aktywność. Pierwsza metoda ekspresji i izolacji eIF4E z komórek *E. coli* została opracowana przez Edery i wsp. w roku 1988 [94] i polegała na oczyszczaniu eIF4E z frakcji rozpuszczalnej wykorzystując do oczyszczania chromatografię powinowactwa ze złożem m<sup>7</sup>GDP-Sepharose. W dalszych latach metoda ta była modyfikowana. Ze względu jednak na tendencję eIF4E do agregacji podczas ekspresji w komórkach *E. coli* i zamykania białka w cytoplazmatycznych granulach zwanych ciałkami inkluzyjnymi w roku 1997 Marcotrigiano i wsp. [11] opracowali metodę izolacji mysiego eIF4E z ciałek inkluzyjnych poprzez zastosowanie czynnika denaturującego, jakim jest chlorowodorek guanidyny, a następnie ponowne zwinięcie eIF4E do formy natywnej poprzez usunięcie czynnika denaturującego w procesie dializy. Tę ostatnią metodę z rozwinęłam i dostosowałam do otrzymywanych przeze mnie własnoręcznie rekombinowanych izoform eIF4E z różnych organizmów badanych w prezentowanych pracach. Owocem moich wątpliwości, co do prawidłowego zwijania białek eIF4E *in vitro*, jest poboczna praca (publikacja w przygotowaniu), w której porównałam właściwości ludzkiego eIF4E-1a i drożdżowego eIF4E, w tym przede wszystkim ich powinowactwa do kapu. Białka otrzymywałam trzema różnymi procedurami nadekspresji w komórkach *E. coli* i oczyszczając je z frakcji rozpuszczalnej na złożu powinowactwa: m<sup>7</sup>GDP-Sepharose oraz na złożu niklowym (chromatografia metalopowinowactwa), stosując w tym drugim przypadku białka eIF4E z dołączoną etykietką polyhistydynową na N – lub C-końcu białka, jak i standardowo stosowaną przez ze mnie metodą izolacji z ciałek inkluzyjnych. Już na samym wstępie analiza mas uzyskanych białek eIF4E poprzez zastosowanie filtracji żelowej pokazała, że dołączenie do eIF4E etykiетки powinowactwa na C-końcu białka wywołuje jego szybką i silną agregację, w przeciwieństwie do pozostałych białek, dla których obserwowano wyłącznie monomery. Wcześniejsze badania biofizyczne (M7), jak i badania strukturalne [19] oraz przeprowadzone w pracach H6 i H7 przewidywanie struktur izoform eIF4E poprzez modelowanie homologiczne pokazały istotne znaczenie C-końca eIF4E dla oddziaływania z końcem 5' mRNA, jak i również dla formowania prawidłowej struktury eIF4E. Obserwowana agregacja eIF4E, po dołączeniu do C-końca białka sześciu histydyn, jest kolejnym potwierdzeniem jak ważną rolę strukturalną i funkcjonalną odgrywa C-koniec białka oraz, że wybór etykiетки jak i miejsca jej dołączenia może wpłynąć na własności białka.

Przeprowadzone badania oddziaływania otrzymanych w różny sposób pozostałych eIF4E z szeregiem analogów kapu metodą miareczkowania fluorescencyjnego pokazały, że eIF4E uzyskane z frakcji rozpuszczalnej jak i z ciałek inkluzyjnych, poprzez ponowne zwinięcie białka *in vitro*, wykazują tą samą specyficzność wobec badanych analogów kapu. Analiza z pomiarów fluorescencyjnych frakcji białka aktywnego pokazuje, iż w przypadku powszechnie stosowanej w pracach metody oczyszczania na m<sup>7</sup>GTP-Sepharose aktywne jest około 30-40 % białka, podczas gdy we frakcji białka izolowanej z ciałek inkluzyjnych, czy oczyszczanej za pomocą chromatografii metalopowinowactwa aktywne jest od 70 do 90 % białka. Przeprowadzona, za pomocą spektroskopii CD w zakresie bliskiego i dalekiego nadfioletu, w analiza potencjalnych zmian w strukturze II i III rzędowej białek mogąca powstać z różnego sposobu uzyskiwania białek nie wykazała obecności takich zmian.

Podsumowując uzyskane wyniki pokazują, że poprzez izolację eIF4E z ciałek inkluzyjnych i jego ponowne zwinięcie do formy natywnej *in vitro*, uzyskujemy w pełni funkcjonalne białka eIF4E, oraz że sposób izolacji nie może być przyczyną różnic w specyficzności do końca 5' mRNA obserwowanych we wszystkich prezentowanych przeze mnie pracach.

## 6.2 Publikacje stanowiące pozostały dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora

### 6.2.1. Publikacje z listy filadelfijskiej

- D1. Grudzien-Nogalska E., Stepinski J., Jemielity J., Zuberek J., Stolarski R., Rhoads R.E., Darzynkiewicz E. (2007) Synthesis of Anti-Reverse Cap Analogs (ARCAs) and their Applications in mRNA Translation and Stability. *Methods Enzymology* 431: 203-227, [IF 1,640/Cyt. 29](#)
- D2. Lewdorowicz M., Stepinski J., Kierzek R., Jemielity J., **Zuberek J.**, Yoffe Y, Shapira M., Stolarski R., Darzynkiewicz E. Synthesis of Leishmania cap-4 intermediates, cap-2 and cap-3. (2007) *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 26: 1339-1348, [IF 0,671/Cyt. 1](#)
- D3. Kowalska J., Lewdorowicz M., **Zuberek J.**, Bojarska E., Stepinski J., Stolarski R., Darzynkiewicz E. Jemielity J. (2007) Assignment of the absolute configuration of P-chiral 5' mRNA cap analogues containing phosphorothioate moiety. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 26: 1301-1305, [IF 0,671/Cyt. 2](#)
- D4. Kowalska J., Lewdorowicz M., **Zuberek J.**, Grudzien-Nogalska E., Bojarska E., Stepinski J., Rhoads R.E., Darzynkiewicz E., Davis R.E., Jemielity J. (2008) Synthesis and characterization of mRNA cap analogs containing phosphorothioate substitutions that bind tightly to eIF4E and are resistant to the decapping pyrophosphatase DcpS. *RNA* 14: 1119-1131, [IF 5,840/Cyt. 47](#)
- D5. Szklarczyk O., **Zuberek J.**, Antosiewicz J.M. (2009) Poisson-Boltzmann model analysis of binding mRNA cap analogues to the translation initiation factor eIF4E. *Biophysical Chemistry* 140: 16-23, [IF 2,362/Cyt. 5](#)
- D6. Yoffe Y., Léger M., Zinoviev A., **Zuberek J.**, Darzynkiewicz E., Wagner G., Shapira M. (2009) Evolutionary changes in the Leishmania eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. *Nucleic Acid Research* 37: 3243-3253, [IF 7.479/Cyt. 23](#)
- D7. Kowalska J., Lukaszewicz M., **Zuberek J.**, Ziemniak M., Darzynkiewicz E., Jemielity J. (2009) Phosphorothioate analogs of m<sup>7</sup>GTP are enzymatically stable inhibitors of cap-dependent translation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19: 1921-1925, [IF 2,650/Cyt. 20](#)
- D8. Kowalska J., Lukaszewicz M., **Zuberek J.**, Darzynkiewicz E., Jemielity J. (2009) Phosphoroselenoate dinucleotides for modification of mRNA 5' end. *Chembiochem* 10: 2469-2473, [IF 3,332/Cyt. 18](#)
- D9. Rydzik A., Lukaszewicz M., **Zuberek J.**, Kowalska J., Darzynkiewicz Z.M., Darzynkiewicz E., Jemielity J. (2009) Synthetic dinucleotide mRNA cap analogs with tetraphosphate 5',5' bridge containing methylenebis(phosphonate) modification. *Organic & Biomolecular Chemistry* 7: 4763-4776, [IF 3,550/Cyt. 28](#)
- D10. Strenkowska M., Kowalska J., Lukaszewicz M., **Zuberek J.**, Su W., Rhoads R. E., Darzynkiewicz E., Jemielity J. (2010) Towards mRNA with superior translational activity: synthesis and properties of ARCA tetraphosphates with single phosphorothioate modifications. *New Journal of Chemistry* 34, 993 – 1007, [IF 2,631/Cyt. 15](#)
- D11. Su W, Slepnev S., Grudzien-Nogalska E., Kowalska J., Kulis M., **Zuberek J.**, Lukaszewicz M., Darzynkiewicz E., Jemielity J., Rhoads R.E. (2011) Translation, stability, and resistance to decapping of mRNAs containing caps substituted in the triphosphate chain with BH<sub>3</sub>, Se, and NH. *RNA* 17: 978-988, [IF 6,051/Cyt. 16](#)

- D12. Rydzik A. M., Kulis M., Lukaszewicz M., Kowalska J., **Zuberek J.**, Darzynkiewicz Z. M., Darzynkiewicz E., Jemielity J. (2012). Synthesis and properties of mRNA cap analogs containing imidodiphosphate moiety – fairly mimicking natural cap structure, yet resistant to enzymatic hydrolysis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20: 1699-1710, [IF 2,903/Cyt. 23](#)
- D13. Kowalska J., Osowniak A., **Zuberek J.**, Jemielity J. (2012) Synthesis of nucleoside phosphosulfates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22: 3661-3664, [IF 2,338/Cyt. 9](#)
- D14. Szczepaniak S.A., **Zuberek J.**, Darzynkiewicz E., Kufel J., Jemielity J.(2012) Affinity resins containing enzymatically resistant mRNA cap analogs-a new tool for the analysis of cap-binding proteins. *RNA* 18: 1421-1432, [IF 5,095/Cyt. 7](#)
- D15. Jemielity J., Lukaszewicz M., Kowalska J., Czarnecki J., **Zuberek J.**, Darzynkiewicz E. (2012) Synthesis of biotin labelled cap analogue - incorporable into mRNA transcripts and promoting cap-dependent translation. *Organic & Biomolecular Chemistry* 10: 8570-8574, [IF 3,568/Cyt. 11](#)
- D16. Hernández G., Han H., Gandin V., Fabian L., Ferreira T., **Zuberek J.**, Sonenberg N., Brill J.A., Lasko P. (2012) Eukaryotic initiation factor 4E-3 is essential for meiotic chromosome segregation, cytokinesis and male fertility in *Drosophila*. *Development* 139: 3211-3220, [IF 6,3208/Cyt. 14](#)
- D17. Warminski M., Kowalska J., Buck J., **Zuberek J.**, Lukaszewicz M., Nicola C., Kuhn A.N., Sahin U., Darzynkiewicz E., Jemielity J. (2013) The synthesis of isopropylidene mRNA cap analogs modified with phosphorothioate moiety and their evaluation as promoters of mRNA translation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23: 3753-3758, [IF 2,331/Cyt. 8](#)
- D18. Modrak-Wojcik A., Gorka M., Niedzwiecka K., Zdanowski K., **Zuberek J.**, Niedzwiecka A., Stolarski R. (2013) Eukaryotic translation initiation is controlled by cooperativity effects within ternary complexes of 4E-BP1, eIF4E, and the mRNA 5' cap. *FEBS Letters* 587: 3928-3934, [IF 3,582/Cyt. 5](#)
- D19. Nowakowska M, Kowalska J, Martin F, d'Orchymont A, **Zuberek J**, Lukaszewicz M, Darzynkiewicz E, Jemielity J. (2014) Cap analogs containing 6-thioguanosine--reagents for the synthesis of mRNAs selectively photo-crosslinkable with cap-binding biomolecules. *Organic & Biomolecular Chemistry* 12: 4841-4847, [IF 3,487/Cyt. 4](#)
- D20. Kowalska J., Wypijewska del Noga A., Darzynkiewicz Z.M., Buck J., Nicola C., Kuhn A.N., Lukaszewicz M., **Zuberek J.**, Strenkowska M., Ziemniak M., Maciejczyk M., Bojarska E., Rhoads R.E., Darzynkiewicz E., Sahin U., Jemielity J. (2014) Synthesis, properties, and biological activity of boranophosphate analogs of the mRNA cap: versatile tools for manipulation of therapeutically relevant cap-dependent processes. *Nucleic Acids Research* 42: 10245-10264, [IF 8,808/Cyt. 14](#)
- D21. Zytek M., Kowalska J., Lukaszewicz M., Wojtczak B.A., **Zuberek J.**, Ferenc-Mrozek A., Darzynkiewicz E., Niedzwiecka A., Jemielity J. (2014) Towards novel efficient and stable nuclear import signals: synthesis and properties of trimethylguanosine cap analogs modified within the 5',5'-triphosphate bridge. *Organic & Biomolecular Chemistry* 12: 9184-9199, [IF 3,487/Cyt. 8](#)
- D22. Ziemniak M., Kowalska J., Lukaszewicz M., **Zuberek J.**, Wnek K., Darzynkiewicz E., Jemielity J. (2015) Phosphate-modified analogues of m<sup>7</sup>GTP and m<sup>7</sup>Gppppm<sup>7</sup>G – synthesis and biochemical properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23: 5369-5381, [IF 2,793/Cyt. 4](#)

- D23. Strenkowska M., Grzela R., Majewski M., Wnek K., Kowalska J., Lukaszewicz M., **Zuberek J.**, Darzynkiewicz E., Kuhn A.N., Sahin U., Jemielity J. (2016) Cap analogs modified with 1,2-dithiodiphosphate moiety protect mRNA from decapping and enhance its translational potential. *Nucleic Acids Research* 44: 9578-9590, [IF 9,202/Cyt. 4](#)
- D24. Warminski M., Sikorski P.J., Warminska Z., Lukaszewicz M., Kropiwnicka A., **Zuberek J.**, Darzynkiewicz E., Kowalska J., Jemielity J. (2017) Amino-Functionalized 5' Cap Analogs as Tools for Site-Specific Sequence-Independent Labeling of mRNA. *Bioconjugate Chemistry* 28: 1978-1992, [IF 4,818/Cyt. 0](#)
- D25. Rydzik A.M., Warminski M., Sikorski P.J., Baranowski M.R., Walczak S., Kowalska J., **Zuberek J.**, Lukaszewicz M., Nowak E., W Claridge T.D., Darzynkiewicz E., Nowotny M., Jemielity J. (2017) mRNA cap analogues substituted in the tetraphosphate chain with CX2: identification of O-to-CCl2 as the first bridging modification that confers resistance to decapping without impairing translation. *Nucleic Acids Research* 45: 8661-8675, [IF 10,162/Cyt. 0](#)

### 6.2.2. Artykuły w wydawnictwach spoza listy filadelfijskiej

- D26. Stepinski J., Worch R., **Zuberek J.**, Bojarska E., Jemielity J., Lewdorowicz M., Stolarski R., Haber D., Darzynkiewicz E. (2005) Synthesis and preliminary characterization of mRNA 5' cap analogues containing ribavirin. *Chemistry of Nucleic Acid Components, Collection Symposium Series 7*: 479-480.
- D27. Kowalska J., Lewdorowicz M., **Zuberek J.**, Bojarska E., Darzynkiewicz Z.M., Grudzien E., Davis R.E., Rhoads R.E., Stepinski J., Stolarski R., Darzynkiewicz E., Jemielity J. (2005) Synthesis and Properties of phosphorothioate 5' mRNA cap dinucleotides. *Chemistry of Nucleic Acid Components, Collection Symposium Series. 7*: 417-419.
- D28. Jemielity J., Stepinski J., **Zuberek J.**, Grudzien E., Lewdorowicz M., Stolarski R., Rhoads R.E., Darzynkiewicz E. (2005) Dinucleotide analogues of the mRNA cap that enhance translational efficiency. *Chemistry of Nucleic Acid Components, Collection Symposium Series 7*: 361-365.
- D29. Kalek M., Jemielity J., Grudzien E., **Zuberek J.**, Darzynkiewicz Z.M., Bojarska E., Stepinski J., Stolarski R., Davis R.E., Rhoads R.E., Darzynkiewicz E. (2005) Synthesis and biochemical properties of the novel enzymatically table mRNA cap analogues with versatile potential applications. *Chemistry of Nucleic Acid Components, Collection Symposium Series 7*: 355-359
- D30. Kowalska J., Ziemiak M., Lukaszewicz M., **Zuberek J.**, Strenkowska M., Darzynkiewicz E., Jemielity J. (2008) Phosphorothioate analogues of m7GTP: strong inhibitor of translation with increased resistance towards enzymatic degradation. *Chemistry of Nucleic Acid Components, Collection Symposium Series 10*: 487-490
- D31. Szczepaniak S.A., Jemielity J., **Zuberek J.**, Darzynkiewicz E., Kufel J. (2008) Synthesis of nonhydrolyzable cap analog substituted Sepharose for affinity purification of decapping enzymem. *Chemistry of Nucleic Acid Components, Collection Symposium Series 10*: 461-464
- D32. Rydzik A., **Zuberek J.**, Kowalska J., Darzynkiewicz E., Jemielity J. (2008) Bisphosphonate modification In tetraphosphate 5'mRNA cap analogs- synthesis and biochemical properties. *Chemistry of Nucleic Acid Components, Collection Symposium Series. 10*: 444-447

- D33. Kulis M., Kowalska J., **Zuberek J.**, Darzynkiewicz E., Jemielity J. (2008) Imidodiphosphate modification of dinucleotide mRNA cap analogs. *Chemistry of Nucleic Acid Components, Collection Symposium Series 10*: 389-392
- D34. Kowalska J., Grudzien-Nogalska E., Lewdorowicz M., **Zuberek J.**, Bojarska E., Stepinski J., Rhoads R.E., Darzynkiewicz E., Davis R.E., Jemielity J. (2008) Phosphorothioate analogues of mRNA cap with superior biological properties *Chemistry of Nucleic Acid Components, Collection Symposium Series 10*: 362-365
- D35. Kowalska J., **Zuberek J.**, Darzynkiewicz Z.M., Lukaszewicz M., Darzynkiewicz E., Jemielity J. (2008) Synthesis and properties of boranophosphate mRNA cap analogues. *Chemistry of Nucleic Acid Components, Collection Symposium Series 10*: 383-385
- D36. Rydzik A., **Zuberek J.**, Kowalska J., Lukaszewicz M., Darzynkiewicz E., Jemielity J. (2008) Synthesis and biochemical studies of tetraphosphate 5' mRNA cap analogs bearing bisphosphonate modification. *Nucleic Acids Symposium Series 52*: 287-288
- D37. Kowalska J., **Zuberek J.**, Darzynkiewicz Z.M., Lukaszewicz M., Darzynkiewicz E., Jemielity J. (2008) The first examples of mRNA cap analogs bearing boranophosphate modification. *Nucleic Acids Symposium Series 52*: 289-290
- D38. Kowalska J., Lukaszewicz M., **Zuberek J.**, Ziemiak M., Strenkowska M., Darzynkiewicz E., Jemielity J. (2008) m7GTP alphaS is a strong and stable inhibitor of cap-dependent translation. *Nucleic Acids Symposium Series 52*: 291-292
- D39. Szczepaniak S.A., Jemielity J., **Zuberek J.**, Kufel J., Darzynkiewicz E. (2008) Bisphosphonate mRNA cap analog attached to Sepharose for affinity chromatography of decapping enzymes. *Nucleic Acids Symposium Series 52*: 295-296
- D40. Jemielity J., Lukaszewicz M., Kowalska J., Czarnecki J., **Zuberek J.**, Darzynkiewicz E. (2011) Synthesis and properties of dinucleotide cap analog for mRNA 5' end labeling *Chemistry of Nucleic Acid Components, Collection Symposium Series 12*: 351-353
- D41. Warminski M., Kowalska J., Nowakowska M., **Zuberek J.**, Lukaszewicz M., Darzynkiewicz E., Jemielity J. (2011) Synthesis and properties of new thio-substituted mRNA cap analogs *J. Chemistry of Nucleic Acid Components, Collection Symposium Series 12*: 378-380
- D42. Ziemiak M., Mugridge J., Kowalska J., Stelmachowska A., **Zuberek J.**, Edward Darzynkiewicz E., Gross J.D., Rhoads R.E. Jemielity J. (2014) Utility of chemically modified cap analogues in studying Dcp1/2 decapping complex mechanism of action. *Chemistry of Nucleic Acid Components, Collection Symposium Series 14*: 155–158
- D43. Kowalska J., Baranowski M.R., Nowicka A., Kasprzyk R., **Zuberek J.**, Wojcik J., Jemielity J. (2014) Synthesis and properties of nucleotides containing a fluorophosphate moiety. *Chemistry of Nucleic Acid Components, Collection Symposium Series 14*: 159–162
- D44. Majewski M., Strenkowska M., **Zuberek J.**, Kowalska J., Jemielity J. (2014) Synthesis and properties of cap-decorated gold nanoparticles. *Chemistry of Nucleic Acid Components, Collection Symposium Series 14*: 287–288
- D45. Walczak S., Wanat P., Nowicka A., **Zuberek J.**, Kowalska J., Jemielity J. (2014) Synthesis and properties of dinucleotide cap analogs containing a triazole ring within the oligophosphate bridge. *Chemistry of Nucleic Acid Components, Collection Symposium Series 14*: 289–290

- D46. Tomaszewicz Z., Warminski M., Ubych K., Łukaszewicz M., **Zuberek J.**, Kropiwnicka A., Darzynkiewicz E., Kowalska J., Jemielity J. (2014) Properties and applications of amino- or carboxyfunctionalized mRNA 5'-cap analogues and their conjugates *Chemistry of Nucleic Acid Components, Collection Symposium Series 14*: 387–388

### 6.2.2. Patenty

- P1. Kowalska J. Jemielity J., Darzynkiewicz E., Łukaszewicz M., **Zuberek J.** "Nowe boranofosforanowe analogi dinukleozydów, ich zastosowanie, cząsteczka RNA, sposób otrzymywania RNA, oraz otrzymywania peptydów lub białka." Patent nr P 215513 przyznany 31.12.2013 przez Urząd Patentowy RP.
- P2. Kowalska J. Jemielity J., Darzynkiewicz E., Rhoads R.E., Łukaszewicz M., **Zuberek J.** "mRNA Cap Analogs" US Patent US8519110, przyznany 27.08.2013.

## 6.3 Publikacje stanowiące pozostały dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora

### 6.3.1. Publikacje z listy filadelfijskiej

- M1. **Zuberek J.**, Wyslouch-Cieszynska A., Niedzwiecka A., Dadlez M., Stepinski J., Augustyniak W., Gingras A-C., Zhang Z., Burley S. K., Sonenberg N., Stolarski R., Darzynkiewicz E. (2003) Phosphorylation of eIF4E attenuates its interaction with mRNA 5' cap analogs by electrostatic repulsion; Intein-Mediated Protein Ligation strategy to obtain phosphorylated protein. *RNA* 9: 52-61, [IF 5,099/Cyt. 82](#)
- M2. Jemielity J., Fowler T., **Zuberek J.**, Stepinski J., Lewdorowicz M., Niedzwiecka A., Stolarski R., Darzynkiewicz E., Rhoads RE. (2003) Novel "anti-reverse" cap analogs with superior translational properties. *RNA* 9: 1108-1122, [IF 5,099/Cyt. 110](#)
- M3. **Zuberek J.**, Jemielity J., Niedzwiecka A., Stepinski J., Wyslouch-Cieszynska A., Stolarski R., Darzynkiewicz E. (2003) Influence of the length of the phosphate chain in mRNA 5' cap analogues on their interaction with eukaryotic initiation factor 4E. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 22: 1707-1710, [IF 0,781/Cyt. 4](#)
- M4. **Zuberek J.**, Jemielity J., Stepinski J., Lewdorowicz M., Niedzwiecka A., Haber D., Stolarski R., Rhoads R.E., Darzynkiewicz E. (2003) Binding studies of eukaryotic initiation factor eIF4E with novel mRNA dinucleotide cap analogues. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 22: 1703-1706, [IF 0,781/Cyt. 1](#)
- M5. **Zuberek J.**, Jemielity J., Jablonowska A., Stepinski J., Dadlez M., Stolarski R., Darzynkiewicz E. (2004) Influence of electric charge at residues 209 and 159 on the interaction of eIF4E with the mRNA 5' terminus. *Biochemistry* 43: 5370-5379, [IF 3,922/Cyt. 49](#)
- M6. Lewdorowicz M., Yoffe Y., **Zuberek J.**, Jemielity J., Stepinski J., Kierzek R., Stolarski R., Shapira M., Darzynkiewicz E. (2004) Chemical synthesis and binding activity of trypanpsomatid cap-4 structure. *RNA* 10: 1469-1478, [IF 4,430/Cyt. 25](#)
- M7. Yoffe Y., **Zuberek J.**, Lewdorowicz M., Zeira Z., Keasar C., Shaanan B., Orr-Dahan I., Jankowska-Anyszka M., Darzynkiewicz E., Shapira M. (2004) Cap binding activity of a eIF4E homologue from *Leishmania*. *RNA* 10: 1764-1775, [IF 4,430/Cyt. 26](#)



- M8. Kowalska J., Lewdorowicz M., **Zuberek J.**, Bojarska E., Wojcik J., Cohen L.S., Davis R.E., Stepinski J., Stolarski R., Darzynkiewicz E., Jemielity J. (2005) Synthesis and properties of mRNA cap analogs containing phosphorothioate moiety in 5',5'-triphosphate chain. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 24: 595-600, [IF 0,429/Cyt. 8](#)
- M9. Kalek M., Jemielity J., Grudzien E., **Zuberek J.**, Bojarska E., Cohen L.S., Stepinski J., Stolarski R., Davis R.E., Rhoads R.E., Darzynkiewicz E. (2005) Synthesis and biochemical properties of Novel mRNA 5' cap analogs resistant to enzymatic hydrolysis. *Nucleosides Nucleotides Nucleic* 24: 615-621, [IF 0,429/Cyt. 25](#)
- M10. Stepinski J., **Zuberek J.**, Jemielity J., Kalek M., Stolarski R., Darzynkiewicz E. . (2005) Novel dinucleoside 5',5'-triphosphate cap analogues Synthesis and affinity for murine translation factor eIF4E. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 24: 628-633, [IF 0,429/Cyt. 7](#)
- M11. Westman B., Beeren L., Grudzien E., Stepinski J., Worch R, **Zuberek J.**, Jemielity J., Stolarski R., Darzynkiewicz E., Rhoads R.E., Preiss T. (2005) The antiviral drug ribavirin does not mimic the 7-methylguanosine moiety of the mRNA cap structure in vitro. *RNA*, 11: 1505-1513, [IF 5,842/Cyt. 29](#)

### 6.3.2. Artykuły w wydawnictwach spoza listy filadelfijskiej

- M12. **Zuberek J.**, Stepinski J., Niedzwiecka A., Stolarski R., Salo H., Lonnberg H., Darzynkiewicz E. (2002) Synthesis of tetra-ribonucleotide cap analogue  $m^7GpppA^{m2'}pU^{m2'}pA^{m2'}$  and its interaction with eukaryotic initiation factor eIF4E. *Chemistry of nucleic Acid Components, Collection Symposium Series* 5: 399-403.
- M13. Jemielity J., **Zuberek J.**, Stepinski J., Lewdorowicz M., Niedzwiecka A., Haber D., Tolvert F., Stolarski R., Rhoads R.E., Darzynkiewicz E. (2002) Synthesis, physico-chemical and biochemical properties of the novel tri-, tetra-, and pentaphosphate mRNA cap analogues. *Chemistry of nucleic Acid Components, Collection Symposium Series* 5: 159-168.

## 7. Działalność na rzecz rozwijania nowej infrastruktury naukowo-badawczej w Zakładzie Biofizyki oraz nowe inicjatywy w procesie dydaktycznym

Przedstawiona przez ze mnie cała działalność naukowo-badawcza przed i po uzyskaniu stopnia doktora nie byłaby możliwa bez ogromnego wkładu pracy, który włożyłam i wkładam w utworzenie i rozwijanie zainicjowanego przez prof. Edwarda Darżynkiewicza, „*Laboratorium Ekspresji Genu*” w Zakładzie Biofizyki Wydziału Fizyki UW, w którym uzyskałam większość z badanych przeze mnie białek. Obecny stan laboratorium pozwala Nam na uzyskiwanie różnego typu obiektów biologicznych (w tym rekombinowanych białek, cząsteczek RNA, DNA) do badań biofizycznych przy zastosowaniu szerokiej gamy metod biologii molekularnej, jak i na przeprowadzanie prostych eksperymentów biochemicznych i biologicznych *in vitro*.

Moje zaangażowanie w tworzenie „*Laboratorium Ekspresji Genu*” rozpoczęło się zaraz po rozpoczęciu studiów doktoranckich na Wydziale Fizyki UW realizowanych pod opieką prof. Darżynkiewicza w Zakładzie Biofizyki, tworząc jego infrastrukturę, bazę aparaturową jak i metodologiczną. Dzięki uprzejmości profesora dr hab. Michała Dadleza i dr Aleksandry Wysłouch-Cieszyńskiej z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, przez dwa pierwsze lata studiów doktoranckich, miałam możliwość pracy oraz nauki podstawowych technik biologii molekularnej w kierowanych przez nich laboratoriach, co dla mnie jako fizyka z wykształcenia było ogromnym wyzwaniem. Całe zdobyte w IBB i rozwijane następnie na specjalistycznych kursach doświadczenie zarówno w metodach biologii molekularnej jak i organizacji i funkcjonowania tego typu laboratoriów przenieśliśmy do Zakładu Biofizyki stając się jednocześnie pracownikiem naukowym, dydaktycznym, jak i technicznym Laboratorium Ekspresji Genu.

Organizacja Laboratorium jak i zdobyte doświadczenie w zakresie metod biologii molekularnej pozwoliło mi na rozszerzenie zakresu ćwiczeń prowadzonej w Zakładzie Biofizyki „Pracowni z Biochemii” jak i na utworzenie autorskiej „Pracowni Genetyki Molekularnej” dla studentów Wydziału Fizyki na specjalności „Biofizyka” odbywającej się dotychczas gościnie w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN. Uczestniczyłam również aktywnie w tworzeniu biologicznej części programów nowego kierunku studiów I stopnia „Zastosowania Fizyki w Biologii i Medycynie” dla specjalności „Biofizyka Molekularna” oraz „Projektowanie Molekularne i Bioinformatyka” na Wydziale Fizyki. W ramach tego kierunku studiów współtworzyłam infrastrukturę „Pracowni Biologii Molekularnej” i przygotowałam autorskie programy, skrypty dla studentów oraz wszystkie niezbędne materiały biologiczne na zajęcia: „Praktikum z Mikrobiologii Ogólnej i Genetyki Bakterii” oraz „Pracownia Biologii Molekularnej”. W ramach kierunku ZFBM przygotowałam i prowadziłam autorski wykład „Biologia Molekularna cz II” prezentujący studentom nowoczesne techniki biologii molekularnej.

Podczas swojej pracy na Wydziale Fizyki prowadziłam pięć prac licencjackich (2009, 2012, 2013, 2015) oraz trzy prace magisterskie (2007, 2009, 2015). Praca mgr Doroty Kubackiej pt. „Oddziaływania warstwowe w mechanizmie rozpoznawania struktury kapu końca 5' mRNA przez izoformy ludzkiego białka eIF4E” uzyskała nagrodę I stopnia im. Arkadiusza Piekary za pracę magisterską w roku 2007 przyznawaną przez Polskiego Towarzystwo Fizyczne. Sprawowałam również nieformalną bezpośrednią opiekę nad pracami doktorskimi wykonywanymi na Wydziale Fizyki UW, czego owocem są prace **H5** i **H6**. Obecnie sprawuję również bezpośrednią opiekę nad doktorantem będącym na III-roku studiów doktoranckich.

W latach 2006 i 2007 zorganizowałam i przeprowadziłam tygodniowe warsztaty pt.: „Podstawy Mikrobiologii i Biologii Molekularnej” dla studentów II roku studiów I-stopnia kierunku Fizyka, a w latach 2006, 2007, 2011 i 2012 prowadziłam dla studentów staże wakacyjne.

## 8. Literatura

- [1] Furuichi Y. SA. Viral and cellular mRNA capping : past and prospects . *Adv Virus Reserch* 2000;55:135–84.
- [2] Konarska MM, Padgett RA SP. Recognition of cap structure in splicing in vitro of mRNA. *Cell* 1984;38:731–6.
- [3] Patzelt E, Hartmuth K, Blaas D, Kuechler E. Assembly of pre-mRNA splicing complex is cap dependent *Nucleic. Nucleic Acids Research* 1987;15:1387–99.
- [4] Culjkovic B, Topisirovic I, Skrabanek L, Ruiz-gutierrez M, Borden KLB. eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3' J UTR. *Journal of Cell Biology* 2005;169:245–56.
- [5] Osborne MJ, Borden KLB. The eukaryotic translation initiation factor eIF4E in the nucleus: Taking the road less traveled. *Immunological Reviews* 2015;263:210–23.
- [6] Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova T V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010;11:113–27.
- [7] Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* 2009;136:731–45.
- [8] Ho JJD, Lee S. A Cap for Every Occasion: Alternative eIF4F Complexes. *Trends in Biochemical Sciences* 2016;41:821–3.
- [9] Li Y, Kiledjian M. Regulation of mRNA decapping. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2010;1:253–65.
- [10] Ling SHM, Qamra R, Song H. Structural and functional insights into eukaryotic mRNA decapping. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2011;2:193–208.
- [11] Marcotrigiano J, Gingras A, Sonenberg N, Burley SK. Cocrystal Structure of the Messenger RNA 5' Cap-Binding Protein ( eIF4E ) Bound to 7-methyl-GDP. *Cell* 1997;89:951–61.
- [12] Mazza C, Segref A, Mattaj IW, Cusack S. Large-scale induced fit recognition of an m7GpppG cap analogue by the human nuclear cap-binding complex. *EMBO Journal* 2002;21:5548–57.
- [13] Hsu P, Hodel MR, Thomas JW, Taylor LJ, Hagedorn CH, Hodel AE. Structural Requirements for the Specific Recognition of an m 7 G mRNA Cap. *Biochemistry* 2000;39:13730–6.
- [14] Guanghui Hu, Ah-Lim Tsai FAQ. Insertion of an N7-methylguanine mRNA Cap between Two Coplanar Aromatic Residues of a Cap-binding Protein Is Fast and Selective for a Positively Charged Cap. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:51515–20.
- [15] Strasser A, Dickmanns A, Ficner R. Structural basis for m 3 G-cap-mediated nuclear import of spliceosomal UsnRNPs by snurportin1. *EMBO Journal* 2005;24:2235–43.
- [16] Wu M, Nilsson P, Henriksson N, Niedzwiecka A, Lim MK, Cheng Z, et al. Article Structural Basis of m 7 GpppG Binding to Poly ( A ) -Specific Ribonuclease. *Structure/Folding and Design* 2009;17:276–86.
- [17] Osborne MJ, Volpon L, Kornblatt J a, Culjkovic-Kraljacic B, Baguet A, Borden KLB. eIF4E3 acts as a tumor suppressor by utilizing an atypical mode of methyl-7-guanosine cap recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013;110:3877–82.
- [18] Tomoo K, Shen X, Okabe K, Nozoe Y, Fukuhara S, Morino S, et al. Crystal structures of 7-methylguanosine 5'-triphosphate (m(7)GTP)- and P(1)-7-methylguanosine-P(3)-adenosine-5',5'-triphosphate (m(7)GpppA)-bound human full-length eukaryotic initiation factor 4E: biological importance of the C-terminal flexible region. *The Biochemical Journal* 2002;362:539–44.
- [19] Tomoo K, Shen X, Okabe K, Nozoe Y, Fukuhara S, Morino S, et al. Structural Features of Human Initiation Factor 4E, Studied by X-ray Crystal Analyses and Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Molecular Biology* 2003;328:365–83.
- [20] Borden KLB. The eukaryotic translation initiation factor eIF4E wears a “ cap ” for many occasions. *Translation* 2016;4:1–12.
- [21] Tomoo K, Matsushita Y, Fujisaki H, Abiko F, Shen X, Taniguchi T, et al. Structural basis for mRNA Cap-

- Binding regulation of eukaryotic initiation factor 4E by 4E-binding protein, studied by spectroscopic, X-ray crystal structural, and molecular dynamics simulation methods. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005;1753:191–208.
- [22] Kamenska A, Simpson C, Standart N. eIF4E-binding proteins: new factors, new locations, new roles. *Biochemical Society Transactions* 2014;42:1238–45.
- [23] Peter D, Igreja C, Weber R, Wohlbold L, Weiler C, Ebertsch L, et al. Molecular Architecture of 4E-BP Translational Inhibitors Bound to eIF4E. *Molecular Cell* 2015;57:1–14.
- [24] Gruner S, Peter D, Weber R, Valkov E, Izaurralde E, Gru S. The Structures of eIF4E-eIF4G Complexes Reveal an Extended Interface to Regulate Translation Initiation Article The Structures of eIF4E-eIF4G Complexes Reveal an Extended Interface to Regulate Translation Initiation. *Molecular Cell* 2016;64:467–79.
- [25] Merrick WC. eIF4F: A Retrospective. *Journal of Biological Chemistry* 2015;290:24091–9.
- [26] Sonenberg N, Hinnebusch AG. New Modes of Translational Control in Development, Behavior, and Disease. *Molecular Cell* 2007;28:721–9.
- [27] Dostie Â, Ferraiuolo M, Pause A, Adam SA, Sonenberg N. A novel shuttling protein , 4E-T , mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein , eIF4E. *EMBO Journal* 2000;19:3142–56.
- [28] Nishimura T, Padamsi Z, Gingras A, Fabian MR. The eIF4E-Binding Protein 4E-T Is a Component of the mRNA Decay Machinery that Bridges the 5' and 3' Termini of Target mRNAs. *Cell Reports* 2015;11:1425–36.
- [29] Sonenberg N, Morgan MA, Merrick WC, Shatkin AJ. A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1978;75:4843–7.
- [30] Browning KS, Maia DM, Lax SR, Ravel JM. Identification of a new protein synthesis initiation factor from wheat germ. *Journal of Biological Chemistry* 1987;262:538–41.
- [31] Browning KS, Webster C, Roberts JKM, Ravel JM. Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *Journal of Biological Chemistry* 1992;267:10096–100.
- [32] Rodriguez CM, Freire MA, Camilleri C, Robaglia C. The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development. *Plant Journal* 1998;13:465–73.
- [33] Altmann M, Muller PP, Pelletier J, Sonenberg N, Trachsel H. A mammalian translation initiation factor can substitute for its yeast homologue in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 1989;264:12145–7.
- [34] Rom E, Kim HC, Gingras a C, Marcotrigiano J, Favre D, Olsen H, et al. Cloning and characterization of 4EHP, a novel mammalian eIF4E-related cap-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:13104–9.
- [35] Ruud KA, Kuhlow C, Goss DJ, Browning KS. Identification and Characterization of a Novel Cap-binding Protein from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:10325–30.
- [36] Keiper BD, Lamphear BJ, Deshpande AM, Jankowska-Anyszka M, Aamodt EJ, Blumenthal T, et al. Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:10590–6.
- [37] Ptushkina M, Berthelot K, von der Haar T, Geffers L, Warwicker J, McCarthy JE. A second eIF4E protein in *Schizosaccharomyces pombe* has distinct eIF4G-binding properties. *Nucleic Acids Research* 2001;29:4561–9.
- [38] Robalino J, Joshi B, Fahrenkrug SC, Jagus R. Two Zebrafish eIF4E Family Members Are Differentially Expressed and Functionally Divergent. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279:10532–41.
- [39] Joshi B, Cameron A, Jagus R. Characterization of mammalian eIF4E-family members. *European Journal of Biochemistry* 2004;271:2189–203.
- [40] Hernández G, Altmann M, Sierra JM, Urlaub H, Diez Del Corral R, Schwartz P, et al. Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in *Drosophila*.

Mechanisms of Development 2005;122:529–43.

- [41] Mangio RS, Votra S, Pruyne D. The canonical eIF4E isoform of *C. elegans* regulates growth, embryogenesis, and germline sex-determination. *Biology Open* 2015;1–9.
- [42] Henderson M a, Cronland E, Dunkelbarger S, Contreras V, Strome S, Keiper BD. A germline-specific isoform of eIF4E (IFE-1) is required for efficient translation of stored mRNAs and maturation of both oocytes and sperm. *Journal of Cell Science* 2009;122:1529–39.
- [43] Kawasaki I, Jeong MH, Shim YH. Regulation of sperm-specific proteins by IFE-1, a germline-specific homolog of eIF4E, in *C. elegans*. *Molecules and Cells* 2011;31:191–7.
- [44] Dinkova TD, Keiper BD, Nadejda L, Aamodt EJ, Rhoads RE, Korneeva NL. Translation of a Small Subset of *Caenorhabditis elegans* mRNAs Is Dependent on a Specific Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Isoform. *Molecular and Cellular Biology* 2005;25:100–13.
- [45] Villaescusa JC, Buratti C, Penkov D, Mathiasen L, Planagumà J, Ferretti E, et al. Cytoplasmic Prep1 Interacts with 4EHP Inhibiting Hoxb4 Translation. *PLoS ONE* 2009;4:e5213.
- [46] Morita M, Ler LW, Fabian MR, Siddiqui N, Mullin M, Henderson VC, et al. A Novel 4EHP-GIGYF2 Translational Repressor Complex Is Essential for Mammalian Development. *Molecular and Cellular Biology* 2012;32:3585–93.
- [47] Cho PF, Poulin F, Cho-Park YA, Cho-Park IB, Chicoine JD, Lasko P, et al. A New Paradigm for Translational Control: Inhibition via 5′-3′ mRNA Tethering by Bicoid and the eIF4E Cognate 4EHP. *Cell* 2005;121:411–23.
- [48] Cho PF, Gamberi C, Cho-Park YA, Cho-Park IB, Lasko P, Sonenberg N. Cap-Dependent Translational Inhibition Establishes Two Opposing Morphogen Gradients in *Drosophila* Embryos. *Current Biology* 2006;16:2035–41.
- [49] Chapat C, Mehdi S, Matta-camacho E, Hesketh GG, Gelbart IA. Cap-binding protein 4EHP effects translation silencing by microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2017;114:5425–30.
- [50] Uniacke J, Holterman CE, Lachance G, Franovic A, Jacob MD, Fabian MR, et al. An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature* 2012;486:126–9.
- [51] Uniacke J, Perera JK, Lachance G, Francisco CB, Lee S. Cancer cells exploit eIF4E2-directed synthesis of hypoxia response proteins to drive tumor progression. *Cancer Research* 2014;74:1379–89.
- [52] Timpano S, Uniacke J. Human Cells Cultured Under Physiological Oxygen Utilize Two Cap-binding Proteins to Recruit Distinct mRNAs for Translation. *Journal of Biological Chemistry* 2016;291:10772–82.
- [53] Patrick RM, Browning KS. The eIF4F and eIFiso4F Complexes of Plants: An Evolutionary Perspective. *Comparative and Functional Genomics* 2012;2012:287814.
- [54] Hernández G, Vazquez-Pianzola P. Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mechanisms of Development* 2005;122:865–76.
- [55] Evsikov A V, Marín de Evsikova C. Evolutionary origin and phylogenetic analysis of the novel oocyte-specific eukaryotic translation initiation factor 4E in Tetrapoda. *Development Genes and Evolution* 2009;219:111–8.
- [56] Minshall N, Reiter MH, Weil D, Standart N. CPEB interacts with an ovary-specific eIF4E and 4E-T in early *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282:37389–401.
- [57] Patrick RM, Mayberry LK, Choy G, Woodard LE, Liu JS, White A, et al. Two *Arabidopsis* Loci Encode Novel Eukaryotic Initiation Factor 4E Isoforms That Are Functionally Distinct from the Conserved Plant Eukaryotic Initiation Factor 4E. *Plant Physiology* 2014;164:1820–30.
- [58] Kuge H, Richterl JD. ribose methylation : implications for translational control of maternal mRNA. *EMBO Journal* 1995;14:6301–10.
- [59] Kuge H, Brownlee GG, Gershon PD, Richter JD. Cap ribose methylation of *c-mos* mRNA stimulates translation and oocyte maturation in *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Research* 1998;26:3208–14.

- [60] Gillian-Daniel DL, Gray NK, Åstrom J, Barkoff A, Wickens M. Modifications of the 5' Cap of mRNAs during *Xenopus* Oocyte Maturation : Independence from Changes in Poly ( A ) Length and Impact on Translation. *Molecular and Cellular Biology* 1998;18:6152–63.
- [61] Altman M, Edery I, Trachsel H, Sonenberg N. Site-directed mutagenesis of the tryptophan residues in yeast eukaryotic initiation factor 4E. *Journal of Biological Chemistry* 1988;263:17229–32.
- [62] Morino S, Hazama H, Ozaki M, Teraoka Y, Shibata S, Doi M. Analysis of the mRNA cap-binding ability of human eukaryotic initiation factor-4E by use of recombinant wild-type and mutant forms 1996;601:597–601.
- [63] Rosettani P, Knapp S, Vismara M-G, Rusconi L, Cameron AD. Structures of the human eIF4E homologous protein, h4EHP, in its m7GTP-bound and unliganded forms. *Journal of Molecular Biology* 2007;368:691–705.
- [64] Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 2005;1751:119–39.
- [65] Strickland E. Aromatic contributions to circular dichroism spectra of proteins. *Critical Reviews in Biochemistry* 1974;2:113–75.
- [66] Joshi B, Lee K, Maeder DL, Jagus R. Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evolutionary Biology* 2005;5:48.
- [67] Matsuo H, Li H, McGuire a M, Fletcher CM, Gingras a C, Sonenberg N, et al. Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nature Structural Biology* 1997;4:717–24.
- [68] Ghosh P, Park C, Peterson MS, Bitterman PB, Polunovsky V a, Wagner CR. Synthesis and evaluation of potential inhibitors of eIF4E cap binding to 7-methyl GTP. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2005;15:2177–80.
- [69] Brown CJ, McNae I, Fischer PM, Walkinshaw MD. Crystallographic and mass spectrometric characterisation of eIF4E with N7-alkylated cap derivatives. *Journal of Molecular Biology* 2007;372:7–15.
- [70] Jia Y, Chiu T-L, Amin E a, Polunovsky V, Bitterman PB, Wagner CR. Design, synthesis and evaluation of analogs of initiation factor 4E (eIF4E) cap-binding antagonist Bn7-GMP. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2010;45:1304–13.
- [71] Li S, Jia Y, Jacobson B, McCauley J, Kratzke R, Bitterman PB, et al. Treatment of breast and lung cancer cells with a N-7 benzyl guanosine monophosphate tryptamine phosphoramidate pronucleotide (4Ei-1) results in chemosensitization to gemcitabine and induced eIF4E proteasomal degradation. *Molecular Pharmaceutics* 2013;10:523–31.
- [72] Haile S, Papadopoulou B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Current Opinion in Microbiology* 2007;10:569–77.
- [73] Liang X, Haritan A, Uliel S. trans and cis Splicing in Trypanosomatids : Mechanism, Factors and Regulation. *Eukaryotic Cell* 2003;2:830–40.
- [74] Bangs JD, Crain PF, Hashizume T, McCloskey JA, Boothroyd JC. Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *Journal of Biological Chemistry* 1992;267:9805–15.
- [75] Mair G, Ullu E, Tschudi C. Cotranscriptional cap 4 formation on the *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:28994–9.
- [76] Freire ER, Dhalia R, Moura DMN, Da Costa Lima TD, Lima RP, Reis CRS, et al. The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2011;176:25–36.
- [77] Karaki S, Andrieu C, Ziouziou H. The Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E ( eIF4E ) as a Therapeutic Target for Cancer. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 2015;101:1–26.
- [78] Siddiqui N, Sonenberg N. The Centenary Award Signalling to eIF4E in cancer. *Biochemical Society Transactions* 2015;43:763–72.

- [79] Evans TC, Xu M. Mechanistic and Kinetic Considerations of Protein Splicing. *Chemical Review* 2002;102:4869–83.
- [80] Xu M, Evans TC. Intein-Mediated Ligation and Cyclization of Expressed Proteins. *Methods* 2001;277:257–77.
- [81] Fischer PM. Cap in hand : Targeting eIF4E. *Cell Cycle* 2009;8:2535–41.
- [82] Jia Y, Polunovsky V, Bitterman PB, Wagner CR. Cap-dependent translation initiation factor eIF4E: an emerging anticancer drug target. *Medicinal Research Reviews* 2012;32:786–814.
- [83] Pasquinelli Amy E, Dahlberg James E. LE. Reverse 5' caps in RNAs made in vitro by phage RNA polymerases. *RNA* 1995;1:957–67.
- [84] Stepinski J, Waddell C, Stolarski R, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel " anti-reverse " cap analogs. *RNA* 2001;7:1486–95.
- [85] Liu H, Rodgers ND, Jiao X. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO Journal* 2002;21:4699–708.
- [86] Graff JR, Konicek BW, Carter JH, Marcusson EG. Targeting the Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E for Cancer Therapy. *Cancer Research* 2008;68:631–5.
- [87] Weide B, Garbe C, Rammensee H, Pascolo S. Plasmid DNA- and messenger RNA-based anti-cancer vaccination. *Immunology Letters* 2008;115:33–42.
- [88] Yamamoto A, Kormann M, Rosenecker J, Rudolph C. Current prospects for mRNA gene delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009;71:484–9.
- [89] Kalek M, Jemielity J, Darzynkiewicz ZM, Bojarska E, Stepinski J, Stolarski R, et al. Enzymatically stable 5' O mRNA cap analogs : Synthesis and binding studies with human DcpS decapping enzyme. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2006;14:3223–30.
- [90] Grudzien E, Kalek M, Jemielity J, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. Differential Inhibition of mRNA Degradation Pathways by Novel Cap Analogs. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281:1857–67.
- [91] Deshmukh M V, Jones BN, Flinders J, Floor SN, Kim C, Jemielity J, et al. Article mRNA Decapping Is Promoted by an RNA-Binding Channel in Dcp2. *Molecular Cell* 2008;1:324–36.
- [92] Mugridge JS, Ziemniak M, Jemielity J, Gross JD, Francisco S, Francisco S. Structural basis of mRNA cap recognition by Dcp1–Dcp2. *Nature Structural & Molecular Biology* 2017;23:987–94.
- [93] Kuhn AN, Diken M, Kreiter S, Selmi A, Kowalska J, Jemielity J, et al. Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo. *Gene Therapy* 2010;17:961–71.
- [94] Ederly I, Altmann M, Sonenberg N. High-level synthesis in *Escherichia coli* of functional cap-binding eukaryotic initiation factor eIF-4E and affinity purification using a simplified cap-analog resin . *Gene* 1988;74:1988.

#### *Patenty*

- [95] Jemielity J., Grudzien-Nogalska E., Kowalska J., Darzynkiewicz E., Rhoads R.E "Synthesis and use of anti-reverse phosphorothioate analogs of the messenger RNA cap " US Patent 8, 153, 773, przyznany 10.04. 2012.
- [96] Jemielity J., Grudzien-Nogalska E., Kowalska J., Darzynkiewicz E., Rhoads R.E. "Cząsteczka RNA oraz sposób otrzymywania peptydów lub białka". Patent nr P 214850 przyznany 26.02.2013 przez Urząd Patentowy RP
- [97] Jemielity J., Grudzien-Nogalska E., Kowalska J., Darzynkiewicz E., Rhoads R.E "Synthesis and use of anti-reverse phosphorothioate analog of the messenger RNA cap" Australian Patent 2008265683 (issued 12.12.2013)
- [98] Ugur Sahin, Andreas Kuhn, Edward Darzynkiewicz, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska "Vaccine composition comprising 5'-cap modified RNA" US Patent nr: 9295717 przyznany 29.03 2016