

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

SYNTEZA I BADANIA BIOLOGICZNE ANALOGÓW 5' KOŃCA mRNA ZAWIERAJĄCYCH  
MODYFIKOWANĄ W POZYCJI N2 I N7 GUANOZYNE

Promotor: Dr hab. Marzena Jankowska-Anyszka

Na przestrzeni ostatnich lat bardzo duże zainteresowanie naukowców budzi rola końca 5' mRNA w procesie inicjacji translacji organizmów eukariotycznych. Kluczowym jego etapem jest rozpoznanie oraz związanie kapu przez czynnik inicjujący 4E (eIF4E), co w rezultacie umożliwia włączenie mRNA do maszyny translacyjnej. Jest to etap szczególnie ważny, gdyż odpowiada za szybkość procesu biosyntezy białka, a zatem odgrywa niewrażliwą rolę w rozwoju komórki. Od lat podejmowane są liczne badania mające na celu poznanie molekularnego mechanizmu inicjacji translacji oraz wykorzystanie tej wiedzy w celach terapeutycznych. W tym kontekście nadzieję stwarzają syntetyczne analogi kapu o silnym powinowactwie do faktora 4E. Dotychczasowe eksperymenty z wykorzystaniem chemicznie modyfikowanych analogów doprowadziły do określenia zależności między jego budową a efektywnym wiązaniem przez białko eIF4E oraz zostały ukierunkowane na poszukiwanie takiego analogu końca 5' mRNA, który będzie miał szanse znaleźć zastosowanie w terapii. Grupą związków, które nie zostały do tej pory przebadane ze względu na trudności w ich otrzymywaniu, a w oparciu o dotychczasowe wyniki, zasługujące na uwagę, stanowią analogi kapu zmodyfikowane w obrębie egzocyklicznej grupy aminowej guaniny.

W ramach mojej pracy doktorskiej opracowałam wydajną metodę otrzymywania mononukleotydowych analogów 5' końca mRNA, posiadających w pozycji N2 podstawniki alifatyczne (o łańcuchach prostych i rozgałęzionych), jak i aromatyczne, w tym też analogi zawierające w swojej strukturze pierścień triazolowy. Przygotowane przez mnie pochodne wykorzystane zostały jako inhibitory zdolne do kompetycyjnego hamowania procesu inicjacji translacji w dwóch układach translacyjnych: lizacie z retikulocytów króliczych oraz

ekstrakcie z pasożytniczych *Ascaris suum*, który jest jedynym dostępnym bezkomórkowym układem odtwarzającym translację w organizmach nicieni. Przeprowadzone badania biologiczne pozwoliły określić wpływ właściwości elektronowych grupy w pozycji N2 na wiązanie białka eIF4E. Wstępne wyniki pokazały, że *para* podstawienie podstawnika benzylogo grupą zwiększającą gęstość elektronową pierścienia aromatycznego powodując wzrost wydajności inhibicji translacji związku. Najwydajniejszym inhibitorem translacji w ekstrakcie z pasożytniczych nicieni okazał się związek posiadający w pozycji N2 guanozyny podstawnik *p*-metoksybenzyłowy. Wykazywał on około siedmiokrotny wzrost inhibicji translacji w porównaniu do m<sup>7</sup>GTP. W przypadku badań w retikulocytach króliczych, przebadanych zostało pięć analogów, których częścią wspólną modyfikacji w pozycji N2 był pierścień triazolowy. W oparciu o uzyskane wyniki można stwierdzić, iż otrzymane analogi z modyfikacją w obrębie egzocyklicznej grupy aminowej są obiecującymi inhibitorami translacji, a obecność podstawnika w pozycji N2 rekompensuje brak dwóch grup fosforanowych w cząsteczce. Ponadto występowanie tylko jednej grupy fosforanowej w molekułe zwiększa jej zdolność do przenikania przez błony komórkowe, co umożliwia potencjalne zastosowanie badanych związków *in vivo*.

Poza analogami mononukleotydowymi w ramach pracy doktorskiej otrzymałam również dinukleotydową pochodną struktury kapu zawierającą modyfikację w obrębie zasady azotowej, umożliwiającą przyłączenie jej struktury do peptydu (MPS) penetrującego błonę komórkową. Synteza tego typu koniugatu została zaplanowana ze względu na fakt, że w większości przypadków analogi silnie hamujące translację *in vitro* posiadają ładunek elektrostatyczny, utrudniający im potencjalne zastosowanie *in vivo*, z racji na niezdolność do przenikania przez błonę do wnętrza komórki. W oparciu o dotychczasową wiedzę wydawało się możliwym zaprojektowanie takiego analogu, który nie tylko będzie wydajnym inhibitorem inicjacji translacji, ale także będzie posiadał dodatkowe modyfikacje umożliwiające jego transport przez błonę komórkową. Ze względu na fakt, że do wydajnego wiązania kapu przez białko eIF4E część jego struktury odpowiadającej za wiązanie z białkiem (pierwsza zasada oraz łańcuch fosforanowy) musi pozostać niezmienną, do syntezy koniugatu wykorzystałam połączenie poprzez wiązanie kowalencyjne odpowiednio zmodyfikowanego analogu kapu z zsyntetyzowanym w fazie stałej peptydem zawierającym modyfikację w łańcuchu bocznym lizyny. W ramach pracy doktorskiej zaprojektowałam oraz otrzymałam koniugat kap-MPS, będący pierwszym do tej pory uzyskanym połączeniem struktury 5' końca mRNA z peptydem penetrującym błonę komórkową. W tym celu zoptymalizowałam metodę syntezy w fazie stałej hydrofobowego oligopeptydu składającego się z szesnastu reszt aminokwasowych,

posiadającego grupę azydkową w łańcuchu bocznym lizyny oraz opracowałam procedurę jego wydajnego sprzęgania ze zmodyfikowanym dinukleotydom analogiem kapu z wykorzystaniem reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena.

Ostatnimi zsyntetyzowanymi w ramach pracy doktorskiej związkami były dinukleotydom pochodne struktury kapu zmodyfikowane w pozycji N2 oraz N7. Synteza tej klasy analogów została podjęta z myślą o wykorzystaniu ich w badaniach nad oddziaływaniem struktury kapu ze snurportyną – białkiem odpowiedzialnym za transport RNA zakończonych N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>,7-trimetyloguanozyno kapem do jądra, w celu wyselekcjonowania analogu wykazującego największą efektywność w transporcie dojądrowym. Spośród kilkunastu analogów, trzy pochodne dinukleotydom ( $m_3^{2,2,7}$ GpppG,  $m_2^{2,7}$ GpppG,  $et^2m_2^{2,7}$ GpppG) zastosowałam w oparciu o opracowane warunki pomiarowe do eksperymentów biofizycznych polegających na miareczkowaniu snurportyny analogami kapu z wykorzystaniem wygaszania fluorescencji. Wstępne wyniki potwierdziły istotny wymóg obecności dwóch grup metylowych w obrębie egzocyklicznej grupy aminowej dinukleotydom struktury kapu, w kontekście wydajnego wiązania z białkiem. W przypadku analogu  $m_2^{2,7}$ GpppG, który został wybrany jako kontrola ujemna eksperymentu, wstępnie zaobserwowano osłabienie jego oddziaływania ze snurportyną. Wynik ten jest prawdopodobnie następstwem utraty jednej grupy metylowej, której brak utrudnia strukturze kapu utworzenie charakterystycznej dla oddziaływania ze snurportyną formy „kanapkowej”.

Modyfikowane analogi kapu są jednymi z podstawowych narzędzi w badaniach nad molekularnymi mechanizmami rozpoznawania końca 5' mRNA przez specyficzne czynniki białkowe w procesach takich jak: inicjacja translacji, splicing, czy transport wewnątrzkomórkowy. Z tego powodu godnym podkreślenia jest, że wszystkie otrzymane analogi, zarówno mono- jak i dinukleotydom, mogą zostać wykorzystane nie tylko w opisanych w tej pracy eksperymentach, ale również w innych badaniach biologicznych oraz biofizycznych.