

Warszawa, 09.09.2020r.

mgr Paulina Pietrow

Pracownia Syntezy Organicznych Nanomateriałów i Biomolekuł

Wydział Chemii Uniwersytet Warszawski

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**„Synteza podwójnie funkcjonalizowanych dinukleotydowych analogów końca 5' mRNA  
(tzw. kapu)”**

“Synthesis of double-functionalized dinucleotide analogs of the 5' end of mRNA (cap)”

Promotor: dr hab. Marzena Jankowska-Anyszka, prof. UW

Informacyjny kwas rybonukleinowy organizmów eukariotycznych i niektórych wirusów posiada na swoim końcu 5' unikalną strukturę zwaną kapem. Powstaje ona na wczesnym etapie transkrypcji i uczestniczy w wielu ważnych procesach, takich jak splicing, poliadenylacja czy transport do cytoplazmy, gdzie pośredniczy we włączaniu mRNA w proces translacji. Kap przyczynia się również do ochrony przed degradacją enzymatyczną eukariotycznego mRNA.

Od lat projektuje i otrzymuje się analogi końca 5' mRNA, które mogą wpływać na różnorodne procesy molekularne, w których kap uczestniczy. Wśród wielu proponowanych modyfikacji, kilka odegrało istotną rolę w badaniach mechanizmów oraz znalazło zastosowanie praktyczne. Wskazać tu należy analogi typu ARCA, umożliwiające tylko poprawne wbudowanie kapu w transkrypt, co ma szczególny wpływ na poprawę efektywności translacji. Ważnymi okazały się również modyfikacje wprowadzane w mostek fosforanowy, umożliwiając otrzymanie analogów kapu o zwiększonej odporności na degradację enzymatyczną, ułatwiając tym samym ich potencjalne praktyczne zastosowanie. Otrzymano również N2-modyfikowane związki wykazujące zwiększoną inhibicję procesu translacji, co stanowi ważny aspekt w terapeutycznym zastosowaniu nukleotydów.

Analogi kapu modyfikuje się również tak, by stały się narzędziem molekularnym umożliwiającym zastosowanie nowych technik biochemicznych czy biofizycznych do badań mechanizmów procesów, w które koniec 5' mRNA jest zaangażowany. Co więcej, pożądana jest zmiana struktury kapu w sposób pozwalający na selektywne dołączenie cząsteczek wspomagających jego translokację przez błonę komórkową. Kap ze względu na obecność grup fosforanowych nie wykazuje zdolności do przenikania do wnętrza komórki, co pociąga za sobą ograniczone zastosowanie w badaniach *in vivo*. Najlepszym miejscem do wprowadzenia tego typu modyfikacji, niezakłócającym podstawowych funkcji pełnionych przez kap, jest drugi nukleotyd. Dotychczas zaproponowano różne modyfikacje umożliwiające tylko pojedynczą funkcjonalizację analogu końca 5' mRNA, między innymi znacznikami fluorescencyjnymi czy spinowymi, uzyskując sondy molekularne.

W odpowiedzi na zapotrzebowanie na nowego typu analogi końca 5' mRNA podjęłam się syntezy podwójnie funkcjonalizowanych, w obrębie drugiego nukleotydu, dinukleotydowych analogów kapu, co jest tematem i głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej. Podwójna modyfikacja struktury kapu umożliwi dołączenie dwóch różnych cząsteczek do analogu końca 5' mRNA. Zaplanowane zostało między innymi wyposażenie analogu w cząsteczkę peptydu, który

umożliwi transport analogu przez błonę komórkową oraz znacznika fluorescencyjnego, ułatwiającego śledzenie lokalizacji komórkowej związku.

Synteza zaplanowanych analogów końca 5' mRNA rozpoczęła się od uzyskania podwójnie modyfikowanych monofosforanów guanozyny, które następnie zostały przekształcone w dinukleotydy. Finalnym etapem było dołączenie do analogów kapu modelowych związków oraz takich, które pełnić będą określoną funkcję. Selektywna funkcjonalizacja została osiągnięta poprzez zastosowanie odmiennych metod sprzęgania. W tym celu wybrane grupy funkcyjne (grupa karboksylowa, ugrupowanie alkinowe oraz grupa tiolowa) wprowadzone zostały w trzy różne miejsca drugiego nukleozydu. Otrzymane analogi posiadały dwie z trzech wymienionych grup, co więcej, każda z nich miała przypisaną pozycję w guanozynie. Grupa karboksylowa pochodząca od kwasu lewulinowego wprowadzonego w pozycję 2',3'-cis diolu rybozy umożliwiła dołączenie pierwszorzędowej aminy poprzez wiązanie amidowe. Propargilamina, znajdująca się w pozycji N2 guanozyny, posiadająca ugrupowanie alkinowe pozwoliła zastosować reakcję cykloaddycji z związkiem zawierającym azydek. Natomiast grupa tiolowa zlokalizowana w purynie w pozycji C6 w wyniku utlenienia w obecności drugiego tiolu utworzyła wiązanie disiarczkowe. Wspomniane metody sprzęgania opierają się na kowalencyjnym wiązaniu cząsteczek, ale tylko jedna z nich wykazuje właściwości redoks - mostek disiarczkowy. Zastosowanie tego typu wiązania w funkcjonalizacji analogów kapu może okazać się niezwykle użyteczne, ponieważ po dostarczeniu analogów kapu do wnętrza komórki, gdzie panują warunki redukujące, może nastąpić kontrolowane cięcie wiązania disiarczkowego i uwolnienie połączonych cząsteczek w niezmiennych formach.

Otrzymane mono- i dinukleotydy poddałam funkcjonalizacji wyselekcjonowanymi cząsteczkami, którymi były: prosty, alifatyczny tiol (1-heksanotiol), znacznik fluorescencyjny (pochodna etylenodiaminowa dansylu) oraz peptydy N<sub>3</sub>-(Ala)<sub>3</sub> i N<sub>3</sub>-TAT. O ile dołączanie z wykorzystaniem reakcji tworzenia wiązania amidowego oraz reakcji cykloaddycji znane jest i stosowane w chemii nukleotydów, to niewiele wiadomo o syntezie wiązania disiarczkowego. Ważnym więc celem pracy było również opracowanie metody umożliwiającej otrzymanie takiego wiązania na poziomie nukleozydu, mononukleotydu oraz dinukleotydu, w tym analogu kapu, zawierających 6-tioguanozynę.

Po przeprowadzeniu wielu prób wykorzystujących różne metody syntezy asymetrycznych disulfidów udało mi się opracować metody funkcjonalizacji poprzez mostek disiarczkowy oraz izolacji i oczyszczania otrzymanych produktów zawierających 6-tioguanozynę. Nukleozyd udało się sfunkcjonalizować przy użyciu metod wykorzystujących utleniacze oraz sulfenylowe pochodne, a dołączanymi związkami były proste tiole alifatyczne oraz takie zawierające dodatkowe grupy funkcyjne, różnie podstawione tiole aromatyczne oraz znacznik fluorescencyjny. Natomiast 5'-monofosforan 6-tioguanozyny oraz jego dinukleotydowe pochodne, w tym analog kapu, sfunkcjonalizowano poprzez mostek disiarczkowy wykorzystując metodę wymiany między disulfidem a tiolem. Umożliwiło to dołączenie do monofosforanu związków takich jak proste tiole alifatyczne i takie posiadające dodatkowe grupy funkcyjne a także tiol aromatyczny. Natomiast w przypadku dinukleotydów oprócz prostych tioli alifatyczne oraz takich posiadających dodatkowe grupy funkcyjne dołączono znaczniki fluorescencyjne.

Osiągnięcie to umożliwiło kontynuowanie badań i dążenie do osiągnięcia głównego celu pracy, czyli otrzymanie podwójnie funkcjonalizowanych dinukleotydowych analogów kapu. Zsyntezowane i wyizolowane trzy podwójnie modyfikowane dinukleotydowe analogi końca 5' mRNA:

5',5'-trifosforan P1-7-metyloguanozyno-P3-N2-propargilo-{2',3'-O-[1-(2-karboksyetylo)etylideno]} guanozyny, 5',5'-trifosforan P1-7-metyloguanozyno-P3-2',3'-O-(1-(2-karboksyetylo) etylideno)-6-tioguanozyny, 5',5'-trifosforan P1-7-metyloguanozyno-P3-N2-

propargilo-6-tioguanozyny można było funkcjonalizować w wyniku dwóch strategii, co wynika z obecności dwóch wprowadzonych modyfikacji. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że do analogu kapu należy najpierw dołączyć wybrany związek poprzez wiązanie amidowe, a następnie należy przeprowadzić syntezę pierścienia triazolowego albo wiązania disiarczowego.

W ten sposób otrzymałam i wyizolowałam trzy podwójnie funkcjonalizowane dinukleotydowe analogi końca 5' mRNA. Do 5',5'-trifosforanu P1-7-metyloguanozyno-P3-N2-propargilo-{2',3'-O-[1-(2-karboksyetylo)etylideno]}guanozyny dołączyłam znacznik fluorescencyjny (dansyl etylenodiaminy) za pomocą wiązania amidowego do znajdującego się na rybozie kwas lewulinowego oraz peptydy: modelowy peptyd ( $N_3$ -Ala-Ala-Ala-NH<sub>2</sub>) oraz peptyd penetrujący błonę komórkową ( $N_3$ -Tat), umiejscowione w obrębie egzocyklicznej grupy aminowej, dołączone w wyniku reakcji dipolarnej cykloaddycji Huisgena. Do 5',5'-trifosforanu P1-7-metyloguanozyno-P3-2',3'-O-(1-(2-karboksyetylo)etylideno)-6-tioguanozyny dołączyłam znacznik fluorescencyjny (dansyl etylenodiaminy) za pomocą wiązania amidowego przez znajdujący się na rybozie kwas lewulinowy oraz modelowy tiol (1-heksanotiol) do grupy tiolowej znajdującej się w pozycji C6 guaniny poprzez mostek disiarczowy.

Ważnym osiągnięciem niniejszej rozprawy doktorskiej było sprawdzenie użyteczności tego typu modyfikacji w badaniach biologicznych. Otrzymany podwójnie funkcjonalizowany analog kapu, posiadający peptyd penetrujący błonę komórkową oraz znacznik fluorescencyjny, został przebadany pod kątem zdolności translokacji przez błonę komórkową. Eksperymenty pokazały, że funkcjonalizowany analog jest zdolny do wnikięcia do wnętrza komórek raka piersi MCF-7 po 24 h inkubacji. Co więcej, analog ten wpływa tylko na kap zależną translację w systemie *in vitro* w lizacie z retikulocytów króliczych oraz *in vivo* w komórkach MCF-7, co zostało szerzej omówione w opublikowanej w *Bioconjugate Chemistry* pracy z tego roku.