

Sylwia Ciechanowicz

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Analogi kapu zawierające ugrupowanie triazolowe w łańcuchu fosforanowym – synteza, wbudowywanie do RNA oraz badania wpływu modyfikacji na funkcje końca 5' mRNA

Struktura 5' końca mRNA, tzw. kap, bierze udział w najważniejszych procesach związanych z metabolizmem RNA głównie poprzez oddziaływanie z białkami lub ochronę mRNA przed przedwczesną degradacją. Ze względu na swoją ważną rolę biologiczną stał się obiektem chemicznych modyfikacji mających na celu uzyskanie użytecznych narzędzi do selektywnego modulowania procesów zależnych od kapu. Szczególnie pożądanym efektem takich modyfikacji jest zwiększenie powinowactwa do czynnika inicjacji translacji, eIF4E, którego oddziaływanie ze strukturą końca 5' mRNA ma kluczowe znaczenie dla rozpoczęcia procesu biosyntezy białka. Dla wolnych dinukleotydowych analogów kapu zwiększone powinowactwo do eIF4E oznacza możliwość zastosowania jako inhibitorów translacji w terapii przeciwnowotworowej. Z kolei po inkorporacji na 5' końcu mRNA związki tego typu, silnie oddziałujące z białkiem eIF4E, mogą korzystnie wpływać na wydajność translacji terapeutycznego transkryptu, który można wykorzystać m.in. jako szczepionkę RNA w nowatorskiej strategii zwalczania nowotworów. Zarówno w tych, jak i w innych potencjalnych zastosowaniach znaczącym ograniczeniem są tradycyjne czasochłonne i wymagające dużego nakładu pracy metody syntezy analogów kapu.

Celem projektu doktoranckiego było sprawdzenie, czy jedna z najpopularniejszych obecnie strategii syntetycznych, jaką jest chemia „click”, może stanowić alternatywną metodę syntezy funkcjonalnych mimików struktury końca 5' mRNA. Wykorzystując najważniejszą reakcję „click”, czyli katalizowaną jonami miedzi(I) azydowo-alkinową cykloaddykcję, oraz odpowiednio sfunkcjonalizowane wcześniej analogi nukleotydów i nukleozydów, otrzymano zupełnie nową klasę analogów kapu, które zawierają pierścień triazolowy w obrębie mostka oligofosforanowego. Następnie związki te poddano badaniom biologicznym w celu sprawdzenia, jaki wpływ na właściwości charakterystyczne dla struktury kapu ma nowy typ modyfikacji oraz czy otrzymane w taki nietypowy sposób analogi kapu mają szanse na

zastosowania podobne do znanych już modyfikowanych analogów kapu, a w szczególności w projektowaniu terapeutycznych mRNA o zwiększonym potencjale translacyjnym.

Część literaturową niniejszej pracy rozpoczęto od scharakteryzowania struktury końca 5' mRNA, przedstawiając jej biosyntezę, najważniejsze właściwości oraz funkcje biologiczne, a następnie zaprezentowano ją jako obiekt modyfikacji chemicznych, opisując przykłady terapeutycznych zastosowań modyfikowanych analogów kapu oraz metody ich syntezy chemicznej. W części tej zawarty jest również rozdział dotyczący chemii „click”, jej zastosowań w modyfikacji nukleozydów, nukleotydów i kwasów nukleinowych ze szczególnym uwzględnieniem modyfikacji w obrębie struktury końca 5' mRNA.

W części poświęconej badaniom własnym opisano metody syntetyczne zastosowane na poszczególnych etapach otrzymywania biblioteki ponad 40 fosfortriazolowych analogów kapu. Następnie zaprezentowano wyniki dotyczące wpływu nowego typu modyfikacji na oddziaływanie z białkami wiążącymi kap, w tym z czynnikiem inicjacji translacji eIF4E, oraz stabilność chemiczną zależną od pH. W dalszej kolejności przedstawiono dwie metody inkorporacji nowych analogów kapu na 5' końcu RNA, z których jedna stanowi nowatorską metodę post-transkrypcyjną wykorzystującą chemię „click”, oraz wyniki translacji mRNA zawierających na 5' końcu analogi fosfortriazolowe. W kolejnych podrozdziałach opisano syntezę i charakterystykę biologiczną analogów kapu zaprojektowanych na podstawie wniosków wyciągniętych z przedstawionych wcześniej badań nad zależnością między typem modyfikacji a właściwościami analogów. Zidentyfikowano przy tym analogi o najbardziej atrakcyjnych z punktu widzenia potencjalnych zastosowań właściwościach, a także zaproponowano kierunek dalszej optymalizacji tego typu związków.

W części eksperymentalnej zawarte są szczegółowe opisy syntez wraz z opisami widm NMR oraz eksperymentów biologicznych.

Sylwia Ciechanowicz

ABSTRACT OF DISSERTATION

Cap analogues containing a triazole moiety within the phosphate chain - synthesis, incorporation into RNA and studies on the influence of the modification on the functions of 5' mRNA end

The structure of 5' mRNA end, so called cap, participates in most important processes of RNA metabolism, mainly by interacting with proteins and protecting mRNA from premature degradation. Because of its crucial biological role it became the object of chemical modifications aimed at obtaining useful tools for selective modulation of cap-dependent processes. Particularly desired effect of such modifications is the enhancement of affinity to translation initiation factor, eIF4E, as its interaction with the structure of 5' mRNA end is the prerequisite of the initiation of protein biosynthesis. For free dinucleotide cap analogues enhanced affinity to eIF4E means the possibility of their application as translation inhibitors in anticancer therapy. On the other hand, after incorporation at the 5' end of mRNA such compounds, strongly interacting with eIF4E protein, may have a beneficial influence on the efficiency of translation of therapeutic transcripts which may be applied i.a. as RNA vaccines in innovative strategies of cancer treatment. In both these and other potential applications of cap analogues traditional time-consuming and labour-intensive methods of their synthesis are a significant limitation.

The aim of PhD project was to verify if one of currently most popular synthetic strategies, which is "click chemistry", may serve as an alternative method of the synthesis of functional mimics of the cap structure. Applying the most important "click" reaction, Cu(I)-catalysed azide-alkyne cycloaddition, and properly functionalised nucleotide and nucleoside analogues, a new class of cap analogues containing triazole moiety within oligophosphate bridge was obtained. Then, the compounds were subjected to biological studies to see what influence the new type of modification has on properties characteristic for cap structure and to verify if cap analogues obtained in such different way have any chances for applications similar to the ones of already known modified cap analogues, particularly in the design of therapeutic mRNA with enhanced translational potential.

The literature part of this dissertation begins with the characterisation of the structure of 5' mRNA end by depicting its biosynthesis, most significant properties and biological functions and then presenting it as an object of chemical modifications, giving the examples of therapeutic applications of modified analogues and describing methods of their chemical synthesis. Also, this part includes a chapter about "click chemistry", its applications in modification of nucleosides, nucleotides and nucleic acids, paying much attention to modifications within the structure of 5' mRNA end.

In the part concerning self-performed studies synthetic methods applied at different steps of the preparation of the library of more than 40 phosphotriazole cap analogues are described. Then, the results of the studies on the influence of the new modification on interactions with cap-binding proteins, including translation initiation factor eIF4E, and on the pH-dependent stability are presented. Next, two methods of incorporation of cap analogues at 5' end of mRNA, one of which being an innovative post-transcriptional method applying "click chemistry", as well as the results of translation of mRNA capped with phosphotriazole analogues are depicted. The following chapters contain the presentation of synthesis and biological characterisation of cap analogues designed based on conclusions derived from previously presented studies on the relationship between the type of modification and the properties of modified analogues. A few analogues with most attractive properties in terms of potential applications are identified and the direction of later optimisation of such type of compounds is proposed.

The experimental part of the dissertation contains detailed descriptions of synthetic procedures along with interpretation of NMR spectra and descriptions of biological experiments.