

Mgr Mateusz Kozarski

„Modyfikowane nukleotydy jako narzędzia do badania białek zaangażowanych w metabolizm końca 5' mRNA”

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Informacyjne (lub matrycowe) RNA (mRNA; *ang. messenger RNA*), jest cząsteczką odpowiedzialną za przenoszenie informacji genetycznej z jądra komórkowego do cytoplazmy, co umożliwia biosyntezę białek. Informacją zakodowaną w mRNA jest sekwencja aminokwasów budujących funkcjonalne białko, które jest biosynteżowane w procesie translacji. Na końcu 5' eukariotycznego mRNA znajduje się struktura zwana czapeczką (kapem). Jest to zazwyczaj dodatnio naładowana 7-metyloguanozyna (m^7G) połączona z pierwszym transkrybowanym nukleotydem mostkiem 5',5'-trifosforanowym ($m^7GpppN^1pN^2$). Kap bierze udział w wielu ważnych procesach biologicznych zachodzących w komórkach eukariotycznych, takich jak dojrzewanie czy transport mRNA. Element ten chroni również mRNA przed przedwczesną degradacją przez 5'-egzonukelazy, reguluje proces translacji mRNA, a także odgrywa kluczową rolę w rozpoznawaniu komórkowego i obcego mRNA przez układ immunologiczny. Z powodu tak istotnych funkcji, struktura kapu oraz jego pochodne stały się bardzo interesującym obiektem chemicznych modyfikacji. Chemiczne modyfikowane analogi kapu i jego pochodne są obecnie wykorzystywane do monitorowania procesów komórkowych związanych z mRNA, jako narzędzia molekularne do badania białek rozpoznających strukturę kapu, jako reagenty do produkcji szczepionek mRNA, a także mają wiele innych potencjalnych zastosowań terapeutycznych, m.in. w terapiach przeciwnowotworowych.

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej była synteza nowych, chemicznie modyfikowanych analogów nukleotydów, w tym analogów kapu, które mogłyby umożliwić badania wybranych procesów związanych z metabolizmem końca 5' mRNA. Swoją uwagę skupiłem na analogach kapu i jego pochodnych, które można wykorzystać do badania procesu translacji mRNA oraz degradacji metabolitów jego końca 5'.

W pierwszej części niniejszej rozprawy wykorzystałem analogi 5'-monofosforanu 7-metyloguanozyny (m^7GMP) do badania roli ludzkiej cytozolowej 5'-nukleotydazy IIIB (cN-IIIB). Cytozolowa 5'-nukleotydaza IIIB (cN-IIIB), jest stosunkowo niedawno odkrytym enzymem należącym do rodziny 5'-nukleotydz. Rolą 5'-nukleotydz jest kontrolowanie stężeń 5'-monofosforanów nukleozydów (NMP) w komórkach poprzez katalizowanie ich defosforylacji. Enzym cN-IIIB jest unikalną 5'-nukleotydzą z punktu widzenia specyficzności substratowej, ponieważ katalizuje on reakcję defosforylacji 5'-monofosforanu 7-metyloguanozyny, który jest

Mgr Mateusz Kozarski

„Modyfikowane nukleotydy jako narzędzia do badania białek zaangażowanych w metabolizm końca 5' mRNA”

jednym z metabolitów końca 5' mRNA. Do tej pory, rola enzymu cN-IIIB nie została w pełni poznana, jednak jego specyficzność substratowa sugeruje, że może on odgrywać kluczową rolę w jednym z końcowych etapów degradacji końca 5' mRNA. Nie wykluczony jest także udział enzymu cN-IIIB w dezaktywacji aktywnych form terapeutyków pochodzenia nukleozydowego. W części rozprawy dotyczącej enzymu cN-IIIB, skupiłem się na poszukiwaniu inhibitorów enzymu cN-IIIB, które mogą pełnić rolę narzędzi molekularnych i być wykorzystane w badaniach nakierowanych na pogłębienie wiedzy o tym enzymie. Projekt ten obejmował zarówno syntezę modyfikowanych nukleotydów, a także zbadanie ich właściwości substratowych i inhibitorowych względem enzymu cN-IIIB. Na podstawie przeprowadzonych przeze mnie badań, spośród kilkudziesięciu związków wytypowałem dwie pochodne m⁷GMP jako najsilniejsze inhibitory enzymu cN-IIIB. Wyselekcjonowane związki zostały zastosowane jako narzędzia w badaniach w lizatach komórkowych, co miało na celu weryfikację roli enzymu cN-IIIB w degradacji metabolitów struktury kapu. Najsilniejsze inhibitory enzymu cN-IIIB zostały również wykorzystane do badań strukturalnych, dzięki którym otrzymano pierwszą strukturę krystalograficzną ludzkiego enzymu cN-IIIB wraz z ligandem. Wyselekcjonowane inhibitory enzymu cN-IIIB przekształciłem również w pronukleotydy, które mogą przenikać przez błonę komórkową do wnętrza komórki, i mogą być wykorzystane w badaniach *in vivo*. Na koniec, zbadałem właściwości inhibitorowe nowej klasy związków posiadających modyfikację umożliwiającą, w odpowiednich warunkach, samoistne wytworzenie wiązania kowalencyjnego z białkiem. Związki te zbadałem pod kątem ich właściwości inhibitorowych względem enzymu cN-IIIB. Z puli przebadanych związków udało mi się zidentyfikować związek będący kowalencyjnym, nanomolarnym inhibitorem enzymu cN-IIIB.

Druga część niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczyła badania procesu kap-zależnej translacji (*ang. cap-dependent translation*) mRNA, w który to zaangażowane jest białko eIF4E. Trinukleotydowe analogi kapu są wykorzystywane w reakcji transkrypcji *in vitro* do otrzymywania funkcjonalnego mRNA, w tym mRNA stosowanego w terapiach przeciwnowotworowych i przeciwwirusowych. Niestety, synteza trinukleotydowych analogów kapu jest trudna i czasochłonna. Z tego powodu w moim projekcie doktorskim, opisanym w drugiej części niniejszej rozprawy, zajmowałem się opracowaniem nowej ścieżki syntezy trinukleotydowych analogów kapu. Zaprojektowana przeze mnie ścieżka syntetyczna wykorzystywała chemię typu „click”, która miała na celu przyspieszenie i uproszczenie syntezy tri- i tetranukleotydowych analogów kapu, a dodatkowo wprowadzała w obrębie struktury kapu

Mgr Mateusz Kozarski

„Modyfikowane nukleotydy jako narzędzia do badania białek zaangażowanych w metabolizm końca 5' mRNA”

modyfikacje mające na celu potencjalne ulepszenie właściwości translacyjnych mRNA. Opracowana przeze mnie ścieżka syntetyczna skróciła czas ostatniego etapu syntezy trinukleotydowych analogów kapu do 1 h, podczas gdy synteza w standardowych warunkach może trwać nawet 48 h. Za pomocą opracowanej przeze mnie ścieżki syntetycznej, otrzymałem kilkanaście nowych analogów kapu, które posłużyły mi do badań kap-zależnej translacji mRNA. Otrzymane związki miały wydajnie wbudowywać się ko-transkrypcyjnie do nici mRNA oraz inicjować translację takiego mRNA wydajniej niż mRNA zakończone naturalnie występującym kapem. W wyniku reakcji transkrypcji *in vitro* otrzymałem mRNA zakończone różnymi analogami kapu, które następnie wykorzystałem do badania translacji w lizatach komórkowych. Tak przygotowane mRNA zostało również wykorzystane do zbadania wydajności procesu produkcji białka w komórkach dendrytycznych. Jeden z otrzymanych analogów kapu, okazał się być dobrym mimetykiem naturalnego kapu, gdyż wydajność translacji mRNA zakończonego modyfikowanym trinukleotydem była porównywalna z mRNA zakończona niemodyfikowanym kapem 1.

Niniejszej rozprawa doktorska miał charakter interdyscyplinarny, w ramach której zajmowałem się zarówno syntezą chemiczną pochodnych końca 5' mRNA jak i ich charakterystyką za pomocą testów biofizyczno-biochemicznych i biologicznych. Przeprowadzone przeze mnie badania przyczyniły się do uzyskania pierwszej struktury krystalograficznej ludzkiego enzymu cN-IIIB, dzięki której poznany został mechanizm działania tego enzymu. Z kolei zaprojektowany i zsyntezowany przeze mnie trinukleotydowy analog kapu, może być wykorzystany do syntezy mRNA o bardzo dobrych właściwościach translacyjnych, co potencjalnie może mieć zastosowanie w terapeutycznym mRNA.

Lista publikacji

1. *7-Methylguanosine monophosphate analogues with 5' -(1,2,3-triazoyl) moiety: Synthesis and evaluation as the inhibitors of cNIIIB nucleotidase*; Mateusz Kozarski§, Dorota Kubacka§, Błażej Wojtczak, Renata Kasprzyk, Marek Baranowski, Joanna Kowalska, *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2018**, 26(1), 191-199.
2. *Substrate-Based Design of Cytosolic Nucleotidase IIIB Inhibitors and Structural Insights into Inhibition Mechanism*; Dorota Kubacka§, Mateusz Kozarski§, Marek R. Baranowski, Radosław Wójcik, Joanna Panecka-Hofman, Dominika Strzelecka, Jerome Basquin, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska; *Pharmaceuticals* **2022**, 15(5), 554

Mgr Mateusz Kozarski

„Modyfikowane nukleotydy jako narzędzia do badania białek zaangażowanych w metabolizm końca 5' mRNA”

3. Towards superior mRNA caps accessible by click chemistry: synthesis and translational properties of triazole-bearing oligonucleotide cap analogs; Mateusz Kozarski, Karolina Drazkowska, Marcelina Bednarczyk, Marcin Warminski, Jacek Jemielity and Joanna Kowalska; *RSC Advances* **2023**, 13, 12809-1282
4. M. Chrominski, M. Kozarski i wsp. Proximity-induced SuFEx increases the potency of substrate-derived inhibitors of cytosolic nucleotidase IIIB - w przygotowaniu

§Równorzędni współautorzy