

UNIwersytet Warszawski
Wydział Fizyki
Zakład Biofizyki, IFD

Małgorzata Waszczuk

**Syntetyczne analogi trimetyloguanozyno kapu
modyfikowane w mostku trifosforanowym jako
narzędzia do badania snurportyny i optymalizacji
sygnału transportu dojądrowego dla czynników
terapeutycznych**

promotor: dr hab. Jacek Jemielity, prof. UW
promotor pomocniczy: dr hab. Anna Niedźwiecka

Streszczenie Rozprawy Doktorskiej

Trimetyloguanozyno (TMG) kap występuje na 5' końcu małych jądro-
wych RNA (sn RNA) u organizmów wyższych. Jego główną funkcją jest
transport małych jądrowych rybonukleoprotein (snRNP) do jądra komór-
kowego poprzez oddziaływanie z białkiem adaptorowym – snurportyną1.
Struktura TMG kapu zbudowana jest z N^2, N^2, N^7 -trimetyloguanozyny po-
łączonej mostkiem 5',5'-trifosforanowym z pierwszym nukleozydem łańcucha
RNA.

Głównym celem badań zawartych w niniejszej rozprawie doktorskiej,
było opracowanie metod syntezy chemicznej analogów kapu, posiadających
różne modyfikacje w obrębie mostka 5',5'- trifosforanowego oraz zbadanie
jak dana modyfikacja wpływa na ich właściwości biologiczne – oddziaływa-
nie ze snurportyną oraz odporność na degradację enzymatyczną. Ważne jest
także, by wprowadzona modyfikacja nie zaburzała funkcjonowania kapu.
Analogi o zwiększonym bądź porównywalnym powinowactwie do snurpor-
tyny, odporne na degradację enzymatyczną (o przedłużonym czasie życia *in*
vivo, w systemach biologicznych) stanowią potencjalne narzędzie do wpro-
dzania terapeutyków do jądra komórkowego. Ponadto zarówno analogi mo-
dyfikowane w mostku fosforanowym, jak i znakowane fluorescencyjnie, można
także wykorzystać do badań nad mechanizmem procesów, w które zaangażo-
wany jest TMG kap: transport dojądrowy makromolekuł, biosynteza TMG

kapu, powstawanie agregatów snRNA w chorobie Alzheimera. Niniejsza rozprawa podzielona została na trzy główne części: Wstęp Literaturowy, Badania Własne i Dyskusję Wyników oraz Część Eksperymentalną.

We Wstępie Literaturowym czytelnik zostaje szczegółowo wprowadzony w rolę jaką odgrywa struktura TMG kapu w organizmach żywych: gdzie występuje, w jaki sposób powstaje, z jakimi białkami oddziałuje oraz na jakiej drodze zostaje zdegradowana. Omówione w tej części zostały także właściwości fizykochemiczne struktury TMG kapu. Przedstawiono również liczne przykłady syntez zarówno TMG kapu, jak i przykładowe sposoby wprowadzania modyfikacji mostka fosforanowego do struktury dinukleotydów. Końcowe rozdziały wprowadzają czytelnika w zagadnienia związane z absorpcją oraz fluorescencją struktury TMG kapu oraz białek, co jest bardzo przydatne do zrozumienia metod oraz wyników badań opisanych w dalszych rozdziałach.

W części Badania Własne i Dyskusja Wyników w pierwszej kolejności przedstawiono cele pracy, następnie przedstawiona została synteza chemiczna analogów TMG kapu modyfikowanych w mostku 5',5'-trifosforanowym, oraz znakowanych fluorescencyjnie. Przedstawiona została także charakterystyka właściwości spektroskopowych zsyntezowanych analogów. Następnie opisane zostały wyniki badań biofizycznych mających na celu wyznaczenie powinowactwa analogów TMG kapu do snurportyny. W tej części zostały także opisane wyniki badań biologicznych nad stabilnością zsyntezowanych analogów TMG kapu w warunkach *in vitro*, które nie były wykonane przez autorkę. Wyniki te ukazują jednak zasadność założeń niniejszej pracy oraz podjętych syntez chemicznych. I jednocześnie ukazują potencjał zsyntezowanych związków.

W trzeciej części – Części Eksperymentalnej- przedstawiony został szczegółowy opis wykonywanych eksperymentów. Począwszy od syntez chemicznych oraz charakterystyki otrzymanych związków (MS i NMR), poprzez opis metody biofizycznych, termodynamicznych, a skończywszy na wyprowadzeniach wzorów, które niezbędne były w otrzymaniu niektórych wyników (wymienić jakich). Syntezy chemiczne oraz wyniki badań biofizycznych i biologicznych zostały opisane w czterech publikacjach naukowych, z czego dwóch z listy filadelfijskiej, a dwóch konferencyjnych. Piąta publikacja jest w trakcie przygotowywania. Spis publikacji przedstawiono poniżej.

Publikacje naukowe w czasopismach z listy filadelfijskiej:

1) Zytek M., Kowalska J., Lukaszewicz M., Wojtczak B. A., Zuberek A., Ferenc-Mrozek A., Darzynkiewicz E., Niedzwiecka A., Jemielity J., Towards novel efficient and stable nuclear import signals: synthesis and properties

of trimethylguanosine cap analogs modified within the 5',5'-triphosphate bridge, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, 12, 9184-9199.

2) Honcharenko M., Zytek M., Bestas B., Moreno P., Jemielity J., Darzynkiewicz E., Smith E. C. I., Stromberg R., Synthesis and evaluation of stability of m3 G-CAP analogues in serum-supplemented medium and cytosolic extract, *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 2013, 21, 7921-7928.

Publikacje konferencyjne:

1) Zytek M., Kowalska J., Darzynkiewicz E., Jemielity J., The First Examples of Phosphate Modified Trimethylguanosine Cap Analogues, *Coll. Symp Ser*, 2011, 12, 503-504.

2) Zytek M., Kowalska J., Lukaszewicz M., Darzynkiewicz E., Niedzwiecka A., Jemielity J., Evaluation of biological activity of trimethylguanosine cap analogs modified within the 5',5'-triphosphate bridge, *Coll. Symp Ser*, 2014, 14, 416-417.