

STRESZCZENIE ROPRAWY DOKTORSKIEJ

Projektowanie i synteza narzędzi molekularnych do badań struktury i funkcji końca 5' mRNA (kapu) oraz badanie ich kompleksów z białkami metodą krystalografii rentgenowskiej

Na końcu 5' informacyjnego RNA (mRNA) wszystkich eukariontów (a więc i u ludzi) znajduje się wyjątkowa struktura zwana kapem (ang. 5' cap), pełniąca wiele kluczowych funkcji w procesach biochemicznych związanych z ekspresją informacji genetycznej. Niektóre z białek wiążących kap zostały zidentyfikowane jako potencjalne cele terapeutyczne (eIF4E: terapie przeciwnowotworowe; DcpS: rdzeniowy zanik mięśni), jednak praktyczne wykorzystanie analogów struktury kapu w terapii wymaga jej chemicznej modyfikacji w celu poprawy właściwości farmakologicznych, opracowania metod dostarczania do wnętrza komórek oraz oznaczania i śledzenia kapu w komórce. Z tego względu konieczne jest lepsze poznanie wpływu chemicznych modyfikacji struktury kapu na jej właściwości biologiczne.

Ogólnym celem projektu będącego podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej było stworzenie narzędzi molekularnych do badania procesów biologicznych, w które zaangażowany jest koniec 5' mRNA oraz ich wykorzystanie do badań strukturalnych nad odpowiednimi procesami komórkowymi. Projekt ten składał się z dwóch głównych i równorzędnych części, obejmujących syntezę chemiczną analogów kapu oraz badania strukturalne ich kompleksów z białkami metodą krystalografii rentgenowskiej. Pierwsza z nich miała na celu otrzymanie szeregu di- oraz oligonukleotydowych analogów końca 5' mRNA, zawierających różnego rodzaju modyfikacje chemiczne, zapewniające zwiększoną wydajność translacji zakończonych tak mRNA, odporność na hydrolizę przez specyficzne enzymy, bądź umożliwiające znakowanie i koniugację kapu. Celem badań strukturalnych natomiast była charakteryzacja na poziomie molekularnym oddziaływań z najważniejszymi białkami wiążącymi kap, tj. eIF4E, DcpS i Dcp2, możliwie szerokiego spektrum modyfikowanych analogów kapu, ze szczególnym uwzględnieniem modyfikacji zlokalizowanych w obrębie mostka oligo-fosforanowego. Punktem wyjścia była krystalizacja opisanych wcześniej analogów kapu, o znanych właściwościach biologicznych (w szczególności analogów β -tiofosforanowych o dużym potencjale terapeutycznym), w kompleksach z czynnikiem inicjującym translację 4E. Uzyskane dzięki temu informacje na temat geometrii oraz rozkładu ładunku w obrębie poszczególnych modyfikacji były motywacją do syntezy nowych analogów kapu i/lub krystalizacji kolejnych kompleksów.

Projekt ten w założeniu łączy dwie dziedziny nauki, jakimi są synteza chemiczna oraz biologia strukturalna, odnosząc je do konkretnego obiektu, jakim jest struktura kapu i białka ją wiążące. Na niemal każdym etapie realizacji projektu aspekty te silnie się przenikały – badania strukturalne dostarczały informacji pomocnych przy projektowaniu nowych związków, ale niekiedy również stawiały nowe pytania, podczas gdy synteza chemiczna dostarczała narzędzi umożliwiających bardziej szczegółowe badanie danego zagadnienia lub weryfikację wniosków z analizy strukturalnej.

Pierwszą część rozprawy stanowi krótki wstęp wprowadzający w tematykę struktury i funkcji końca 5' mRNA, zastosowań chemicznie modyfikowanych nukleotydów oraz badań strukturalnych nad kompleksami białek z nukleotydami. W kolejnym rozdziale omówiono metody badawcze wykorzystywane podczas realizacji projektu, takie jak synteza chemicznie modyfikowanych analogów kapu, synteza oligonukleotydów na podłożu stałym, a także wybrane aspekty zastosowanych metod

biofizycznych – krystalografii rentgenowskiej, spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego oraz termoforezy mikroskalowej. W części poświęconej badaniom własnym szczegółowo opisano strategię syntezy nowych związków, wyniki badań nad ich właściwościami biochemicznymi i biologicznymi, struktury przestrzenne kompleksów chemicznie modyfikowanych analogów kapu z białkami, a także informacje strukturalne uzyskane na podstawie spektroskopii NMR wodnych roztworów analogów kapu. Po zwięzłym podsumowaniu najważniejszych efektów pracy, opisano procedury doświadczalne wraz z charakterystyką nowych związków chemicznych oraz zamieszczono spis cytowanej w rozprawie literatury.

ABSTRACT OF DISSERTATION

Design and synthesis of molecular tools for structural and functional investigation of mRNA 5' end (cap) and studies on their complexes with proteins by X-Ray crystallography

The 5' end of messenger RNA (mRNA) in eukaryotes (including humans) is modified by a unique structure called 5' cap, which plays a crucial role in several biochemical processes associated with expression of genetic information. Some of the cap-binding proteins involved in those processes were identified as potential therapeutic targets (e.g. eIF4E in cancer treatment, DcpS in spinal muscular atrophy). However, practical application of cap analogues in therapy requires chemical modification of that structure to improve its pharmacokinetics, cellular delivery of the therapeutic molecules, as well as to allow for their localization and quantification in cells. For that purpose, it is beneficial to investigate the structure-activity relationship of cap upon its chemical modification.

The main objective of this project was to create molecular tools suitable for investigation of biological processes involving mRNA 5' end and their application in structural studies on appropriate cellular processes. The project consists of two main and equivalent parts: chemical synthesis of cap analogues and X-Ray studies of their complexes with cap-binding proteins. The first part included synthesis of a series of di- and oligonucleotide analogues of mRNA 5' end, bearing various chemical modifications providing increased translation efficiency of such capped mRNAs, resistance to hydrolysis by specific enzymes, or allowing for labeling and conjugation. The aim of the structural studies was to characterize molecular interactions between chemically modified (especially within oligophosphate bridge) caps and major cap-binding proteins, i.e. eIF4E, DcpS and Dcp2. The starting point was crystallization of eukaryotic translation initiation factor (eIF4E) in complexes with analogues synthesized and characterized earlier (including β -phosphorothioate analogues tested in clinical trials). The results of that studies provided useful information on the geometry and charge distribution in different analogues and so gave motivation to synthesis of new analogues and/or co-crystallization of other complexes.

In principle, this project combines two fields of science – chemical synthesis and structural biology – and applies them to a specific objects, which are cap structure and cap-binding proteins. Those two aspects intersected at almost every stage of the project: structural studies provided information useful for the design of new compounds and sometimes also raised new questions, while chemical synthesis provided molecular tools that enabled more detailed studies of a particular problem or allowed verification of conclusions drawn from structural analysis.

The first part of the dissertation is a short introduction to structure and function of mRNA 5' end, application of chemically modified nucleotides and structural studies on protein-nucleotide complexes. The next chapter describes the methods that were particularly useful in the project, including chemical synthesis of modified cap analogues, solid-phase oligonucleotide synthesis, as well as some biophysical methods, such as X-Ray crystallography, nuclear magnetic resonance spectroscopy, and microscale thermophoresis. Then, the results obtained during realization of this project were described in details: the synthetic strategy to new compounds, their biological and biochemical properties, crystal structures of chemically modified caps in complexes with proteins, and supplementary information on the geometry of free ligands obtained by solution NMR. After brief summary of the results, a detailed experimental protocols and compound characterization were described, and the literature cited in dissertation was listed.