

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Nowe analogi kofaktorów adeninowych jako narzędzia do badania procesów biologicznych – synteza, badanie właściwości i zastosowania

Nukleotydy adeninowe to cząsteczki występujące w organizmach żywych i pełniące wiele kluczowych funkcji w komórkach. Są m.in. budulcem kwasów nukleinowych (DNA i RNA), regulują procesy metaboliczne zachodzące w komórkach, są nośnikami energii (ATP), biorą udział w sygnalizacji wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej, jako kofaktory stanowiące nośniki elektronów biorą czynny udział w reakcji utleniania – redukcji czy też, również w formie kofaktorów, umożliwiają przebieg wielu innych reakcji enzymatycznych polegających na transferze biologicznie ważnych grup funkcyjnych. Ze względu na mnogość funkcji, nukleotydy adeninowe stały się obiektem badań naukowych, które pozwoliły systematycznie odkrywać i zrozumieć procesy przebiegające w komórkach. W tym celu nieustannie tworzone są odpowiednie narzędzia biologiczne, będące pod względem strukturalnym analogami nukleotydów adeninowych np. analogi ATP jako narzędzia do badania enzymów z grupy kinaz czy analogi SAM umożliwiające poznanie funkcji metylotransferaz. Mimo ogromnych sukcesów jakie zostały osiągnięte na tym polu, wiele klas nukleotydów adeninowych i związanych z nimi modyfikacji kwasów nukleinowych wciąż pozostaje słabo (lub wcale) zbadanych pod kątem projektowania i syntezy funkcjonalnych analogów. W konsekwencji utrudnione jest badanie enzymów i procesów biologicznych zależnych od tych nukleotydów. Przykładami tego typu molekuł, które zwróciły moją uwagę, są nukleotydy modyfikujące końce 5' RNA oraz analogi 5'-fosfosiarczanu 3'-fosfoadenozyny (PAPS), który jest uniwersalnym kofaktorem sulfotransferaz. Niewielka liczba narzędzi molekularnych odpowiednich do badania tych dwóch procesów stała się motywacją do podjęcia przeze mnie badań opisanych w rozprawie doktorskiej.

Celem pracy doktorskiej było zaprojektowanie i otrzymanie nowych analogów NAD (dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego oraz PAPS (5'-fosforanu 3'-fosfosiarczanu adenozyne) jako narzędzi do badań strukturalnych i funkcjonalnych enzymów rozpoznających wymienione związki lub ich pochodne. Analogi te zostały zaprojektowane jako narzędzia do modyfikacji RNA służące do badania funkcji biologicznych NAD-RNA lub uniwersalne narzędzia do badania enzymów z grupy sulfotransferaz.

Projekt ten w założeniu składał się z dwóch części: (i) części syntetycznej oraz (ii) badań biofizycznych i biochemicznych z wybranymi enzymami modelowymi. W pierwszej części otrzymałam analogi kofaktorów adeninowych, które w przyszłości miały posłużyć m.in. do badania aktywności specyficznych enzymów *in vitro* i w warunkach komórkowych, badania ich lokalizacji komórkowej, ich identyfikacji lub opracowania metod poszukiwania inhibitorów o znaczeniu terapeutycznym. Drugą część stanowi opracowanie metod biofizycznych służących do ewaluacji opracowanych narzędzi oraz demonstracja przykładowych zastosowań. Dodatkowo, zdobyte na polu syntezy chemicznej doświadczenie pozwoliło mi na rozszerzenie badań o projekty poboczne, takie jak otrzymanie analogów trifosforanu dinukleotydu adeninowego, które posłużyły do badania szlaków metabolicznych roślin czy synteza analogów dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD), które zostały użyte do badań biologicznych z egzonukleazą DXO.

Cząsteczka NAD jest jednym z bardzo istotnych, licznie występującym w komórkach kofaktorem adeninowym. Jego najbardziej znaną funkcją jest udział w procesie utleniania – redukcji zachodzącym w komórkach (nośnik elektronów). W roku 2009 w *Nature Chemical Biology* ukazała się praca wykazująca obecność struktury NAD-kapu na końcu 5' bakteryjnych cząsteczek RNA. W kolejnych latach została odkryta na końcu 5' RNA również u innych organizmów eukariotycznych,

m.in. ssaków. Dotychczas wykazano, że u bakterii obecność cząsteczki 5' NAD-kapu zwiększa stabilność RNA poprzez zmniejszenie jego podatności na działanie specyficznych pirofosfataz. W przeciwieństwie do roli jaką pełni u bakterii, u eukariotów obecność NAD kapu na 5' końcu wydaje się destabilizować RNA i ułatwiać jego degradację. Badania te pokazują, że rola NAD-kapu jest inna dla każdego typu organizmów i pomimo rosnącej liczby nowych narzędzi analitycznych i chemicznych pozostaje w ogromnej mierze nieznana. W ramach pracy doktorskiej zaprojektowałam i otrzymałam 8 analogów NAD, które w założeniu wykazywały częściową lub całkowitą odporność na działanie enzymów hydrolizujących, NudC i Nudt12 oraz DXO (enzymy rozpoznające NAD-RNA w komórkach). Otrzymane związki pomyślnie wbudowywały się do końca 5' RNA a także, cztery z nich, wykazywały odporność na działanie wszystkich trzech enzymów degradujących NAD-RNA. Dzięki zwiększonej stabilności komórkowej, analogi takie mogą stanowić cenne narzędzia do badań strukturalnych i funkcjonalnych niekanonicznych RNA.

Kolejną część pracy poświęciłam stworzeniu narzędzi molekularnych bazujących na strukturze PAPS oraz opracowaniu metod do badania sulfotransferaz. Sulfotransferazy to grupa enzymów zaangażowana w metabolizm siarki w komórce poprzez katalizę procesów sulfurylacji. Proces ten polega na przeniesieniu grupy siarczanowej z uniwersalnego kofaktora, wspomnianej już cząsteczki PAPS, na akceptory takie jak małe endogenne biomolekuły, endogenne makrocząsteczki lub ksenobiotyki. Funkcje katalityczne sulfotransferaz ingerują w szereg istotnych zjawisk takich jak detoksykacja organizmu, metabolizm leków, regulacja gospodarki hormonalnej, rozpoznanie molekularne w procesach immunologicznych, czy kontrola poziomu neuroprzekaźników. Zaburzenia aktywności wspomnianej grupy enzymów zostały powiązane z wieloma chorobami, w tym z chorobą Parkinsona, hemofilią i nowotworzeniem. Istotę prowadzonych przeze mnie badań stanowi fakt, że, pomimo ważnej roli jaką pełnią sulfotransferazy w różnych organizmach, dotychczas nie opracowano narzędzi na bazie uniwersalnego kofaktora, PAPS, które umożliwiłyby zastosowanie nowoczesnych metod chemii biologicznej i medycznej do badania tych enzymów. Jedną z prawdopodobnych przyczyn pomijania cząsteczki PAPS w tworzeniu narzędzi molekularnych jest wysoka niestabilność wiązania fosfosiarczanowego oraz wynikające z tego trudności w syntezie. W ramach pracy doktorskiej problem ten rozwiązałam poprzez optymalizację trzyetapowej metody syntezy tego typu związków, którą następnie wykorzystałam do otrzymania szeregu analogów z modyfikacjami w obrębie zasady azotowej (pozycje N6, C2 oraz C8), reszty rybozy (pozycja 2') oraz grupy fosfosiarczanowej (różnego rodzaju analogi funkcjonalizowane i izostery). Aby umożliwić systematyczne zbadanie zależności pomiędzy strukturą a właściwościami uzyskanych związków, opracowałam następnie dwie metody biofizyczno-biochemiczne. Pierwsza z tych metod pozwoliła na określanie powinowactwa tych związków (wyznaczania stałych dysocjacji, K_D) do modelowych sulfotransferaz z wykorzystaniem metody termoforezy mikroskalowej. Druga metoda pozwoliła natomiast na monitorowanie aktywności sulfotransferaz w czasie rzeczywistym metodą ^{19}F NMR oraz ocenę aktywności potencjalnych inhibitorów.

Wszystkie wymienione zagadnienia zostały rozwinięte w części literaturowej oraz eksperymentalnej rozprawy doktorskiej.