

Warszawa, 9 listopada 2016

Biofizycy przemeblowują terapię genową

Terapia genowa daje nadzieję milionom pacjentów. Naukowcy z Uniwersytetu Warszawskiego badają od kilku lat możliwość wykorzystania w niej mRNA ze zmodyfikowanym fragmentem inicjującym biosyntezę białka. Opublikowane niedawno wyniki wskazują, że nowe związki - projektowane i otrzymywane na UW – mają większą trwałość i efektywność niż ich odpowiedniki naturalne, a ich chemiczne wytwarzanie może być tanie. Dzięki zaprojektowanym związkom naukowcom udało się podejrzeć i lepiej zrozumieć mechanizmy reprodukcji białka w komórce, co powinno pozwolić na stworzenie lepszych terapeutyków.

Produkcja białek w komórkach organizmu dotkniętego chorobą może być zaburzona. Przejawia się to zmniejszeniem lub szkodliwym zwiększeniem produkcji niektórych białek albo produkcją cząsteczek wadliwych, czego skrajnym przypadkiem jest choroba nowotworowa. Jednym ze sposobów radzenia sobie z takimi problemami jest terapia genowa. Polega ona na dostarczaniu do organizmu materiału genetycznego kodującego białka o własnościach, które wspomagają prawidłowe działanie komórki. W początkach eksperymentów nad terapiami genowymi jako materiał genetyczny próbowano stosować DNA. Niestety, ze względu na jego bardzo złożoną strukturę, istnieje duże ryzyko, że dostarczone geny rozwiążą część problemów, ale i spowodują problemy nowe, czasem poważniejsze i zupełnie nieoczekiwane. Z tego powodu lekarze wiążą duże nadzieje z możliwością terapeutycznego zastosowania mRNA – cząsteczek mniejszych, prostszych, przez to łatwiejszych do przygotowania w laboratorium, a przede wszystkim cząsteczek, które w przeciwieństwie do DNA nie modyfikują na trwałe genetycznego zapisu o organizmie.

Cząsteczki mRNA to naturalne polimery, które tworzone są w komórkach. Zawierają one dokładne obrazy genów (fragmentów DNA), są więc nośnikiem kodu genetycznego i pełnią w komórce rolę wzorców przy produkcji nowych białek. Cząsteczka mRNA żyje w komórce od kilku minut do kilku godzin, po czym jest degradowana przez enzymy. Krótki czas życia mRNA – także tego, które mogłoby być wytworzone w laboratorium w celach terapeutycznych – jest jednym z problemów limitujących jego potencjalne praktyczne wykorzystanie. Lekarze i farmaceuci chcieliby, by mRNA użyte w preparatach leczniczych „żyło” dłużej niż jego naturalny odpowiednik i by wydajność medykamentu była jak największa.

Znaczące osiągnięcia w badaniach terapeutycznego mRNA ma zespół utworzony pierwotnie w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej na Wydziale Fizyki UW. Inicjatorem podjęcia tematyki badań nad modyfikacjami mRNA jest prof. dr hab. Edward Darżynkiewicz (WF UW). Liderem zespołu pracującego nad terapeutycznie ważnymi modyfikacjami mRNA jest dr hab. prof. UW Jacek Jemielity (wywodzący się z WF UW, obecnie zatrudniony w Centrum Nowych

Technologii UW). W zespole pracuje kilkunastu badaczy – doktorów i studentów, a głównym animatorem prac na WF UW jest dr Joanna Kowalska. Uczeń współpracują z naukowcami z USA i z Niemiec oraz z firmami farmaceutycznymi. Konsorcjum UW i Uniwersytetu Stanowego w Luizjanie opatentowało w 2011 r. i skomercjalizowało wynalazek grupy badaczy pozwalający zwiększyć trwałość i wydajność mRNA. Rozwiązanie znajduje się obecnie w fazie badań klinicznych w jednym z koncernów, który wykupił licencję. Istotą wynalazku jest zbudowanie sztucznego fragmentu mRNA, który zastępuje jego naturalną strukturę znaną jako kap 7-metyloguanozynowy.

Warszawskie badania są kontynuowane i rozwijane. Zmierzają do znalezienia nowych, jeszcze użyteczniejszych analogów kapu, do opracowania technologii masowej produkcji terapeutycznego mRNA oraz do zrozumienia przebiegu procesów naturalnej syntezy białek. „Kap 7-metyloguanozynowy znajduje się na jednym z końców mRNA (tzw. końcu 5')” wyjaśnia prof. Darżynkiewicz. W cytoplazmie struktura kapu rozpoznawana jest przez czynnik eIF4E inicjujący proces biosyntezy białek, czyli translacji. Ten etap decyduje o szybkości całej złożonej sekwencji zdarzeń, które kończą się wyprodukowaniem białka w komórce. Obecność kapu chroni też mRNA przed przedwczesną degradacją przez enzymy przecinające czyli nukleazy. Niestety, komórki posiadają naturalny mechanizm usuwania kapu przez tzw. enzymy degradacji kapu (decapping enzyme, np. Dcp1/Dcp2). Kilka lat temu odkryliśmy, że zastosowanie modyfikowanych analogów kapu może uodpornić koniec 5' mRNA na degradację i pozwala zwiększyć wydajność translacji”

Najnowsze prace zespołu pokazują, że poszukiwania nowych analogów naturalnych kapów są bardzo obiecujące. „W pracy opublikowanej niedawno w czasopiśmie *Nucleic Acids Research* zaprezentowaliśmy nową klasę zmodyfikowanych kapów, które są udoskonaloną wersją tych znajdujących się obecnie w badaniach klinicznych” informuje prof. Jemielity. „Modyfikacja polega na zamianie atomu tlenu atomem siarki w kilku pozycjach w szczególnym miejscu cząsteczki kapu zwanym mostkiem trój- lub czterofosforanowym. mRNA z tak zmodyfikowanym chemicznie kapem jest rekordowo efektywnie wiązane przez czynnik eIF4E w etapie limitującym szybkość biosyntezy białka. Jednocześnie ma ono wysoką odporność na odcinanie struktury kapu przez enzym Dcp1/Dcp2. Tak modyfikowane mRNA w warunkach komórkowych prowadzi do powstania znacznie większej ilości terapeutycznego białka, co wykazaliśmy w systemie modelowym używanym w badaniach nad szczepionkami przeciwnowotworowymi. Cały czas dążymy do tego, by nasze zmodyfikowane mRNA pozwoliło na stosowanie mniejszych dawek terapeutyku u pacjenta. Zmniejszona dawka to zawsze zmniejszenie ryzyka wystąpienia ewentualnych skutków ubocznych.”

Dla pacjentów bardzo ważna jest też dostępność leku. Tradycyjne enzymatyczne metody syntezy zmodyfikowanych kapów (i w efekcie terapeutycznego mRNA) są czasochłonne i bardzo mało wydajne. „Gdy w 2010 r. musieliśmy przygotować pierwsze 4 gramy kapu potrzebnego do rozpoczęcia badań klinicznych, to zajęło nam to pół roku, a ta ilość wystarczała na leczenie zaledwie 12-13 pacjentów” przypomina dr Kowalska. Tymczasem potencjalne zapotrzebowanie można szacować jako kilogramy specyfiku rocznie. Dlatego badacze poszukują metod szybszej i tańszej produkcji. „Zwróciliśmy uwagę na tzw. chemię kliknięć” opowiada mgr Sylwia Walczak, doktorantka w Kolegium Międzywydziałowych Indywidualnych Studiów Doktoranckich UW (MiSDoMP). „Jest to rozwijana dopiero od kilkunastu lat metoda bardzo efektywnej syntezy złożonych związków chemicznych z odpowiednio przygotowanych wcześniej półfabrykatów, czyli chemicznych klocków. Każdy klocek posiada w swojej strukturze przynajmniej jeden fragment, który – gdy napotka swój odpowiednik w innej cząsteczce – łączy się z nim, działając podobnie jak odzieżowy zatrzask. Nazwa metody pochodzi właśnie od skojarzenia z charakterystycznym kliknięciem łączących się części.” Badając możliwości zastosowania tej metody przy masowej produkcji zmodyfikowanych kapów polscy naukowcy otrzymali 36 nowych wariantów analogów. „Wśród nich dwa nowe związki mają właściwości, których oczekiwaliśmy: po wprowadzeniu do mRNA „działają” równie dobrze co naturalny kap” dodaje mgr Anna Nowicka, która przygotowuje doktorat z tej tematyki na Wydziale Fizyki UW. „Jesteśmy pewni, że odkrycie to otwiera drogę do opracowywania nowych, chemicznych metod włączania kapu do mRNA, które będą konkurencyjne do drogich i czasochłonnych metod enzymatycznych” uzupełnia mgr Nowicka. Praca zespołu ośmiu autorów informująca o tym odkryciu ukazała się pod koniec lata w opiniotwórczym

Poszukiwania nowych, bardziej przydatnych analogów naturalnych kapów powoli wychodzą z fazy działania metodą prób i błędów. Uчени starają się zrozumieć jak – krok po kroku i w szczegółach – przebiegają interesujące ich procesy, co je warunkuje, jaka jest ich dynamika. Rozumiejąc na poziomie cząsteczkowym fizykę procesów, można będzie je kontrolować poprzez świadome modyfikowanie elementów złożonego układu biologicznego takich jak mRNA. „Po raz pierwszy udało się nam zaprojektować i otrzymać związki, które naśladując koniec 5' mRNA (kap), są zdolne do hamowania (inhibicji) aktywności enzymu Dcp1/Dcp2 odcinającego kap od mRNA, co decyduje o zniszczeniu mRNA” chwali się dr Marcin Ziemniak, który wiosną obronił swoją pracę doktorską na Wydziale Fizyki UW. „Nasz związek wykorzystaliśmy do uchwycenia kluczowego etapu działania tego enzymu jakim jest „schwywanie” kapu. Upraszczając trochę, można powiedzieć, że kompleks enzymatyczny połknął naszą niestrawną przynętę imitującą kap w mRNA i został zamrożony tuż po połączeniu. Dzięki temu my, wraz ze współpracownikami z Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Francisco – stosując metody rentgenostrukturalne, czyli wykonując coś w rodzaju odpowiednio sprytnego zdjęcia - mogliśmy poznać strukturę samego złożonego kompleksu enzymatycznego odpowiedzialnego za odcięcie kapu, po raz pierwszy w kompleksie z analogiem kapu. Nasze wyniki wskazują, że podczas chwytania przynęty, czyli wiązania inhibitora, w kompleksie enzymatycznym zachodzą bardzo duże (globalne) zmiany strukturalne. Skład chemiczny złożonych cząsteczek pozostaje oczywiście niezmienny, ale ich fragmenty istotnie przekręcają się względem siebie w stosunku do sytuacji, w której pozostają one nieaktywne.” Wyniki zostały opublikowane w dwóch prestiżowych czasopismach naukowych: *RNA* (w styczniu) i *Nature Structural and Molecular Biology* (w październiku). Dzięki nim naukowcy lepiej rozumieją mechanizm procesu degradacji kapu (dekapiingu). „Jesteśmy przekonani, że pozwoli nam to zaprojektować jeszcze lepsze inhibitory procesu dekapiingu mRNA” zapewnia prof. Jemielity. „Będą one użyteczne nie tylko w dalszych badaniach nad procesami degradacji mRNA, ale spodziewamy się, że znajdą zastosowanie terapeutyczne m.in. w terapii wspomagającej szczepionki przeciwnowotworowe i w terapiach przeciwwirusowych.”

Naukowcy podkreślają, że problemy, którymi się zajmują, wymagają interdyscyplinarnego podejścia. „To, co robimy na Wydziale Fizyki UW jest w pewnym sensie unikalne” przekonuje dr Kowalska. „Mamy dostęp do bardzo dobrze wyposażonych laboratoriów badawczych, jednak wiele innych zespołów na świecie również posiada podobną aparaturę. Naszą przewagą jest jednak kapitał ludzki, który umożliwia połączenie ekspertyz z dziedziny (bio)fizyki, chemii, oraz biologii molekularnej i komórkowej. Prowadzenie badań na styku trzech różnych dziedzin i możliwość spojrzenia na ten sam problem badawczy z różnych perspektyw jest niezwykle stymulujące intelektualnie i skutkuje zupełnie nowymi pomysłami i rozwiązaniami, do których dużo trudniej byłoby dojść patrząc na problem tylko z jednej strony. Uważam, że w tej dziedzinie jest to unikalne podejście, nie tylko w skali naszego kraju, ale również świata” podsumowuje badaczka.

Fizyka i astronomia na Uniwersytecie Warszawskim pojawiły się w 1816 roku w ramach ówczesnego Wydziału Filozofii. W roku 1825 powstało Obserwatorium Astronomiczne. Obecnie w skład Wydziału Fizyki UW wchodzi Instytut: Fizyki Doświadczalnej, Fizyki Teoretycznej, Geofizyki, Katedra Metod Matematycznych oraz Obserwatorium Astronomiczne. Badania pokrywają niemal wszystkie dziedziny współczesnej fizyki, w skalach od kwantowej do kosmologicznej. Kadra naukowo-dydaktyczna Wydziału składa się z ok. 200 nauczycieli akademickich, wśród których jest 88 pracowników z tytułem profesora. Na Wydziale Fizyki UW studiuje ok. 1000 studentów i ponad 170 doktorantów.

PUBLIKACJE NAUKOWE:

“Cap analogs modified with 1,2-dithiodiphosphate moiety protect mRNA from decapping and enhance its translational potential”, By Malwina Strenkowska, Renata Grzela, Maciej Majewski, Katarzyna Wnek, Joanna Kowalska, Maciej Lukaszewicz, Joanna Zuberek, Edward Darzynkiewicz, Andreas N Kuhn, Ugur Sahin, Jacek Jemielity, Published in *Nucleic Acids Research* 44 (2016) doi: 10.1093/nar/gkw896, <http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2016/10/06/nar.gkw896.full>

“A novel route for preparing 5' cap mimics and capped RNAs: phosphate-modified cap analogues obtained via click chemistry”, By Sylwia Walczak, Anna Nowicka, Dorota Kubacka, Kaja Fac, Przemysław Wanat, Seweryn Mroczek, Joanna Kowalska, Jacek Jemielity, Published in *Chemical Science* 7 (2016) DOI: 10.1039/C6SC02437H, <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/SC/C6SC02437H#divAbstract>

“Two-headed tetraphosphate cap analogs are inhibitors of the Dcp1/2 RNA decapping complex”, By Marcin Ziemniak, Jeffrey S.

Mugridge, Joanna Kowalska, Robert E. Rhoads, John D. Gross, Jacek Jemielity, Published in RNA 22 (2016) 518-529,
<http://rnajournal.cshlp.org/content/early/2016/01/29/rna.055152.115>

"Structural basis of mRNA-cap recognition by Dcp1–Dcp2", By Jeffrey S. Mugridge, Marcin Ziemniak, Jacek Jemielity, John D. Gross,
Published in Nature Structural & Molecular Biology 23 (2016) doi:10.1038/nsmb.3301,
<http://www.nature.com/nsmb/journal/vaop/ncurrent/full/nsmb.3301.html>

KONTAKTY:

dr Joanna Kowalska · Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Zakład Biofizyki, , tel. +48 22 55 40 774, +48 22 55 40 788, e-mail: asia@biogeo.uw.edu.pl

prof. dr hab. Edward Darżynkiewicz Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Zakład Biofizyki, tel. +48 22 55 40 787, e-mail: edek@biogeo.uw.edu.pl

dr hab. Jacek Jemielity (prof. UW) Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego, tel. +48 22 55 43774, e-mail: jacekj@biogeo.uw.edu.pl

POWIĄZANE STRONY WWW:

<http://www.jemielitygroup.pl/>

www.biogeo.uw.edu.pl

<http://www.fuw.edu.pl/>

Strona Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego.

<http://www.fuw.edu.pl/informacje-prasowe.html>

Serwis prasowy Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego.

MATERIAŁY GRAFICZNE:

FUW161109b_fot01s.jpg

HR: http://www.fuw.edu.pl/press/images/2016/FUW161109b_fot01.jpg

Fragment struktury krystalograficznej ukazujący sposób wiązania kapu przez Dcp1/Dcp2. Na podstawie pdb-entry 5KQ4. (Źródło: FUW)