

Mgr inż. Karolina Bartosik

Promotor: prof. dr hab. inż. Elżbieta Sochacka

Promotor pomocniczy: dr inż. Grażyna Leszczyńska

STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ

„Badania nad syntezą oligorybonukleotydów zawierających 5-podstawione urydyny i 2-tiourydyny metodą post-syntetycznej modyfikacji RNA”

5-Podstawione urydyny i 2-tiourydyny należą do grupy modyfikowanych jednostek nukleozydowych występujących w cytozolowych i mitochondrialnych transferowych kwasach rybonukleinowych (tRNA/mt-tRNA). Wśród tego typu modyfikacji, szczególnie ważne są urydyny i 2-tiourydyny posiadające przy atomie C5 zasady heterocyklicznej podstawnik aminometylowy (xnm^5U/xnm^5s^2U). Różnorodne 5-aminometylourydyny (xnm^5U) i 5-aminometylo-2-tiourydyny (xnm^5s^2U) zlokalizowane są w pętli antykodonu tRNA, w pozycji 34 (pierwsza litera antykodonu, tzw. pozycja wahadłowa), i mają znaczący wpływ na prawidłowy przebieg procesu biosyntezy białek. Mimo intensywnych badań licznych ośrodków naukowych, dla wielu nukleozydów xnm^5U/xnm^5s^2U zależność między ich strukturą a funkcją biologiczną nie została wyjaśniona. W tym kontekście syntetyzowane chemicznie modyfikowane fragmenty RNA, w szczególności o sekwencji ramienia antykodonu, stanowią dogodne modele do badań uwarunkowań strukturalnych determinujących aktywność tRNA w procesach komórkowych. Ponadto, synteza odpowiednio zaprojektowanych oligorybonukleotydów zawierających nienatywne 5-aminometylourydyny (xnm^5U) i 2-tiourydyny (xnm^5s^2U), stwarza możliwość konstruowania terapeutycznych kwasów nukleinowych o zwiększonej selektywności i powinowactwie względem patogennej cząsteczki RNA/DNA, a także zwiększonej biodostępności i odporności na działanie enzymów nukleolitycznych obecnych w medium komórkowym.

Z uwagi na liczne możliwości aplikacji fragmentów RNA zawierających xnm^5U/xnm^5s^2U , wciąż poszukiwane są nowe, efektywne rozwiązania syntetyczne w zakresie otrzymywania tego typu modyfikowanych oligomerów. W związku z tym, celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie protokołów umożliwiających wydajną syntezę oligorybonukleotydów zawierających xnm^5U/xnm^5s^2U z zastosowaniem post-syntetycznej strategii modyfikacji RNA. Realizacja tego zadania opierała się na wykorzystaniu 5-piwaloiloksymetylourydyny (Pivom⁵U) i 5-piwaloiloksymetylo-2-tiourydyny (Pivom⁵s²U) jako dogodnych jednostek prekursorowych, które po włączeniu w oligomer metodą amidofosforynową pozwoliłyby na ich efektywną transformację do xnm^5U oraz xnm^5s^2U . Użyteczność Pivom⁵U/Pivom⁵s²U jako prekursorów dla otrzymania xnm^5U -RNA/ xnm^5s^2U -RNA wynika z reaktywności grupy piwaloiloksylowej umieszczonej w pozycji pseudobenzylowej (pozycja C-5,1), która w reakcjach S_N z nukleofilami azotowymi może ulegać podstawieniu resztą -NH₂, -NHR lub -NRR'.

W pierwszym etapie badań możliwość substytucji grupy piwaloiloksylowej w pozycji pseudobenzylowej została przetestowana na poziomie nukleozydu. W tym celu opracowałam warunki pozwalające na wydajną syntezę 5-piwaloiloksymetylourydyny i jej 2-tio analogu, które następnie poddałam reakcjom S_N stosując szereg odczynników o charakterze nukleofilowym oraz zróżnicowane warunki preparatywne. Przeprowadzone eksperymenty pokazały możliwość wykorzystania Pivom⁵U i Pivom⁵s²U w reakcjach nie tylko z nukleofilami azotowymi, takimi jak amoniak, metyloamina, izopenetyloamina, dietyloamina, morfolina, piperydyna, sole tetrabutylamoniove aminokwasów (glicyny i tauryny), ale również anionem metoksylowym, tiolanowym i cyjankowym. Reakcje S_N prowadziłam głównie w podwyższonej temperaturze, w roztworach alkoholowych, wodnych lub ich

mieszaniu, w czasie 1-20 godz. Opracowana metodyka umożliwiła otrzymanie 22 modyfikowanych nukleozydów typu xnm^5U/xnm^5s^2U z wydajnością 65-90%, spośród których 11 to jednostki natywne (nm^5U/nm^5s^2U , mnm^5U/mnm^5s^2U , inm^5U/inm^5s^2U , $cmnm^5U/cmnm^5s^2U$, $\tau m^5U/\tau m^5s^2U$, cnm^5U) występujące w tRNA/mt-tRNA. Pozostałe jednostki to nukleozydy nienaturalne o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym.

Wyniki badań na nukleozydach pozwoliły mi na wykonanie dalszych prac związanych z możliwością włączenia tych jednostek w oligorybonukleotydy oraz przeprowadzenia post-syntetycznej transformacji $Pivom^5U/Pivom^5s^2U$ z nukleofilami azotowymi wybranymi pod kątem otrzymania oligomerów zawierających natywne modyfikacje. Bardzo ważne było opracowanie warunków pozwalających na efektywną konwersję 2-tionukleozydu do xnm^5s^2U -RNA, ze względu na podatność grupy 2-tiokarbonylowej obecnej w strukturze xnm^5s^2U na utlenienie i/lub oksydacyjną desulfurację w warunkach standardowej syntezy RNA. Realizację tego zadania przeprowadziłam poprzez syntezę 3'-O-amidofosforynów $Pivom^5U$ i $Pivom^5s^2U$ w wariantcie 5'-O-DMT-2'-O-TBDMS według standardowych procedur, a następnie uzyskane jednostki monomeryczne wprowadziłam w modelowy pentamer zawierający wszystkie nukleozydy kanoniczne, o sekwencji 5'-GUPivom⁵UAC-3'/5'-GUPivom⁵s²UAC-3', stosując metodę amidofosforynową na nośniku polimerowym. Opracowany protokół umożliwiający efektywną post-syntetyczną transformację składał się z trzech etapów. W pierwszym etapie prekursorowy oligomer poddałam częściowej deprotekcji (usunięcie osłon β -cyanoetylowych), a następnie reakcji z nukleofilem optymalizując wykorzystane na poziomie nukleozydu warunki preparatywne takie jak: nadmiary użytych reagentów, rozpuszczalnik oraz czas prowadzenia reakcji. Zastosowane warunki reakcji S_N pozwoliły nie tylko na wydajne podstawienie grupy -OPiv odpowiednim nukleofilem, ale umożliwiły również odcięcie oligomeru od złoza i usunięcie zasadolabilnych grup ochronnych. W ostatnim etapie usunęłam fluorolabilne grupy silylowe. W rezultacie, uzyskałam szereg 5-merów zawierających natywne 5-aminometylourydyny (nm^5U , mnm^5U , inm^5U , $cmnm^5U$, τm^5U , cnm^5U) oraz 5-aminometylo-2-tiourydyny (nm^5s^2U , mnm^5s^2U , inm^5s^2U , $cmnm^5s^2U$, τm^5s^2U).

W ostatnim etapie sprawdzona została użyteczność opracowanej metodyki dla otrzymania dłuższych fragmentów RNA - 17-merów stanowiących modele do badań relacji struktura-funkcja tRNA. W tym celu otrzymane 3'-O-amidofosforyny $Pivom^5U$ i $Pivom^5s^2U$ włączyłam w 17-mery o sekwencji ramienia antykodonu tRNA *E. coli* specyficznego dla lizyny, a następnie poddałam post-syntetycznej transformacji z dwoma wybranymi nukleofilami: metyloaminą i solą tetrabutylamoniumową tauryny, zgodnie z warunkami opracowanymi dla modelowych 5-merów. W efekcie, otrzymałam cztery 17-mery modyfikowane mnm^5U , mnm^5s^2U , τm^5U i τm^5s^2U z wydajnością 60-78%.

Część wyników dotyczących przeprowadzonych badań została opublikowana. Synteza jednostek nukleozydowych typu xnm^5U/xnm^5s^2U stanowi przedmiot prac opisanych w *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 6593 i *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 2097, natomiast dane związane z efektywną syntezą zarówno 5-merów jak i 17-merów modyfikowanych 5-aminometylourydynami zostały przedstawione w *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 2097.

Opracowana metodyka, umożliwiająca efektywne podstawienie grupy piwaloiloksylowej obecnej w strukturze $Pivom^5U$ i $Pivom^5s^2U$ różnorodnymi nukleofilami pozwoliła znacznie uprościć protokół syntezy zarówno jednostek nukleozydowych typu xnm^5U/xnm^5s^2U , jak również oligomerów zawierających tego rodzaju modyfikacje. Zastosowana strategia ma szczególnie istotne znaczenie dla otrzymywania oligomerów modyfikowanych 5-aminometylo-2-tiourydynami, których uzyskanie z wykorzystaniem dotychczas stosowanych metod stanowi poważny problem syntetyczny z uwagi na brak stabilności funkcji 2-tiokarbonylowej xnm^5s^2U w warunkach syntezy lub/i deprotekcji oligorybonukleotydów. Warto podkreślić, iż strategia post-syntetycznej modyfikacji pozwala na otrzymanie kilku produktów z jednego prekursorowego substratu, bez konieczności przeprowadzania za każdym razem syntezy modyfikowanej jednostki monomerycznej i włączenia jej w oligomer, co w kontekście nakładu czasu i pracy stanowi bardzo korzystne rozwiązanie.

Karolina Bobasik