

„Opracowanie nowej metody syntezy oligorybonukleotydów modyfikowanych 5-aminometylourydynami (xnm⁵U) i 5-aminometylo-2-tiourydynami (xnm⁵s²U) via post-syntetyczne podstawienie nukleofilowe 5-piwaloiloksymetylourydyny/2-tiourydyny”

Urydyny i 2-tiourydyny zawierające grupę 5-aminometylową (xnm⁵U/xnm⁵s²U) występują w sekwencjach transportowych RNA (tRNA) zarówno organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych.¹⁻⁵ Modyfikacje te zlokalizowane są w pozycji 34 (tzw. pozycja wahadłowa, pierwsza litera antykodonu) ramienia antykodonu cytozolowych i mitochondrialnych tRNA (mt-tRNA), gdzie pełni zasadniczą funkcję w procesie dekodowania informacji genetycznej. Poprzez aranżację odpowiedniej konformacji płaszczyzny antykodonu, wpływają one na stabilność rybosomalnego kompleksu mRNA-tRNA, co w konsekwencji determinuje efektywne i prawidłowe rozpoznanie kodonów zakończonych purynami (NNA/NGG). Wykazano, że w niektórych przypadkach brak modyfikacji może powodować całkowite zahamowanie procesu translacji, a w efekcie pojawienie się symptomów chorobowych.^{6,7} Dla przykładu, brak 5-taurynometylo-2-tiourydyny w sekwencjach ludzkiego, mitochondrialnego tRNA^{Lys} jest przyczyną pojawienia się mitochondriopatii MERRF.⁶ W tym względzie, chemicznie modyfikowane fragmenty tRNA, w szczególności sekwencje ramienia antykodonu, stanowią atrakcyjne modele do badania warunków strukturalnych determinujących funkcjonalność tRNA w procesach komórkowych.^{1,2} Brak wystarczającej dostępności do cząsteczek tRNA/mt-tRNA izolowanych z materiału biologicznego, w mniejszym stopniu również ograniczona dostępność syntetyczna, powodują, że jedynie dla wiskiej grupy modyfikowanych nukleotydów opisano w literaturze zależności między ich strukturą a funkcją tRNA.

Oligorybonukleotydy modyfikowane urydynamiami/2-tiourydynamiami typu xnm⁵U/xnm⁵s²U mają również istotne znaczenie w kontekście otrzymywania terapeutycznych kwasów nukleinowych.⁸⁻¹¹ Znaczącą rolę w tym aspekcie odgrywa obecność atomu azotu w strukturze modyfikacji xnm⁵U/xnm⁵s²U. Możliwość protonowania i ugrupowania aminowego neutralizuje ładunek ujemny grup fosforanowych oligomerów, przez co znacząco zwiększa ich biodostępność. Co więcej obecność grup(y) aminowej wpływa na zwiększenie selektywności i powinowactwa oligomeru względem patogennej cząsteczki RNA/DNA, jak również zwiększa jej odporność na degradację enzymatyczną w medium komórkowym. Dodatkowo, modyfikacje zawierające funkcję 2-tiokarbonylową (xnm⁵s²U) zwiększają stabilność struktur helikalnych.¹²

Pomimo, iż istnieje wiele możliwości zastosowania oligorybonukleotydów modyfikowanych urydynamiami/2-tiourydynamiami typu xnm⁵U/xnm⁵s²U, to w literaturze nie ma wielu przykładów opisujących ich efektywną syntezę.^{1,13-16} Dotychczas stosowane są trzy metody syntezy fragmentów RNA modyfikowanych xnm⁵U/xnm⁵s²U: chemiczna, enzymatyczna i semienzymatyczna, przy czym tylko metoda chemiczna umożliwia syntezę oligomeru w większej skali, jak również jest jedyną - jak do tej pory - metodą umożliwiającą wprowadzenie nukleotydów 2-tiopirymidynowych xnm⁵s²U w sekwencję RNA.

Badania zaplanowane w ramach projektu są próbą włączenia się w aktualny nurt badań nad syntezą modyfikowanych fragmentów RNA. Program badań obejmuje opracowanie efektywnej syntezy oligorybonukleotydów modyfikowanych 5-podstawionymi urydynamiami i 2-tiourydynamiami typu xnm⁵U/xnm⁵s²U na drodze post-syntetycznej transformacji 5-piwaloiloksymetylourydyny (Pivom⁵U) i 5-piwaloiloksymetylo-2-tiourydyny (Pivom⁵s²U). Proponowana metoda zakłada wykorzystanie grupy piwaloiloksylowej, umieszczonej w pozycji pseudobenzylowej w strukturze Pivom⁵U/Pivom⁵s²U jako grupy opuszczającej w reakcjach nukleofilowego podstawienia z szeregiem różnorodnych nukleofilów azotowych. W rezultacie, synteza jednego prekursorowego oligomeru modyfikowanego Pivom⁵U lub Pivom⁵s²U stworzy możliwość otrzymania kilkunastu różnych produktów, w zależności od użytego odczynnika nukleofilowego. W ramach badań zostaną przetestowane następujące odczynniki o charakterze nukleofilowym: amoniak, aminy I-rzędowe, aminy II-rzędowe: alifatyczne i cykliczne oraz sole tetra-*n*-butyloamoniowe aminokwasów.

Jako model do opracowania warunków post-syntetycznej transformacji Pivom⁵U/Pivom⁵s²U → xnm⁵U/xnm⁵s²U planujemy wykorzystanie krótkiego oligomeru o sekwencji 5'-GUPivom⁵UAC-3'/5'-GUPivom⁵s²UAC-3', zawierającego wszystkie jednostki kanoniczne. Synteza prekursorowych oligorybonukleotydów modyfikowanych Pivom⁵U/Pivom⁵s²U zostanie przeprowadzona zgodnie z manualnym protokołem metody amidofosforynowej.

W ramach projektu planowana jest również synteza 17-meru o sekwencji ramienia antykodonu tRNA^{Lys}_{*E.coli*} modyfikowanego w pozycji 34 jednostkami 5-metyloaminometylo-2-tiourydynami (mmm⁵s²U) via post-syntetyczna transformacja Pivom⁵s²U. Ponadto, zostaną przeprowadzone badania nad włączeniem kilku jednostek Pivom⁵U w łańcuch RNA oraz ich post-syntetyczną transformację z wybranym nukleofilem, dające możliwość zastosowania proponowanej metodyki do otrzymywania oligomerów o lepszych właściwościach terapeutycznych w stosunku do pojedynczo modyfikowanego fragmentu RNA.

Literatura:

1. Kurata, S.; Weixlbaumer, A.; Ohtsuki, T.; Shimazaki, T.; Wada, T.; Kirino, Y.; Watanabe, K.; Ramakrishnan, V.; Suzuki, T.; *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283, 18801.
2. Murphy IV, F. V.; Ramakrishnan V.; Malkiewicz A.; Agris, P. F.; *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2001**, 11, 1186.
3. Rodriguez-Hernandez, A.; Spears, J. L.; Gaston, K. W.; Limbach, P. A.; Hou, Y. M.; Kaiser, R.; Agris, P. F.; Perona, J. J.; *J. Mol. Biol.*, **2013**, 425, 3888;

4. Takai, K.; Yokoyama, S.; *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31, 6383;
5. Takai, K.; *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **2005**, 49, 317.
6. Suzuki, T.; Nagao, A.; Suzuki, T.; *WIREs RNA*, **2011**, 2, 376.
7. Wang, X.; Yan, Q.; Guan, M-X.; *J. Mol. Biol.*, **2010**, 395, 1038.
8. Sanghvi, Y.S.; *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **2011**, Chapter 4, Unit 4.1. 1.
9. Hashimoto, H.; Nelson, M. G.; Switzer, C.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 7128.
10. Verma, S.; Jager, S.; Thum, O.; Familok, M.; *Chem. Res.*, **2003**, 3, 51.
11. Bittker, J. A.; Phipps, K. J.; Liu, D. R.; *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, 6, 367.
12. Shohda, K.; Okamoto, I.; Wada, T.; Seio, K.; Sekine, M.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10, 1795.
13. Leszczynska, G.; Pi ta, J.; Leonczak, P.; Tomaszewska A.; Malkiewicz, A.; *Tetrahedron Lett.*, **2012**, 53, 1214.
14. Leszczynska, G.; Pi ta, J.; Wozniak, K.; Malkiewicz, A.; *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12, 1052.
15. Leszczynska, G.; Leonczak, P.; Wozniak, K.; Malkiewicz, A.; *RNA*, **2014**, 20, 938.
16. Sundaram, M.; Crain, P. F.; Davis, D. R.; *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 5609.