

dr inż. Grażyna Leszczyńska
Politechnika Łódzka
Wydział Chemiczny
Instytut Chemii Organicznej
ul. Żeromskiego 116
90-924 Łódź
Tel. +48426313150
e-mail: grazyna.leszczynska@p.lodz.pl

SYNTEZA FRAGMENTÓW tRNA ZAWIERAJĄCYCH MODYFIKOWANE URYDINY Z POZYCJI WAHADŁOWEJ

Autoreferat do wniosku habilitacyjnego

Łódź, 2018

1. IMIĘ I NAZWISKO: Grażyna Bożena Leszczyńska (z d. Czerwińska)

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE (z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej)

2010 Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Wydział Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego
Świadectwo ukończenia studiów podyplomowych w zakresie biotechnologia medyczna
Tytuł pracy dyplomowej: Nowe aspekty mitochondrialnej terapii genowej

2000 Politechnika Łódzka, Wydział Chemiczny
Uzyskany stopień: doktor nauk chemicznych
Promotor: Prof. dr hab. Andrzej Małkiewicz
Tytuł rozprawy doktorskiej: WYKORZYSTANIE METYLOPOCHODNYCH URYDYNY I PSEUDOURYDYNY DO BADAŃ RELACJI STRUKTURA-FUNKCJA BIOLOGICZNA tRNA

1997 Politechnika Łódzka, Międzywydziałowe Studium Pedagogiczne
Dyplom uzyskania kwalifikacji pedagogicznych do pracy nauczycielskiej

1996 Politechnika Łódzka, Wydział Chemiczny
Kierunek Technologia chemiczna
Specjalność Technologia Chemiczna Organiczna
Uzyskany stopień: magister inżynier chemii
Promotor: Dr inż. Elżbieta Sochacka
Tytuł pracy dyplomowej: Badania nad syntezą 6-metylo-2-tiourydyny (studia ukończone z wyróżnieniem)

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:

XI.2000 – obecnie	Politechnika Łódzka Wydział Chemiczny Stanowisko: adiunkt
VI.2001 – III.2002	urlop macierzyński
VI.2010 – VI.2011	urlop macierzyński
XI.2013 – XI.2014	urlop macierzyński

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Synteza fragmentów tRNA zawierających modyfikowane urydyny z pozycji wahadłowej

b) Cytowane w Autoreferacie oryginalne naukowe prace twórcze stanowiące podstawę wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego (tytuł, autorzy, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy).

Podstawę osiągnięcia stanowi cykl dziesięciu oryginalnych publikacji, jednego patentu krajowego oraz jednego artykułu przeglądowego.

Kopie publikacji oraz oświadczenia współautorów (poza oświadczeniem prof. dr hab. Andrzeja Małkiewicza, który zmarł w sierpniu 2017 r.) zostały zamieszczone w załącznikach, odpowiednio 7 i 5.

* autor do korespondencji

** równy udział z pierwszym autorem publikacji

H1. Site-specific incorporation of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine and 2-thiouridine(s) into RNA sequences.

Leszczynska G., Pieta J., Leonczak P., Tomaszewska A., Malkiewicz A., *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 1214-1217; IF₂₀₁₂ = 2.397.

H2. mt-tRNA components: synthesis of (2-thio)uridines modified with blocked glycine / taurine moieties at C-5,1.

Leszczynska G.,* Leonczak P., Dziergowska A., Malkiewicz A. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2013**, 32, 599-616; IF₂₀₁₃ = 0.894.

H3. Site-selected incorporation of 5-carboxymethylaminomethyl(-2-thio)uridine into RNA sequences by phosphoramidite chemistry.

Leszczynska G.,* Pięta J., Wozniak K., Malkiewicz A. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12, 1052-1056; IF₂₀₁₄ = 3.562.

H4. Chemical synthesis of the 5-aurinomethyl(-2-thio)uridine modified anticodon arm of the human mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} and tRNA^{Lys}.

Leszczynska G.,* Leonczak P., Wozniak K., Malkiewicz A. *RNA*, **2014**; 20, 938-947; IF₂₀₁₄ = 4.940.

H5. Synthesis of various substituted 5-methyluridines (xm⁵U) and 2-thiouridines (xm⁵s²U) via nucleophilic substitution of 5-pivaloyloxymethyluridine/2-thiouridine.

Bartosik K., **Leszczynska G.*** *Tetrahedron Lett.*, **2015**, 56, 6593-6597; IF₂₀₁₅ = 2.347.

H6. S-Geranylated 2-thiouridines of bacterial tRNAs: chemical synthesis and physicochemical properties.

Leszczynska G.,* Sadowska K., Bartos P., Nawrot B., Sochacka E., *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 3482-3485; IF₂₀₁₆ = 2.834.

H7. S-Geranyl-2-thiouridine wobble nucleosides of bacterial tRNAs; chemical and enzymatic synthesis of S-geranylated-RNAs and their physicochemical characterization.

Sierant M.,** **Leszczyńska G.**,** Sadowska K., Dziergowska A., Rozanski M., Sochacka E., Nawrot B. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 10986-10998; IF₂₀₁₆ = 10.162.

H8. Post-synthetic conversion of 5-pivaloyloxymethyluridine present in a support-bound RNA oligomer into biologically relevant derivatives of 5-methyluridine.

Bartosik K., Sochacka E., **Leszczyńska G.*** *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, *15*, 2097-2103. IF₂₀₁₇ = 3.564.

H9. Reaction of S-geranyl-2-thiouracil modified oligonucleotides with alkyl amines leads to the N2-alkyl isocytosine derivatives.

Leszczyńska G.,* Sadowska K., Sierant M., Sobczak M., Nawrot B., Sochacka E. *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, *15*, 5332-5336. IF₂₀₁₇ = 3.564.

H10. Sposób wytwarzania oligorybonukleotydów zawierających 5-taurynometylourydynę lub 5-taurynometylo-2-tiourydynę oraz hipermodyfikowanych jednostek monomerycznych do syntezy tych oligorybonukleotydów.

Małkiewicz A, Leonczak P., **Leszczyńska G.**, Dziergowska A., Patent Polski, PL 218817 B1, opublikowany 30.01.2015, numer zgłoszenia 399290 z dnia 24.05.2012.

H11. Nucleoside modifications in the regulation of gene expression: focus on tRNA.

Duechler M., **Leszczyńska G.**, Sochacka E., Nawrot B. *Cell Mol Life Sci.* **2016**, *73*, 3075-3095; IF₂₀₁₆ = 5.694.

Sumaryczny impact factor 10 publikacji: 35.958

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

I. PRZEDMOWA

Zaprezentowany cykl dziewięciu oryginalnych publikacji (**H1-H9**) oraz jednego patentu krajowego (**H10**) z zakresu chemii dotyczy kompleksowego opracowania syntez modelowych fragmentów RNA, zawierających urydyny modyfikowane w pozycji C5 i/lub C2 zasady heterocyklicznej. Zakres przedstawionych badań obejmuje w głównej mierze pochodne 5-aminometylourydyny (w skrócie xnm⁵U), 5-aminometylo-2-tiourydyny (xnm⁵s²U) oraz S-geranylo-2-tiourydyny (ges²U). Sekwencje syntetycznych oligorybonukleotydów w większości odpowiadają strukturze ramienia antykodonu cytozolowych lub mitochondrialnych (mt) cząsteczek tRNA, w których wymienione urydyny zajmują pozycję odpowiadającą ich naturalnej lokalizacji w cząsteczkach tRNA/mt-tRNA, jaką jest pierwsza litera antykodonu (tzw. pozycja wahadłowa, pozycja 34 wg numeracji od 5'-końca tRNA). Istotnym efektem wspomnianych prac syntetycznych było opracowanie nowej procedury preparatyki kilkunastu urydyn i 2-tiourydyn zawierających w położeniu C5 – zróżnicowany pod względem struktury - podstawnik typu aminometylowego (xnm⁵). Zakres badań

obejmował ponadto syntezę oraz określenie właściwości fizykochemicznych odkrytych w ostatnim czasie, wahadłowych 5-aminometylo-5-geranylo-2-tiourydyn ($xm_n^5ges^2U$) oraz oligomerów RNA i DNA modyfikowanych 5-geranylo-2-tiouracylem. Do cyklu dziesięciu publikacji dołączony został artykuł przeglądowy (**H11**), opisujący wpływ modyfikowanych rybonukleozydów na aktywność biologiczną cząsteczek tRNA/mt-tRNA.

II. WSTĘP

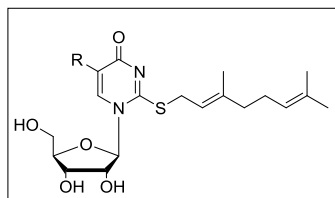
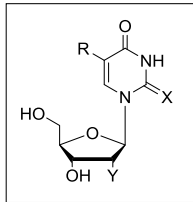
Znaczenie biologiczne 5-podstawionych urydyn i 2-tiourydyn zlokalizowanych w pozycji wahadłowej cząsteczek tRNA/mt-tRNA

Cechą charakterystyczną budowy wszystkich rodzajów kwasów rybonukleinowych (RNA) jest występowanie w ich sekwencjach licznych post-transkrypcyjnie modyfikowanych rybonukleozydów. W chwili obecnej znanych jest blisko 150 naturalnych modyfikacji RNA, z których ponad 100 zostało zidentyfikowanych w transferowych kwasach rybonukleinowych (tRNA) [Cantara i in., 2011; Machnicka i in. 2014, Boccaletto i in. 2017]. Liczba modyfikowanych jednostek może sięgać nawet 23% ogólnej liczby nukleozydów w cząsteczce tRNA [Machnicka i in. 2014], a ich rola biologiczna uzależniona jest zarówno od typu modyfikacji jak i lokalizacji modyfikowanej jednostki w sekwencji tRNA [**H11**, Bjork & Hagervall, 2014]. Prowadzone na przestrzeni ostatnich 30 lat badania nad określeniem zależności pomiędzy obecnością modyfikowanych jednostek a aktywnością biologiczną tRNA/mt-tRNA pozwalają sformułować ich znaczenie w kilku podstawowych kategoriach: stabilizowanie struktury drugo- i trzeciorzędowej tRNA [Motorin & Helm, 2010], modulowanie oddziaływań tRNA z innymi makrocząsteczkami (m.in. z syntetazami aminoacylo-tRNA, czynnikami translacji, enzymami modyfikującymi tRNA) [Giege & Lapinte, 2009] oraz regulacja właściwości dekodujących tRNA [Yokoyama & Nishimura, 1998; Manickam i in., 2016]. Należy podkreślić, że brak odpowiednio zmodyfikowanych, a tym samym prawidłowo funkcjonujących cząsteczek tRNA/mt-tRNA w komórkach ludzkich jest przyczyną poważnych chorób, takich jak nowotwory, cukrzyca typu 2 (T2D), choroby neurodegeneracyjne czy mitochondriopatie [Torres i in., 2014; Bednářová i in., 2017]. W ostatnich latach zaobserwowano, że warunki komórkowe, takie jak stres oksydacyjny dynamizują proces modyfikacji rybonukleozydów tRNA [Yi & Pan, 2011; Dedon & Begley, 2014]. Prowadzone w tym zakresie badania pozwalają wyciągnąć wnioski, że system modyfikacji tRNA, będący w tym przypadku odpowiedzią na stres komórkowy, jest elementem regulacji procesu translacji umożliwiającym przetrwanie komórki w nowych warunkach.

Szczególnie dużo uwagi poświęcono badaniom nad wpływem modyfikowanych nukleozydów tRNA/mt-tRNA na poprawność odczytu informacji genetycznej oraz efektywność biosyntezy białek [**H11**]. Najistotniejsze w tym względzie są badania nad rolą modyfikowanych nukleozydów zlokalizowanych w pozycji odpowiadającej pierwszej literze antykodonu (tzw. pozycji wahadłowej, pozycji 34 wg numeracji tRNA), które bezpośrednio uczestniczą w rozpoznaniu antykodon(tRNA)-kodon(mRNA) w procesie biosyntezy białek [**H11**; Agris i in., 2007; Agris 2008]. Rola wahadłowych nukleozydów tRNA może przejawiać się na kilka sposobów: zwiększanie stabilności rybosomalnego kompleksu mRNA-tRNA poprzez aranżację odpowiedniej konformacji pętli antykodonu (często ze wspomagającym udziałem modyfikowanej jednostki zlokalizowanej w pozycji 37, sąsiadującej z antykodonem

od 3'-końca) [Agris, 2008; Sundaram i in., 2000a, Manickam i in. 2016], utrzymanie poprawnej ramki odczytu [Urbonavicius i in., 2001; Dumelin i in. 2012], zwiększenie efektywności wiązania tRNA do rybosomu [Ashraf i in., 1999, 2000; Vendeix i in., 2008], dyskryminację/regulację rozpoznania trzeciej litery kodonu [Agris i in., 2007; Murphy i in., 2004; Näsvall i in., 2007], udział w procesie translukacji peptydylo-tRNA z miejsca A do miejsca P rybosomu [Phelps i in., 2004] oraz zwiększenie szybkości aminoacylowania [Rodriguez-Hernandez i in., 2013]. Wszystkie te czynniki determinują wysoką efektywność i/lub dokładność procesu translacji odzwierciedloną faktem pojawiania się jednego błędu na 10^3 - 10^4 wbudowywanych aminokwasów [Kurland i in., 1996]. W tym kontekście uzasadniona wydaje się różnorodność modyfikacji w jakie Natura wyposażyła wahadłowe nukleozydy tRNA.

Największą grupę wahadłowych nukleozydów stanowią pochodne urydyny modyfikowane w pozycji C5 i/lub C2 zasady nukleinowej (Rys.1, Tabela 1) [Machnicka i in. 2014]. Ze względu na rodzaj podstawnika w pozycji C5, wahadłowe urydyny można podzielić na dwie grupy: *i/* urydyny zawierające atom tlenu bezpośrednio związany z C5 uracylu (pochodne 5-hydroksurydyny); *ii/* urydyny zawierające metylenowy atom węgla bezpośrednio związany z C5 uracylu (pochodne 5-metylourydyny i 5-metylo-2-tiourydyny). Wśród tych ostatnich, znaczącą grupę stanowią 5-aminometylourydyny (xnm^5U) oraz ich analogi siarkowe (xnm^5s^2U), selenowe (xnm^5se^2U) oraz *S*-geranylowe (xnm^5ges^2U) [Machnicka i in., 2014].



s^2U (R=H, X=S, Y=OH),	2-tiourydyna
mcm^5U (R=CH ₂ COOCH ₃ , X=O, Y=OH),	5-metoksykarbonylometylourydyna
mcm^5Um (R=CH ₂ COOCH ₃ , X=O, Y=OMe),	2'-O-metylo-5-metoksykarbonylometylourydyna
ncm^5U (R=CH ₂ CONH ₂ , X=O, Y=OH),	5-karbamoiplometylourydyna
cm^5U (R=CH ₂ COOH, X=O, Y=OH),	5-karboksymetylourydyna
mnm^5U (R=CH ₂ NHCH ₃ , X=O, Y=OH),	5-metyloaminometylourydyna
mnm^5s^2U (R=CH ₂ NHCH ₃ , X=S, Y=OH),	5-metyloaminometylo-2-tiourydyna
mnm^5se^2U (R=CH ₂ NHCH ₃ , X=Se, Y=OH),	5-metyloaminometylo-2-selenourydyna
$cmnm^5U$ (R=CH ₂ NHCH ₂ COOH, X=O, Y=OH),	5-karboksymetyloaminometylourydyna
$cmnm^5Um$ (R=CH ₂ NHCH ₂ COOH, X=O, Y=OMe),	2'-O-metylo-5-karboksymetyloaminometylourydyna
$cmnm^5s^2U$ (R=CH ₂ NHCH ₂ COOH, X=S, Y=OH),	5-karboksymetyloaminometylo-2-tiourydyna
$cmnm^5se^2U$ (R=CH ₂ NHCH ₂ COOH, X=Se, Y=OH),	5-karboksymetyloaminometylo-2-selenourydyna
τm^5U (R=CH ₂ NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ H, X=O, Y=OH),	5-taurynometylourydyna
τm^5s^2U (R=CH ₂ NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ H, X=S, Y=OH),	5-taurynometylo-2-tiourydyna
inm^5U (R=CH ₂ NHCH ₂ CH=CMe ₂ , X=O, Y=OH),	5-izopentenyloaminometylourydyna
inm^5Um (R=CH ₂ NHCH ₂ CH=CMe ₂ , X=O, Y=OMe),	2'-O-metylo-5-izopentenyloaminometylourydyna
inm^5s^2U (R=CH ₂ NHCH ₂ CH=CMe ₂ , X=S, Y=OH),	5-izopentenyloaminometylo-2-tiourydyna
cnm^5U (R=CH ₂ CN, X=O, Y=OH),	5-cyjanometylourydyna
mo^5U (R=OCH ₃ , X=O, Y=OH),	5-metoksyurydyna
cmo^5U (R=OCH ₂ COOH, X=O, Y=OH),	5-karboksymetoksyurydyna
mnm^5ges^2U (R=CH ₂ NHCH ₃),	5-metyloaminometylo- <i>S</i> -geranylo-2-tiourydyna
$cmnm^5ges^2U$ (R=CH ₂ NHCH ₂ COOH),	5-karboksymetyloaminometylo- <i>S</i> -geranylo-2-tiourydyna

Rys.1. Struktury chemiczne modyfikowanych urydyn w pozycji wahadłowej zidentyfikowane w sekwencjach tRNA/mt-tRNA; kolorem niebieskim zostały wyróżnione 5-aminometylourydyny oraz ich 2-tio, 2-selenu i *S*-geranylo-2-tio analogi.

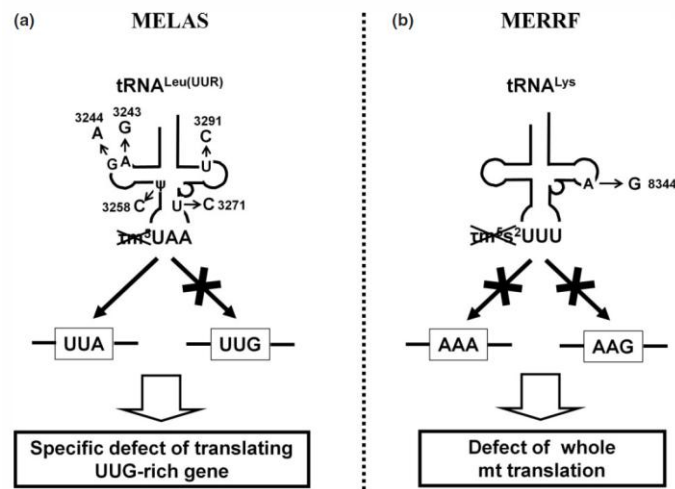
Tabela 1. Dystrybucja modyfikowanych urydyn w pozycji wahadłowej cząsteczek tRNA pochodzących z różnych filogenetycznie grup organizmów. Sporządzone na podstawie bazy Modomics [http://modomics.genesilico.pl] oraz Machnicka i in. 2014.

Pochodzenie tRNA	Modyfikowane urydyny w pozycji wahadłowej
Bakterie gram ujemne, głównie <i>E.coli</i>	cmnm ⁵ Um, mnm ⁵ U, mnm ⁵ s ² U, cmnm ⁵ s ² U, mnm ⁵ ges ² U, cmnm ⁵ ges ² U, mnm ⁵ se ² U, cmnm ⁵ se ² U, cmo ⁵ U, inm ⁵ U, inm ⁵ Um, inm ⁵ s ² U
Bakterie gram dodatnie, głównie <i>Bacillus</i> i <i>Mycoplasma</i>	cmnm ⁵ Um, cmnm ⁵ U, cmnm ⁵ s ² U, mo ⁵ U
Grzyby i zwierzęta-cytozol, głównie <i>S. cerevisiae</i>	Um, cmnm ⁵ Um, ncm ⁵ U, mcm ⁵ U, s ² U, mcm ⁵ s ² U, mchm ⁵ U, chm ⁵ U
Rośliny zielone – cytozol, głównie <i>Lupinus luteus</i>	Um, ncm ⁵ U
Mitochondria, głównie <i>Bos taurus</i>	cmnm ⁵ U, cmnm ⁵ s ² U, tm ⁵ U, tm ⁵ s ² U
Plastydy, głównie <i>Spinacia oleacea</i>	Um, cmnm ⁵ U, mnm ⁵ s ² U
Euryarchaeota, głównie <i>Halobacteria</i>	ncm ⁵ U, mo ⁵ U

Cechą wspólną wszystkich 5-aminometylowych analogów urydyny jest ich występowanie w cząsteczkach tRNA/mt-tRNA wykazujących restrykcję odczytu do dwóch synonimowych kodonów zakończonych puryną NNA/NNG. Co ważne kodony te należą wyłącznie do grupy kodonów słabych (ang. *weak codons*) AAA/AAG (Lys), UUA/UUG (Leu) bądź przejściowych (ang. *intermediate codons*) GAA/GAG (Glu), CAA/CAG (Gln), AGA/AGG (Arg) i UGA/UGG (Trp w mitochondriach) [Grosjean & Westhof, 2016, Armengod i in., 2014, Suzuki & Suzuki, 2014], których sekwencje uniemożliwiają utworzenie silnych oddziaływań pomiędzy dwiema pierwszymi parami zasad minihelisy kodon-antykodon. Wzmocnienie tych oddziaływań uzyskuje się poprzez modyfikacje urydyn/2-tiourydyn w pozycji wahadłowej podstawnikiem 5-aminometylowym (xnm) [Manickam i in., 2016, Urbonavicius i in., 2001; Dumelin i in., 2012, Rozov i in., 2016]. Skutkiem tego jest polepszenie precyzji odczytu informacji genetycznej oraz podwyższenie efektywności biosyntezy białek. Istotnie, analiza dostępnej w bazie danych puli tRNA^{Lys} rozpoznających słabe kodony pokazuje, że wszystkie z nich posiadają w pozycji wahadłowej 5-podstawione urydyny/2-tiourydy, a wśród nich ponad 80% to 5-aminometylourydy [www.modomics.genesilico.pl]. Poza wpływem 5-aminometylourydyn na zwiększenie stabilności minihelisy kodon-antykodon, uważa się, że ich obecność w pozycji wahadłowej zapobiega pomyłkowemu odczytowi dwóch kodonów NNU i NNC, znajdujących się w tym samym co NNA i NNG boksie kodonów, lecz kodujących inny aminokwas [Suzuki & Suzuki, 2014].

Wpływ 5-aminometylourydyn na efektywność dekodowania informacji genetycznej demonstruje się szczególnie silnie w przypadku mitochondrialnych cząsteczek tRNA. Odkryto, że brak 5-taurynometylourydyny (tm⁵U) i 5-taurynometylo-2-tiourydyny (tm⁵s²U) w pozycji wahadłowej odpowiednio, mt-tRNA^{Leu} i mt-tRNA^{Lys} z człowieka (efekt mutacji mt-DNA), powoduje dramatyczne obniżenie efektywności odczytu kodonu NNG lub obu synonimowych kodonów NNA/NNG (Rys. 3) [Suzuki i in., 2011]. Wykazano, że bezpośrednią konsekwencją zaburzeń w procesie dekodowania jest obniżenie efektywności syntezy białek łańcucha oddechowego, spadek aktywności oddechowej mitochondriów a ostatecznie, pojawienie się symptomów chorobowych o charakterze mitochondriopatii, określanych w skrócie jako MELAS, MERRF [Suzuki i in., 2011; Torres i in., 2014; Kirino & Suzuki, 2008]. Podobne defekty procesu translacji zaobserwowano w mitochondriach komórek innych ssaków zawierających tm⁵-modyfikowane mt-tRNA^{Leu,Lys} oraz drożdży, gdzie w pozycji wahadłowej mt-tRNA^{Leu} i mt-tRNA^{Lys} występują, odpowiednio 5-karboksymetylo-

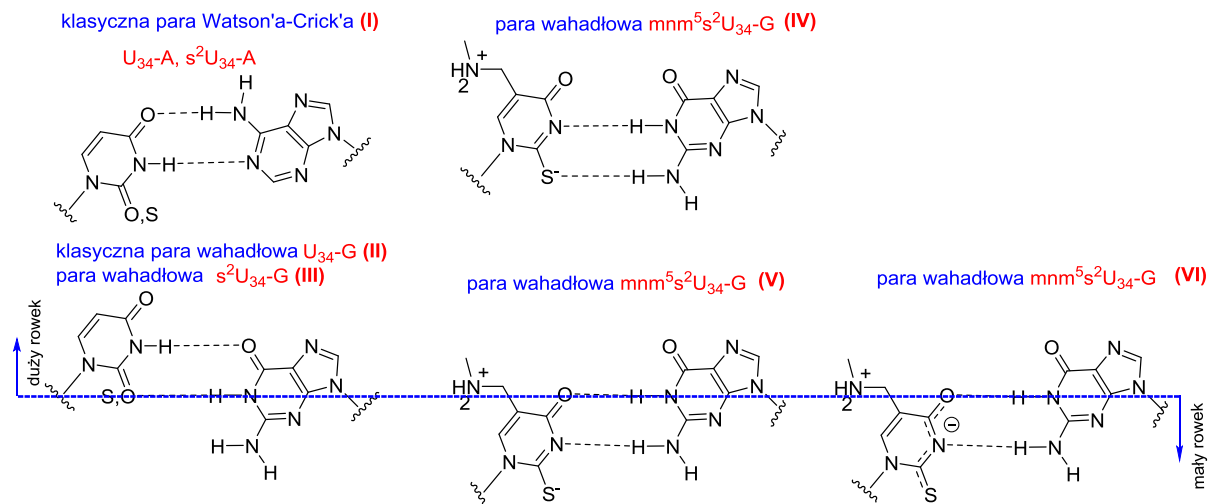
aminometylourydyna (cmnm⁵U) i 5-karboksymetyloaminometylo-2-tiourydyna (cmnm⁵s²U) [Wang i in., 2010]. Te ostatnie wydają się użytecznymi modelami do opracowania metod leczenia/diagnostyki chorób mitochondrialnych, ze względu na ich wysoką homologię z cząsteczkami tRNA^{Lys,Leu} występującymi u człowieka, tak pod względem sekwencji domeny ramienia antykodonowego jak i miejsc występowania patogennych mutacji [Montanari i in., 2012; Sepuri i in., 2012; Karicheva i in., 2011; Feuermann i in., 2003; Rohou i in., 2001]. Brak dostępu do modelowych oligomerów mt-tRNA zawierających tm⁵- i cmnm⁵-modyfikowane urydyny i 2-tiourydyny znacząco ogranicza podjęcie systematycznych badań nad określeniem molekularnych przyczyn zahamowania procesu translacji białek łańcucha oddechowego, patogenezy ludzkich chorób mitochondrialnych oraz opracowaniem metod ich leczenia i diagnostyki.



Rys.3. Defekty procesu translacji prowadzące do pojawienia się chorób mitochondrialnych MELAS (a) i MERRF (b), wg. Suzuki i in., 2011.

Zaobserwowana w badaniach biologicznych tendencja 5-aminometylourydyn i 2-tiourydyn do prawie równorzędnego rozpoznawania dwóch kodonów NNA i NNG [Krüger i in., 1998; Hagervall i in., 1998], w badaniach strukturalnych została potwierdzona stosunkowo niedawno [Rozov i in., 2016]. Pierwsze prace strukturalne nad określeniem wpływu 2-tiourydyny (s²U) na stabilność dupleksów RNA wykazały, że zastąpienie U→s²U powoduje wzmocnienie oddziaływań wyłącznie w obrębie klasycznej pary Watson'a-Crick'a s²U-A (Rys.4, model I) [Kumar & Davis, 1997; Testa i in., 1999]. W przypadku wahadłowej pary s²U-G (Rys.4, model III), znacznie słabsze wiązanie wodorowe między N1H guanozyny a atomem siarki s²U, powodowało znaczące osłabienie jej stabilności w porównaniu z klasyczną parą wahadłową U-G (Rys.4, model II). Późniejsze badania strukturalne wykazały, że urydyny/2-tiourydyny posiadające podstawnik 5-aminometylowy (xnm) potrafią efektywnie rozpoznawać guanozynę [Rozov i in. 2016; Murphy IV i in., 2004; Kurata i in., 2008], ale rodzaj oddziaływań w parze wahadłowej xnm⁵(s²)U-G jest odmienny niż w parze U-G (Rys.4, modele IV-VI) [Rozov i in. 2016]. Ważną propozycję, wyjaśniającą model oddziaływań 5-aminometylourydyn/2-tiourydyn z guanozyną przedstawili Takai i Yokoyama [Takai & Yokoyama, 2003]. Autorzy założyli, że w warunkach fizjologicznych atom azotu obecny w podstawniku bocznym xnm⁵s²U ulega uprotonowaniu, co prowadzi do „wyciągania elektronów” z pierścienia uracylu, a w rezultacie do częściowej deprotonacji N3-H. Zjonizowana forma xnm⁵s²U z uprotonowaną grupą aminoalkilową oraz ładunkiem

ujemnym zlokalizowanym na atomie S2 jest w stanie utworzyć wahadłową parę z G przez dwa wiązania wodorowe (Rys. 4, model IV, V). Model deprotonacji N3-H został potwierdzony w badaniach z udziałem modelowych nukleozydów [Sochacka i in., 2017], z tym, że rezultat prac obliczeniowych wskazywał, że ładunek ujemny zwitterjonowej postaci xm^5s^2U jest zdelokalizowany w obrębie czterech wiązań O4-N3-C2-S2 (Rys.4, model VI). Badania z udziałem biologicznego modelu - kompleksu tRNA(mnm⁵s²U₃₄)-mRNA-70S rybosom w stanie krystalicznym ostatecznie potwierdziły, że mnm⁵s²U przyjmuje postać jonu obojnaczego, z ładunkiem ujemnym zlokalizowanym na atomie siarki (Rys.4, model V) [Rozov i in., 2016]. Para mnm⁵s²U-G w obu proponowanych modelach V i VI posiada odmienny rozkład miejsc akceptorowo-donorowych w pierścieniu zasady heterocyklicznej w porównaniu z klasyczną wahadłową parą U-G (model II). Efektem tego jest widoczna zmiana geometrii par mnm⁵s²U-G, w której 5-aminometylo-2-tiourydyna jest przesunięta w stronę małego rowka.



Rys.4. Modele oddziaływań w klasycznych i wahadłowych parach U₃₄-A, U₃₄-G, s²U₃₄-G oraz mnm⁵s²U₃₄-G.

Zacytowane powyżej prace oraz chemiczna różnorodność istniejących w Naturze podstawników 5-alkilometylowych xm^5 urydyn i 2-tiourydyn wskazują na potrzebę syntezy modelowych fragmentów RNA modyfikowanych wahadłowymi 5-aminometylourydynami $xm^5s^2U_{34}$ i xm^5U_{34} , które od wielu lat z powodzeniem stosuje się jako dogodne modele do badań strukturalnych w roztworze i w ciele stałym [Murphy i in., 2004; Vendeix i in., 2008; Vendeix i in., 2012; Weixlbaumer i in., 2007; Yarian i in., 2002; Phelps i in., 2004].

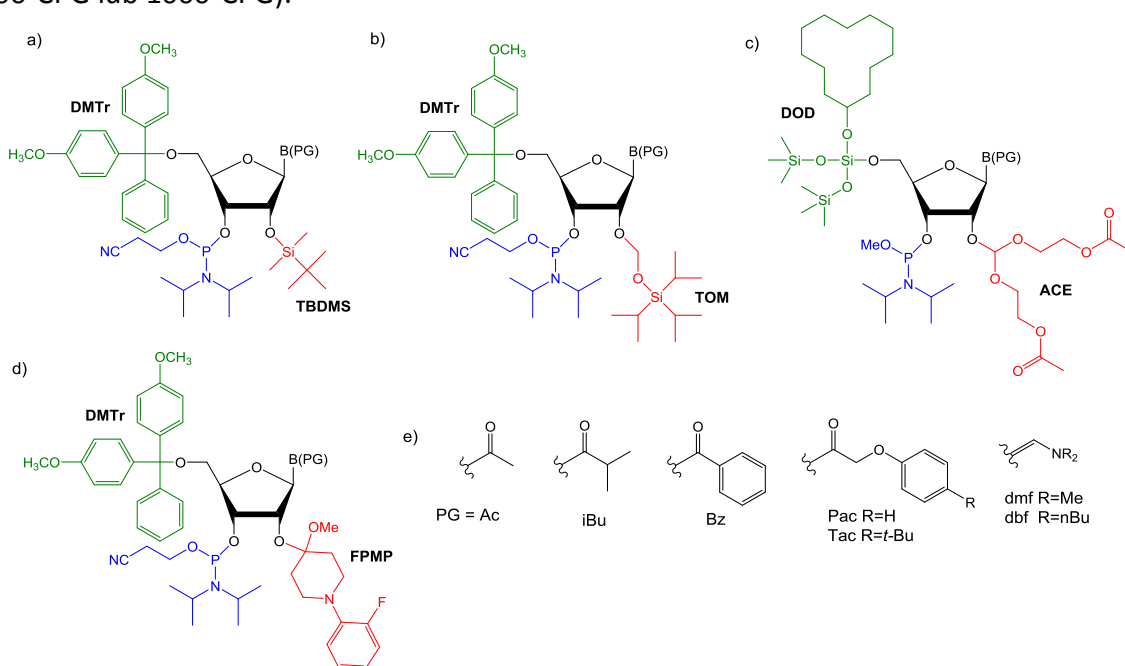
Synteza modyfikowanych oligorybonukleotydów metodą amidofosforynową na podłożu stałym

Syntezę modyfikowanych fragmentów RNA można przeprowadzić korzystając z jednej z trzech strategii: chemicznej, semi-enzymatycznej lub enzymatycznej. Wybór metody uwarunkowany jest długością łańcucha docelowego RNA, specyficznością lokalizacji modyfikowanego nukleozydu w sekwencji, rodzajem/złożonością modyfikacji oraz ilością finalnego produktu. Najszerzej stosowaną metodą pozyskiwania modyfikowanych fragmentów RNA jest synteza chemiczna. Jej zaletą jest możliwość wprowadzenia jednej lub

kilku modyfikowanych jednostek nukleozydowych w ściśle określone pozycje oligorybonukleotydu jak również możliwość przeprowadzenia syntezy w dużej skali.

W chwili obecnej najbardziej uniwersalną i najchętniej stosowaną metodą syntezy fragmentów RNA jest metoda amidofosforynowa [Matteucci & Caruthers, 1981]. Strategia ta cechuje się wysoką wydajnością tworzenia wiązania internukleotydu (98,5-99%), a także możliwością syntezy względnie długich (nawet 110-merowych) łańcuchów RNA [Shiba i in., 2007]. Na popularność metody amidofosforynowej wpłynął również fakt dostępności handlowych 3'-*O*-amidofosforynowych jednostek kanonicznych i najbardziej popularnych modyfikowanych jednostek monomerycznych. W praktyce, stosowane są cztery kombinacje zabezpieczeń grup 5'- i 2'-hydroksylowych jednostek monomerycznych: a) 5'-*O*-DMT–2'-*O*-TBDMS; b) 5'-*O*-DMT–2'-*O*-TOM; c) 5'-*O*-DOD–2'-*O*-ACE; d) 5'-*O*-DMT–2'-*O*-FPMP (Rys. 5).

W preparatyce oligomerów będących przedmiotem badań niniejszej rozprawy habilitacyjnej zastosowany został standardowy zestaw grup ochronnych jednostek monomerycznych: kwasowolabilna grupa 5'-DMTr, fluorolabilna grupa 2'-TBDMS, a w przypadku zabezpieczeń grup egzoaminowych zasad heterocyklicznych: osłony –tac (A, G, C), Ac- (C) lub -pac (A, G), które można usuwać w łagodnych warunkach alkalicznych, w stosunkowo krótkim czasie. Jako nośnik stosowane było szkło o kontrolowanej porowatości (500-CPG lub 1000-CPG).

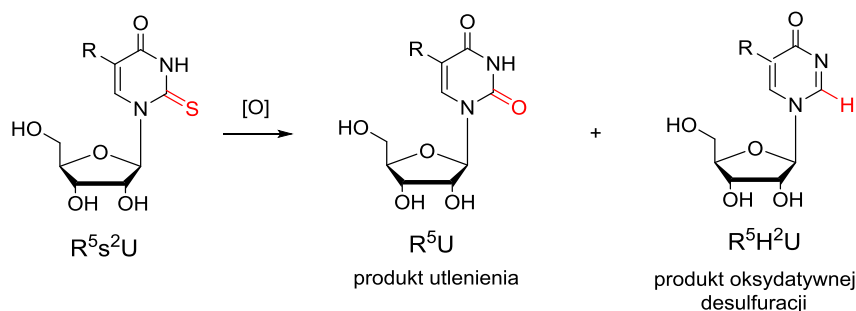


Rys. 5. Systemy grup ochronnych jednostek monomerycznych stosowanych w syntezie RNA metodą amidofosforynową na podłożu stałym: a) 5'-*O*-DMTr–2'-*O*-TBDMS–3'-*O*-(2-cyanoetylo-*N,N*-diizopropyl)amidofosforyn; b) 5'-*O*-DMTr–2'-*O*-TOM–3'-*O*-(2-cyanoetylo-*N,N*-diizopropyl)amidofosforyn; c) 5'-*O*-DOD–2'-*O*-ACE–3'-*O*-(metylo-*N,N*-diizopropyl)amidofosforyn; d) 5'-*O*-DMTr–2'-*O*-FPMP–3'-*O*-(2-cyanoetylo-*N,N*-diizopropyl)amidofosforyn; e) standardowe grupy ochronne funkcji egzoaminowych heterozasad.

Preparatyka modyfikowanych fragmentów RNA wymaga dodatkowych zabiegów syntetycznych, w szczególności jeśli docelowa modyfikacja zawiera w swojej strukturze, reaktywne w syntezie oligorybonukleotydów grupy funkcyjne tj. -OH, -NH-, -COOH, -SO₃H, -CHO. W syntezie tak modyfikowanych fragmentów RNA niezbędne jest wprowadzenie dodatkowych – czasami niestandardowych grup ochronnych na reaktywne centra modyfikowanych jednostek [Kachalova i in., 2002; **H2-H5**]. Wyselekcjonowane grupy

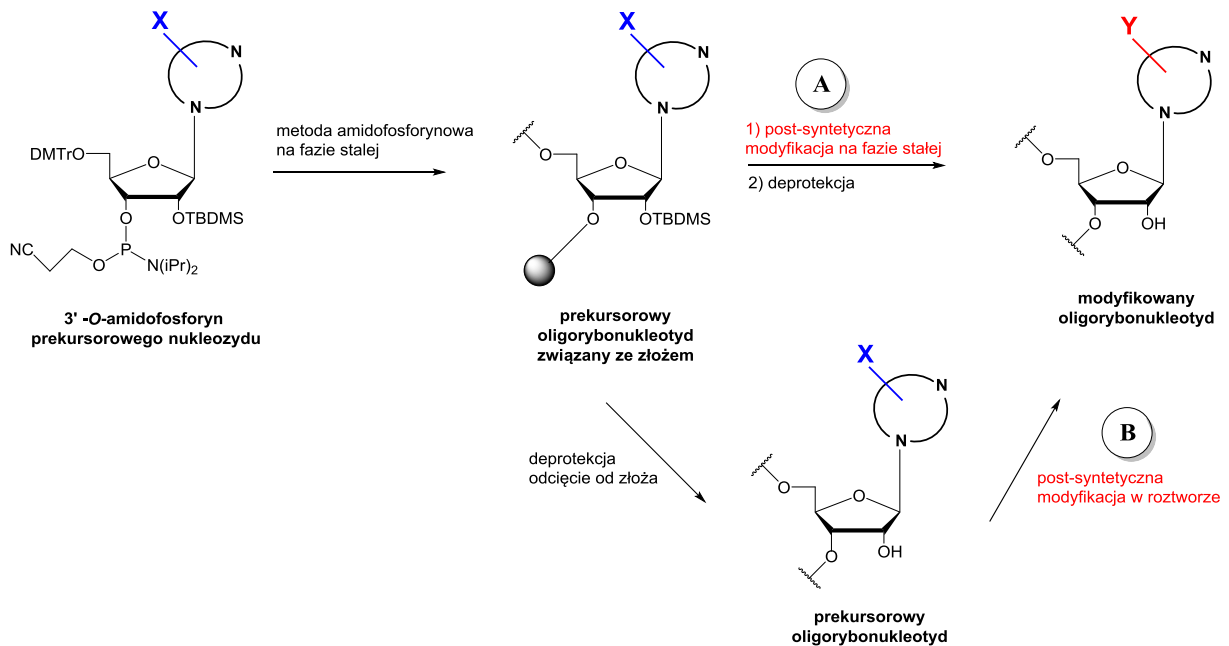
ochronne muszą być kompatybilne z osłonami jednostek kanonicznych oraz warunkami syntezy i deprotekcji oligomeru, muszą również dać się usunąć po syntezie oligomeru w warunkach bezpiecznych dla jego stabilności. Wprowadzenie dodatkowego zabezpieczenia wydłuża i komplikuje syntezę jednostki monomerycznej, często wiąże się z koniecznością zmiany procedury syntezy i/lub deprotekcji oligomeru.

W przypadku syntezy oligorybonukleotydów modyfikowanych pochodnymi 2-tiourydyny, dodatkowym problemem syntetycznym jest ryzyko desulfuracji 2-tiourydyń, polegające na przemianie $s^2 \rightarrow o^2$ (utlenienie) i/lub $s^2U \rightarrow H^2U$ (oksydatywna desulfuracja) (Schemat 1) pod wpływem czynników utleniających stosowanych w etapie utleniania fosforynu do fosforanu [Sochacka, 2001; Okamoto i in., 2006; Kumar & Davis, 1995; H1]. Proces desulfuracji, nawet jeśli jest częściowy, powoduje obniżenie wydajności pożądanego oligomeru oraz generuje problem oddzielenia $s^2Ura-RNA$, od oligomerycznych produktów dekompozycji, a w szczególności od utlenionego homologu ($Ura-RNA$). Literatura jak i badania własne pokazują, że reaktywność grupy s^2 względem odczynników utleniających zależy nie tylko od rodzaju zastosowanego utleniacza, ale również rodzaju podstawnika w pozycji C5 [Sochacka, 2001; Okamoto i in., 2006; Sundaram i in., 2000b; Eshete i in., 2007; Bartos i in., 2015]. Jak do tej pory nie znaleziono uniwersalnego systemu utleniającego, który pozwoliłby na efektywne wprowadzenie 5-podstawionych 2-tiourydyń.



Schemat 1. Desulfuracja 2-tiourydyń pod wpływem czynników utleniających stosowanych w metodzie amidofosforynowej w etapie utleniania fosforynu do fosforanu.

Alternatywną, choć zdecydowanie rzadziej stosowaną metodą syntezy modyfikowanych oligorybonukleotydów jest post-syntetyczna strategia modyfikacji RNA. W metodzie tej, nukleozyd zawierający w swojej strukturze reaktywne centrum, po włączeniu w łańcuch RNA metodą amidofosforynową poddaje się reakcji/reakcjom chemicznym z udziałem reaktywnej grupy, prowadzących do otrzymania finalnego oligonukleotydu. Post-syntetyczna modyfikacja może być prowadzona na fazie stałej, gdy prekursorowy oligorybonukleotyd jest połączony ze złożem (Schemat 2, metoda A) lub w roztworze, gdy modyfikacji poddaje się oligomer nie związany ze złożem, najczęściej w pełni odblokowany (Schemat 2, metoda B).



Schemat 2. Ogólny schemat metody post-syntetycznej modyfikacji RNA, na fazie stałej (A), w roztworze (B).

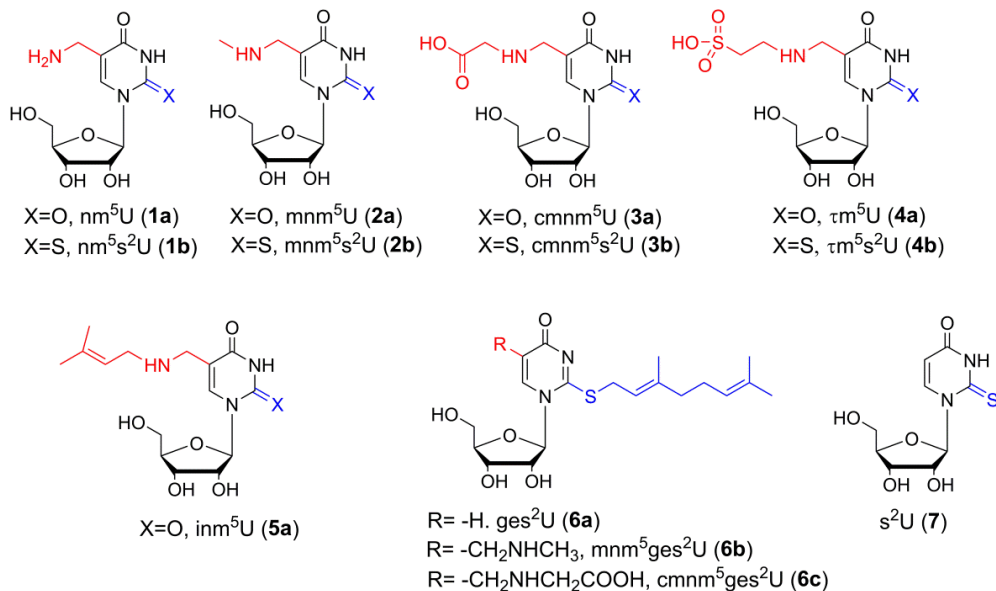
W porównaniu z metodą bezpośredniego włączania modyfikowanych nukleozydów w łańcuch RNA, zastosowanie post-syntetycznej modyfikacji ma kilka istotnych zalet: *i/* możliwość przeprowadzenia syntezy kilku sekwencyjnie homologicznych oligomerów z jednego oligomeru prekursorowego; efektem jest znaczące obniżenie kosztów syntezy ponieważ korzysta się z jednego prekursorowego amidofosforynu [Kierzek & Kierzek, 2003; Allerson i in., 1997, **H7-H9**], *ii/* uniknięcie problemu selekcji grup ochronnych w przypadku gdy docelowa modyfikacja zawiera w swojej strukturze reaktywne grupy funkcyjne [**H8**], *iii/* użyteczność w syntezie RNA zawierających nukleozydy wrażliwe lub niestabilne w warunkach syntezy metodą amidofosforynową lub w warunkach alkalicznej deprotekcji oligomeru [Avino i in., 2004; Matuszewski i in., 2017a; **H7; H9**].

Efektywność post-syntetycznej modyfikacji RNA jest uzależniona od reaktywności prekursorowego nukleozydu, który po wprowadzeniu w łańcuch RNA powinien zapewnić praktycznie stechiometryczną konwersję. Nie bez znaczenia jest również łatwy dostęp syntetyczny do prekursorowej jednostki monomerycznej i jej wydajne włączenie w łańcuch RNA metodą amidofosforynową. Ze względu na ograniczoną stabilność oligorybonukleotydów oraz hydrofilowy charakter tych cząsteczek stosunkowo niewiele reakcji organicznych może być zastosowane do post-syntetycznej modyfikacji RNA; z reguły reakcje przeprowadza się w polarnych rozpuszczalnikach, w umiarkowanych temperaturach, w czasie krótszym niż 24 godz.

III. CEL NAUKOWY PRACY

Badania stanowiące podstawę niniejszej rozprawy habilitacyjnej miały na celu opracowanie nowych metod syntezy oligorybonukleotydów zawierających biologicznie ważne 5-podstawione urydyny i 2-tiourydyny występujące w komórkowych tRNA. Ze względu na szeroką dystrybucję w cząsteczkach tRNA oraz brak metod umożliwiających ich specyficzne włączenie w łańcuch RNA, w obszarze moich zainteresowań znalazły się urydyny i 2-tiourydyny zawierające w pozycji C5 podstawnik aminometylowy (xnm⁵U i xnm⁵s²U).

Spośród 16 natywnych 5-aminometylourydyn/2-tiourydyn badaniami zostało objętych 11 z nich, o strukturze podstawnika: $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ (nm, **1a**, **1b**), $-\text{CH}_2\text{NHMe}$ (mnm, **2a**, **2b**), $-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{COOH}$ (cmnm, **3a**, **3b**), $-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ (tm, **4a**, **4b**), $-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}=\text{CMe}_2$ (inm, **5a**) oraz *S*-geranylo-2-tiourydyny **6a-6c** (Rys.4).



Rys.4. Wzory strukturalne 5-aminometylourydyn (xnm⁵U, **1a-5a**), 5-aminometylo-2-tiourydyn (xnm⁵s²U, **1b-4b**), *S*-geranylo-2-tiourydyn (xnm⁵ges²U, **6a-6c**), 2-tiourydyny (**7**).

Wszystkie wymienione pochodne urydyny są zlokalizowane w pozycji wahadłowej cytozolowych lub mitochondrialnych cząsteczek tRNA (Tabela 1), przy czym 5-aminometylourydyna (**1a**) i 5-aminometylo-2-tiourydyna (**1b**) pełnią rolę związków pośrednich w biosyntezie mnm⁵-modyfikowanych urydyn [Hagervall, 1987; Machnicka i in., 2014]. W związku z lokalizacją wahadłowych modyfikowanych urydyn/2-tiourydyn w cząsteczkach tRNA, otrzymane przeze mnie oligorybonukleotydy odpowiadały najczęściej 17-merowej sekwencji ramienia antykodonu tRNA (ASL), w której xnm⁵U/xnm⁵s²U występowały jako 8-my nukleozyd licząc od 5'-końca.

Syntezy oligomerów były realizowane w oparciu o metodę amidofosforynową na fazie stałej (CPG), jednakże obecność wysoce reaktywnych centrów w strukturach 5-aminometylourydyn **2a**, **3a**, **4a** ($-\text{NH}$ -, $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$), a dodatkowo grupy 2-tiokarbonylowej w 5-aminometylo-2-tiourydynach **2b**, **3b**, **4b** wymagała wprowadzenia znaczących zmian w standardowym protokole syntezy RNA, jak również prac badawczych nad wyselekcjonowaniem grup ochronnych i syntezą odpowiednio zabezpieczonych modyfikowanych jednostek monomerycznych. Szczególnym wyzwaniem syntetycznym było wyselekcjonowanie odpowiedniej osłony dla funkcji sulfonowej w tm⁵U/tm⁵s²U (**4a/4b**)[H4], ponieważ chemiczna synteza RNA modyfikowanych tą grupą nie była jak dotąd opisana w literaturze, a charakter chemiczny podstawnika (podobnie jak funkcji karboksylowej w cmnm⁵U/cmnm⁵s²U, **3a/3b**, [H3]) nakłada szereg ograniczeń w wyborze grupy ochronnej kompatybilnej z warunkami syntezy/deprotekcji oligomerów. Poza problemem doboru odpowiedniej grupy ochronnej, niezbędne było również wyselekcjonowanie efektywnej metody wprowadzenia - często złożonego podstawnika aminometylowego xnm w pozycję

C5 urydyny/2-tiourydyny. Biorąc pod uwagę fakt, że wszystkie 5-aminometylourydyny xnm^5U/xnm^5s^2U posiadają ten sam łącznik aminometylowy (nm) bezpośrednio związany z węglem C5, podjęte zostały próby znalezienia uniwersalnej strategii kondensacji opartej na wykorzystaniu nukleofilu azotowych [H2].

Włączanie 5-aminometylo-2-tiourydyn xnm^5s^2U w łańcuch RNA, poza wspomnianymi powyżej aspektami syntezy, dodatkowo wymagało opracowania warunków prowadzenia etapu utlenienia $P(III) \rightarrow P(V)$, które eliminowałyby proces desulfuracji ($s^2 \rightarrow o^2$ i/lub $s^2 \rightarrow H^2$) [H3, H4]. Późniejsze eksperymenty wykazały, że desulfuracja niektórych xnm^5s^2U może zachodzić również na etapie alkalicznej deprotekcji oligomerów co skutkowało koniecznością modyfikacji procedury lub rezygnacji z wybranej taktyki syntezy [H3, H4]. Szczególnie dużo wysiłku zostało włożone w opracowanie warunków syntezy mnm^5s^2U -modyfikowanych RNA [H1], ponieważ mnm^5 -podstawiona 2-tiourydyna - w szeregu wszystkich nukleozydów 2-tiopirymidynowych - wykazuje największą wrażliwość w etapie utleniania, a systemy utleniające zastosowane z powodzeniem w syntezie innych s^2Ura -RNA są nieskuteczne.

Różnorodność grup funkcyjnych w położeniu C5 wahadłowych urydyny/2-tiourydyn a jednocześnie obecność - względnie łatwego w dalszej funkcjonalizacji - podstawnika aminometylowego skłaniało do poszukiwań wspólnego prekursorowego nukleozydu dla wszystkich 5-aminometylourydyn i 2-tiourydyn, z którego można byłoby uzyskać serię xnm^5U - i xnm^5s^2U -modyfikowanych RNA w strategii post-syntetycznej modyfikacji RNA. W ramach tych badań potwierdziliśmy użyteczność 5-piwaloiloksymetylourydyny ($Pivom^5U$) - nowego prekursorowego rybonukleozydu, który po wbudowaniu w łańcuch RNA ulega szybkiej i efektywnej konwersji do xnm^5U -RNA w reakcji S_N z nukleofilami azotowymi [H8]. Zrealizowane na poziomie oligomeru transformacje $Pivom^5U \rightarrow xnm^5U$ zostały uprzednio zoptymalizowane na poziomie nukleozydu, również dla 2-tiourydyn xnm^5s^2U . Efektem tych badań było otrzymanie zestawu 10 natywnych i 10 nienatywnych 5-aminometylourydyn i 5-aminometylo-2-tiourydyn [H5].

Kolejną grupą związków, która została otrzymana w ramach prowadzonych prac były - niescharakteryzowane do tej pory - oligomery RNA modyfikowane 5-geranylo-2-tiourydyną (ges^2U_{34} , 6a) [H7]. Obecność reaktywnej wobec zasadowych nukleofilu, grupy 5-alkilowej w strukturze ges^2U , stanowiła istotny problem w syntezie RNA i wymagała przeprowadzenia badań nad doбором optymalnych warunków alkalicznej deprotekcji i odcięcia oligomeru od złoza [H7, H9]. Wyselekcjonowane warunki usuwania grup zasadowolabilnych z sukcesem zostały wykorzystane do włączenia amidofosforynu ges^2U w łańcuch RNA [H7]. Z drugiej strony, warunki reakcji geranylowania 2-tiourydyny (s^2U), prowadzone z dużą efektywnością na poziomie nukleozydu skłaniały do ich zastosowania w post-syntetycznej modyfikacji RNA, w której s^2U -RNA mógł posłużyć jako oligomer prekursorowy. Opracowanie takiej preparatyki ges^2U -RNA było korzystne ponieważ dawało możliwość otrzymania dwóch sekwencyjnie homologicznych oligomerów s^2U - i ges^2U -RNA w jednej syntezie [H7]. Oba oligomery zostały wykorzystane w badaniach nad określeniem wpływu 5-geranylowej modyfikacji na właściwości fizykochemiczne i hybrydazyjne cząsteczek tRNA [H7]. Aktualnie, oligomery s^2U - i ges^2U -RNA wykorzystywane są jako cząsteczki wzorcowe lub substraty w badaniach nad ustaleniem ścieżki biosyntezy 5-aminometyloselenourydyn (xnm^5se^2U), dla których substratami mogą być 5-aminometylo-2-tiourydyny (xnm^5s^2U) i/lub

5-aminometylo-*S*-geranylo-2-tiourydyny (xnm^5ges^2U) [Dumelin i in., 2012; Jager i in., 2017; Bartos i in., 2014].

Z uwagi na rozbieżności we właściwościach lipofilowych między zsyntezowanym przez nas ges^2U -RNA oraz raportowanym w literaturze ges^2T -DNA [Wang i in., *Chem. Commun.*, 2015], analogiczny cykl prac syntetycznych - jak w serii RNA - został przeprowadzony do otrzymania i charakterystyki ges^2dU -DNA [H9]. Efektem tych prac było określenie ryzyka pracy syntetycznej z ges^2 -modyfikowanymi oligomerami RNA i DNA w warunkach alkalicznej deprotekcji oligomerów a jednocześnie wykazanie niepoprawności protokołu deprotekcji ges^2T -DNA prezentowanego w literaturze [H9]. Analiza produktów transformacji –Sge wobec nukleofili zasadowych umożliwiła opracowanie nowej, efektywnej metody syntezy oligomerów DNA modyfikowanych izocytydyną i jej *N*-alkilowymi pochodnymi [H9].

Uzupełnieniem badań nad rolą biologiczną *S*-geranylowej modyfikacji, w połączeniu z określeniem wpływu podstawnika 5-aminometylowego, była synteza natywnych nukleozydów geranylowych: mnm^5ges^2U (6b) i $cmnm^5ges^2U$ (6c) oraz określenie ich właściwości strukturalnych i biofizycznych [H6].

W efekcie powyżej opisanych prac syntetycznych, opracowane zostały metody syntezy xnm^5U -, xnm^5s^2U - i ges^2U -modyfikowanych oligomerów, które posłużyły lub mogą posłużyć do przeprowadzenia kompleksowych badań biofizycznych, biochemicznych i strukturalnych nad wpływem wahadłowych urydyn/2-tiourydyn na aktywność biologiczną cząsteczek tRNA/mt-RNA w procesie translacji. Oligomery modyfikowane τm^5U i τm^5s^2U , których brak w pozycji wahadłowej ludzkich mt-tRNA^{Lys,Leu} rozważa się jako podstawową przyczynę mitochondriopatii MEERF i MELAS, są cennym narzędziem do określenia molekularnego mechanizmu powstawania tych chorób. Warto nadmienić, że opracowany przez nas protokół włączania τm^5s^2U w łańcuch RNA został z powodzeniem wykorzystany do syntezy 13-merów modyfikowanych pojedynczo $\tau m^5s^2U_{34}$ oraz podwójnie $\tau m^5s^2U_{34}$, t^6A_{37} , które umożliwiły zbudowanie całej cząsteczki ludzkiego mt-tRNA^{Lys} przy użyciu techniki *splint DNA ligation* (lab. prof. M. Helma) [Kurschat i in., 2005]. Aktualnie trwają prace nad określeniem synergicznego wpływu modyfikacji $\tau m^5s^2U_{34}$, t^6A_{37} oraz m^1A_9 na strukturę i stabilizację cząsteczki ludzkiego mt-tRNA^{Lys}. W badaniach nad patogenezą ludzkich chorób MELAS i MEERF dogodnymi modelami są również oligomery o sekwencji ASL^{Lys,Leu} z drożdży, modyfikowane odpowiednio $cmnm^5U_{34}$ i $cmnm^5s^2U_{34}$. Cząsteczki te wykazują wysoką homologię do ludzkich mt-tRNA^{Lys,Leu} dlatego rozważane są jako atrakcyjne modele do badań patologicznych mutacji oraz opracowania metod leczenia i diagnostyki ludzkich chorób mitochondrialnych. Poza wspomnianymi fragmentami mitochondrialnych cząsteczek tRNA, istotne znaczenie w chemii medycznej ma dostęp do modelowych fragmentów RNA modyfikowanych mnm^5s^2U . Oligomery o sekwencji ramienia antykodonu bakteryjnych tRNA z mnm^5s^2U w pozycji wahadłowej używa się do screeningu terapeutyków o działaniu przeciwbakteryjnym [patenty: Agris & Ashraf, 2002; Guenther i in., 2008] oraz do poszukiwań selektywnych inhibitorów odwrotnej transkrypcji HIV-1, z uwagi na wysoką homologię *E.coli* ASL^{Lys} z ludzkim ASL^{Lys,3} (primer odwrotnej transkryptazy wirusa HIV) [patent: Agris, 2011].

Ponad połowa zaprezentowanych osiągnięć będących podstawą rozprawy habilitacyjnej jest wynikiem pracy realizowanej w latach 2011-2015, w ramach kierowanego przeze mnie grantu *Fragmenty tRNA/mt-tRNA: synteza, wykorzystanie do modelowych badań mechanizmu translacji oraz selekcji inhibitorów replikacji patogenów (HIV-1, S.aureus)*,

przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki. Dzięki pozyskanym funduszom miałam możliwość uruchomienia pracowni do syntezy oligomerów i jej wyposażenia w sprzęt i odczynniki niezbędne do manualnej syntezy oligorybonukleotydów w dużej skali. Wiedzę i umiejętności dotyczące praktycznych aspektów manualnej syntezy RNA zdobyłam dzięki wieloletniej współpracy z prof. B. Sproatem, z którym realizowałam kilka projektów syntetycznych, m.in. syntezy znakowanych oligorybonukleotydów o sekwencji ramienia antykodonu tRNA^{Lys,3} ludzkiego modyfikowanego mcm⁵s²U₃₄, ms²t⁶A₃₇, Ψ₃₉ oraz tRNA^{Arg} z *S.aureus* modyfikowanego s²C₃₂, mnm⁵U₃₄, t⁶A₃₇. W ramach kierowanego przez siebie grantu kontynuowałam współpracę z prof. P. Agrisem, która została zapoczątkowana w latach 80-tych przez prof. A. Małkiewicza, jak również - ze względu na możliwości komercjalizacji wyników - z amerykańską firmą TRANA DISCOVERY, Inc, Cary. Pozytywne rezultaty prac nad syntezą mt-tRNA^{Lys} modyfikowanego tm⁵s²U pozwoliły nawiązać kooperację z prof. M. Helmem.

Większość prac zrealizowanych w ciągu ostatnich 3 lat jest efektem współpracy z Zakładem Chemii Bioorganicznej CBMiM Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, w ramach grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki *Biosynteza seleno-modyfikowanych nukleozydów w pętli antykodonu transferowych kwasów rybonukleinowych. Ewaluacja enzymatycznej transformacji 2-tiourydyny do 2-selenourydyny, badania funkcji i struktury tRNA selenourydyno syntazy z E. coli* (grant konsorcjum, kierownicy grantu: prof. dr hab. Barbara Nawrot i prof. dr hab. Elżbieta Sochacka). W granie tym jestem odpowiedzialna za opracowanie i przeprowadzenie syntez oligomerów modyfikowanych 5-podstawionymi 2-tiourydynami, S-geranylo-2-tiourydynami oraz 2-selenourydynami.

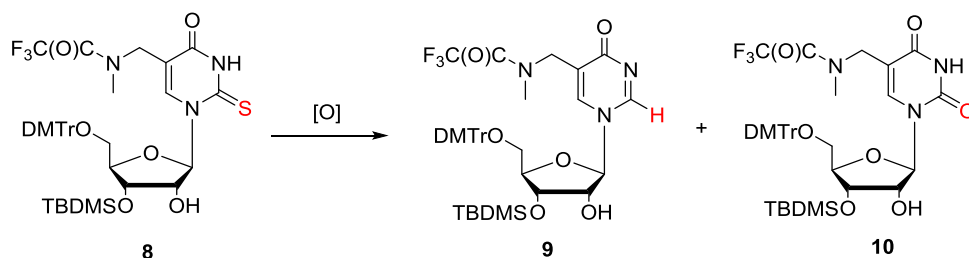
IV. Synteza oligorybonukleotydów modyfikowanych 5-metyloaminometylo-2-tiourydyną (mnm⁵s²U) i 2-tiourydyną (s²U)

Jednym z problemów syntetycznych który napotkałam w pracach nad preparatyką s²-modyfikowanych oligorybonukleotydów jest podatność grupy 2-tiokarbonylowej na utlenienie (s²→o²) i/lub oksydacyjną desulfurację (s²→H²) w warunkach jakie standardowo stosuje się w metodzie amidofosforynowej do utleniania fosforynowej formy wiązania internukleotydowego do fosforanu. Problem desulfuracji można względnie łatwo rozwiązać w syntezie oligomerów modyfikowanych 2-tiouracylem poprzez dobór odpowiedniego systemu utleniającego [Sochacka, 2001; Okamoto i in., 2006; Kumar & Davis, 1995; Testa i in., 1999; Sundaram i in., 2000b] lub poprzez zabezpieczenie funkcji N3 lub O4 2-tiouracylu [Kuimelis & Nambiar, 1994]. W praktyce, w syntezie oligonukleotydów modyfikowanych 2-tiouracylem najczęściej stosuje się 1 M tBuOOH/acetonytryl [Kumar & Davis, 1995] lub 0.02 M I₂/pirydyna-THF-woda [Okamoto i in., 2006].

Próby zastosowania wspomnianych układów utleniających do wprowadzenia w łańcuch RNA 2-tiourydyny z podstawnikiem 5-metyloaminometylowym (mnm⁵s²U) okazały się jednak nieskuteczne; prowadziły do otrzymania praktycznie wyłącznie produktu utlenienia (mnm⁵U-RNA). Fakt ten skłonił mnie do podjęcia systematycznych badań nad wyselekcjonowaniem takich warunków utlenienia, które eliminowałyby niepożądany proces desulfuracji mnm⁵s²U [H1].

Badania modelowe przeprowadziłam na poziomie nukleozydu, wykorzystując do tego celu mnm⁵s²U zawierający system zabezpieczeń identyczny jak w jednostce monomerycznej: 5'-DMTr, 3'-TBDMS, NH-COCF₃ (**8**, Schemat 3). W badaniach modelowych z udziałem związku **8** wykazałam, że układy utleniające rekomendowane w literaturze do syntezy

s^2 U-RNA (0.02 M I_2/H_2O i 1M $tBuOOH$ /acetonitryl, tu przy 20-krotnym rozcieńczeniu) [Okamoto i in., 2006; Kumar & Davis, 1995; Sundaram i in., 2000b] dają w bardzo krótkim czasie (2 minuty) znaczące ilości produktów desulfuracji. Co ciekawe, w każdym z rozważanych systemów utleniających otrzymywałam wyłącznie jeden produkt transformacji s^2 , do pirymidynonu **9**, jeśli stosowałam wodny roztwór jodu, lub do urydyny **10** jeśli reakcję prowadziłam w obecności 0.05 M $tBuOOH$ w acetonitrylu.



Schemat 3. Produkty utlenienia i oksydatywnej desulfuracji mnm^5s^2U **8**.

W celu wyselekcjonowania właściwego systemu utleniającego przeprowadziłam analizę danych teoretycznych oraz eksperymentalnych (własnych oraz prezentowanych w literaturze), z których wynikało, że: *i/* zastosowanie wodnego roztworu jodu jako czynnika utleniającego promuje proces desulfuracji mnm^5s^2U w większym stopniu niż użycie bezwodnego roztworu $tBuOOH$; *ii/* użycie niepolarnego rozpuszczalnika aprotynowego w etapie utlenienia fosforynu zmniejsza preferencję występowania s^2U w formie 2-tiolowej, która prawdopodobnie uczestniczy w mechanizmie utleniania/oksydatywnej desulfuracji 2-tiourydyn; *iii/* zastosowanie toluenu jako rozpuszczalnika w reakcjach z udziałem $tBuOOH$ zmniejsza jego degradację do reaktywnych form tlenu [Hill i in., 1983]; *iiii/* kilkukrotne rozcieńczenie utleniacza nie wpływa negatywnie na efektywność utleniania P(III)→P(V) oraz na wydajność syntezy oligomeru, natomiast sprzyja zachowaniu grupy 2-tiokarbonylowej [Okamoto i in., 2006]. Na tej podstawie wyselekcjonowałam nowy system utleniający w postaci $tBuOOH$ w bezwodnym toluenie i przetestowałam jego użyteczność w badaniach modelowych na nukleozydzie **8**, stosując roztwory o zróżnicowanym stężeniu $tBuOOH$.

Najbardziej skuteczne okazało się zastosowanie 0.25 M $tBuOOH$ w toluenie (8 equiv), umożliwiające zachowanie mnm^5s^2U **8** w ilości 90% po czasie 40 min (czas wystarczający na włączenie około 20 nukleozydów). Wykazałam, że utlenienie fosforynu do fosforanu w tych warunkach było natychmiastowe, co pozwoliło skrócić czas ekspozycji oligomeru na czynnik utleniający do 100 sec./cykl. Porównując wydajności „odzysku” substratu **8**, w modelowych reakcjach z roztworami $tBuOOH$ /toluen o różnym stężeniu wydaje się, że kluczowe dla zahamowania procesu desulfuracji mnm^5s^2U **8** było zastosowanie bezwodnego toluenu jako rozpuszczalnika, w mniejszym zaś stopniu stężenie roztworu.

Skuteczność wyselekcjonowanego czynnika utleniającego potwierdziłam w syntezie oligomeru modyfikowanego mnm^5s^2U (5'-UUUUUUU mnm^5s^2U UUUUU-3'), w którym nukleozyd 2-tiopirymidynowy był poddany 7 cyklom utlenienia. Użyteczność syntetyczną układu $tBuOOH$ /toluen wykazałam również w syntezie 17-meru o sekwencji homologicznej z *E.coli* ASL^{Glu2} (5'-CCGCCCU mnm^5s^2U mnm^5s^2U UUCm²ACGGCGG-3').

Ze względu na znaczenie aplikacyjne oligomerów modyfikowanych s^2U w chemii medycznej (strategia antysens, analiza SNP), badaniami objęłam również 2-tiourydynę. Potwierdziłam,

że zaproponowany system utleniający umożliwi efektywną syntezę oligomerów RNA modyfikowanych jedną i trzema 2-tiourydynami (5'-UUUUUUUs²UU-3' i 5'-Us²UUUs²UUUs²UU-3'). W badaniach tych, maksymalny czas ekspozycji s²U na czynnik utleniający wynosił ponad 13 minut, co umożliwiło wykonanie 8 włączeń.

Aktualnie wszystkie syntezy oligomerów modyfikowanych s²U oraz mnm⁵s²U prowadzone są w naszym Zespole z wykorzystaniem systemu utleniającego wyselekcjonowanego w tych badaniach [H7, A10].

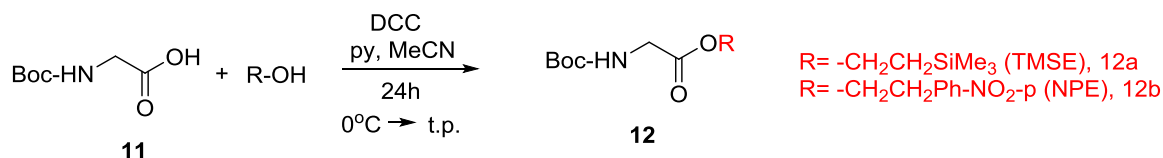
V. Synteza mitochondrialnych fragmentów tRNA modyfikowanych $\tau\text{m}^5\text{U}$, $\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$ cmnm⁵U lub cmnm⁵s²U *via* bezpośrednie włączanie modyfikowanych jednostek monomerycznych

W ramach badań stanowiących podstawę rozprawy habilitacyjnej opracowane zostały protokoły syntezy oligorybonukleotydów modyfikowanych 5-taurynometylourydynami ($\tau\text{m}^5\text{U}$, **4a**, $\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$, **4b**) [H2, H4, H10] oraz 5-karboksymetyloaminometylourydynami (cmnm⁵U, **3a**, cmnm⁵s²U, **3b**) [H2, H3]. Nukleozydy taurynowe ($\tau\text{m}^5\text{U}$, **4a** $\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$, **4b**) są jedynymi natywnymi rybonukleozydami posiadającymi w swojej strukturze grupę sulfonową. Jak dotąd zostały one chemicznie włączone metodą amidofosforynową jedynie w dimery RNA [Ogata & Wada, 2006, 2008]. W badaniach modelowych sprawdziliśmy, że zaproponowane przez autorów grupy ochronne funkcji sulfonowej (estry fenylowe podstawione w pierścieniu aromatycznym grupami elektronoakceptorowymi) są zbyt labilne by umożliwić syntezę dłuższych fragmentów RNA. 5-Karboksymetyloaminometylourydyny cmnm⁵U (**3a**) i cmnm⁵s²U (**3b**) można traktować jako strukturalne analogi 5-taurynometylourydyn, w których w miejscu tauryny występuje glicyna. Urydyny modyfikowane cmnm⁵ nie zostały – jak dotąd - wbudowane w łańcuch RNA, dlatego i w tym przypadku niezbędne było opracowanie kompleksowego protokołu syntezy modyfikowanych nimi oligorybonukleotydów.

Kluczowe dla opracowania nowych metod syntezy oligorybonukleotydów zawierających $\tau\text{m}^5\text{U}$ - i cmnm⁵-modyfikowane urydyny i 2-tiourydyny było: *i/* wyselekcjonowanie odpowiednich grup ochronnych dla funkcji sulfonowej i karboksylowej, odpowiednio τm^5 - i cmnm⁵-podstawników, *ii/* opracowanie efektywnej metody wprowadzania łańcucha bocznego w pozycję C5 urydyny i 2-tiourydyny; *iii/* ustalenie optymalnych warunków etapu utleniania fosforynu do fosforanu, w celu uniknięcia degradacji grupy s² podczas syntezy $\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$ - i cmnm⁵s²U-modyfikowanych oligomerów RNA; *iv/* dostosowanie protokołów deprotekcji oligomerów do warunków sprzyjających efektywnemu usunięciu wyselekcjonowanych grup ochronnych funkcji karboksylowej i sulfonowej.

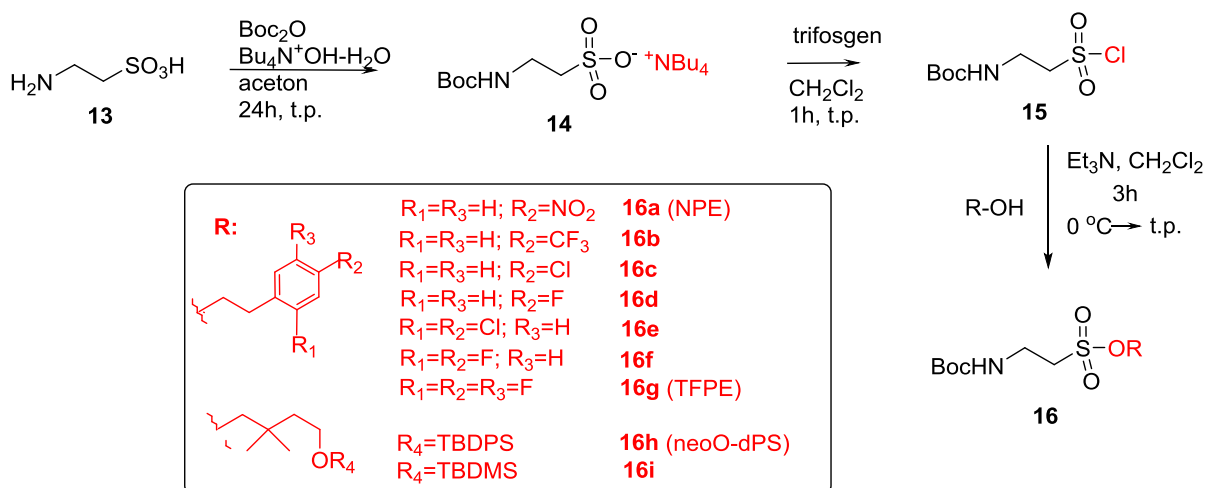
W badaniach nad selekcją grup ochronnych funkcji karboksylowej cmnm⁵U/cmnm⁵s²U przetestowaliśmy dwie osłony typu estrowego: fluorolabilną grupę 2-(trimetylosililo)etylową (TMSE) oraz zasadowolabilną grupę 2-(*p*-nitrofenilo)etylową (NPE), stosowane uprzednio do protekcji funkcji karboksylowej treoniny w syntezie t⁶A- i ms²t⁶A-modyfikowanych fragmentów RNA [Boudou i in., 2000; Sundaram i in., 2000b; Bajji & Davis, 2002; Eshete i in., 2007]. Dla wstępnego oszacowania skuteczności tych grup w syntezie cmnm⁵(s²)U-modyfikowanych oligomerów RNA, zsyntetyzowane zostały związki modelowe w postaci *N*-Boc zabezpieczonych estrów glicyny (**12a**, **12b**, Schemat 3) [H2,H4]. Estry **12a**, **12b** zostały

otrzymane standardowo, w reakcji *N*-Boc glicyny (**11**) z komercyjnie dostępnym alkoholem TMSE-OH lub NPE-OH, w obecności DCC. W badaniach modelowych z udziałem estrów glicyny **12a**, **12b** potwierdziliśmy skuteczność obu grup ochronnych NPE i TMSE w warunkach syntezy/deprotekcji oligomerów, dlatego też obie osłony zostały wykorzystane w syntezie jednostek monomerycznych cmnm^5U i $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$.



Schemat 3. Synteza *N*-Boc estrów glicyny **12a**, **12b**.

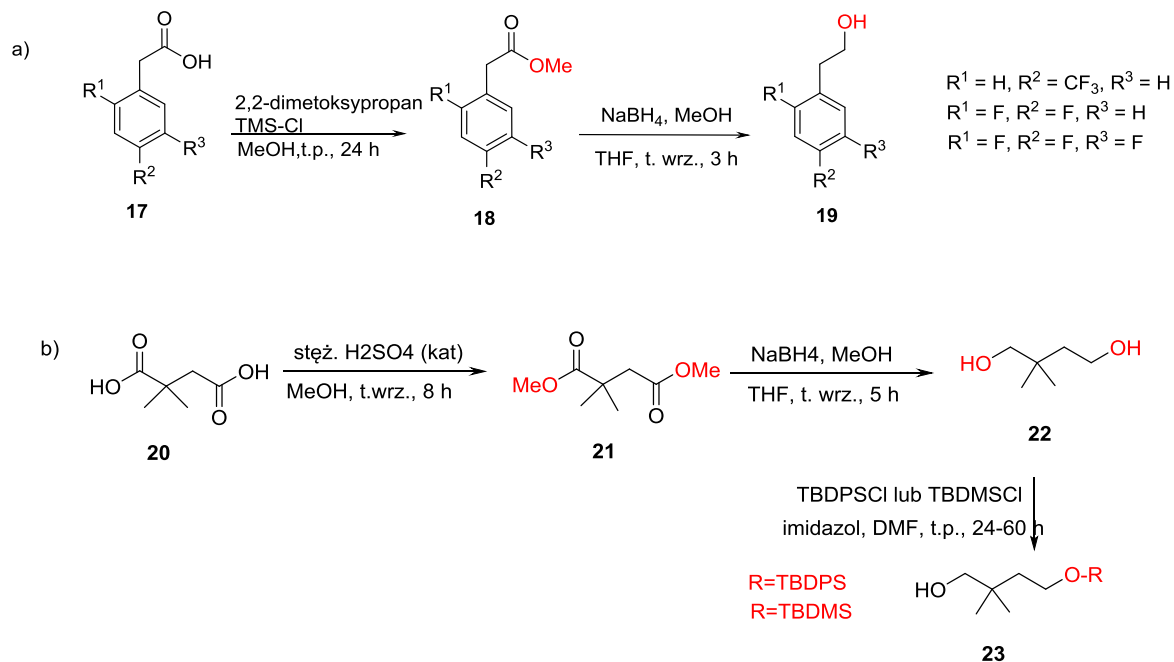
Badania nad selekcją grup ochronnych funkcji sulfonowej $\tau\text{m}^5\text{U}/\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$ miały znacząco szerszy zakres. Większość znanych w literaturze zabezpieczeń funkcji sulfonowej (głównie osłony typu estrowego) nie jest kompatybilna z warunkami syntezy i/lub deprotekcji oligorybonukleotydów [Roberts i in., 1997; Hussain i in., 2008; Yan & Müller, 2004; Wrobel i in., 2002; Avitabile i in., 2005; Klamann & Hofbauer, 1953; Ali i in., 2009; Miller, 2010; Andrianov i in., 2004] dlatego w badaniach modelowych zaproponowaliśmy użycie sprawdzonych w syntezie RNA estrowych zabezpieczeń funkcji karboksylowej NPE i TMSE oraz ich pochodnych jak również grupę 4-(*tert*-butylodifenylsilanyloksy)-2,2-dimetylobutylową, która uprzednio została wykorzystana w syntezie *N*-podstawionych pochodnych tauryny [Seeberger i in., 2007]. Ostatecznie, w badaniach wstępnych z udziałem estrów *N*-Boc tauryny (**16**, Schemat 4) przetestowaliśmy siedem osłon 2-aryloetylowych **16a-16g** – analogów NPE zawierających grupę(y) elektronoakceptorowe w pierścieniu aromatycznym ($-\text{Cl}$, F , $-\text{CF}_3$), oraz estry 4-silanyloksy-2,2-dimetylobutylowe **16h** i **16i** (estru TMSE *N*-Boc tauryny nie udało się otrzymać) [**H2**,**H4**].



Schemat 4. Synteza *N*-Boc estrów tauryny **16a-16i**.

Preparatyka estrów tauryny **16a-16i** polegała na reakcji odpowiednio sfunkcjonalizowanego alkoholu z chlorkiem sulfonylu **15** (Schemat 4), otrzymanym w reakcji soli tetrabutylamoniowej *N*-Boc tauryny (**14**) z trifosgenem [de Bont i in., 1996; Gennari i in., 1998; Truce i in., 1970]. Większość alkoholi 2-aryloetylowych, wykorzystanych w syntezie estrów tauryny była handlowo dostępna; pozostałe zostały otrzymane na drodze redukcji estrów metylowych **18** (Schemat 5a) uzyskanych z komercyjnie dostępnych kwasów **17**.

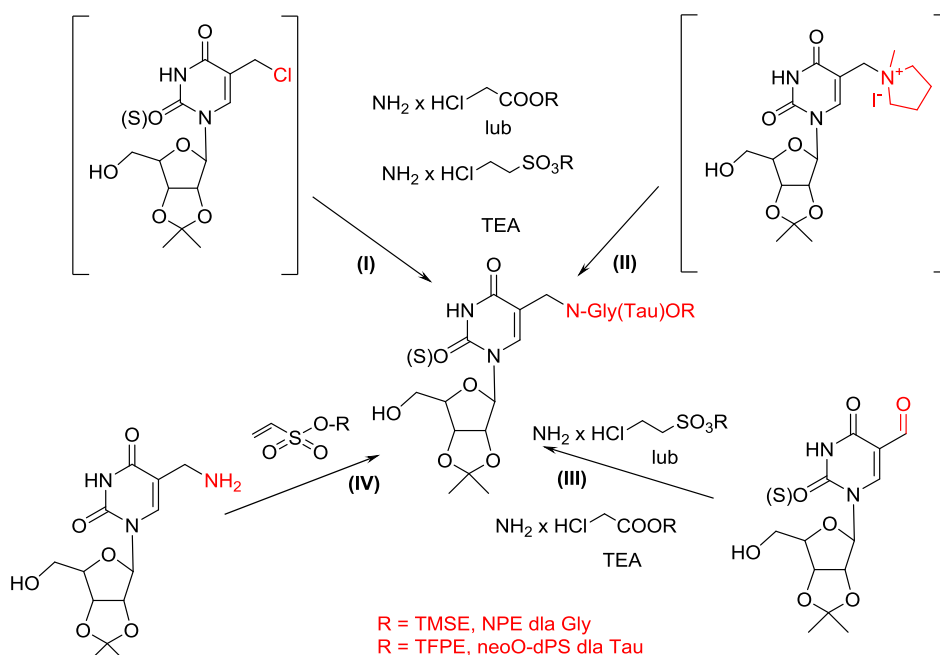
Alkohole 4-(*tert*-butylodifenylosilanyloksy)-2,2-dimetylobutyłowy i 4-(*tert*-butylodimetylosilanyloksy)-2,2-dimetylobutyłowy (**23**, Schemat 5b) zostały otrzymane z kwasu 2,2-dimetylo-1,4-dikarboksylowego (**20**) wg procedury Seebergera [Seeberger i in., 2007].



Schemat 5. Synteza alkoholi 2-aryloetylowych (a) i 4-silanyloksy-2,2-dimetylobutyłowych (b).

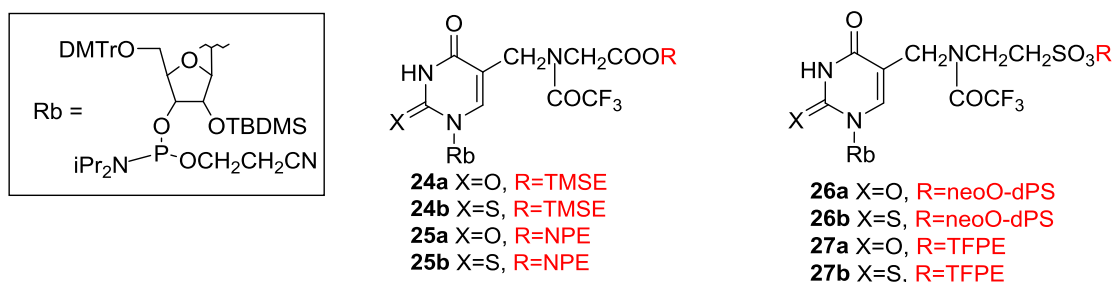
Badania stabilności estrów *N*-Boc tauryny **16a-16i** w warunkach syntezy oligomerów RNA metodą amidofosforynową oraz kontrola efektywności ich deprotekcji wykazały potencjalną użyteczność dwóch grup ochronnych: 2-(2,4,5-trifluorofenilo)etylowej (TFPE – skrót własny, **16g**) oraz 4-(*tert*-butylodifenylosilanyloksy)-2,2-dimetylobutyłowej (neoO-dPS, **16h**). Wykazaliśmy ponadto, że grupa neoO-dPS może być efektywnie usunięta nie tylko za pomocą 1 M TBAF/THF [Seeberger i in., 2007], ale również 1 M TEAF/NMP oraz TEAx3HF/NMP. Ostatecznie, obie osłony estrowe TFPE i neoO-dPS zostały użyte do zabezpieczenia funkcji sulfonowej w syntezie jednostek monomerycznych τ^5U i τ^5s^2U .

Kolejnym zagadnieniem związanym z syntezą jednostek monomerycznych τ^5U/τ^5s^2U i $cmnm^5U/cmnm^5s^2U$ było znalezienie skutecznej i wydajnej metody wprowadzenia podstawnika (fragmentu aminokwasowego) w pozycję C5 urydyny/2-tiourydyny. Na podstawie doświadczeń syntetycznych związanych z preparatyką t^6A oceniliśmy, że najbardziej skuteczną metodą będzie kondensacja odpowiednio sfunkcjonalizowanej urydyny/2-tiourydyny z zabezpieczonym aminokwasem (Gly/Tau). Przetestowaliśmy cztery drogi syntetyczne (Schemat 6) [**H2-H4**]: nukleofilowe podstawienie 5-chlorometylourydyny/2-tiourydyny (metoda I) lub czwartorzędowej soli amoniowej 5-pirolidynometylourydyny/2-tiourydyny (metoda II); redukcyjne aminowanie 5-formylourydyny/2-tiourydyny (metoda III) oraz reakcją typu addycji Michaela 5-aminometylourydyny do estru kwasu winylosulfonowego (metoda IV) (wyłącznie w syntezie τ^5U i τ^5s^2U).



Schemat 6. Warianty syntetyczne umożliwiające wprowadzenie Gly/Tau w pozycję C5 urydyny/2-tiourydyny.

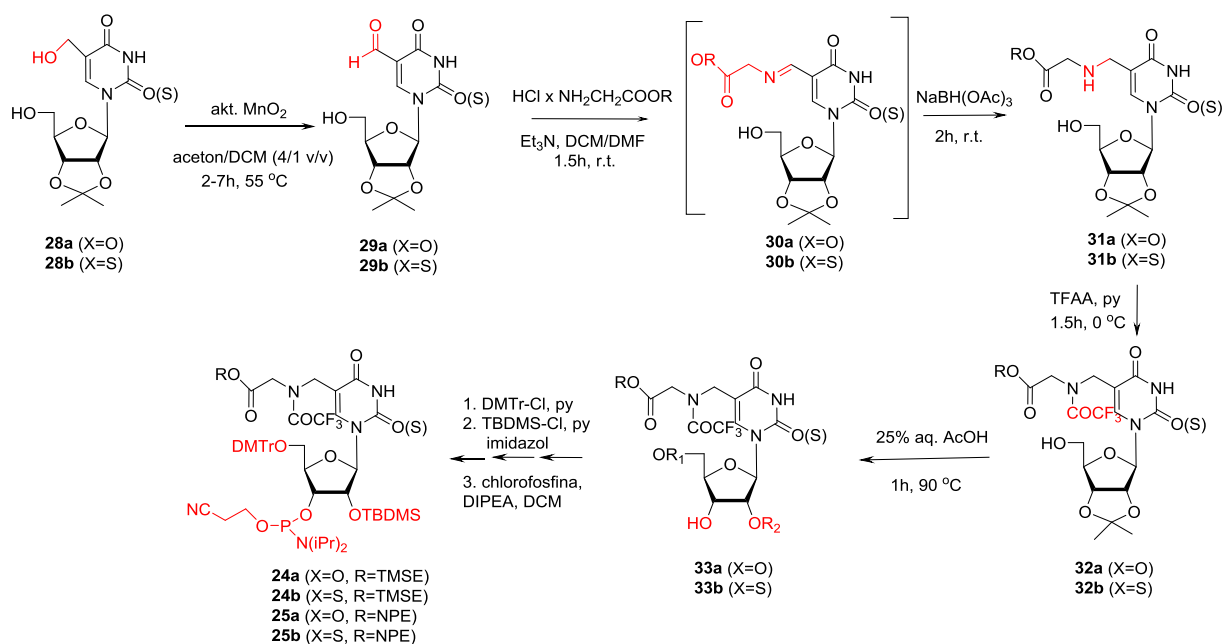
Pośród przetestowanych metod kondensacji (Schemat 6) najbardziej efektywne okazało się aminowanie redukcyjne w przypadku $\text{cmnm}^5\text{U}/\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ (w obu wariantach zabezpieczeń TMSE, NPE) [H2,H3]. Z kolei dla wprowadzenia tauryny z blokiem neoO-dPS i TFPE najbardziej korzystne było zastosowanie addycji Michaela [H2,H4]. Wymienione strategie zostały wykorzystane w preparatyce 3'-O-amidofosforynów cmnm^5U (24a, 25a), $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ (24b, 25b) oraz tm^5U (26a, 27a), $\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$ (26b, 27b), w wariantach zabezpieczeń przedstawionych na Rys. 7.



Rys.7. Strategia zabezpieczeń 3'-O-amidofosforynów cmnm^5U , $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$, tm^5U i $\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$.

Chociaż literatura zawiera wiele doniesień na temat zastosowania metody aminowania redukcyjnego w syntezie 5-alkiloaminometylo-2'-deoksyrybonukleozydów z wykorzystaniem 5-formylowanych nukleozydów i amin, niewiele wiadomo o możliwości zastosowania aminokwasów lub ich pochodnych w roli komponentów aminowych. Smuga i in. [Smuga i in., 2010] opisali transformację 5-formylo-dU do $\text{mcmnm}^5\text{-dU}$, wskazując na możliwość zastosowania estru metylowego glicyny jako użytecznego komponentu aminowego. Opierając się na tej informacji opracowaliśmy warunki reakcji aminowania redukcyjnego między 5-formylourydyną/5-formylo-2-tiourydyną oraz odpowiednio blokowanymi aminokwasami (Gly-TMSE, Gly-NPE) (Schemat 7) [H2]. Do syntezy 5-formylourydyny (f^5U , 29a) wykorzystaliśmy protokół Armstronga [Armstrong & Eckstein, 1975], nieznacznie go

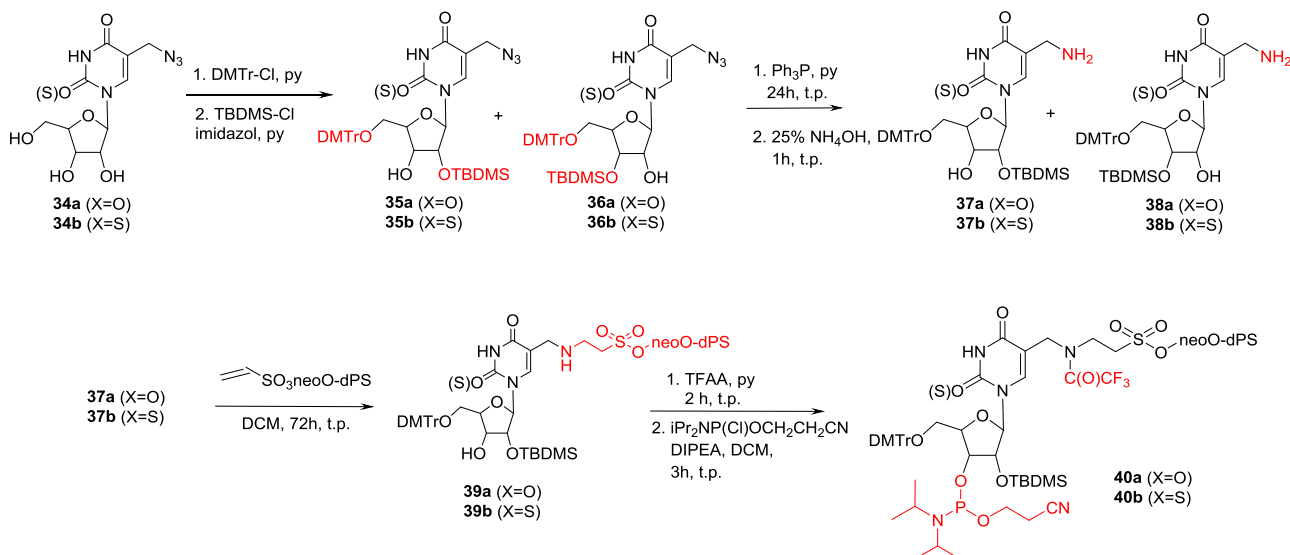
modyfikując, polegający na selektywnym utlenieniu 5-hydroksymetylourydyny (**28a**, Schemat 7) za pomocą aktywowanego tlenu manganu. Ten sam protokół utlenienia zastosowany został do otrzymania nowego syntonu: 5-formylo-2-tiourydyny (f^5s^2U , **29b**). Aminowanie redukcyjne zostało przeprowadzone dwuetapowo. W pierwszym etapie 5-formylourydyna **29a/29b** została poddana reakcji z odpowiednim estrem glicyny, a utworzona imina **30a/30b** – *in situ*, została zredukowana do aminy przy udziale łagodnego czynnika redukującego triacetoksyborowodorku sodu ($NaBH(OAc)_3$). Utworzona amina **31a/31b** została zabezpieczona grupą trifluoroacetylową, a w kolejnych reakcjach usunięcia grupy acetalowej z rybozy, trytylacji, silylacji i fosfitylacji otrzymaliśmy docelowe jednostki monomeryczne $cmnm^5U$ **24a/25a** i $cmnm^5s^2U$ **24b/25b**.



Schemat 7. Synteza 3'-O-amidofosforynów $cmnm^5U$ (**24a,25a**), $cmnm^5s^2U$ (**24b,25b**).

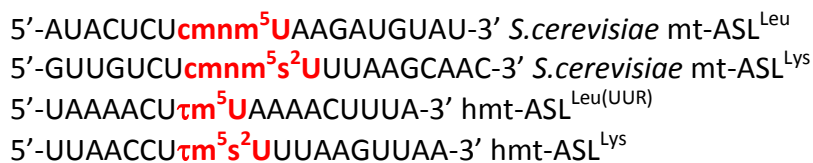
Do preparatyki amidofosforynu $\tau m^5U/\tau m^5s^2U$ zabezpieczonego neoO-dPS została zastosowana zupełnie odmienna strategia wprowadzania łańcucha bocznego w pozycję 5, mianowicie addycja Michaela 5-aminometylourydyny do estru kwasu winylosulfonowego (Schemat 8) [H4]. W początkowej fazie prac zaplanowaliśmy standardową kolejność reakcji jaką stosuje się w syntezie amidofosforynów: wprowadzenie łańcucha bocznego, następnie 5'-trytylację, 2'-silylację i fosfitylację jednakże silna zawada steryczna wokół grupy 5'-hydroksylowej, spowodowana obecnością dużego podstawnika w pozycji 5 uniemożliwiła wydajne trytylowanie. Z tego powodu zmieniliśmy strategię syntezy; 5-azydometylourydynę/2-tiourydynę **34a/34b** (prekursor 5-aminometylourydyny) zabezpieczyliśmy grupami 5'-DMTr i 2'(3')-TBDMS a następnie wprowadziliśmy podstawnik taurynowy w pozycję C5. Zgodnie ze schematem 8, mieszaninę regiomerów 2'- i 3'-TBDMS (**35a,36a** oraz **35b,36b**) otrzymaną po trytylacji i silylacji 5-azydometylourydyny **34a/34b** poddaliśmy, bez rozdzielania, reakcji z trifenylofosfiną, a następnie z amoniakiem w celu zredukowania azydków do odpowiednich amin. Po rozdzieleniu regiomerów, izomer 2'-TBDMS 5-aminometylourydyny/2-tiourydyny **37a/37b** został wykorzystany jako donor w reakcji addycji Michaela do estru neoO-dPS kwasu winylosulfonowego. Ze względu na obecność grupy aminowej w strukturze **37a/37b** i wynikającej stąd możliwości spontanicznej

izomeryzacji 2'-TBDMS \leftrightarrow 3'-TBDMS, reakcję przeprowadziliśmy w rozpuszczalniku aprotynowym (DCM zamiast standardowo używanego w tej reakcji MeOH). Związek **39a/ 39b** zabezpieczyliśmy grupą trifluoroacetylową i przeprowadziliśmy finalną reakcję fosfitylacji. W sposób analogiczny została otrzymana jednostka monomeryczna $\tau\text{m}^5\text{U}/\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$ zabezpieczona TFPE.



Schemat 8. Synteza 3'-O-amidofosforynów $\tau\text{m}^5\text{U}$ i $\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$ zabezpieczonych grupą neoO-dPS.

Odpowiednio zabezpieczone jednostki monomeryczne cmnm^5U i $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ (każda w wersji TMSE i NPE), $\tau\text{m}^5\text{U}$ i $\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$ (każda w wersji TFPE i neoO-dPS) (Rys.7) zostały wykorzystane do syntez oligorybonukleotydów o sekwencji ramienia antykodonu odpowiednio, drożdżowych oraz ludzkich mitochondrialnych tRNA specyficznych dla lizyny i leucyny (mt-ASL^{Lys,Leu}):



Syntezy zostały przeprowadzone automatycznie, w skali 1 μmola , metodą amidofosforynową, stosując 5-benzylmerkapto-1*H*-tetrazol (5-BMT) jako aktywator oraz 0.02 M I_2 w THF/ H_2O /py jako czynnik utleniający. Deprotekcja otrzymanych oligomerów została wykonana zgodnie z Tabelą 3, w oparciu o wcześniej przeprowadzone badania modelowe z udziałem estrów *N*-Boc glicyny i tauryny.

Tabela 3. Protokół deprotekcji oligomerów modyfikowanych $\text{cmnm}^5\text{U}/\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ (TMSE, NPE) oraz $\tau\text{m}^5\text{U}/\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$ (TFPE, neoO-dPS)

Etapy deprotekcji oligomeru	$\text{cmnm}^5\text{U}/\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ (TMSE)	$\text{cmnm}^5\text{U}/\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ (NPE) & $\tau\text{m}^5\text{U}/\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$ (TFPE)	$\tau\text{m}^5\text{U}/\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$ (neoO-dPS)
Usunięcie grup β -cyanoetylowych	TEA/ACN	TEA/ACN	TEA/ACN
Usunięcie NPE/TFPE	-	10% DBU/ACN	-
Usunięcie grup zasadowolabilnych i odcięcie oligomeru od złoza	8 M NH_3/EtOH	8 M NH_3/EtOH	8 M NH_3/EtOH
Usunięcie grup fluorolabilnych: TBDMS, TMSE/neoO-dPS	1 M TBAF/NMP	TEA x 3HF/NMP	TEA x 3HF/NMP lub 1 M TBAF/NMP

Na podstawie przeprowadzonych syntez cmnm^5 - i tm^5 -modyfikowanych oligomerów oraz zastosowanych protokołów deprotekcji wyciągnęliśmy następujące wnioski:

- i/ w syntezie oligorybonukleotydu modyfikowanego cmnm^5U najbardziej użyteczną osłoną funkcji karboksylowej okazała się grupa TMSE. Zastosowanie grupy ochronnej NPE było porównywalnie efektywne, jednakże biorąc pod uwagę konieczność przeprowadzenia dodatkowego etapu deprotekcji (usuwanie NPE za pomocą DBU), wykorzystanie tego zabezpieczenia wydaje się mniej atrakcyjne.
- ii/ w syntezie oligorybonukleotydu modyfikowanego $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ zarówno blok TMSE jak i NPE nie dał pożądaných rezultatów; analiza końcowych produktów wskazywała na całkowitą desulfurację $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ do analogu 2-oxo ($\text{s}^2 \rightarrow \text{o}^2$). Wykazaliśmy, że niepożądana dekompozycja zachodzi w warunkach usuwania grup ochronnych TMSE oraz NPE.
- iii/ w syntezie oligorybonukleotydu modyfikowanego tm^5U najbardziej skuteczną grupą ochronną funkcji sulfonowej okazała się grupa neoO-dPS, przy czym do jej usunięcia niezbędne było zastosowanie TEA x 3HF (użycie TBAF powodowało obniżenie wydajności oligomeru o blisko 50%). Zastosowanie bloku TFPE skutkowało otrzymaniem złożonej mieszaniny produktów, w której właściwy oligomer miał udział ~20%.
- iv/ w syntezie oligorybonukleotydu modyfikowanego $\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$ użyteczność grupy neoO-dPS okazała się ograniczona. Warunki deprotekcji - pomimo zastosowania względnie łagodnego odczynnika TEA x 3HF, dawały mieszaninę produktów $\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$ -RNA i tm^5U -RNA, w proporcji 1:1. Przy zastosowaniu bloku TFPE, poza otrzymaniem złożonej mieszaniny produktów, dodatkowo obserwowaliśmy całkowitą utratę grupy 2-tiokarbonylowej, co potwierdziło, że warunki silnie zasadowej deprotekcji estrów aryloetylowych sprzyjają desulfuracji.
- vi/ zastosowanie łagodnych warunków bezwodnych w celu usunięcia grup zasadowolabilnych -tac (8 M NH_3/EtOH) nie powoduje amonolizy estrów TMSE i neoO-dPS.

Prace optymalizacyjne nad znalezieniem warunków desililacji oligomerów modyfikowanych $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ (TMSE) i $\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$ (neoO-dPS) zostały przeprowadzone w oparciu o serię eksperymentów zróżnicowanych pod względem rodzaju i stężenia czynnika desililującego jak również rozpuszczalnika i czasu prowadzenia reakcji (protokół deprotekcji oligomeru $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ (NPE) nie został poddany optymalizacji ze względu na brak alternatywnego do DBU odczynnika umożliwiającego deprotekcję NPE, a jednocześnie na tyle łagodnego aby sprzyjał zachowaniu grupy s^2). Wynikiem eksperymentów było wyselekcjonowanie fluorku tetraetyloamoniowego jako czynnika desililującego [**H3, H4**] (1M TEAF/NMP, 24 h., t.p. oraz 1M TEAF/py, 6 h, 40 °C gdy modyfikacją towarzyszącą była t^6A (TMSE) [**B2**]). Zastosowane warunki desililacji umożliwiły zachowanie funkcji 2-tiokarbonylowej $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ i $\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$ a jednocześnie zapewniły efektywne usunięcie grup TBDMS, TMSE ($\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$) oraz neoO-dPS ($\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$).

Ostatecznie, użyteczność opracowanych warunków deprotekcji oligorybonukleotydów modyfikowanych $\text{cmnm}^5\text{U}/\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ (TMSE) oraz $\text{tm}^5\text{U}/\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$ (neoO-dPS) została potwierdzona w syntezie oligomerów mt-ASL^{Lys,Leu} (*S.cerevisiae*, human) w skali 5 μmoli [**H3, H4**], metodą manualną. W tym wariantcie syntezy, dla zwiększenia efektywności włączenia modyfikowanych jednostek monomerycznych zastąpiliśmy aktywator 5-BMT bardziej kwasowym analogiem: 5-(3,5-bis(trifluorometylo)fenylo)-1H-tetrazolem (Activator 42) oraz zastosowaliśmy podwójny *coupling* dla modyfikowanych jednostek monomerycznych.

Ze względu na potencjalną użyteczność 17-merów RNA modyfikowanych $\tau\text{m}^5\text{U}/\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$ w diagnostyce medycznej/terapii chorób mitochondrialnych MELAS/MERRF, synteza tych oligomerów jak i jednostek monomerycznych stała się przedmiotem zgłoszenia patentowego i uzyskała patent [H10].

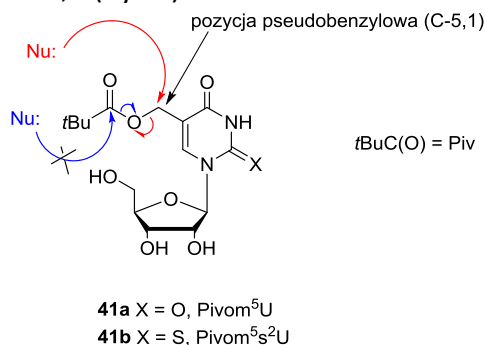
VI. Synteza oligorybonukleotydów zawierających 5-aminometylourydyny xnm^5U metodą post-syntetycznej modyfikacji RNA

Post-syntetyczna strategia modyfikacji RNA nie znalazła, jak dotąd, zastosowania w syntezie xnm^5U -oligomerów; w literaturze nie ma również wielu przykładów jej wykorzystania do syntezy oligorybonukleotydów modyfikowanych 5-podstawionymi urydynami. Wyjątek stanowi post-syntetyczna konwersja 5-jodourydyny (nukleozyd prekursorowy) do 5-alkilourydyny *via* sprzężanie Sonogashiry i Stille prowadzące do utworzenia wiązania C5-C [Wicke & Engels, 2012; Strube i in., 2001; Piton i in., 2007].

Poszukiwania efektywnej drogi syntezy oligorybonukleotydów modyfikowanych 5-aminometylourydynami xnm^5U *via* metoda post-syntetycznej modyfikacji RNA, obejmowały dwa obszary prac eksperymentalnych: *i/* na poziomie nukleozydu, gdzie metoda syntezy poszczególnych xnm^5 -modyfikowanych urydyn oraz 2-tiourydyn była optymalizowana pod względem wydajności finalnych produktów jak również warunków reakcji bezpiecznych dla stabilności oligomerów RNA [H5], *ii/* na poziomie oligomeru, gdzie ustalone dla nukleozydów warunki reakcji zostały zaadoptowane, a w przypadku mniej efektywnych konwersji zostały odpowiednio zoptymalizowane [H8].

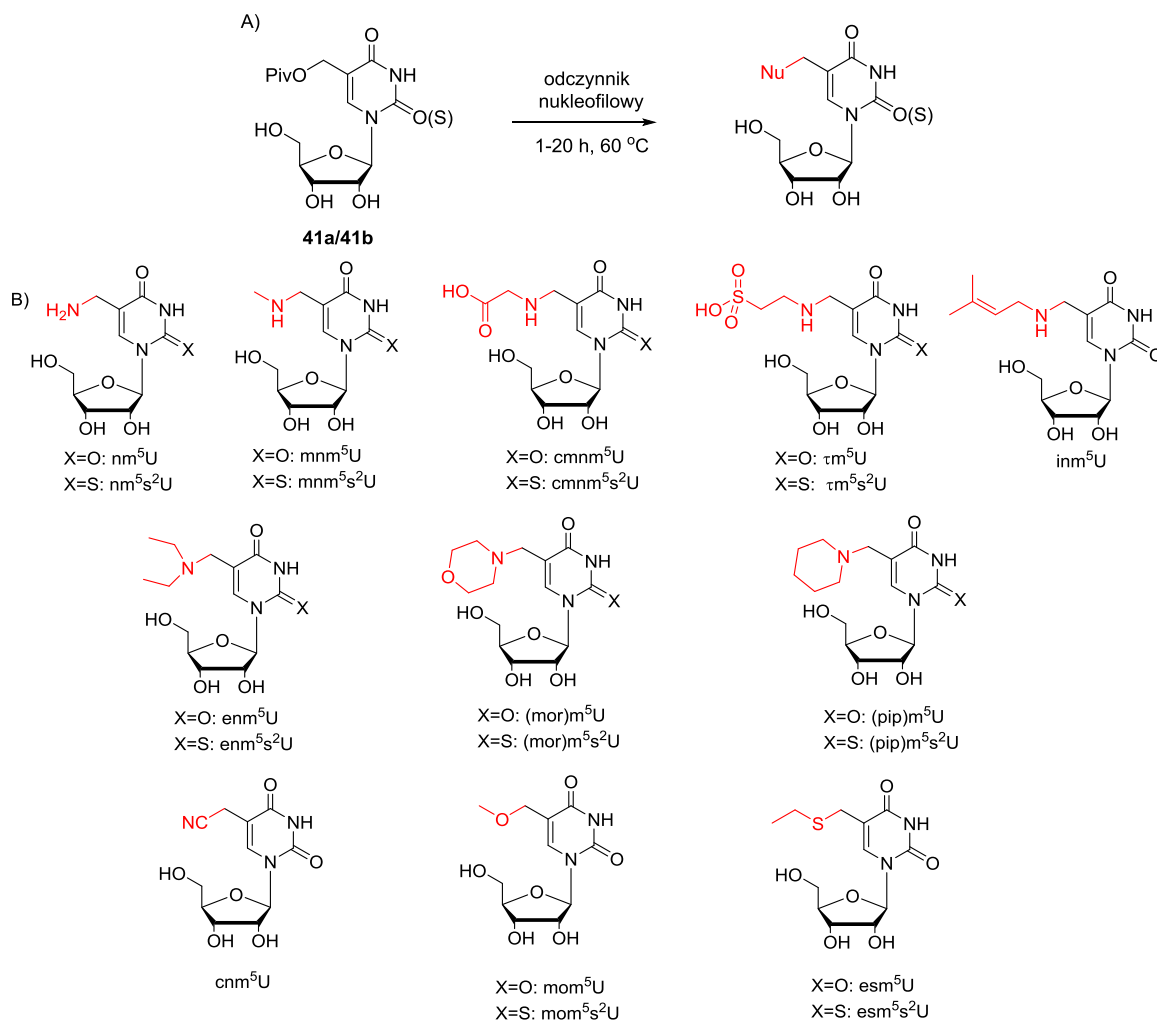
Nowa strategia syntezy 5-aminometylourydyn (xnm^5U) i 5-aminometylo-2-tiourydyn ($\text{xnm}^5\text{s}^2\text{U}$) z wykorzystaniem 5-piwaloiloksymetylourydyny/2-tiourydyny jako substratu

Kluczowe dla omawianego osiągnięcia habilitacyjnego było znalezienie nowego, reaktywnego syntonu – 5-piwaloiloksymetylourydyny (Pivom⁵U, **41a**, Pivom⁵s²U, **41b**, Rys.8), umożliwiającego efektywne otrzymanie 5-aminometylourydyn xnm^5U i 2-tiourydyn $\text{xnm}^5\text{s}^2\text{U}$ w reakcji z nukleofilami (głównie aminami i ich pochodnymi). Zaobserwowana użyteczność Pivom⁵U/Pivom⁵s²U (**41a**, **41b**) w syntezie 5-aminometylourydyn wynika z dwóch faktów: nietypowej dla estrów stabilności PivOCH₂- (tBuC(O)OCH₂-) w warunkach zasadowych (efektem jest zahamowanie lub znaczące ograniczenie amonolizy/aminolizy estru, Rys.8) oraz umiejscowienia grupy PivO- w pozycji pseudobenzylowej urydyny/2-tiourydyny (oznaczonej jako C-5,1), które ułatwia reakcję podstawienia nukleofilowego w położeniu C-5,1 (Rys.8).



Rys.8. Struktura chemiczna 5-piwaloiloksymetylourydyny (Pivom⁵U, **41a**) i jej 2-tioanalogu (Pivom⁵s²U, **41b**); schematyczne oznaczenie reaktywności Pivom⁵U/Pivom⁵s²U z nukleofilami azotowymi.

W badaniach nad reaktywnością 5-piwaloiloksymetylourydyny (**41a**) oraz 5-piwaloiloksymetylo-2-tiourydyny (**41b**) z odczynnikami o charakterze nukleofilowym wykazaliśmy możliwość podstawienia $-OPiv \rightarrow Nu$ w reakcji z amoniakiem, aminami pierwszorzędowymi (MeNH₂, izopentyloaminą), aminami drugorzędowymi (Et₂NH, morfoliną, piperdyną) oraz solami tetrabutylamoniowymi glicyny i tauryny (Schemat 9A, **H5**, **H8**).



Schemat 9. Reakcje Pivom⁵U/Pivom⁵s²U z odczynnikami o charakterze nukleofilowym (A). Struktury 5-podstawionych urydyn i 2-tiourydyn otrzymanych *via* podstawienie nukleofilowe Pivom⁵U/Pivom⁵s²U (B).

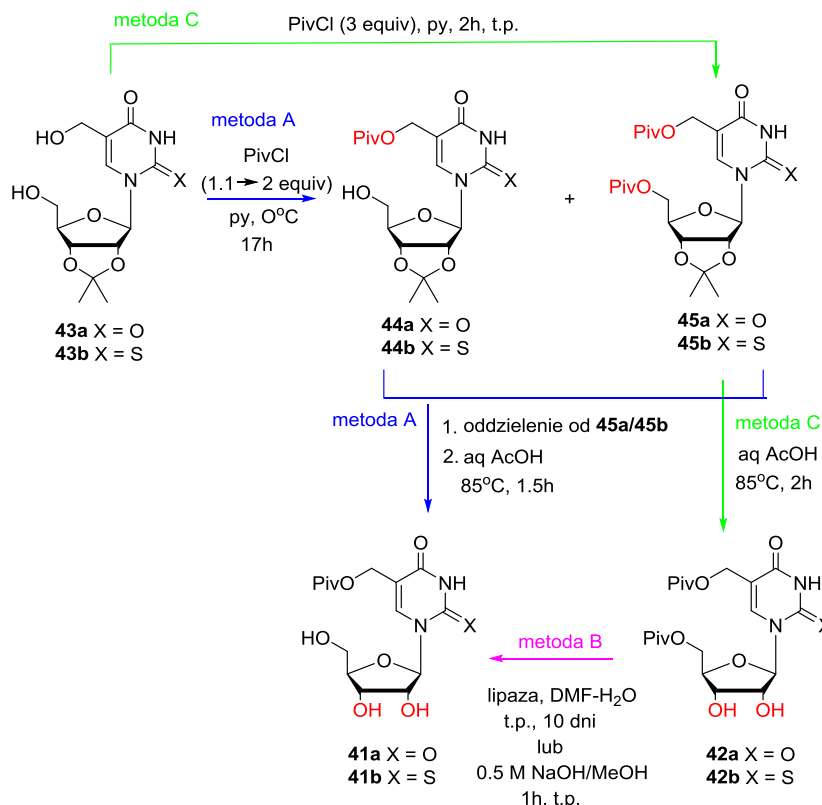
Reakcje z wymienionymi nukleofilami azotowymi zachodziły w temperaturze nie przekraczającej 60 °C, w roztworach alkoholowych lub wodnych, w zróżnicowanym czasie od 1 do 20 godz. Wydajności uzyskiwanych 5-aminometylourydyn (xnm⁵U/xnm⁵s²U) mieściły się w zakresie 70-90 %.

Użyteczność syntetyczną Pivom⁵U/Pivom⁵s²U potwierdziliśmy również w reakcji tych nukleozydów z anionem alkoksylovym, anionem tiolanowym oraz anionem cyjankowym otrzymując odpowiednio mom⁵-, esm⁵- i cnm⁵-modyfikowane urydyny i 2-tiourydyny (Schemat 9B, **H5**). W rezultacie powyższych badań otrzymaliśmy serię 5-podstawionych urydyn i 2-tiourydyn (Schemat 9B), w tym 5-aminometylourydyny natywnie występujące w sekwencjach tRNA: nm⁵U/nm⁵s²U, mnm⁵U/mnm⁵s²U, cmnm⁵U/cmnm⁵s²U, tm⁵U/tm⁵s²U,

$\text{c}n\text{m}^5\text{U}$ i $\text{i}n\text{m}^5\text{U}$. Spośród nich na szczególną uwagę zasługuje 5-izopentenyloaminometylourydyna ($\text{i}n\text{m}^5\text{U}$), która została otrzymana po raz pierwszy. Opracowany protokół syntezy 5-aminometylourydyn $\text{x}n\text{m}^5\text{U}$ i 5-aminometylo-2-tiourydyn $\text{x}n\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$ jest szczególnie użyteczny w syntezie trudnych lub niemożliwych do otrzymania inną metodą, $\text{c}m\text{nm}^5\text{U}/\text{c}m\text{nm}^5\text{s}^2\text{U}$ oraz $\text{t}m^5\text{U}/\text{t}m^5\text{s}^2\text{U}$. Jako odczynnik nukleofilowy zastosowaliśmy w tym przypadku sole tetrabutylamoniowe odpowiednio glicyny i tauryny, które zwiększyły rozpuszczalność aminokwasów w rozpuszczalniku organicznym oraz wzmocniły ich charakter nukleofilowy w porównaniu z ich formą zwitterjonową [H5].

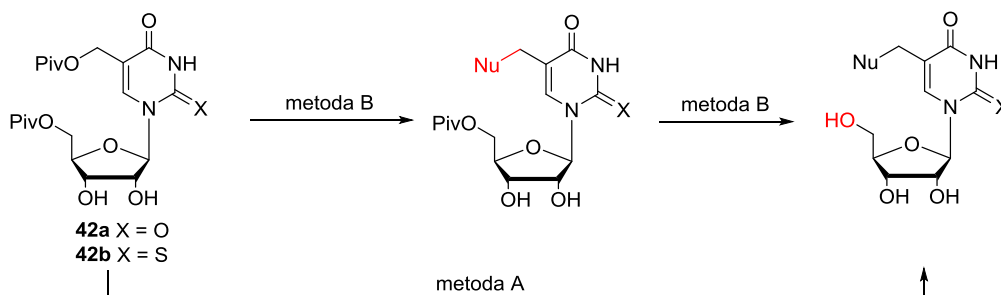
W kilku przypadkach zweryfikowaliśmy konkurencyjność zaproponowanej przez nas metody syntezy 5-podstawionych urydyn/2-tiourydyn ze strategiami opisanymi w literaturze, wykorzystującymi jako substrat: 5-chlorometylourydynę/2-tiourydynę [Malkiewicz & Sochacka, 1983; Ogata i in., 2009; Seio i in., 1998; Ikeda i in., 1975], czwartorzędową sól amoniową 5-pirolidynometylourydyn/2-tiourydyn [Reese & Sanghvi, 1984, Ogata i in. 2009; Sekine i in., 1987; Badman & Reese, 1987], 5-hydroksymetylourydynę/2-tiourydynę [Wada i in., 2002] lub 5-aminometylourydynę/2-tiourydynę [Ogata & Wada, 2006]. Porównanie właściwości oraz reaktywności wymienionych powyżej substratów z $\text{Pivom}^5\text{U}/\text{Pivom}^5\text{s}^2\text{U}$ wskazuje na użyteczność syntetyczną znalezionej przez nas syntonu w kilku aspektach: *i/* $\text{Pivom}^5\text{U}/\text{Pivom}^5\text{s}^2\text{U}$ są stabilne w temp. pokojowej i trwałe podczas dłuższego przechowywania, *ii/* w reakcjach z udziałem $\text{Pivom}^5\text{U}/\text{Pivom}^5\text{s}^2\text{U}$ można zastosować szeroką gamę odczynników o charakterze nukleofilowym (amoniak, aminy pierwszo- i drugorzędowe, aminokwasy, OR , SR , CN) jak i zróżnicowane warunki reakcji (wodne, bezwodne), *iii/* w reakcji $\text{Pivom}^5\text{s}^2\text{U}$ z nukleofilami nie obserwuje się powstawania produktów desulfuracji, *iv/* reakcje z udziałem $\text{Pivom}^5\text{U}/\text{Pivom}^5\text{s}^2\text{U}$ przebiegają efektywnie, w stosunkowo krótkim czasie, *v/* stabilność ugrupowania estrowego Pivom^5U w łagodnych warunkach zasadowych oraz silnych warunkach kwasowych umożliwia przekształcenie Pivom^5U w jednostkę monomeryczną oraz włączenie w łańcuch RNA, zaś opracowane na poziomie nukleozydu warunki konwersji są możliwe do zastosowania w post-syntetycznej strategii modyfikacji RNA [H8].

W toku dalszych badań skoncentrowaliśmy się na pracach optymalizacyjnych związanych z podwyższeniem wydajności syntezy $\text{Pivom}^5\text{U}/\text{Pivom}^5\text{s}^2\text{U}$ (41a/41b). W ramach tych prac przetestowaliśmy dwie strategie syntezy 41a/41b: selektywne piwaloilowanie 5-hydroksymetylourydyn 43a/43b (Schemat 10, metoda A) oraz selektywną hydrolizę bis-piwaloilowej pochodnej 42a/42b (Schemat 10, metoda B) [H5,H8]. Pomimo licznych prób selektywnego piwaloilowania alkoholu 5- CH_2OH 5-hydroksymetylourydyn, nie udało się otrzymać w pełni zadawalających wyników, dlatego metodą z wyboru okazała się strategia wykorzystująca selektywną hydrolizę bis-piwaloilowanej urydyn 42a/42b (Schemat 10, metoda B). Nukleozyd ten można otrzymać wydajnie w dwuetapowej reakcji acylowania 5-hydroksymetylourydyn/2-tiourydyn 43a/43b za pomocą PivCl (Schemat 10, metoda C) a następnie usunięcia kwasowolabilnej grupy izopropylidenowej.



Schemat 10. Metody syntezy: 5-pivaloiloksymetylourdydny/2-tiourydny **41a/41b** przez selektywne pivaloiloilowanie (metoda A), przez selektywną hydrolizę (metoda B). Synteza 5'-O-pivaloilo-5-pivaloiloksymetylourdydny **42a/42b** (metoda C).

Ze względu na większą dostępność syntetyczną bis-pivaloilowej pochodnej **42a/42b**, sprawdziliśmy możliwość jej zastosowania jako substratu w reakcjach podstawienia nukleofilowego $\text{-OPiv} \rightarrow \text{Nu}$ (Schemat 11), z nukleofilami przetestowanymi uprzednio w syntezie $\text{xnm}^5\text{U}/\text{xnm}^5\text{s}^2\text{U}$ z monoestru Pivom⁵U/s²U **41a/41b**.



Schemat 11. Reakcje bis-Pivom⁵U/bis-Pivom⁵s²U (**42a/42b**) z odczynnikami o charakterze nukleofilowym.

Wykazaliśmy, że w obecności dietyloaminy, anionu alkoksylogowego lub tolanowego, bis-pivaloiloU/s²U ulega transformacji do $\text{xnm}^5\text{U}/\text{xnm}^5\text{s}^2\text{U}$ jednocześnie z deprotekcją 5'-OPiv (Schemat 11, metoda A). Pozostałe nukleofile azotowe promują wyłącznie podstawienie Pivom⁵ \rightarrow xnm^5 podczas gdy ester 5'-OPiv pozostaje w tych warunkach stabilny (Schemat 11, metoda B). W drugim etapie reakcji można go efektywnie usunąć stosując 40% aq. MeNH₂. Zaproponowany wariant syntetyczny umożliwił otrzymanie tej samej serii 5-podstawionych urydyn/2-tiourydyn jakiego zostały pokazane na Schemacie 10,

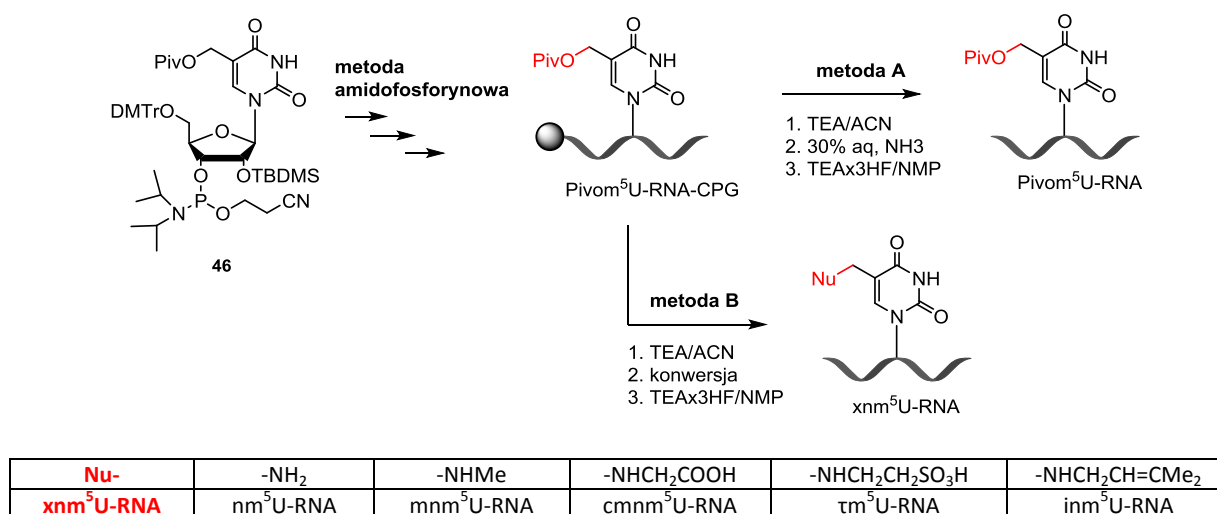
z porównywalnymi wydajnościami, wnosił jednak dodatkową zaletę związaną z dostępnością bis-piwaloilowanego substratu **42a/42b**.

Zastosowanie 5-piwaloiloksymetylourydyny jako nukleozydu prekursorowego w syntezie oligorybonukleotydów modyfikowanych 5-aminometylourydynami (xnm⁵U-RNA)

Sprawdzenie użyteczności Pivom⁵U jako nukleozydu prekursorowego w syntezie oligomerów xnm⁵U-RNA wymagało zweryfikowania: *i/* efektywności syntezy jednostki monomerycznej; *ii/* wydajności syntezy prekursorowego oligomeru (Pivom⁵U-RNA), *iii/* wydajności konwersji Pivom⁵U-RNA → xnm⁵U-RNA; *iv/* stabilności oligomeru RNA w warunkach konwersji; *v/* ustalenia korelacji pomiędzy warunkami konwersji a protokołem deprotekcji i odcinania oligomeru od złoża.

W badaniach modelowych wykazaliśmy, że 5-piwaloiloksymetylourydyna (Pivom⁵U, **41a**) jest stabilna w warunkach syntezy RNA metodą amidofosforynową a jedynymi warunkami alkalicznej deprotekcji, które sprzyjają zachowaniu grupy –OPiv są 30% NH₄OH (3h, t.p.) [H8]. W dalszym etapie prac wykazaliśmy, że Pivom⁵U (**41a**) ulega wydajnej przemianie do 5'-DMTr-2'-TBDMS-zabezpieczonego 3'-O-amidofosforynu Pivom⁵U, na standardowej drodze: trytylacji, silylacji i fosfitylacji. Amidofosforyn Pivom⁵U (**46**) został włączony w modelowy pięciomer o sekwencji 5'-GUPivom⁵UAC-3' metodą manualną, w skali 5 μmoli, stosując *Activator 42* oraz podwójny *coupling* (Schemat 12). Potwierdziliśmy, że wyselekcjonowane uprzednio, zasadowe warunki deprotekcji/odcinania oligomeru od złoża są bezpieczne dla stabilności grupy –OPiv i umożliwiają otrzymanie 5-meru Pivom⁵U-RNA z wydajnością 85% (Schemat 12, metoda A) [H8].

W toku dalszych prac wykazaliśmy użyteczność 5-meru Pivom⁵U-RNA w syntezie oligomerów modyfikowanych 5-aminometylourydynami xnm⁵U (xnm⁵U-RNA), które naturalnie występują w sekwencjach tRNA w pozycji wahadłowej (Schemat 12, metoda B). Wśród nich znalazły się RNA modyfikowane 5-aminometylourydyną (nm⁵U-RNA), 5-metyloaminometylourydyną (mnm⁵U-RNA), 5-karboksymetyloaminourydyną (cmnm⁵U-RNA), taurynometylourydyną (tm⁵U-RNA) i po raz pierwszy w literaturze – 5-izopentenyloaminometylourydyną (inm⁵U-RNA) [H8].



Schemat 12. Ogólny schemat syntezy i deprotekcji Pivom⁵U-RNA (metoda A); xnm⁵U-RNA (metoda B).

Do post-syntetycznej reakcji podstawienia nukleofilowego $\text{Pivom}^5\text{U} \rightarrow \text{xnm}^5\text{U}$ zastosowany został oligomer prekursorowy połączony ze złożem ($\text{Pivom}^5\text{U-RNA-CPG}$), pozbawiony grup β -cyjanoetylowych. Konwersje $\text{Pivom}^5\text{U-RNA} \rightarrow \text{xnm}^5\text{U-RNA}$ zostały przeprowadzone w warunkach wyselekcjonowanych na poziomie nukleozydu, jednakże czas prowadzenia reakcji z komponentami aminowymi (amoniakiem, metyloaminą, izopentenyloaminą lub solą tetrabutylamoniową Gly i Tau) jak i stężenia/ilości reagentów zostały zoptymalizowane tak aby w jednym etapie deprotekcji przeprowadzić podstawienie $-\text{OPiv} \rightarrow \text{Nu}$, odszczepienie oligomeru od złoża oraz usunięcie grup ochronnych funkcji egzoaminowych $-\text{tac}$.

Ostatecznie, wyznaczone stopnie konwersji $\text{Pivom}^5\text{U-RNA} \rightarrow \text{xnm}^5\text{U-RNA}$ kształtowały się w granicach 85-100%, w zależności od rodzaju zastosowanego odczynnika nukleofilowego, zaś wydajności całkowite (uwzględniające syntezę prekursorowego oligomeru, post-syntetyczną konwersję oraz deprotekcję) wynosiły 62-84%. W toku prowadzonych badań podjęliśmy próbę syntezy oligomeru modyfikowanego 5-cyjanometylourydyną (cnm^5U). W przeciwieństwie do badań modelowych przeprowadzonych na nukleozydzie z udziałem KCN jako czynnika nukleofilowego, konwersja oligomeru $\text{Pivom}^5\text{U-RNA} \rightarrow \text{cnm}^5\text{U-RNA}$, nie dała pożądanych rezultatów, prowadząc do częściowej degradacji oligomeru. Ostatecznie wydajność całkowita syntezy $\text{cnm}^5\text{U-RNA}$ wyniosła 20%.

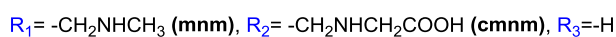
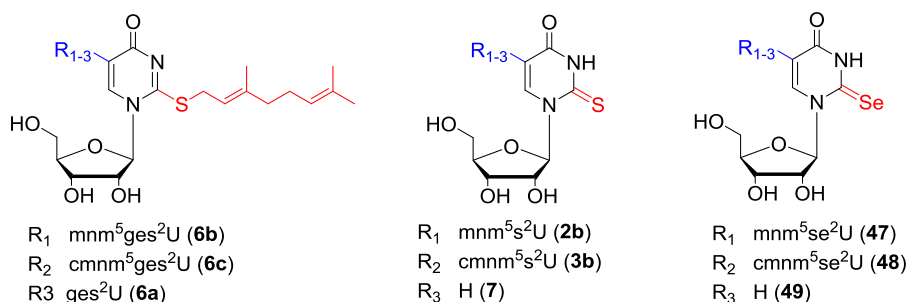
Użyteczność nukleozydu prekursorowego Pivom^5U potwierdziliśmy w syntezie dwóch 17-nt oligorybonukleotydów o sekwencji ramienia antykodonu tRNA^{Lys} z *E.coli*, zawierających mnm^5U oraz tm^5U w pozycji wahadłowej [H8]. Oligomer prekursorowy 5'-GUUGACU**Pivom**⁵UUUAAUCAAC-3' zsyntetyzowany został automatycznie, według standardowego protokołu, z zastosowaniem BMT jako aktywatora oraz podwójnego *couplingu* modyfikowanej jednostki monomerycznej. Warunki konwersji ustalone dla 5-meru zostały z powodzeniem wykorzystane do transformacji 17-nt $\text{Pivom}^5\text{U-RNA}$, dając całkowite wydajności 78% dla $\text{mnm}^5\text{U-RNA}$ oraz 65% dla $\text{tm}^5\text{U-RNA}$, co potwierdziło skuteczność opracowanej metodyki syntezy $\text{xnm}^5\text{U-RNA}$ dla dłuższych oligorybonukleotydów.

Należy podkreślić, że w porównaniu z metodą bezpośredniego włączania tm^5U w łańcuch RNA (rozdział V), zastosowanie post-syntetycznej strategii syntezy znacząco ułatwia preparatykę oligomeru, szczególnie w kontekście syntezy modyfikowanej jednostki monomerycznej (3'-O-amidofosforyn Pivom^5U vs tm^5U), która nie wymaga zastosowania – trudnej do wprowadzenia – grupy ochronnej funkcji sulfonowej a tym samym protokół syntezy jest krótszy i prostszy preparatywnie.

VII. Synteza i właściwości fizykochemiczne 5-podstawionych S-geranylo-2-tiourydyn ($\text{xnm}^5\text{ges}^2\text{U}$) oraz oligomerów RNA i DNA modyfikowanych S-geranylo-2-tiouracylem

Postępujący rozwój metod analitycznych oraz zastosowanie nowych procedur izolacji tRNA umożliwił, w ostatnim czasie, odkrycie i identyfikację kilku nowych modyfikowanych rybonukleotydów [Kowtoniuk i in., 2009; Chen i in., 2009; Ikeuchi i in., 2010; Matuszewski i in., 2017b; Kang i in., 2017], w tym dwóch nowych 5-aminometylo-2-tiourydyn: 5-metyloaminometylo-S-geranylo-2-tiourydyny ($\text{mnm}^5\text{ges}^2\text{U}$, **6b**, Rys.9) oraz 5-karboksymetyloaminometylo-S-geranylo-2-tiourydyny ($\text{cmnm}^5\text{ges}^2\text{U}$, **6c**) [Dumelin i in., 2012]. Geranylowe nukleozydy zostały zidentyfikowane w pozycji wahadłowej bakteryjnych cząsteczek tRNA specyficznych dla Lys, Glu, Gln, jako sub-populacja o udziale poniżej 10%.

W pozycji wahadłowej pozostałej populacji cząsteczek tRNA^{Lys,Glu,Gln} występują 5-podstawione 2-selenourydyny (mnm⁵se²U **47**, cmnm⁵se²U **48**) oraz 5-podstawione 2-tiourydyny (mnm⁵s²U, **2b**, cmnm⁵s²U **3b**), przy czym te ostatnie uważa się za cząsteczki prekursorowe w biosyntezie zarówno geranylo- jak i selenonukleozydów [Dumelin i in., 2012; Jager i in., 2017; Bartos i in., 2014].

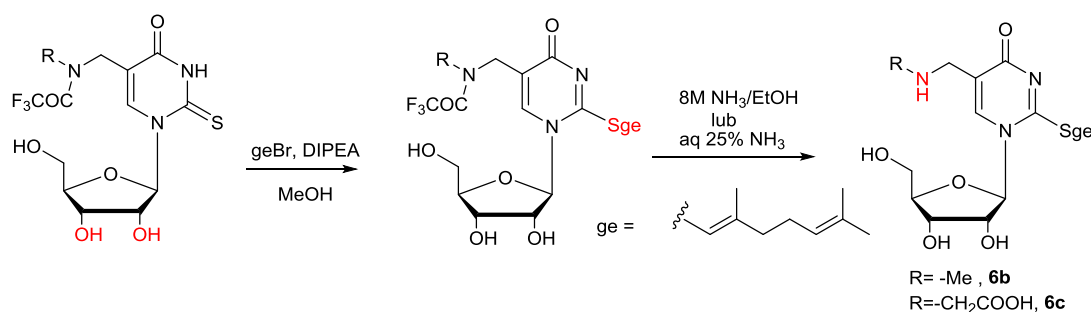


Rys.9. Struktury chemiczne *S*-geranylo-2-tiourydyn **6a-6c**; 2-tiourydyn **2b, 3b, 7**; 2-selenourydyn **46-48**.

Brak dostępu do modelowych oligorybonukleotydów modyfikowanych natywnymi (c)mnm⁵ges²U **6b/6c** i (c)mnm⁵se²U **47/48** nie pozwolił – jak dotąd – zweryfikować na czym polega „fenomen” współistnienia obok siebie trzech rodzajów wahadłowych urydyn. Nie jest również poznana rola biologiczna geranylowych nukleozydów. Wydaje się, że ich odmienność strukturalna (jedyne w Naturze rybonukleozydy oligoizoprenylowe) jest kluczowa dla aktywności biologicznej modyfikowanych nimi cząsteczek tRNA. Obecność podstawnika *S*-geranylowanego (-Sge) w pozycji C-2 skutkuje zmianą układu wiązań podwójnych w pierścieniu heterocyklicznym, w porównaniu z uracylem czy 2-tiouracylem, i konsekwentnie zmianą właściwości akceptorowo-donorowych w obszarze zasady nukleinowej co powinno mieć wpływ na zmianę modelu oddziaływań w parach (c)mnm⁵ges²U₃₄ z A/G.

W celu wyjaśnienia, jak obecność grupy *S*-geranylowej wpływa na właściwości modyfikowanych nią nukleozydów oraz oligonukleotydów przeprowadziliśmy syntezę i charakterystykę natywnych nukleozydów mnm⁵ges²U (**6b**) i cmnm⁵ges²U (**6c**) [**H6**] oraz oligomerów RNA i DNA modyfikowanych *S*-geranylo-2-tiouracylem [**H7,H9**]. Uzyskane wyniki porównaliśmy z identycznymi danymi uzyskanymi dla komponentów 2-tiourydynowych.

Synteza geranylowych nukleozydów **6b/6c** wymagała opracowania metodyki umożliwiającej wprowadzenie podstawnika aminometylowego (mnm lub cmnm) w pozycję C5 2-tiourydyny oraz geranylowego na atom siarki. Wybierając jako substrat 5-aminometylo-2-tiourydynę **2b/3b** ustaliliśmy, że geranylowanie nie zachodzi chemoselektywnie w kierunku *S*-alkilacji i niezbędne jest zastosowanie grupy ochronnej na funkcji aminowej (c)mnm⁵ (Schemat 13) [**H6**]. Do tego celu z powodzeniem została zastosowana grupa trifluoroacetylowa, którą – w ostatnim etapie syntezy - usunęliśmy w łagodnych warunkach zasadowych, umożliwiając zachowanie grupy –*S*-geranylowej.



Schemat 13. Synteza 5-(karboksy)metyloaminometylo-*S*-geranylo-2-tiourydyny (**6b/6c**).

Otrzymane 5-podstawione *S*-geranylo-2-tiourydyny **6b/6c** poddane zostały badaniom strukturalnym i fizykochemicznym [H6]. W celu określenia wpływu podstawnika *S*-geranylowego oraz aminometylowego otrzymane wyniki zostały porównane z danymi uzyskanymi dla analogów 2-tio oraz pochodnych niepodstawionych w pozycji C5 (*S*-geranylo-2-tiourydyna **6a** oraz 2-tiourydyna **7**, Rys.9).

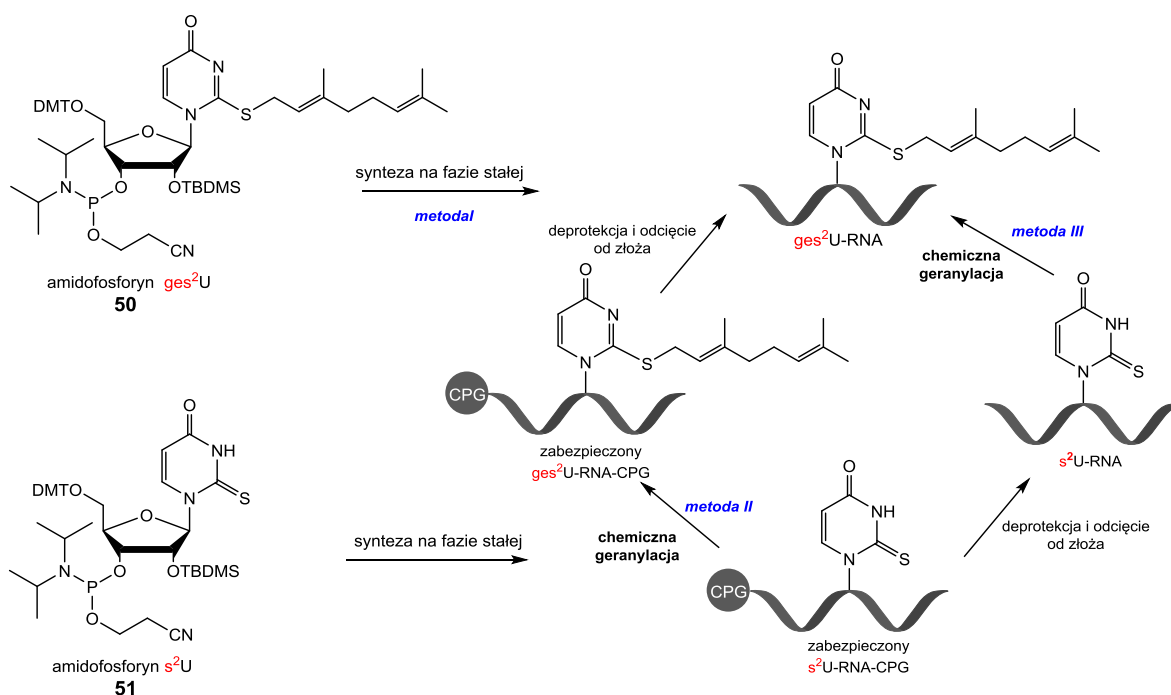
Na podstawie wyznaczonych wskaźników lipofilowości (log P) wykazaliśmy wysoce hydrofobowy charakter geranylowych nukleozydów (logP = 1-3), który rośnie w szeregu $\text{cmnm}^5\text{ges}^2\text{U} < \text{mnm}^5\text{ges}^2\text{U} < \text{ges}^2\text{U}$, i jest znacząco wyższy od macierzystych 2-tiourydyn ($\Delta\log P \approx 3$). Korzystając z wartości stałych sprzężeń wyznaczonych z widm ¹H NMR określony został procentowy udział konformacji rybozy C3'-endo vs C2'-endo dla *S*-geranylo-2-tiourydyn **6a-6c** oraz ich 2-tioanalogów. Okazało się, że obecność grupy Sge w strukturze geranylo-nukleozydów powoduje zmniejszenie udziału konformacji C3'-endo z 70-80% wyznaczonej dla 2-tiourydyn do 50-58%. Uzyskany wynik był nieoczekiwany, ponieważ do tej pory sądzono, że obecność dużego objętościowo podstawnika w położeniu C2 zwiększa preferencję nukleozydów do przyjmowania konformacji C3'-endo (konformacja ta daje możliwość odsunięcia w przestrzeni podstawnika w położeniu C2 od grupy 2'-OH) [Yamamoto i in., 1983]. Wysunęliśmy przypuszczenie, że kryterium wielkości podstawnika nie jest jedynym czynnikiem, który może wpływać na preferencję konformacji rybozy. Innym czynnikiem może być odmienna struktura elektronowa zasady heterocyklicznej jaką posiadają geranylowe 2-tiourydyny. Korzystając z pomiarów widm UV w szerokim zakresie pH, potwierdziliśmy odmienny układ wiązań podwójnych 5-podstawionych Sge-uracyli w porównaniu z ich 2-tioanalogami.

W toku dalszych prac spróbowaliśmy odpowiedzieć sobie na pytanie w jaki sposób *S*-geranylourydyny, cechujące się tak dalece odmienną strukturą i właściwościami od ich macierzystych 2-tiourydyn wpływają na właściwości biofizyczne oraz hybrydazyjne oligomerów RNA. Jako związek modelowy wyselekcjonowaliśmy fragment tRNA o sekwencji ramienia antykodonu ASL^{Lys} z *E. coli* (5'-GUUGACUges²UUUAAUCAAC-3' = ges²U-RNA), który w miejsce naturalnie występującej w pozycji wahadłowej mnm⁵ges²U (**6b**) zawiera *S*-geranylo-2-tiourydynę (ges²U, **6a**).

Ze względu na brak doniesień literaturowych na temat syntezy oligorybonukleotydów modyfikowanych *S*-alkilo-2-tiourydynami oraz raportowaną reaktywnością grupy -SMe 2-tiourydyny z odczynnikami o charakterze nukleofilowym [Martin i in., 1985; Muramatsu i in., 1988], niezbędne było opracowanie kompleksowego protokołu syntezy ges²U-RNA uwzględniającego: i/ sprawdzenie stabilności -Sge w warunkach syntezy oligomeru; ii/ wyselekcjonowanie warunków alkalicznej deprotekcji ges²U-RNA w celu wyeliminowania niepożądanych transformacji *S*-geranylu.

W badaniach modelowych zrealizowanych na poziomie nukleozydu, wykazaliśmy, że ges^2U jest stabilna w standardowych warunkach syntezy RNA metodą amidofosforynową, wykazuje jednak reaktywność względem większości odczynników które standardowo wykorzystuje się w procesie alkalicznej deprotekcji oligomerów. Ustaliliśmy, że jedynymi warunkami deprotekcji, w których grupa $-Sge$ nie ulega niepożądanym przemianom są warunki bezwodne ($8M NH_3/EtOH$). W badaniach modelowych ustaliliśmy ponadto, że ges^2U jest stabilna wobec standardowych czynników desililujących ($TEA \times 3HF$, $TBAF$), jednakże wyłącznie w temp. pokojowej [H7].

W dalszym etapie prac, wykazaliśmy, że ges^2U **6a**, ulega wydajnej przemianie do 5'-DMTr-2'-TBDMS-zabezpieczonego 3'-*O*-amidofosforynu, na standardowej drodze trytylacji, sililacji i fosfitylacji. Amidofosforyn ges^2U został włączony w 17-mer o sekwencji ASL^{Lys} z *E.coli* automatycznie, w skali 0.2 μ moła, stosując BMT jako aktywator oraz podwójny *coupling* (Schemat 14, metoda I). Potwierdziliśmy, że wyselekcjonowane warunki deprotekcji zasadowej i odcinania oligomeru od złoża są bezpieczne dla stabilności grupy $-Sge$ a wydajność syntezy ges^2U -RNA określiliśmy na 55% [H7].



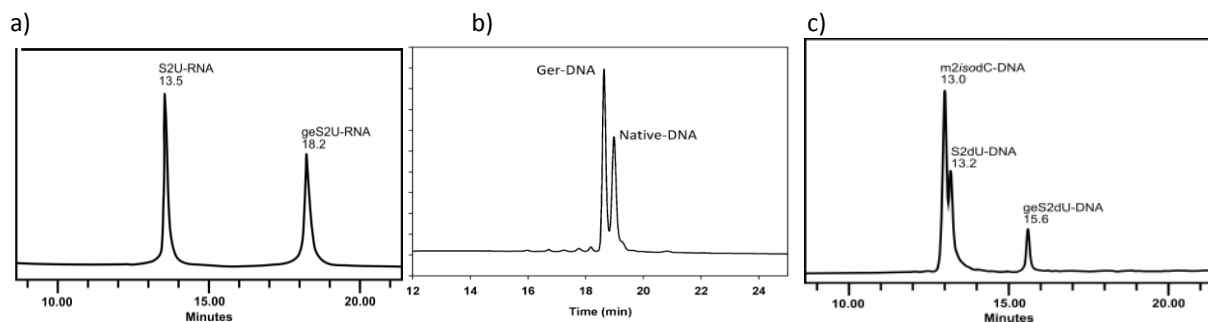
Schemat 14. Ogólny schemat syntezy chemicznej (metody I-III) ges^2U -RNA. Metoda I – bezpośrednie włączenie amidofosforynu ges^2U w łańcuchach RNA; Metoda II – post-syntetyczna strategia geranylacji s^2U -RNA w fazie stałej; Metoda III – post-syntetyczna strategia geranylacji s^2U -RNA w roztworze.

Wobec faktu, że warunki geranylowania 2-tiourydyny (s^2U) wydawały się kompatybilne z protokołem deprotekcji oligomeru, nie zagrażały dekompozycji oligomeru, a dodatkowo, reakcja przebiegała szybko z bardzo dobrymi wydajnościami ($> 95\%$) postanowiliśmy sprawdzić możliwość syntezy ges^2U -RNA *via* post-syntetyczną modyfikację RNA, wykorzystując oligomer modyfikowany s^2U jako cząsteczkę prekursorową. Jak do tej pory, w literaturze znany jest tylko jeden przykład post-syntetycznej modyfikacji RNA z udziałem grupy 2-tiokarbonylowej s^2U -RNA. Dotyczy ona transformacji 5-podstawionych 2-tiourydyn

do odpowiednich 4-pirymidynonów ($R^5s^2U\text{-RNA} \rightarrow R^5H^2U\text{-RNA}$) z wykorzystaniem oksonu jako reagenta [Chwiałkowska i in., 2015].

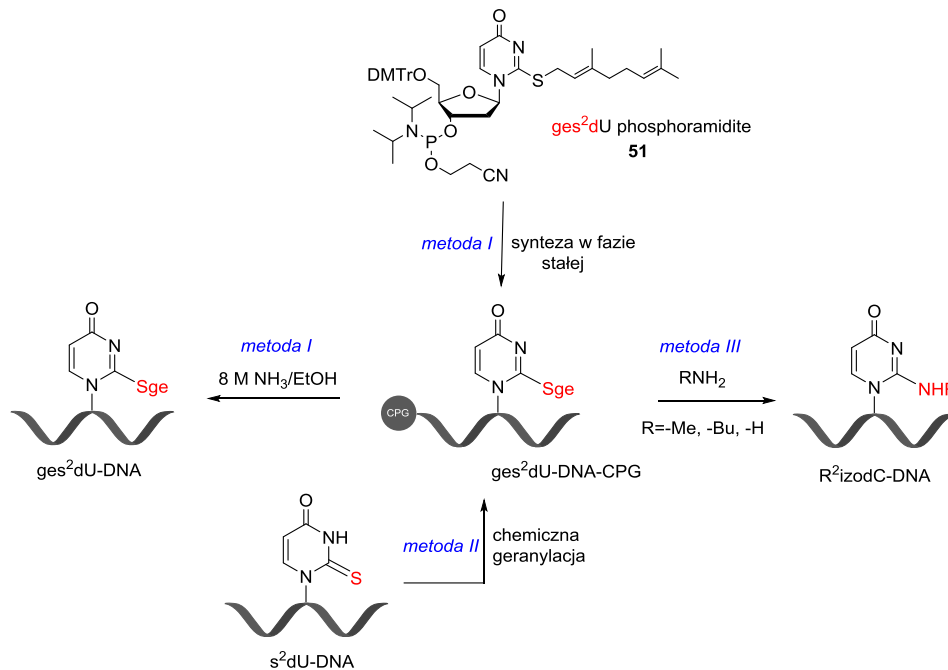
Opierając się na zoptymalizowanych uprzednio protokołach S-alkilacji s^2U , opracowałam metodę post-syntetycznego geranylowania $s^2U\text{-RNA}$ na złożu (Schemat 14, metoda II) oraz w roztworze (Schemat 14, metoda III), optymalizując je w zakresie nadmiaru reagentów oraz rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika. W obu przypadkach, w reakcji S-alkilacji zastosowany został nadmiar (> 200 equiv) geBr i trietyloaminy oraz EtOH (metoda II) lub mieszanina EtOH-H₂O (metoda III) jako rozpuszczalnik. Reakcje były prowadzone przez 3 godz., w temp. pokojowej, dając całkowitą wydajność $ges^2U\text{-RNA}$ 40% (metoda II) i $\sim 70\%$ (metoda III), przy wydajności konwersji $s^2 \rightarrow ges^2$ bliskiej 100% [H7].

Analiza chromatograficzna oligomerów modyfikowanych ges^2U i s^2U (RP HPLC, Rys.10a) oraz różnice w wartościach log P określone na podstawie pomiaru rozpuszczalności oligomerów w układzie woda/oktan-1-ol wskazały na wzrost lipofilowości Sge-RNA względem s^2 -analogu. Chociaż uzyskane wyniki były zgodne z naszymi oczekiwaniami, wątpliwości budziła ich rozbieżność z danymi opublikowanymi przez Wang'a i in. [Wang i in., 2015], którzy praktycznie nie obserwowali różnic w mobilności między oligomerem $ges^2T\text{-DNA}$ i jego niemodyfikowanym analogiem (Rys.10b).



Rys.10. Chromatogramy RP-HPLC z ko-iniekcji oligorybonukleotydów modyfikowanych a) $s^2U\text{-RNA}$ i $ges^2U\text{-RNA}$; b) $ges^2T\text{-DNA}$ i $T\text{-DNA}$ [Wang i in., 2015]; c) $s^2U\text{-DNA}$, $ges^2U\text{-DNA}$ i $m^2isodC\text{-DNA}$.

Analizując procedurę syntetyczną oligomeru $ges^2T\text{-DNA}$ opisaną przez Wang'a i in. [Wang i in., 2015] doszliśmy do wniosku, że autorzy opublikowanych badań zastosowali system zasadowej deprotekcji Sge-oligomeru obciążony ryzykiem podstawienia $-Sge \rightarrow -NMe$ (AMA = 40% aq. MeNH₂/30% NH₄OH, 65 °C, 30 min). W celu potwierdzenia wysuniętych przypuszczeń oraz zaproponowania alternatywnego protokołu syntezy Sge-oligomerów DNA przeprowadziliśmy systematyczne badania obejmujące syntezę $ges^2dU\text{-DNA}$ oraz zbadanie reaktywności ges^2dU w warunkach zasadowej deprotekcji oligomerów DNA [H9]. Jako cząsteczkę modelową wyselekcjonowaliśmy oligomer DNA o sekwencji analogicznej jak poprzednio zsyntetyzowany oligomer $ges^2U\text{-ASL}^{Lys}$. Syntezę przeprowadziliśmy w dwóch wariantach: przez bezpośrednie włączenie amidofosforynu ges^2dU , stosując bezwodne alkaliczne warunki deprotekcji (Schemat 15, metoda I) oraz post-syntetycznie, geranylując w pełni odbezpieczony $s^2dU\text{-DNA}$ (Schemat 15, metoda II). Uzyskane wydajności $ges^2dU\text{-DNA}$ były odpowiednio, 70% i 80% co potwierdziło użyteczność i powtarzalność procedur opracowanych uprzednio dla oligomerów ge-RNA.



Schemat 15. Synteza ges²dU-DNA przez bezpośrednie włączenia jednostki ges²dU w oligomer i deprotekcję w bezwodnych warunkach alkalicznych (metoda I), poprzez post-syntetyczną geranylację w pełni odblokowanego s²dU-DNA (metoda II). Synteza R²izodC-DNA jako wynik post-syntetycznej konwersji SgeUra do R²izoCyt (metoda III).

Badania nad deprotekcją ges²dU-DNA w warunkach zaproponowanych przez Wang a i in. [Wang i in., 2015] wykazały praktycznie 100% konwersję ges²dU do N²-metyloizocytydyny (m²izodC, Schemat 15, metoda III). Analiza chromatograficzna ges²dU-DNA, s²dU-DNA oraz m²isodC-DNA (Rys.10c) potwierdziła wzrost hydrofobowości oligomeru modyfikowanego Sge w porównaniu z s²dU-modyfikowanym analogiem, wykazała ponadto podobieństwo t_R dwóch pozostałych oligomerów – analogiczne jak w przypadku ges²T-DNA i T-DNA w badaniach Wang a. Można zatem przypuszczać, że autorzy – w wyniku niewłaściwej metody zasadowej deprotekcji oligomeru ges²T-DNA otrzymali niepoprawny oligomer (pochodną izocytydyny) i konsekwentnie wykorzystali go do badań biofizycznych. Wykazaliśmy również, że warunki alkalicznej deprotekcji zastosowane przez Wang a powodują dekompozycję ges²Ura w serii RNA [H9].

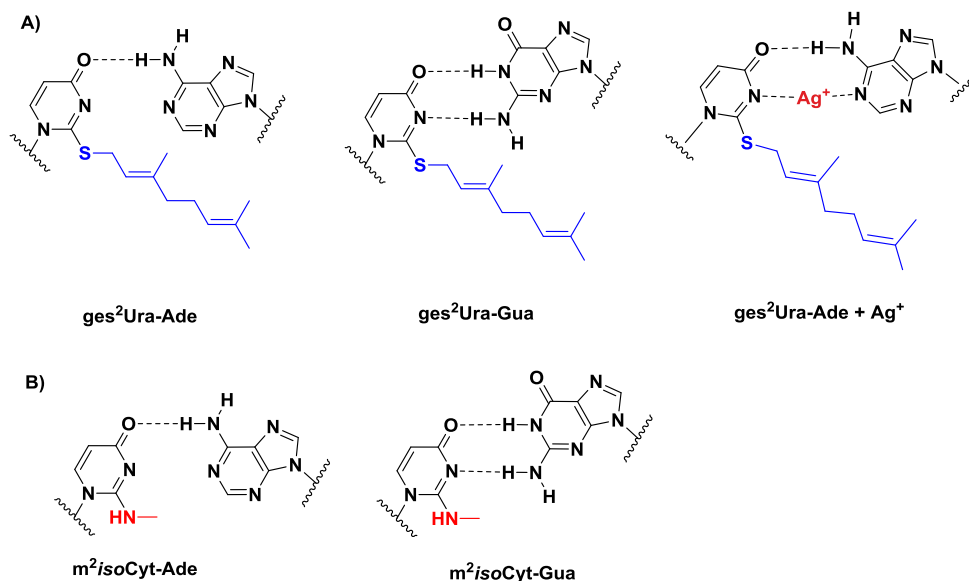
W toku dalszych badań udowodniliśmy, że ges²dU-DNA reaguje z 30% NH₄OH nawet w temperaturze pokojowej dając jako jedyny produkt, oligomer DNA modyfikowany izodC (Schemat 15, metoda III) [H9]. Efektywną konwersję ges²dU-DNA → izodC-DNA można traktować jako nową metodę otrzymywania oligomerów DNA zawierających izocytydynę – modyfikację, która występuje naturalnie w sekwencjach DNA, a z powodu ograniczonej stabilności jest bardzo trudna do włączenia tradycyjną metodą z użyciem amidofosforynu izodC [Bande i in., 2015].

W związku z tak dużą reaktywnością grupy –Sge z nukleofilami azotowymi zadaliśmy sobie pytanie czy w warunkach komórkowych Sge-oligomery mogą reagować z białkami poprzez grupę ε-aminową lizyny. Aby potwierdzić taką możliwość przeprowadziliśmy – analogiczną do poprzednio opisywanych – reakcję ges²dU-DNA z butyloaminą w wodzie w temp. 37⁰ i po 24 godz. zaobserwowaliśmy 100% konwersję ges²dU-DNA → Bu²izodC-DNA [H9].

Wykorzystując zsyntetyzowane 17-mery ges^2U -RNA oraz ges^2dU -DNA przeprowadzone zostały badania stabilności termicznej homo- i heterodupleksów zawierających pary zasad $ges^2Ura-Ade$ oraz $ges^2Ura-Gua$ [H7, H9]. W celu określenia wpływu $-Sge$ na właściwości hybrydyzacyjne, badaniom poddano również dupлексы zawierające w miejsce ges^2Ura , macierzystą s^2Ura oraz niemodyfikowany Ura. Porównanie T_m dupлексы zawierających pary W-C ($ges^2Ura-Ade$, $s^2Ura-Ade$ oraz $Ura-Ade$) wykazało silnie destabilizujący wpływ S -geranylowej modyfikacji na trwałość dupлексы RNA i DNA ($\Delta T_m = 8-13$ °C). Przeciwnie do tej obserwacji, analiza T_m układów helikalnych zawierających pary $ges^2Ura-Gua$, $s^2Ura-Gua$ oraz $Ura-Gua$ pokazała niewielkie różnice w ich stabilności. Ponadto dupлексы zawierające parę $ges^2Ura-Gua$ okazały się bardziej stabilne niż analogi zawierające $ges^2Ura-Ade$ ($\Delta T_m \sim 3$ °C). Fakt ten stanowił przesłankę do stwierdzenia, że obecność ges^2U w pozycji wahadłowej tRNA powoduje zmianę preferencji odczytu trzeciej litery kodonu z A (jaką wykazują macierzyste s^2U) na G. Nie jest wykluczone, że wspomniana zmiana preferencji odczytu kodonów może być elementem regulacji procesu biosyntezy białek np. w warunkach stresowych komórki.

Zwiększona trwałość termodynamiczna została wykazana również dla dupлексы zawierających pary $m^2isoCyt-Gua$ w porównaniu z $m^2isoCyt-Ade$ [H9]. Ponieważ pochodne izocytydyny posiadają identyczny z ges^2Ura układ elektronowy w obszarze zasady nukleinowej, a różnią się rodzajem podstawnika w położeniu C2, wysunęliśmy przypuszczenie, że za zróżnicowanie trwałości w obrębie par $ges^2Ura-Gua/m^2isoCyt-Gua$ i $ges^2Ura-Ade/m^2isoCyt-Ade$ odpowiedzialna jest wyłącznie specyficzna dystrybucja miejsc akceptorowo-donorowych w obu modyfikacjach (brak N3-H) i wynikający z tego nietypowy układ wiązań wodorowych z A/G (Rys.12).

Opierając się na wynikach badań termodynamicznych, zaproponowaliśmy modele oddziaływań w parach $ges^2Ura-Ade/m^2isoCyt-Ade$ (jedno wiązanie wodorowe) oraz $ges^2Ura-Gua/m^2isoCyt-Gua$ (dwa wiązania wodorowe) (Rys.12). Wykonując dodatkowy pomiar stabilności termicznej dupлексы z $ges^2Ura-Ade$, w obecności jonów srebra Ag^+ , wykazaliśmy, że stabilność dupлексы wzrasta co sugeruje możliwość „zszycia” tej pary *via* wiązanie wodorowe pomiędzy N3 ges^2Ura a N1 guaniny (Rys.12).



Rys.12. Modele oddziaływań par zasad z udziałem ges^2Ura (A) i $m^2isoCyt$ (B).

Należy podkreślić, że model zaproponowany dla pary $ges^2Ura-Gua$ ma identyczną geometrię pary (przesunięcie ges^2U w stronę małego rowka) jak rozważany w literaturze model stabilizujący oddziaływania wahadłowej pary mnm^5s^2U-G (Rys.4). Stanowi to dodatkowe potwierdzenie silnej tendencji ges^2U do rozpoznawania G jako trzeciej litery kodonu.

VIII. Podsumowanie

Główne osiągnięcia naukowe zgłoszone jako podstawa do przewodu habilitacyjnego:

- 1) Wyselekcjonowanie nowego systemu utleniającego $P(III) \rightarrow P(V)$ w syntezie oligomerów RNA modyfikowanych 5-metyloaminometylo-2-tiourydyną (mnm^5s^2U) i 2-tiourydyną/2-tiourydynami (s^2U) metodą amidofosforynową - skutecznie eliminującego uboczne reakcje utlenienia ($s^2 \rightarrow o^2$) i/lub oksydatywnej desulfuracji ($s^2 \rightarrow H^2$) jakie zachodzą przy zastosowaniu standardowych warunków utlenienia.
- 2) Synteza oligomerów RNA modyfikowanych 5-karboksymetyloaminometylourydynami $cmnm^5U$, $cmnm^5s^2U$ oraz 5-taurynometylourydynami τm^5U , τm^5s^2U . Badania obejmowały wyselekcjonowanie grup ochronnych funkcji karboksylowej oraz sulfonowej, ustalenie metodyki wprowadzania łańcucha bocznego w położenie C-5, wykazanie skuteczności zaproponowanego modelu modyfikowanych jednostek monomerycznych w syntezie i deprotekcji oligorybonukleotydów oraz rozwiązanie problemu desulfuracji oligomerów modyfikowanych 2-tiourydynami $cmnm^5s^2U$ i τm^5s^2U na etapie utlenienia fosforynu do fosforany jak również w procesie deprotekcji oligomerów.
- 3) Wprowadzenie nowego syntonu – 5-piwaloiloksymetylourydyny ($Pivom^5U$) i 2-tiourydyny ($Pivom^5s^2U$) do syntezy różnorodnie 5-podstawionych urydyn i 2-tiourydyn. Użyteczność $Pivom^5U$ i $Pivom^5s^2U$ w reakcjach podstawienia $PivO- \rightarrow -NH_2, -NHR, -NR_2, -OR, -SR, -CN$ została potwierdzona w syntezie dwudziestu 5-podstawionych urydyn/2-tiourydyn, w tym dziesięciu natywnych 5-aminometylourydyn nm^5U , nm^5s^2U , mnm^5U , mnm^5s^2U , $cmnm^5U$, $cmnm^5s^2U$, τm^5U , τm^5s^2U , inm^5U i cnm^5U .
- 4) Odkrycie nowej prekursorowej cząsteczki RNA – $Pivom^5U-RNA$ i wykazanie jej użyteczności w post-syntetycznej syntezie oligorybonukleotydów modyfikowanych natywnymi 5-aminometylourydynami nm^5U , mnm^5U , $cmnm^5U$, τm^5U , inm^5U i cnm^5U .
- 5) Synteza i charakterystyka nowo-odkrytych 5-aminometylo 5-geranylo-2-tiourydyn (mnm^5ges^2U , $cmnm^5ges^2U$). Wykazanie różnic we właściwościach fizykochemicznych pomiędzy geranylowymi nukleozydami a macierzystymi 2-tiourydynami.
- 6) Synteza oligomerów RNA i DNA zawierających resztę 5-geranylo-2-tiouracylu w trzech strategiach (bezpośrednie włączenie amidofosforynu ges^2U/ges^2dU , post-syntetyczna geranylacja $s^2Ura-RNA/DNA$ w roztworze i na fazie stałej). Określenie ryzyka pracy syntetycznej z ges^2U -modyfikowanymi oligomerami RNA i DNA w warunkach alkalicznej deprotekcji oligomerów. Wykazanie niepoprawności protokołu deprotekcji ges^2T-DNA prezentowanego w literaturze (*Chem. Commun.*, 2015). Zastosowanie ge-RNA i ge-DNA do wyznaczenia ich właściwości fizykochemicznych i hybrydacyjnych (kooperacja, prof. Nawrot, CBMiM, PAN, Łódź) i porównanie tych właściwości z danymi uzyskanymi dla oligomerów zawierających s^2Ura i Ura

pozwoili sformuować generalny wniosek, że rolą biologiczną xnm⁵ges²U zlokalizowanych w pozycji wahadłowej tRNA jest przesunięcie preferencji odczytu trzeciej litery kodonu z A do G.

IX. Literatura

- Agris PF. Bringing order to translation: the contribution of transfer RNA anticodon-domain modifications. *EMBO Rep.*, **2008**, *9*, 629-635.
- Agris PF. Wobble position modified nucleosides evolved to select transfer RNA codon recognition: a modified wobble hypothesis. *Biochimie*, **1991**, *73*, 1345-1349.
- Agris PF, Vendeix F, Graham WD. tRNA's Wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *J. Mol. Biol.*, **2007**, *366*, 1–13.
- Agris PF. Peptides and methods of use as therapeutics and screening agents. **2011**, Patent: US 20110098215 A1.
- Agris PF, Ashraf S. Antibacterial agents and methods of screening for the same, **2002**, Patent: US 6461815 B1
- Ali AM, Hill B, Taylor SD. Trichloroethyl group as a protecting group for sulfonates and its application to the synthesis of a disulfonate analog of the tyrosine sulfated PSGL-1₄₃₋₅₀ peptide. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3583-3586.
- Allerson CR, Chen SL, Verdine GL. A chemical method for site-specific modification of RNA: the convertible nucleoside approach. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 7423-7433.
- Andrianov AK, Marin A, Chen J, Sargent J, Corbett N. Novel route to sulfonated polyphosphazenes: Single-step synthesis using "noncovalent protection" of sulfonic acid functionality. *Macromolecules*, **2004**, *37*, 4075-4080.
- Armengod NE, Meseguer S, Villarroya M, Prado S, Moukardiri I, Ruiz-Partida R, Garzon MJ, Navarro-Gonzalez C, Matinez-Zamora A. Modification of the wobble uridine in bacterial and mitochondrial tRNAs reading NNA/NNG triplets of 2-codon boxes. *RNA Biol.* , **2014**, *11*, 1495-1507.
- Armstrong VW, Eckstein F. The synthesis of 5-formyluridine-5'-triphosphate: an unusual anomerisation reaction. *Nucleic Acids Res.* **1975**, *1*, 97-100.
- Ashraf SS, Guenther RH, Ansari G, Malkiewicz A, Sochacka E, Agris PF. Role of modified nucleosides of yeast tRNA^{Phe} in ribosomal binding. *Cell Biochem. Biophys.*, **2000**, *33*, 241–252.
- Avino A, Garcia RG, Eritja R. Synthesis of oligoribonucleotides containing 4-thiouridine using the convertible nucleoside approach and the 1-(2-fluorophenyl)-4-methoxypiperidin-4-yl group. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **2004**, *23*, 1767-1777.
- Avitabile BG, Smith CA, Judd DB. Pentafluorophenyl sulfonate ester as a protecting group for the preparation of biaryl- and heterobiaryl sulfonate esters. *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 843-846.
- Badman GT, Reese CB. Reaction between methiodides of nucleoside Mannich bases and carbon nucleophiles. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 1732-1734.
- Bajji AC, Davis DR. Synthesis of the tRNA^{Lys,3} anticodon stem-loop domain containing the hipermodified ms^{2,6}A nucleoside. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 5352-5358.
- Bande O, El Asrar RA, Braddick D, Dumbre S, Pezo V, Schepers G, Pinheiro VB, Lescrinier E, Holliger P, Marlière P, Herdewijn P. Isoguanine and 5-methyl-isocytosine bases, in vitro and in vivo. *Chemistry*, **2015**, *21*, 5009-5022.
- Bartos P, Maciaszek A, Rosinska A, Sochacka E, Nawrot B. Transformation of a wobble 2-thiouridine to 2-selenouridine via S-geranyl-2-thiouridine as a possible cellular pathway. *Bioorg. Chem.*, **2014**, *56*, 49-53.
- Bartos P, Ebenryter-Olbinska K, Sochacka E, Nawrot B. The influence of the C5 substituent on the 2-thiouridine desulfuration pathway and the conformational analysis of the resulting 4-pyrimidinone products. *Bioorg. & Med. Chem.* **2015**, *23*, 5587-5594.
- Bednářová A, Hanna M, Durham I, VanCleave T, England A, Chaudhuri A, Krishnan N. Lost in translation: defects in transfer RNA modifications and neurological disorders. *Front. Mol. Neurosci.*, **2017**, *10*, article 135.
- Bjork G, Hagervall T. Transfer RNA modifications: presence, synthesis, and function. *EcoSal Plus*, **2014**, doi: 10.1074/jbc.M908890199.
- Boccaletto P, Machnicka MA, Purta E, Piatkowski P, Baginski B, Wirecki TK, de Crécy-Lagard V, Ross R, Limbach PA, Kotter A, Helm M, Bujnicki JM. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Res.*, **2017**, doi: 10.1093/nar/gkx1030.

- Boudou V, Langridge J, Van Aerschot A, Hendix C, Millar A, Weiss P, Herdewijn P. Synthesis of the anticodon hairpin tRNA^{Met} containing *N*-{[9-(β-D-ribofuranosyl)-9*H*-purin-6-yl]carbamoyl}-L-threonine (=N⁶-{[(1*S*,2*R*)-1-Carboxy-2-hydroxypropyl]amino}carbonyl)adenosine, t⁶A). *Helv. Chim. Acta*, **2000**, *83*, 152-161.
- Cantara WA, Crain PF, Rozenski J, McCloskey JA, Harris KA, Zhang X, Vendeix FA, Fabris D, Agris PF. The RNA modification database, RNAMDB: 2011 update. *Nucleic Acids Res.*, **2011**, *39*, D195–D201.
- Chen YG, Kowtoniuk WE, Agarwal I, Shen Y, Liu DR. LC/MS analysis of cellular RNA reveals NAD-linked RNA. *Nat. Chem. Biol.*, **2009**, *5*, 879–881;
- Chwialkowska A, Wielgus E, Leszczynska G, Sobczak M, Mikolajczyk B, Sochacka E, Nawrot B. An efficient approach for conversion of 5-substituted 2-thiouridines built in RNA oligomers into corresponding desulfured 4-pyrimidinone products. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, *25*, 3100-3104.
- de Bont DBA, Dijkstra GDH, den Hartog JAJ, Liskamp RMJ. Solid-phase synthesis of peptidosulfonamide containing peptides derived from Leu-enkephalin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, 3035-3040.
- Dedon PC, Begley TJ. A system of RNA modifications and biased codon use controls cellular stress response at the level of translation. *Chem. Res. Toxicol.*, **2014**, *27*, 330-337.
- Dumelin CE, Chen Y, Leconte AM, Chen YG, Liu DR. Discovery and biological characterization of geranylated RNA in bacteria. *Nat. Chem. Biol.*, **2012**, *11*, 913-919.
- Eshete M, Marchbank MT, Deutscher SL, Sproat B, Leszczynska G, Malkiewicz A, Agris PF. Specificity of phage display selected peptides for modified anticodon stem and loop domains of tRNA. *Protein J.* **2007**, *26*, 61-73.
- Feuermann M, Francisci S, Rinaldi T, de Luca C, Rohou H, Frontali L, Bolotin-Fukuhara M. The yeast counterparts of human 'MELAS' mutations cause mitochondrial dysfunction that can be rescued by overexpression of the mitochondrial translation factor EF-Tu. *EMBO reports*, **2001**, *4*, 53-58.
- Gennari C, Gude M, Potenza D, Piarulli UJ. Hydrogen-bonding donor/acceptor scales in β-sulfonamidopeptides. *Chem. Eur.*, **1998**, *4*, 1924-1931.
- Giege R, Lapointe J. Transfer RNA aminoacylation and modified nucleosides. In: Grosjean H, ed. DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution. Austin, Texas, USA: Landes Bioscience, **2009**, 476-492.
- Grosjean H, Westhof E. An integrated, structure- and energy-based view of the genetic code. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 8020-8040.
- Guenther RH, Newman WH, Yenne SP, Mitchell D, Malkiewicz A. Compositions and methods for the identification of inhibitors of protein synthesis. **2008**, Patent: WO 2008064304 A2
- Hagervall TG, Edmonds CG, McCloskey JA, Björk GR. Transfer RNA(5-methylaminomethyl-2-thiouridine)-methyl transferase from *Escherichia coli* K-12 has two enzymatic activities. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 8488-8495.
- Hagervall TG, Pomerantz SC, McCloskey JA. Reduced misreading of asparagines codons by *Escherichia coli* tRNA^{Lys} with hypermodified derivatives of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine in the wobble position. *J. Mol. Biol.*, **1998**, *284*, 33-42.
- Hill JG, Rossiter BE, Sharpless KB. Anhydrous tert-butyl hydroperoxide in toluene: the preferred reagent for applications requiring dry TBHP. *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 3607-3608.
- Hussain M, Ahmed V, Hill B, Ahmed Z, Taylor SD. A re-examination of the difluoromethylenesulfonic acid group as a phosphotyrosine mimic for PTP1B inhibition. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 6764-6777.
- Ikeda K, Tanaka S, Mizuno Y. Syntheses of potential antimetabolites. XX. Syntheses of 5-carbomethoxymethyl- and 5-methylaminomethyl-2-thiouridine (the "first letters" of some anticodons) and closely related nucleosides from uridine. *Chem. Pharm. Bull.*, **1975**, *23*, 2958-2964.
- Ikeuchi Y, Kimura S, Numata T, Nakamura D, Yokogawa T, Ogata T, Wada T, Suzuki T, Suzuki T. Agmatine-conjugated cytidine in a tRNA anticodon is essential for AUA decoding in archaea. *Nat. Chem. Biol.*, **2010**, *6*, 277–282.
- Jager G, Chen P, Bjork GR. Transfer RNA bound to MnmH protein is enriched with geranylated tRNA – a possible intermediate in its selenation? *PLoS*, **2017**, DOI: 10.1371/journal.pone.0153488.
- Kachalova AV, Zubin EM, Oretskaya TS. Methods for the synthesis of oligonucleotides containing reactive electrophilic groups. *Russ. Chem. Rev.*, **2002**, *71*, 1041-1059.
- Kang B, Miyauchi K, Matuszewski M, D'Almeida GS, Rubio MAT, Alfonso JD, Inoue K, Sakaguchi Y, Suzuki T, Sochacka E, Suzuki T. Identification of 2-methylthio cyclic N⁶-threonylcarbamoyladenine (ms2ct6A) as a novel RNA modification at position 37 of tRNAs. *Nucleic Acids Res.*, **2017**, *45*, 2124–2136.
- Karicheva OZ, Kolesnikova OA, Schirtz T, Vysokikh MY, Mager-Heckel A-M, Lombes A, Boucheham A, Krasheninnikov IA, Martin RP, Entelis N, Tarassov I. Correction of the consequences of mitochondrial 3243A>G mutation in the *MT-TL1* gene causing the MELAS syndrome by tRNA import into mitochondria. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 8173-8186.

- Kierzek E, Kierzek R. The synthesis of oligonucleotides containing N6-alkyladenosines and 2-methylthio-N6-alkyladenosines via post-synthetic modification of precursor oligomers. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 4461-4471.
- Kirino Y, Suzuki T. Human mitochondrial diseases associated with tRNA wobble modification deficiency, *RNA Biol.*, **2008**, *2*, 41-45.
- Klamann D, Hofbauer G. Reduktive Spaltungen von Sulfamiden. *Chem. Ber.* **1953**, *86*, 1246-1252.
- Kowtoniuk WE, Shen Y, Heemstra JM, Agarwal I, Liu DR. A Chemical screen for biological small molecule-RNA conjugates reveals CoA-linked RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, *106*, 7768-7773.
- Krüger MK, Pedersen S, Haagervall TG, Sorensen MA. The modification of the wobble base of tRNA^{Glu} modulates the translation rate of glutamic acid codons in vivo. *J. Mol. Biol.*, **1998**, *284*, 621-631.
- Kuimelis RG, Nambiar KP. Synthesis of oligodeoxynucleotides containing 2-thiopyrimidine residues--a new protection scheme. *Nucleic Acids Res.*, **1994**, *22*, 1429-1436.
- Kumar RK, Davis DR. Synthesis and studies on the effect of 2-thiouridine and 4-thiouridine on sugar conformation and RNA duplex stability. *Nucleic Acids Res.*, **1997**, *25*, 1272-1280.
- Kumar RK, Davis DR. Synthesis of oligoribonucleotides containing 2-thiouridine: incorporation of 2-thiouridine phosphoramidite without base protection. *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 7726-7727.
- Kurata S, Weixlbaumer A, Ohtsuki T, Shimazaki T, Wada T, Kirino Y, Takai K, Watanabe K, Ramakrishnan V, Suzuki T. Modified uridines with C5-methylene substituents at the first position of the tRNA anticodon stabilize U-G wobble pairing during decoding. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 18801-18811.
- Kurland CG, Hughes D, Ehrenberg M. Limitations of translation accuracy. In Neidhardt F.C. i wsp. (eds). *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, **1996**, str. 979-1004.
- Kurschat WC, Müller J, Wombacher R, Helm M. Optimizing splinted ligation of highly structured small RNAs. *RNA*, **2005**, *11*, 1909-1914.
- Larsen AT, Fahrenbach AC, Sheng J, Pian J, Szostak JW. Thermodynamic insights into 2-thiouridine-enhanced RNA hybridization. *Nucleic Acids Res.*, **2015**, *43*, 7675-7687.
- Machnicka MA, Olchowik A, Grosjean H, Bujnicki JM. Distribution and frequencies of post-transcriptional modifications in tRNAs. *RNA Biology*, **2014**, *11*, 1619-1629.
- Malkiewicz A, Sochacka E. The protected derivatives of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine and 5-carbomethoxymethyl-2-thiouridine as components for the oligonucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **1983**, *24*, 5387-5390.
- Manickam N, Joshi K, Bhatt MJ, Farabaugh PJ. Effects of tRNA modification on translational accuracy depend on intrinsic codon-anticodon strength. *Nucleic Acids Res.*, **2016**, *44*, 1871-1881.
- Martin JC, Jeffrey GA, McGee DP, Tippie MA, Smee DF, Matthews TR, Verheyden JPH. Acyclic analogs of 2'-deoxynucleosides related to 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine as potential antiviral agents. *J. Med. Chem.*, **1985**, *28*, 358-362.
- Matteucci MD, Caruthers MH. Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 3185-3191.
- Matuszewski M, Debiec K, Sochacka S. Efficient conversion of N6-threonylcarbamoyladenine (t6A) into a tRNA native hydantoin cyclic form (ct6A) performed at nucleoside and oligoribonucleotide levels. *Chem Commun*, **2017**, *53*, 7945-7948; (a)
- Matuszewski M, Wojciechowski J, Miyauchi K, Gdaniec Z, Wolf WM, Suzuki T, Sochacka E. A hydantoin isoform of cyclic N6-threonylcarbamoyladenine (ct6A) is present in tRNAs. *Nucleic Acids Res.*, **2017**, *45*, 2137-2149; (b)
- Miller SC. Profiling sulfonate ester stability: identification of complementary protecting groups for sulfonates. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4632-4635.
- Mizuno H, Sundaralingam M. Stacking of Crick wobble pair and Watson-Crick pair: stability rules of G-U pairs at ends of helical stems in tRNAs and the relation to codon-anticodon wobble interaction. *Nucleic Acids Res.*, **1978**, *5*, 4451-4461
- Montanari A., Besagni C., de Luca C., Morea V., Oliva R., Tramontano A., Bolotin-Fukuhara M., Frontali L. Francisci S. Yeast as a model of human mitochondrial tRNA base substitutions: investigation of the molecular basis of respiratory defects. *RNA*, **2012**, *14*, 275-283.
- Motorin Y, Helm M. tRNA stabilization by modified nucleotides. *Biochemistry*, **2010**, *49*, 4934-4944.
- Muramatsu T, Yokoyama S, Horie N, Matsuda A, Ueda Z, Yamaizumi Z, Kuchino Y, Nishimura S, Miyazawa T. A novel lysine-substituted nucleoside in the first position of the anticodon of minor isoleucine tRNA from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 9261-9267.

- Murphy IV FV, Ramakrishnan V, Malkiewicz A, Agris PF. The role of modifications in codon discrimination by tRNA(Lys)UUU. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2004**, *11*, 1186-1191.
- Näsvalld SJ, Chen P, Björk R. The wobble hypothesis revisited: uridine-5-oxyacetic acid is critical for reading of G-ending codons. *RNA*, **2007**, *13*, 2151-2164.
- Ogata T, Wada T. Chemical synthesis of RNA including 5-taurinomethyluridine. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2006**, *50*, 9-10.
- Ogata T, Wada T. Chemical synthesis of RNA including 5-taurinomethyluridine and 5-taurinomethyl-2-thiouridine. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **2008**, *52*, 323-324.
- Ogata T, Shumazaki T, Umemoto T, Kurata S, Ohtsuki T, Suzuki T, Wada T. Chemical synthesis and properties of 5-taurinomethyluridine and 5-taurinomethyl-2-thiouridine. *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 2585-2588.
- Okamoto I, Seio K, Sekine M. Incorporation of 2'-O-methyl-2-thiouridine into oligoribonucleotides induced stable A-form structure. *Chem. Lett.*, **2006**, *35*, 136-137.
- Phelps SS, Malkiewicz A, Agris PF, Joseph S. Modified nucleotides in tRNA(Lys) and tRNA(Val) are important for translocation. *J Mol Biol.*, **2004**, *338*, 439-444.
- Piton N, Mu Y, Stock T, Prisner TF, Schiemann O, Engels JW. Base-specific spin-labeling of RNA for structure determination. *Nucleic Acids Res.*, **2007**, *35*, 3128-3143.
- Reese CB, Sanghvi YS., The synthesis of 5-carboxymethylaminomethyluridine and 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1984**, 62-63.
- Roberts JC, Gao H, Gopalsamy A, Kongsjahju A, Patch RJ. Neopentyl ester protecting groups for arylsulfonic acids. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 355-358.
- Rodriguez-Hernandez A, Spears JL, Gaston KW, Limbach PA, Gamper H, Hou Y-M, Kaiser R, Agris PF, Perona JJ. Structural and mechanistic basis for enhanced translational efficiency by 2-thiouridine at the tRNA anticodon wobble position. *J. Mol. Biol.*, **2013**, *425*, 3888-3906.
- Rohou H, Francisci S, Rinaldi T, Frontali L, Bolotin-Fukuhara M. Reintroduction of a characterized Mitt RNA glycine mutation into yeast mitochondria provides a new tool for the study of human neurodegenerative diseases. *Yeast*, **2001**, *18*, 219-227.
- Rozov A, Demeshkina N, Khusainov I, Westhof E, Yusupov M, Yusupova G. Novel base-pairing interactions at the tRNA wobble position crucial for accurate reading of genetic code. *Nat. Commun.*, **2016**, *7*, 10457-10466.
- Seeberger S, Griffin RJ, Hardcastle IR, Golding BT. A new strategy for the synthesis of taurine derivatives using the 'safety-catch' principle for the protection of sulfonic acids. *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 132-138.
- Seio K, Wada T, Sakamoto K, Yokoyama S, Sekine M. Chemical synthesis and properties of conformationally fixed diuridine monophosphates as building blocks of the RNA turn motif. *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 1429-1443.
- Sekine M, Peshakova LS, Hata T, Yokoyama S, Miyazawa T. Novel method for regioselective 2'-O-methylation and its application to the synthesis of 2'-O-methyl-5-[[carboxymethyl]amino]methyl]uridine. *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 5060-5061.
- Sepuri NBV, Gorla M, King MP. Mitochondrial lizyl-tRNA synthetase independent import of tRNA lysine into yeast mitochondria. *PLoS one*, **2012**, *7*, e35321.
- Shiba Y, Masuda H, Watanabe N, Ego T, Takagaki K, Ishiyama K, Ohgi T, Yano J. Chemical synthesis of a very long oligoribonucleotide with 2-cyanoethoxymethyl (CEM) as the 2'-O-protecting group: structural identification and biological activity of a synthetic 110mer precursor-microRNA candidate. *Nucleic Acids Res.*, **2007**, *35*, 3287-3296.
- Smuga D, Majchrzak K, Sochacka E, Nawrot B. RNA-cleaving 10-23 deoxyribozyme with a single amino acid-like functionality operates without metal ion cofactors. *New. J. Chem.*, **2010**, *34*, 934-948.
- Sochacka E. Efficient assessment of modified nucleoside stability under conditions of automated oligonucleotide synthesis: characterization of the oxidation and oxidative desulfurization of 2-thiouridine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.*, **2001**, *20*, 1871-1879.
- Sochacka E, Lodyga-Chruscinska E, Pawlak J, Cypryk M, Bartos P, Ebenryter-Olbinska K, Leszczynska G, Nawrot B. C5-substituents of uridines and 2-thiouridines present at the wobble position of tRNA determine the formation of their keto-enol or zwitterionic forms – a factor important for accuracy of reading of guanosine at the 3'-end of the mRNA codons. *Nucleic Acids Res.*, **2017**, *45*, 4825-4836.
- Sochacka E, Szczepanowski RH, Cypryk M, Sobczak M, Janicka M, Kraszewska K, Bartos P, Chwialkowska A, Nawrot B. 2-Thiouracil deprived of thiocarbonyl function preferentially base pairs with guanine rather than adenine in RNA and DNA duplexes. *Nucleic Acids Res.*, **2015**, *43*, 2499-2512.
- Sowers LC, Beardsley GP. Synthesis of oligonucleotides containing 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine at defined sites. *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 1664-1665.

- Strube T, Schiemann O, MacMillan F, Prisner TF, Engels JW. A new facile method for spin-labeling of oligonucleotides. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, **2001**, *20*, 1271-1274.
- Sundaram M, Durant PC, Davis DR. Hypermodified nucleosides in the anticodon of tRNA^{Lys} stabilize a canonical U-turn structure. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 12575-12584; (a)
- Sundaram M, Crain PF, Davis DR. Synthesis and characterization of the native anticodon domain of *E. coli* tRNA^{Lys}. Simultaneous incorporation of modified nucleosides mnm⁵s²U, t⁶A, and pseudouridine using phosphoramidite chemistry. *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 5609-5614; (b)
- Suzuki T, Nagao A, Suzuki S. Human mitochondrial diseases caused by lack of taurine modification in mitochondrial tRNAs. *WIREs RNA*, **2011**, *2*, 376-386.
- Suzuki T, Suzuki T. A complete landscape of post-transcriptional modifications in mammalian mitochondrial tRNAs. *Nucleic Acids Res.*, **2014**, *42*, 7346-7357.
- Sylvers LA, Rogers KC, Shimizu M, Ohtsuka E, Söll D. A 2-thiouridine derivative is a positive determinant for aminoacylation by *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, **1993**, *32*, 3836-3841.
- Takai K, Yokoyama S. Roles of 5-substituents of tRNA wobble uridines in the recognition of purine-ending codons. *Nucleic Acid Res.*, **2003**, *31*, 6383-6391.
- Testa SM, Disney MD, Turner DH, Kierzek R. Thermodynamics of RNA-RNA duplexes with 2- or 4-thiouridines: implications for antisense design and targeting a group I intron. *Biochemistry*, **1999**, *38*, 16655-16662.
- Torres AG, Batlle E, Ribas de Pouplana L. Role of tRNA modifications in human diseases. *Trends. Mol. Med.* **2014**, *20*, 306-314.
- Truce WE, Vrencur DJ. Hydrogen-bonding donor/acceptor scales in β -sulfonamidopeptides. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 1226-1227.
- Urbonavicius J, Qian Q, Durand JMB, Hagervall TG, Bjork GR. Improvement of reading frame maintenance is a common function of several tRNA modifications. *EMBO J.*, **2001**, *20*, 4863-4873.
- Vendeix FAP, Murphy IV FV, Gustilo E, Graham W, Cantora W, Leszczyńska G, Sproat B, Małkiewicz A, Agris PF. Human tRNA^{Lys3} anticodon is pre-structured by its naturally occurring post-transcriptional modifications. *J. Mol. Biol.*, **2012**, *416*, 467-485.
- Vendeix FAB, Dziergowska A, Gustilo EM, Graham WD, Sproat B, Malkiewicz A, Agris PF. Wobble-position modifications contribute order to tRNA's anticodon for ribosome-mediated codon binding. *Biochemistry*, **2008**, *47*, 6117-6129.
- Wada T, Shimazaki T, Nakagawa S, Ohtsuki T, Kurata S, Suzuki T, Watanabe K, Saigo K. Chemical synthesis of novel taurine-containing uridine derivatives. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **2002**, *2*, 11-12.
- Wang R, Ranganathan SV, Basanta-Sanchez M, Shen F, Chen A, Sheng J. Synthesis and base pairing studies of geranylated 2-thiothymidine, a natural variant of thymidine. *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 16369-16372.
- Wang X, Yan Q, Guan M-X. Combination of the loss of cmnm⁵U₃₄ with the lack of s²U₃₄ modifications of tRNA^{Lys}, tRNA^{Glu}, and tRNA^{Gln} altered mitochondrial biogenesis and respiration. *J. Mol. Biol.* **2010**, *395*, 1038-1048.
- Weixlbaumer A, Murphy IV FV, Dziergowska A, Malkiewicz A, Vendix FA, Agris PF, Ramakrishnan V. Mechanism for expanding the decoding capacity of transfer RNAs by modification of uridines. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2007**, *14*, 498-502.
- Wicke L, Engels JW. Postsynthetic on column RNA Labeling via Stille coupling. *Bioconjugate Chem.*, **2012**, *23*, 627-642.
- Wrobel J, Rogers J, Green D, Kao W. Use of an isopropyl ester moiety as a sulfonic acid protecting group in a greatly improved synthesis of an arylsulfonic acid-based folliclestimulating hormone antagonist. *Synth. Commun*, **2002**, *32*, 2695-2704.
- Yamamoto Y, Yokoyama S, Miyazawa T, Watanabe K, Higuchi S. NMR analyses on the molecular mechanism of the conformational rigidity of 2-thioribothymidine, a modified nucleoside in extreme thermophile tRNAs. *FEBS Lett.*, **1983**, *157*, 95-99.
- Yan L, Müller CE. Preparation, properties, reactions, and adenosine receptor affinities of sulfophenylxanthine nitrophenyl esters: Toward the development of sulfonic acid prodrugs with peroral bioavailability. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1031-1043.
- Yarian C, Townsend H, Czystkowski W, Sochacka E, Małkiewicz A, Guenther R, Miskiewicz A, Agris PF. Accurate translation of the genetic code depends on tRNA modified nucleosides, *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 16391-16395.
- Yi C, Pan T. Cellular Dynamics of RNA modifications. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1380-1388.
- Yokoyama S, Nishimura S. Modified nucleosides and codon recognition, w: tRNA: structure, biosynthesis and function. ed. Söll, D., RajBhandary, U. American Society for Microbiology, **1998**, 207.

Yokoyama S, Watanabe T, Murao K, Ishikura H, Yamaizumi Z, Nishimura S, Miyazawa T. Molecular mechanism of codon recognition by tRNA species with modified uridine in the first position of the anticodon. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **1985**, *82*, 4905-4909.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO – BADAWCZYCH

Badania opisane w publikacjach A1-A11 oraz B1,B2 dotyczą syntezy modyfikowanych oligorybonukleotydów oraz ich wykorzystania jako narzędzi do określenia wpływu modyfikowanych nukleozydów na strukturę/dynamikę konformacyjną tRNA jak również do wyjaśnienia roli jaką pełnią w homo- i heterotopowych oddziaływaniach tych biopolimerów z partnerami cykli komórkowych. Badania te można podzielić na dwa zasadnicze kierunki: 1) badania nad mechanizmem procesu translacji/regulacji ekspresji informacji genetycznej oraz 2) badania nad selekcją inhibitorów namnażania patogenów (HIV-1, *Staphylococcus aureus*). Do realizacji wspomnianych zagadnień wykorzystane zostały chemicznie wytworzone oligorybonukleotydy o sekwencji ramienia antykodonu (ASL) tRNA^{Lys,3} z człowieka, tRNA^{Phe} z drożdży oraz tRNA^{Arg} z bakterii *S.aureus* i *E.coli*, zawierające modyfikowane jednostki w miejscach strategicznych dla ich aktywności biologicznej (pozycje 32, 34, 37 pętli antykodonu oraz 39 i 40 trzonu antykodonu).

Określenie strukturalnych uwarunkowań aktywności tRNA w procesie translacji było realizowane w oparciu o skorelowany cykl badań biochemiczno-biofizycznych, którego zasadniczymi składowymi było określenie stabilności termicznych ASL, badania strukturalne ASL w roztworze, pomiary efektywności wiązania ASL do rybosomu oraz wyznaczenie modelu oddziaływań w obszarze minihelisy kodon-antykodon z zastosowaniem krystalicznych kompleksów 30S rybosom-mRNA-ASL. Na tej podstawie określono rolę biologiczną kilkunastu modyfikowanych rybonukleozydów, w tym pseudourydyny (Ψ_{39}), 5-metylocytydyny (m^5C_{40}), 2-tiocytydyny (s^2C_{32}), inozyny (I_{34}), 5-metoksykarbonylometylo-2-tiourydyny ($mcm^5s^2U_{34}$) i 2-metylotio-6-treonylokarbamoadenozyny ($ms^2t^6A_{37}$).

Niezwykle istotne były badania z udziałem syntetycznego 17-meru o sekwencji ramienia antykodonu ludzkiego tRNA^{Lys,3}_{UUU} (ASL^{Lys,3}) modyfikowanego $mcm^5s^2U_{34}$, $ms^2t^6A_{37}$ i ψ_{39} (w tym znakowanego biotyną), który jest primerem dla odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1. Ustaliliśmy, że status chemiczny modyfikacji występujących w ramieniu antykodonu ludzkiego tRNA^{Lys,3}_{UUU} ma wpływ na efektywność wiązania ASL z białkiem NCp7 wirusa i konsekwentnie, na efektywność tworzenia kompleksu tRNA^{Lys,3}-pętla I RNA wirusa. W związku z odkryciem tej zależności, hipermodyfikowane fragmenty ASL^{Lys,3} zostały wykorzystane do opracowania testów umożliwiających wyselekcjonowanie inhibitorów odwrotnej transkrypcji wirusa HIV-1 (współpraca z prof. P. Agrisem, The RNA Institute, University At Albany-SUNY, Albany, USA i firmą TRANA DISCOVERY, Inc., Cary; USA).

Zrealizowana z moim udziałem, synteza DY647-znakowanego oligomeru ASL^{Arg}_{*S.aureus*} zawierającego mnm^5U_{34} , t^6A_{37} oraz specyficzną wyłącznie dla bakteryjnych tRNA 2-tiocytydynam (s^2C_{32}), umożliwiła przeprowadzenie badań nad selekcją inhibitorów namnażania bakterii *S.aureus* (współpraca z firmą TRANA DISCOVERY, Inc., Cary; USA). W rezultacie tych badań, z puli blisko 60 000 niskocząsteczkowych związków wyselekcjonowano cztery, które okazały się efektywnie hamować syntezę białek *S.aureus*. Pozostała część moich prac dotyczy wykorzystania modyfikowanych rybonukleozydów w badaniach aktywności enzymów modyfikujących tRNA (współpraca z prof. R. Falnes, University of Oslo, Department of Mol. Biosc., Oslo, Norwegia), aktywności katalitycznej DNA-zyków oraz badań transformacji 2-tiourydyn w warunkach stresu oksydacyjnego w komórce (współpraca z prof. B. Nawrot, CBMiM, PAN, Łódź).

Ponadto jestem współautorką czterech prac przeglądowych opublikowanych w czasopismach krajowych (B3-B6), dotyczących budowy i funkcji cytozolowych i mitochondrialnych tRNA oraz strategii mitochondrialnej terapii genowej.

5.1. Wykaz innych (nie wchodzących w skład tematyki habilitacyjnej) opublikowanych prac naukowych

A) Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

- A1. Thermodynamic contribution of nucleoside modifications to yeast tRNA^{Phe} anticodon stem loop analogs
Agris P. F., Guenther R., Sochacka E., Newman W., **Czerwińska G.**, Liu G., Ye W., Malkiewicz A. *Acta Biochem. Pol.*, **1999**, 46, 163-172; IF₁₉₉₉=0.569
- A2. Structural and functional roles of the N1- and N3-protons of Ψ at tRNA's position 39
Yarian C. S., Basti M. M., Cain R. J., Ansari G., Guenther R., Sochacka E., **Czerwińska G.**, Malkiewicz A., Agris P. F. *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27, 3543-3549; IF₁₉₉₉=5.748
- A3. Synthesis and properties of uniquely modified oligoribonucleotides: yeast tRNA^{Phe} fragments with 6-methyluridine and 5,6-dimethyluridine at site-specific positions
Sochacka E., **Czerwińska G.**, Guenther R., Cain R., Agris P.F., Malkiewicz A. *Nucleosides & Nucleotides*, **2000**, 19, 515-522; IF₂₀₀₀=0.622

Po uzyskaniu stopnia doktora:

- A4. Specificity of phage display selected peptides for modified anticodon stem and loop domains of tRNA
Eshete M., Marchbank M.T., Deutscher S.L., Sproat B., **Leszczynska G.**, Malkiewicz A., Agris P.F. *Protein J.*, **2007**, 26, 61-73; IF₂₀₀₄= 1.010
- A5. Chemical synthesis of an RNA sequence containing 2-thiocytidine (s²C): the DY647 labelled anticodon stem and loop sequence of *Staphylococcus aureus* tRNA^{Arg} (s²C₃₂, mnm⁵U₃₄, t⁶A₃₇).
Leszczynska G., Pieta J., Sproat B., Malkiewicz A. *Tetrahedron Lett.*, **2011**, 52, 4443-4447; IF₂₀₁₁ = 2.683.
- A6. Functional recognition of the modified human tRNA^{Lys}3UUU anticodon domain by HIV's nucleocapsid protein and a peptide mimic
Graham W.D., Barley-Maloney L., Stark C.J., Kaur A., Stolyarchuk K., Sproat B., **Leszczynska G.**, Malkiewicz A., Safwat N., Mucha P., Guenther R., Agris P. F. *J. Mol. Biol.*, **2011**, 410, 698-715; IF₂₀₁₁ = 4.001
- A7. ALKBH8-mediated formation of a novel diastereomeric pair of wobble nucleosides in mammalian tRNA

- van den Born E., Vågbo C. B., Songe-Møller L., Leihne V., Lien G. F., **Leszczynska G.**, Malkiewicz A., Krokan H.E., Kirpekar F., Klungland A., Falnes P.Ø. *Nat. Commun.*, **2011**, 2, 172, IF₂₀₁₁ = 7.396.
- A8. Human tRNA^{Lys}3UUU is pre-Structured by natural modifications for cognate and wobble codon binding through keto-enol tautomerism
Vendeix F.A.P, Murphy IV F. V., Cantara W. A., **Leszczynska G.**, Gustilo E. M., Sproat B., Malkiewicz A., Agris P. F. *J. Mol. Biol.*, **2012**, 416, 467-485; IF₂₀₁₂ = 3.905
- A9. Modifications modulate anticodon loop dynamics and codon recognition of *E. coli* tRNA^{Arg1,2}
Cantara W. A., Bilbille Y., Kim J., Kaiser R., **Leszczynska G.**, Malkiewicz A., Agris P. F. *J. Mol. Biol.*, **2012**, 416, 579-597; IF₂₀₁₂ = 3.905
- A10. An efficient approach for conversion of 5-substituted 2-thiouridines built in RNA oligomers into corresponding desulfured 4-pyrimidinone products
Chwiałkowska A., Wielgus E., **Leszczynska G.**, Sobczak M., Mikołajczyk B., Sochacka E., Nawrot B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, 25, 3100-3104; IF₂₀₁₅ = 2.486
- A11. C5-substituents of uridines and 2-thiouridines present at the wobble position of tRNA determine the formation of their keto-enol or zwitterionic forms – a factor important for accuracy of reading of guanosine at the 3'-end of the mRNA codons
Sochacka E., Lodyga-Chruscinska E., Pawlak J., Cypryk M., Bartos P., Ebenryter-Olbinska K., Leszczynska G, Nawrot B. *Nucleic Acids Res.* **2017**, 45, 4825-4836; IF₂₀₁₆ = 10.162

B) Monografie, publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR):

- B1. Synthesis of modified oligonucleotides for investigation of catalytic activity and substrate specificity of DNAzyme 10-23.
Sochacka E., **Leszczyńska G.**, Miśkiewicz A., Frątczak I., Smuga D., *Ann. Pol. Chem. Soc.* **2004**, 652-655.
- B2. Chemical synthesis of human mitochondrial tRNA^{Lys} fragment containing 5-aurinomethyl-2-thiouridine and 6-threonylcarbamoyladenine
Wozniak K., Stasiak A., Leonczak P., **Leszczynska G.**, Malkiewicz A., *Coll. Czech. Chem. Commun., Symp. Series*, **2014**, 14, 408-410.
- B3. Konformacja/dynamika motywów pętli w sekwencjach RNA
Małkiewicz A., **Leszczyńska G.**, Miśkiewicz A., *Na pograniczu chemii i biologii*, red. J. Barciszewski, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. A. M w Poznaniu. **2002**; tom V, 73-103
- B4. Modyfikowane, katalityczne kwasy nukleinowe
Leszczyńska G., Sochacka E. *Biotechnologia*, **2003**, 2(61), 165-181

- B5. Mitochondrialne tRNA (mt-tRNA): struktura, potranskrypcyjna modyfikacja, patogene mutacje w genach mt-tRNA

Leszczyńska G., Leonczak P., Pięta J., Małkiewicz A. *Na pograniczu chemii i biologii* red. J. Barciszewski, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. A. M w Poznaniu. **2007**; tom XVIII, 89-111.

- B6. Strategie mitochondrialnej terapii genowej

Leszczyńska G., Leonczak P., Radzimierski A., *Na pograniczu chemii i biologii*, red. J. Barciszewski, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. A. M w Poznaniu. **2010**; tom XXIV, 33-61.

Sumaryczny impact factor: 79.445

