

Uniwersytet w Białymstoku  
Wydział Biologiczno - Chemiczny

**Alicja Stachelska - Wierzchowska**

**Kinetyka i mechanizm hydrolizy analogów  
5' - końca mRNA**

Streszczenie rozprawy doktorskiej wykonanej  
w Katedrze Fizyki i Biofizyki  
Uniwersytetu Warmińsko - Mazurskiego w Olsztynie

Promotor pracy: dr hab. Zbigniew Jan Wieczorek, prof. UWM  
(Uniwersytet Warmińsko - Mazurski w Olsztynie)

Recenzenci pracy: prof. dr hab. Tadeusz Kulikowski  
(Polska Akademia Nauk w Warszawie)  
Dr hab. Krystyna Midura – Nowaczek  
(Uniwersytet Medyczny w Białymstoku)

Białystok 2009

Eukariotyczny informacyjny RNA (mRNA), syntetyzowany przez polimerazę II RNA, podlega w jądrze komórkowym złożonemu procesowi „dojrzenia”. W efekcie dojrzała forma mRNA zawiera na swoim 5' - końcu charakterystyczną strukturę zwaną kap (*ang. cap*). Struktura ta przyjmuje ogólną formę  $m^7GpppNpNpN\dots$ , przy czym końcowy nukleozyd, 7 - metyloguanozyna ( $m^7Guo$ ), jest połączony nietypowym dla kwasów nukleinowych wiązaniem 5',5' - trifosforanowym z następnym nukleozydem (najczęściej 2'-*O*-metylowanym). Małe jądrowe RNA (snRNA) zawiera na końcu 5' zmodyfikowaną strukturę kap,  $m_3^{2,2,7}GpppN$  (czyli trimetylowany kap, w skrócie TMG -kap) lub metyl-pppN (Mppp-kap). TMG - kap występuje także na końcu 5' mRNA niższych organizmów eukariotycznych (np. nicieni).

Koniec 5' - mRNA jest rozpoznawany przez enzymy uczestniczące w procesie dojrzenia, transportu i procesie syntezy białek. W organizmach eukariotycznych kap jest rozpoznawany przez czynnik inicjacji translacji eIF4E, zwany również białkiem wiążącym kap (*ang. Cap Binding Protein*), dzięki czemu mRNA zostaje włączony do cyklu translacyjnego. Ponieważ struktury kapu – zarówno w mRNA, jak i w snRNA - pełnią istotną rolę w różnych etapach ekspresji genów u eukariotów, z tego względu są one przedmiotem badań farmakologicznych mających na celu sztuczną regulację ekspresji wybranych genów (np. onkogenów). Zmiany w strukturze końca 5' mRNA lub jego usunięcie skutkuje wyłączeniem procesu translacji, w efekcie czego dochodzi do zablokowania ekspresji danego genu. Niedawno zostały odkryte nukleazy specyficzne (lub przynajmniej selektywne) wobec kapów (tzw. *scavenger decapping enzymes*). Ich struktura i własności są nadal badane. Jak dotychczas, nieznane są w literaturze przykłady sztucznych nukleaz hydrolizujących w sposób selektywny zakończenie 5' - mRNA (kap), choć pomysł taki wydaje się obiecujący ze względu na spodziewaną specyficzność względem dojrzałych cząsteczek mRNA. Idea sztucznej nukleazy hydrolizującej w sposób selektywny koniec 5' mRNA wymaga m. in. badania mechanizmów chemicznej hydrolizy analogów kapu.

Niniejsza rozprawa doktorska mieści się w nurcie badań nad chemicznymi możliwościami wyłączenia z procesu translacji mRNA w organizmach eukariotycznych poprzez uszkodzenie lub odcięcie specyficznej struktury 5' - końca mRNA. Wyniki tych badań mogą przyczynić się do postępu w konstruowaniu sztucznych nukleaz służących sterowaniu procesem ekspresji genu na poziomie translacji.

**Celem** rozprawy dysertacyjnej było poszerzenie wiedzy na temat możliwości nieenzymatycznej częściowej destrukcji lub całkowitej degradacji 5' - końca mRNA.

W pracy przedstawiono wyniki badań wpływu wybranych czynników na przebieg hydrolizy analogów kapu. Badania obejmowały trzy rodzaje procesów hydrolitycznych: reakcję hydrolizy alkalicznej pierścienia imidazolowego 7 - metyloguanozyny, depurynacji reszt 7 - metyloguanozynowych oraz katalitycznej hydrolizy wiązań fosfodiesterowych mostków 5',5'-oligosforanowych w obecności jonów metali dwuwartościowych lub ich związków kompleksowych. Kinetykę procesów badano na obszernym zestawie syntetycznych analogów końca 5' mRNA.

Dla zrealizowania celu podjęto badania:

- ▶ wpływu czynników fizykochemicznych i strukturalnych na kinetykę rozpadu pierścienia imidazolowego analogów 5' - końca mRNA,
- ▶ wpływu jonów wybranych metali dwuwartościowych na rozpad wiązań fosfodiesterowych występujących w mostku 5',5' - oligofosforanowym analogów kapu,
- ▶ katalitycznych właściwości chelatowych kompleksów miedzi (II) i cynku z bi - lub terpirydyną:  $\text{Cu}^{2+}\text{BiPy}$ ,  $\text{Zn}^{2+}\text{BiPy}$ ,  $\text{Cu}^{2+}\text{TerPy}$  oraz  $\text{Zn}^{2+}\text{TerPy}$  w hydrolizie kapu.

Końcowym etapem pracy było zaproponowanie mechanizmu hydrolizy mostka 5',5' - tri- oraz tetrafosforanowego w obecności wybranych kompleksów chelatowych.

W części teoretycznej pracy dysercyjnej przedstawiono krótką historię odkrycia 5' - końca mRNA, dokonano przeglądu literatury na temat występowania rozmaitych struktur kapu wyższych eukariotów (roślin i zwierząt) oraz wirusów. Następnie opisano liczne biologiczne funkcje kapu, przedstawiono rentgenograficzny model jego kompleksu z czynnikiem eIF4E, oraz mechanizmy degradacji kapu, działającej jako jedna z dróg regulacji poziomu ekspresji genów. Uzupełnienie tego rozdziału stanowi podrozdział o sztucznych rybonukleazach, które cieszą się zainteresowaniem ze względu na potencjalne zastosowania terapeutyczne. W dalszej części pracy przedstawiono najważniejsze informacje na temat własności fizykochemicznych 5' - końca mRNA, a wśród nich:  $\text{pK}_a$  analogów kapu, konformacje 5' - końca mRNA oraz oddziaływania warstwowe zasad nukleinowych w strukturze kapu. Następnie dokonano przeglądu literatury na temat reakcji hydrolitycznych, którym może ulegać struktura kapu, takich jak: depurynacja w środowisku kwaśnym, otwieranie pierścienia imidazolowego 7 - metyloguanozyny w środowisku alkalicznym oraz hydroliza mostka 5',5' - oligofosforanowego. Po czym omówiono czynniki wpływające na szybkość hydrolizy analogów 5' - końca mRNA, a wśród nich omówiono wpływ alkilacji reszt guanylowych, wpływ temperatury oraz efektu solnego.

W kolejnym rozdziale przedstawiono metodykę badań prowadzonych w pracy dysertacyjnej. Kinetykę reakcji hydrolizy analogów końca 5' mRNA badano śledząc postępowanie reakcji w sposób ciągły, przy pomocy metod optycznych – spektrofotometrii UV oraz fluorymetrii, lub w sposób punktowy, drogą analizy mieszanin reakcyjnych metodami kapilarnej elektroforezy strefowej (CZE) lub wysokorozdzielczej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorami optycznymi. Następnie omówiono metodykę wyznaczania stałych szybkości i energii aktywacji poszczególnych reakcji oraz opisano fluorescencyjną metodę wyznaczania parametrów termodynamicznych w oddziaływaniach warstwowych zasad nukleinowych w dinukleotydach.

W części eksperymentalnej opisano wyniki badań kinetyki reakcji hydrolizy modelowych nukleotydów (17 związków) oraz dinukleotydów (28 związków), analogów kapu, prowadzonych metodami spektroskopowymi, chromatograficznymi i elektroforetycznymi.

W pracy omówiono wyniki badań wpływu na kinetykę hydrolizy pH środowiska oraz różnych czynników strukturalnych analogów kapu: modyfikacji części zasadowej nukleotydów, obecności i charakteru podstawników guaniny w nukleozydach oraz dinukleotydach, długości mostka 5',5'-oligofosforanowego w analogach typu  $m^7GpppG$ ,  $m^{7,2'-O}GpppG$ ,  $m^{7,3'-O}GpppG$ , oddziaływań warstwowych między zasadami w dinukleotydach oraz obecności i rodzaju drugiej zasady tych ostatnich.

Przeprowadzone badania wykazały, że przy zmianie pH stałe szybkości otwierania pierścienia imidazolowego 7 - metyloguanozyny są w przybliżeniu proporcjonalne do stężenia jonów  $OH^-$ , natomiast zależność od siły jonowej jest zgodna z teorią Debye'a-Hückela. Szybkość reakcji wzrasta ze wzrostem siły jonowej w przypadku mono- i dinukleotydowych analogów kapu w związku z osłabieniem elektrostatycznego oddziaływania ujemnie naładowanych reszt fosforanowych na kompleks aktywny, związanym z zależnym od siły jonowej ekranowaniem tych reszt przez jony sodowe. Niezbyt duży natomiast wpływ na szybkość tej reakcji ma rodzaj anionów obecnych w roztworze, natomiast kationy wywierają wpływ znikomy. Stwierdzono, że proces otwierania pierścienia imidazolowego jest kilkakrotnie wolniejszy dla tych analogów, w których reszta 7 - metyloguanozyny zawiera grupę metyloaminową, zależy także w niewielkim stopniu od długości łańcucha oligofosforanowego oraz oddziaływań stackingowych w dinukleotydach.

W temperaturze 60 °C, przy  $pH < 7$ , obserwowano dodatkowo proces depurynacji reszt 7 - metyloguanozynowych, który śledzono metodami fluorymetryczną i chromatograficzną przy  $pH \sim 5$ . Proces ten zależy od oddziaływań elektrostatycznych w cząsteczce: stwierdzono, że depurynacja  $m^7GMP$  jest dwukrotnie wolniejsza niż depurynacja wolnego nukleozydu, a w

dinukleotydach jest ona jeszcze około 2,5 razy wolniejsza. Związane to jest z oddziaływaniem anionowych grup fosforanowych z kationowym pierścieniem imidazolowym. Proces depurynacji jest ponadto ok. 4 razy wolniejszy w tych analogach kapu, w których reszta m<sup>7</sup>Guo zawiera grupę metyloaminową. Zmiany szybkości depurynacji związane z alikilacją analogów kapu w pozycji N - 7, wskazują, na to że wzrost elektroujemności podstawnika destabilizuje wiązanie glikozydowe, a efekt ten wynika ze zwiększenia gęstości ładunku na pierścieniu imidazolowym.

Następnie opisano proces hydrolizy mostka 5',5'-tri- oraz tetrafosforanowego analogów końca 5' mRNA, ślędzony metodami chromatografii cieczowej oraz strefowej elektroforezy kapilarnej (CZE).

Mostki 5',5'-oligofosforanowe w badanych analogach kapu są praktycznie stabilne w umiarkowanych pH przy 60 °C, natomiast obecność jonów metali przejściowych - Zn<sup>2+</sup> lub Cu<sup>2+</sup>, albo ich związków kompleksowych z di- oraz terpirydyną, w stężeniach powyżej  $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  wywołuje katalityczną hydrolizę wiązań fosfodiesterowych. Wzrost stężenia jonów Cu<sup>2+</sup> zwiększa również szybkość depurynacji dinukleotydów, powodem tego jest proces koordynacji jonów z grupami fosforanowymi, który osłabia stabilizujące wiązanie glikozydowe oddziaływanie grup fosforanowych z kationowymi resztami 7 - metyloguanozyny. Stwierdzono, że zarówno jony, jak i związki kompleksowe Cu<sup>2+</sup> lepiej katalizują ten proces od jonów i kompleksów Zn<sup>2+</sup>, chociaż te ostatnie są bardziej selektywne dla wiązań fosfodiesterowych. Przy niskich stężeniach ( $\sim 2 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) kompleksy dipirydynowe są bardziej efektywnymi katalizatorami od kompleksów terpirydynowych, ale przy wyższych stężeniach zależność ta jest odwrotna, przypuszczalnie ze względu na dimeryzację dipirymidyn.

Na podstawie wyników hydrolizy mostka mostka 5',5'-oligofosforanowego analogów końca 5' mRNA zaproponowano mechanizm tej reakcji, zachodzącej w obecności stosowanych związków kompleksowych miedzi (II) i cynku (II).