

MGR INŻ. ANNA RADOMIŁA STASIŃSKA

OLIGONUKLEOTYDY RNA MODYFIKOWANE CYSTAMINĄ: SYNTEZA I WYKORZYSTANIE W
SIECIOWANIU I KONIUGACJI PRZEZ WIĄZANIA DISIARCZKOWE.

Streszczenie

Opracowanie chemicznej metody syntezy oligonukleotydów serii DNA i RNA zrewolucjonizowało świat badań biologii, biochemii i pokrewnych dziedzin. Częsteczki te oraz ich funkcjonalne modyfikacje pozwoliły na scharakteryzowanie szeregu oddziaływań i mechanizmów funkcjonowania organizmów żywych, których badanie wcześniej nie było możliwe. Obecnie oligonukleotydy stanowią podstawowe narzędzia biologii molekularnej, diagnostyki oraz, w coraz większym stopniu, medycyny.

Chemicznie modyfikowane oligonukleotydy mogą służyć jako użyteczne narzędzia w badaniach nad oddziaływaniami biocząsteczek między sobą. Znanych jest wiele modyfikacji o różnych właściwościach, a przy obecnym stanie wiedzy możliwe jest opracowanie metody funkcjonalizacji bezpośrednio dopasowanej do danego zastosowania. Jedną z użytecznych modyfikacji oligonukleotydów jest wprowadzanie łączników do łańcucha, które dzięki zawartej w swojej strukturze grupie funkcyjnej, pozwalają na kowalencyjne łączenie z inną cząsteczką, np. znacznikiem fluorescencyjnym lub białkiem. Istnieje wiele rodzajów łączników zawierających grupy funkcyjne o różnej reaktywności toteż wybór zależy od zapotrzebowania oraz funkcji, jaką mają pełnić.

Zazwyczaj łączniki umieszczane są w pozycjach terminalnych oligonukleotydu, jednak to rozwiązanie ma ograniczone zastosowanie, szczególnie w sytuacji, kiedy wymagane jest precyzyjne położenie łącznika w określonej pozycji wewnątrz łańcucha. Celem moich badań było opracowanie metody pozwalającej na otrzymanie trwałych oligonukleotydów RNA zawierających łącznik 2,2'-ditiobisetyloaminowy (cystaminowy) na wybranym wiązaniu fosfordiesterowym zlokalizowanym wewnątrz łańcucha kwasu nukleinowego. Sieciowanie i koniugacja poprzez cystaminę jest reakcją odwracalną, co w pewnych zastosowaniach może stanowić dodatkowy atut. TioI, stanowiący grupę funkcyjną modyfikowanego oligonukleotydu, ulega utlenianiu w reakcji z inną grupą tiolową obecną w drugiej cząsteczce z wytworzeniem mostka disiarczkowego, który z kolei można zredukować powodując uwolnienie obu uprzednio połączonych cząsteczek.

Do otrzymania P-cystaminowych oligonukleotydów wykorzystałam połączenie dwóch podejść syntetycznych: metody amidofosforynowej oraz metody H-fosfonianowej. Modyfikacja kwasu nukleinowego łącznikiem następowała na drodze kondensacji odpowiedniego H-fosfonianu

nukleozydu, który następnie w wyniku oksydacyjnego sprzęgania cystaminą (aminacji) poprzez reakcję Athertona-Todda pozwalała na otrzymanie wiązania P-cystaminowego. Początkowe próby otrzymania modyfikowanych RNA z wykorzystaniem *H*-fosfonianów serii rybonukleotydów nie powiodły się, a otrzymany produkt ulegał rozpadowi. Jednym z elementów mojej pracy było określenie produktów i w konsekwencji zaproponowanie mechanizmu hydrolizy łańcucha. Aby otrzymać trwałe cząsteczki P-cystaminowego RNA, zdecydowałam się na wprowadzenie analogu rybonukleotydu w miejscu przyłączenia łącznika; w tym celu wykorzystałam *H*-fosfoniany 2'-deoksorybonukleotydów lub 2'-deoksy-2'-fluororybonukleotydów. Punktowe wprowadzenie tych modyfikacji do łańcucha pozwoliło na uzyskanie trwałych oligonukleotydów przy minimalnym wpływie na całkowitą strukturę przestrzenną cząsteczki. Następnie, przeprowadziłam optymalizację warunków reakcji otrzymywania P-cystaminowych RNA. W tym celu zbadalam wpływ takich elementów jak czas kondensacji *H*-fosfonianu, rodzaj czynnika kondensującego oraz warunki reakcji sprzęgania oksydacyjnego.

Kolejnym z celów moich badań było określenie stereochemii reakcji i produktów. W pierwszym etapie skupiłam się na otrzymaniu uproszczonych modeli dinukleotydowych, co pozwoliło mi na stwierdzenie wpływu zasady heterocyklicznej nukleotydu poprzedzającego modyfikację oraz podstawnika w pozycji C2' *H*-fosfonianu. Dodatkowo przeprowadziłam badanie stereochemii P-cystaminowych RNA celem ustalenia czy dalsze otoczenie modyfikacji może mieć na nią wpływ.

Następnie, skupiłam się na wykorzystaniu modyfikowanych oligonukleotydów w reakcjach sieciowania. Zoptymalizowałam i przeprowadziłam serię eksperymentów intercząsteczkowego sieciowania P-cystaminowych RNA o sekwencjach komplementarnych i niekomplementarnych. Podjęłam próby otrzymania kowalencyjnie stabilizowanych spinek RNA poprzez sieciowanie wewnątrzcząsteczkowe. Rozszerzyłam badania nad sieciowaniem wykorzystując dodatkowe homobifunkcjonalne łączniki alkilowe z grupami maleimidowymi.

Jednym z zakładanych zastosowań P-cystaminowych RNA było ich wykorzystanie w badaniach mechanistycznych i strukturalnych białek. Otrzymane przeze mnie modyfikowane oligonukleotydy zostały wykorzystane w celu koniugacji z RNazą H1. We współpracy z Laboratorium Struktury Białek Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej otrzymano trwałe kompleksy mutantów RNazy H1 z substratem DNA:RNA, co obrazuje oddziaływania międzycząsteczkowe. Uzyskane kompleksy mogą posłużyć do dalszych badań strukturalnych.

Podsumowując, opracowane przeze mnie metody i uzyskane wyniki mogą posłużyć do dalszych badań nad wykorzystaniem P-cystaminowych RNA jako narzędzi biologii molekularnej, ze szczególnym uwzględnieniem oddziaływań RNA-białko