

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Wykorzystanie metod biofizycznych w poszukiwaniu i badaniu selektywnych inhibitorów białek odpowiedzialnych za degradację struktury końca 5' mRNA

Na końcu 5' każdej cząsteczki eukariotycznego mRNA znajduje się charakterystyczna struktura 7-metyloguanozyny, zwana też czapeczką lub kapem. Pełni ona w organizmie szereg bardzo istotnych funkcji – do najważniejszych należy ochrona informacyjnego RNA przed przedwczesną degradacją przez nukleazy i udział w inicjacji procesu translacji. mRNA jest jednak z istoty cząsteczką nietrwałą i po spełnieniu swojego zadania ulega degradacji. Odbywa się ona na dwóch alternatywnych ścieżkach – albo w kierunku od końca 5' do końca 3', albo w kierunku odwrotnym. Pierwsza z nich jest inicjowana przez proces zwany dekapowaniem, który polega na usunięciu struktury kapu i dalszej degradacji transkryptu przez odpowiednie egzonukleazy. Tempo hydrolizy 7-metyloguanozyny ma więc bezpośredni wpływ na kontrolę stabilności mRNA, a tym samym odgrywa kluczową rolę w ekspresji genów. Enzymy, które są zaangażowane w ten mechanizm, są często celami terapeutycznymi w leczeniu różnych typów chorób, a poszukiwanie ich inhibitorów może mieć korzystne znaczenie z punktu widzenia projektowania leków celujących w te enzymy.

Głównym celem projektu doktorskiego było opracowanie nowej metody, która umożliwiła monitorowanie aktywności enzymów odpowiedzialnych za degradację końca 5' mRNA i zaadaptowanie jej do formatu wysokoprzepustowego. Pozwoliło to w sposób szybki i efektywny przeszukiwać biblioteki związków w celu identyfikacji nowych, selektywnych inhibitorów dwóch enzymów dekapujących - wirusowego enzymu D9 z wirusa ospy krowiej oraz ludzkiego enzymu DCP2, który wchodzi w skład większego kompleksu dekapującego PNRC2-DCP1-DCP2. W pracy przedstawiono proces opracowywania metody opartej o pomiar intensywności fluorescencji (FLINT) do śledzenia aktywności enzymów w czasie rzeczywistym, a także zaadaptowania jej do formatu wysokoprzepustowego wraz z optymalizacją warunków metody oraz jej walidacją. W następnym kroku wykorzystano opracowaną metodę do badań przesiewowych bibliotek małych cząsteczkowych związków – niewielkiej biblioteki związków pochodzenia nukleotydowego oraz komercyjnej biblioteki związków farmakologicznie czynnych LOPAC^{®1280}. Wyłonione w eksperymentach przesiewowych *hity* poddano dalszej ocenie, w tym określeniu ich wartości parametru IC_{50} . Wyniki te zostały następnie potwierdzone niezależną metodą przez monitorowanie reakcji dekapingu na krótkim substracie RNA *in vitro*. Sprawdzone również selektywność zidentyfikowanych związków względem innych enzymów dekapujących. Na końcu zostały opisane badania strukturalne, które pozwoliły na scharakteryzowanie oddziaływania jednego z enzymów ze zidentyfikowanym metodą FLINT inhibitorem na poziomie atomowym.

Otrzymane wyniki dostarczyły wielu cennych informacji na temat preferencji strukturalnych obu enzymów względem potencjalnych inhibitorów oraz pozwoliły wyselekcjonować kilka związków wykazujących silne właściwości hamujące aktywność badanych enzymów i posłużyć lepszemu projektowaniu nowych związków o pożądanych właściwościach inhibitorowych i potencjalnym znaczeniu terapeutycznym.