

Streszczenie

Enzymatyczna degradacja kapu (ang. *decapping*, dekaping) – charakterystycznej struktury znajdującej się na końcu 5' mRNA, zwanej inaczej czapeczką, jest kluczowym procesem komórkowym, mającym na celu regulację poziomu ekspresji genów. Dekaping polegający na hydrolizie wiązania fosforanowego, zlokalizowanego w mostku łączącym strukturę kapu z dalszą sekwencją nukleotydów w RNA, skutkuje wyeksponowaniem 5'-monofosforylowanego RNA na degradację przez egzorybonukleazy. Obecnie w literaturze opisanych jest około 20 enzymów zdolnych do degradacji kapu, jednak ich preferencje substratowe są jedynie zgrubnie oszacowane. Nadal również niepoznane są dokładne mechanizmy aktywacji tych enzymów. Pewnym jest, że ich rekrutacja wymaga szeregu białek pomocniczych i innych czynników, jak np. kationów dwuwartościowych, które wspólnie ułatwiają przyjęcie odpowiedniej konformacji aktywnego białka i RNA. Dodatkowo, liczne doniesienia literaturowe wskazują na występowanie różnych wariantów kanonicznej struktury kapu m⁷G w cząsteczkach RNA niekodujących białek. Pełny obraz metabolizmu RNA stanowi podstawę w zrozumieniu dynamiki komórki i tym samym jest fundamentalnym elementem w rozwoju nowych podejść terapeutycznych. Stworzenie odpowiednich narzędzi do wizualizacji przebiegu procesu degradacji RNA *in vitro* i *in vivo* wydaje się więc być kluczowe do osiągnięcia tego celu.

Badania prowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczą syntezy oraz charakterystyki sond fluorescencyjnych, opartych na strukturze RNA i zdolnych do selektywnego monitorowania aktywności enzymów degradujących kap.

Pierwszy etap moich badań polegał na opracowaniu testu fluorescencyjnego (FLINT, ang. *fluorescence intensity*, intensywność fluorescencji), który umożliwia wysokoprzepustową analizę specyficzności substratowej enzymów dekapujących. W tym celu przeprowadziłam syntezę siedmiu naturalnych, di- oraz trinukleotydowych analogów kapu, wykorzystując do tego podejście oparte na syntezie chemicznej, łączące chemię fosforu (III) z chemią fosforu (V). Każdy ze związków był poddany dwuetapowemu oczyszczaniu celem zapewnienia jak najwyższej jakości próbki. W kolejnym kroku przygotowane kapy były kotranskrypcyjnie wprowadzane do sekwencji 70-nukleotydowego RNA. Transkrypcja *in vitro* (IVT) była prowadzona na specjalnie zaprojektowanych do tego celu matrycach DNA, kodujących aptamerową sekwencję Broccoli, wzbogaconą o fragment poliA. Optymalizacja całego procesu pozwoliła na uzyskanie czystych frakcji, wolnych od zanieczyszczeń w postaci niekapowanego RNA i z wysoką wydajnością końcową reakcji. Jakość RNA była weryfikowana z wykorzystaniem elektroforezy żelowej. Finalnie RNA wraz z dedykowanym mu fluorogenicznym ligandem DFHBI-1T, zostało wykorzystane do przeprowadzenia fluorescencyjnego testu, w wyniku którego ustalono preferencje substratowe siedmiu wybranych enzymów dekapujących, pochodzących z różnych organizmów. W ramach tej części badań przeprowadzono również pomiary kinetyczne z udziałem enzymu hDcp2 oraz kapu-1, które pozwoliły na wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji. Wykazano też przydatność testu FLINT do poszukiwania inhibitorów enzymów dekapujących. Ustalenie zakresu aktywności poszczególnych enzymów posłużyło mi do opracowania dwuznakowanych sond fluorescencyjnych, ukierunkowanych na pojedynczy cel molekularny, co było przedmiotem drugiego etapu moich badań.

Syntezę podwójnie znakowanych sond fluorescencyjnych rozpocząłam od przygotowania trinukleotydowych analogów kapu, zawierających linkery umożliwiające przyłączenie barwnika. W takiej formie analogi struktury kapu były wprowadzane kotranskrypcyjnie do nici RNA, a w kolejnym kroku znakowane odpowiednimi barwnikami. Drugie podejście obejmowało znakowanie trinukleotydów, a dopiero w następnym etapie przeprowadzanie IVT. Niezależnie od przyjętej strategii, wyznakowane i kapowane RNA, były poddawane znakowaniu na końcu 3' sekwencji, stosując metodę enzymatyczną lub chemiczną. Barwniki zostały dobrane tak, aby tworzyły pary fluorofor-wygaszacz bądź donor-akceptor, umożliwiającą obserwację zjawiska FRET. Sondy fluorescencyjne były poddane charakterystyce metodami biofizycznymi, a te o najkorzystniejszych właściwościach, scharakteryzowane również pod kątem przydatności do monitorowania reakcji enzymatycznych z białkami degradującymi kap.

Zaprezentowane w niniejszej pracy sondy oparte na strukturze RNA oraz zaprojektowane na ich podstawie testy umożliwiają szybkie i wysokoprzepustowe analizy preferencji substratowych enzymów dekapujących. Stanowią one niezwykle przydatne narzędzie do pełnej charakterystyki enzymów, umożliwiając ustalenie ich specyficzności i selektywności substratowej oraz identyfikację nowych inhibitorów enzymów. Ma to szczególnie duże znaczenie w kontekście opracowania nowych podejść terapeutycznych bazujących na cząsteczkach RNA, których trwałość i stabilność jest tu kluczowym elementem. Opracowane przeze mnie narzędzia są więc odpowiedzią na rosnące zapotrzebowanie w erze intensywnego rozwoju biotechnologii i medycyny.