

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Nukleotydy są cząsteczkami o wielu funkcjach biologicznych. Mnogość funkcji powoduje, że syntetyczne analogi nukleotydów są obiecującą klasą związków terapeutycznych o właściwościach przeciwwirusowych lub przeciwnowotworowych oraz narzędzi biologicznych, takich jak sondy nukleotydowe. Nukleotydy stanowią substraty do syntezy kwasów nukleinowych, które uczestniczą w procesie ekspresji genu m.in. mRNA. Funkcją mRNA jest przenoszenie informacji genetycznej z DNA na sekwencję peptydów. Na końcu 5' eukariotycznych mRNA znajduje się unikalna struktura kapu, która oddziałuje ze specyficznymi białkami, związanymi z metabolizmem mRNA, umożliwiając kontrolę ekspresji genu i degradacji mRNA. Z racji tego, że mRNA pełni tak ważne funkcje jego modyfikowane chemicznie analogi są testowane w badaniach klinicznych nad różnymi rodzajami terapii genowej. W związku z tym wykrywanie, identyfikacja, a także analiza składu zarówno naturalnie występujących nukleotydów i kwasów nukleinowych jak i ich syntetycznych analogów, pozwala na lepsze poznanie ich ścieżek metabolicznych, funkcji biologicznych i potencjalnych właściwości terapeutycznych.

Pierwszą część niniejszego projektu doktorskiego stanowiła dogłębna analiza ścieżek fragmentacji nukleotydów za pomocą tandemowej spektrometrii mas. Przeprowadziłam ponad 150 różnych nukleotydów i ich analogów, zawierających modyfikacje w obrębie zasady azotowej, rybozy lub reszty fosforanowej. Wiele z tych związków zostało scharakteryzowanych po raz pierwszy. Analiza widm fragmentacyjnych różnych nukleotydów pokazała, że możliwe jest stwierdzanie, czy dana modyfikacja występuje w obrębie zasady azotowej, rybozy czy fosforanu oraz określenie rodzaju modyfikacji. Co więcej, możliwe jest rozróżnienie związków izobarycznych, czyli takich, które mają tę samą masę nominalną, ale inny skład atomowy, oraz określenie, czy badany związek jest mono-, di- czy trifosforanem nukleozydu. Na podstawie zgromadzonych widm zaproponowałam ogólne reguły rządzące procesem fragmentacji, a wyniki zebrałam w postaci bazy danych dostępnej online (<http://www.mstide-db.com/>). Taka baza może być przydatnym narzędziem w procesie poszukiwania metabolitów leków pochodzenia nukleotydowego, znajdowania biomarkerów chorób związanych z dysfunkcją metabolizmu nukleotydów, szybkiej identyfikacji produktów syntezy chemicznej oraz opracowaniu metod ilościowych. Wyniki otrzymane podczas badań fragmentacji były kluczowe w projektowaniu metod LC-MS/MS do analizy fluorescencyjnych sond nukleotydowych oraz metabolizmu końca 5' mRNA i składu mRNA. Proces degradacji mRNA jest szeroko badany, ale wciąż pozostają pytania, na które należy znaleźć odpowiedź. Za degradację kapu odpowiedzialne są enzymy dekapujące w tym DcpS i Fhit jednak względny udział tych enzymów w proces degradacji w komórkach nie jest znany. Co więcej, pojawia się pytanie, jakie są metabolity tego procesu i jaki jest ich dalszy los. W celu odpowiedzi na pytania dotyczące degradacji kapu opracowałam metodę LC-MS/MS służącą do analizy końca 5' (kapu) mRNA w ekstraktach cytoplazmatycznych z komórek HEK 293. Jako efekt projektu zaproponowałam dokładną ścieżkę degradacji kapu wraz z uwzględnieniem najważniejszych enzymów i powstających metabolitów. Kolejnym zadaniem w projekcie było opracowanie metody, która pozwoliłaby na określenie wydajności wbudowywania modyfikowanych nukleotydów w obręb struktury RNA, w szczególności do ogona poli(A), jak również poznanie

preferencji substratowych polimeraz używanych do transkrypcji *in vitro*. Metoda LC-MS/MS polegała na oznaczaniu ilościowym 5'-monofosforanów nukleozydów otrzymanych po trawieniu enzymatycznym niemodyfikowanego lub modyfikowanego mRNA. Po dokonaniu operacji matematycznych możliwe było wyznaczenia zawartości modyfikacji oraz wyznaczenie długości ogona poli(A). Dzięki tej metodzie pokazano, że analogi ATP są substratami dla polimeraz RNA, co umożliwia wprowadzanie modyfikacji do wiązań fosfodiesterowych RNA. Proces wbudowywania analogów ATP zachodzi stereospecyficznie, dzięki czemu konfiguracja absolutna modyfikowanych wiązań fosfodiesterowych jest ściśle zdefiniowana w produktach RNA. Może to być wykorzystane do tworzenia cennych narzędzi molekularnych. Otrzymane i scharakteryzowane mRNA zostały poddane badaniom biologicznym, które wykazały, że mRNA zawierające modyfikację tiofosforanową w obrębie ogona poli(A) są odporne na degradację enzymatyczną, a jednocześnie obecność tych modyfikacji nie wpływa na wydajność translacji.

Opracowane metody do analizy nukleotydów i RNA pozwolą na lepsze poznanie właściwości, potencjału biologicznego oraz terapeutycznego tych cząsteczek, jak również przyczynią się do projektowania nowych związków, które mają szansę w przyszłości stać się skutecznymi lekami.