

Renata Kasprzyk

## STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

### **Metody badania białek związanych z metabolizmem końca 5' mRNA oparte na nukleotydowych sondach molekularnych**

Informacyjny RNA (mRNA) jest makrocząsteczką reprezentującą kopię informacji genetycznej, która ulega translacji w celu produkcji białka. Koniec 5' mRNA, tzw. kap jest nietypową strukturą nukleotydową zbudowaną z 7-metyloguanozyny połączonej mostkiem 5'-5' trifosforanowym z pierwszym transkrybowanym nukleotydem. Ze względu na obecność łańcucha dodatniego w pierścieniu 7-metyloguanozyny kap specyficznie oddziałuje z wieloma białkami zaangażowanymi w istotne procesy biologiczne, jak dojrzewanie mRNA, transport nukleocytoplazmatyczny oraz inicjacja translacji, a także stabilizuje transkrypt. Białka wiążące kap odgrywają ważną rolę regulatorową w ekspresji genu i często są celem terapeutycznym sprawiając, że kap jest interesującym obiektem badań. Monitorowanie procesów angażujących 5' kap jest możliwe z użyciem np. znakowania fluorescencyjnego. Fluorescencyjne analogi kapu działają jak sondy molekularne, składające się z jednej części odpowiedzialnej za specyficzne oddziaływanie (kap) oraz drugiej za produkcję sygnału analitycznego (znacznik).

Głównym celem projektu było zastosowanie prostych syntetycznie metod do otrzymania uniwersalnych narzędzi, przeznaczonych do opracowania szybkich i wydajnych metod fluorescencyjnych do badań nad takimi celami terapeutycznymi, jak: eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E (eIF4E), enzym degradacji kapu (DcpS) oraz mRNA kap N7-guanino metylotransferaza (N7-MTaza). W oparciu o zmiany fluorescencji w trakcie wiązania, hydrolizy lub biosyntezy kapu możliwe jest wyznaczenie parametrów fizycznych oddziaływania nukleotyd-białko. Ponadto metody wysokoprzepustowe (HTS) mogą być wykorzystane w eksperymentach przesiewowych bibliotek małych cząsteczkowych ligandów o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych (eIF4E, N7-MTaza), przeciwwirusowych (N7-MTaza) lub możliwych do zastosowania w leczeniu schorzeń genetycznych, np. rdzeniowej atrofii mięśniowej (DcpS). Projekt doktorski jest interdyscyplinarny i łączy takie obszary nauki, jak synteza nukleotydów, spektroskopia, biofizyka oraz fizyka nanostruktur węglowych.

W pierwszej części rozprawy zamieszczono krótki opis biologicznej roli 5' kapu włączając w to charakterystykę białek eIF4E, DcpS i N7-MTazy, będących głównym obiektem badań. W kolejnym rozdziale przybliżono podstawy metod szczególnie istotnych dla projektu. Opisano techniki fluorescencyjne: intensywność fluorescencji, polaryzacja/anizotropia fluorescencji (FP/FA) i termoforeza mikroskalowa (MST), a także ich potencjalne zastosowania. Przedstawiono również metody użyteczne w charakterystyce koniugatów molekuł biologicznych z nanomateriałami (spektroskopie w podczerwieni, ramanowska i fotoelektronów promieniowania X). W następnej części opisano główne wyniki uzyskane w ramach projektu. Opracowano cztery metody oparte o oddziaływanie nukleotyd-piren, przystosowane do formatu HTS. Niektóre z zsyntetyzowanych sond wykorzystano do rozwoju metod MTS i FA do badań białek metabolizmu nukleotydów (w tym transglutaminazy II). Następnie przedstawiono koncepcję podwójnie znakowanych analogów nukleotydów

stosujących oddziaływania pomiędzy dwoma znacznikami fluorescencyjnymi. Wykonano charakterystykę spektroskopową i enzymatyczną nukleotydów opartych o formowanie ekscymeru, FRET lub oddziaływania fluorofor–wygaszacz, aby pokazać potencjalne zastosowania *in vivo*. Ostatnią część wyników stanowią próby chemicznej modyfikacji warstw grafenu odłożonych na węglu krzemu oraz synteza koniugatu kap–tlenek grafenu, w celu rozwoju biosensora do oznaczania stężenia białka eIF4E (marker nowotworowy) z użyciem zmian przewodnictwa. Część eksperymentalna składa się ze szczegółowych protokołów syntezy nukleotydów, pomiarów spektroskopowych oraz obliczeń parametrów fizycznych. Ostatni rozdział stanowi lista pozycji literaturowych cytowanych w rozprawie doktorskiej.