

Streszczenie

Technologie oparte na potencjalnym zastosowaniu syntetycznych cząsteczek mRNA w medycynie rozwijane są od lat 90. ubiegłego wieku. Dzięki znaczącemu postępowi technologicznemu mRNA staje się coraz powszechniej stosowanym narzędziem w opracowywaniu szczepionek i terapii genowych. Mimo wielu zalet względem stosowanych dotychczas konwencjonalnych metod, jednym z głównych problemów terapii wykorzystujących syntetyczne mRNA jest inherentnie niska stabilność owych cząsteczek. Niezależnie od ścieżki rozpadu, proces degradacji mRNA w komórkach ssaków jest inicjowany przez deadenylację, czyli usunięcie ogona poli(A) znajdującego się na końcu 3' większości dojrziałych eukariotycznych mRNA. Ogon poli(A) działa jako jeden z głównych regulatorów losów mRNA, między innymi chroniąc regiony kodujące mRNA przed degradacją, a także odgrywając ważną rolę w procesie inicjacji translacji dzięki złożonym interakcjom białko-RNA. Obie te cechy, w połączeniu z niekodującą naturą ogona poli(A), czynią go idealnym celem do wprowadzenia korzystnych modyfikacji zwiększających stabilność i wydajność translacyjną mRNA, bez ingerencji w aktywność maszyneryi rybosomalnej odpowiedzialnej za biosyntezę białek. W ostatnich latach zaprezentowano szereg badań dotyczących modyfikacji mRNA w celu manipulacji stabilnością oraz potencjałem translacyjnym mRNA, co stanowiło inspirację dla moich badań.

Pierwsza część niniejszej rozprawy dotyczyła opracowania metody biofizycznej umożliwiającej badania nad zależnością struktura-aktywność w oddziaływaniu analogów ogona poli(A) z białkiem specyficznie wiążącym strukturę końca 3' mRNA (PABP). W celu opracowania metody wykorzystałam czułą technikę termoforezy mikroskalowej, która pozwala na badanie szerokiego spektrum oddziaływań molekularnych. Opracowana metoda została wykorzystana do badania oddziaływań między białkiem PABP, a blisko trzydziestoma oligonukleotydowymi analogami ogona poli(A), zawierającymi wybrane chemiczne i strukturalne modyfikacje. Dzięki szczegółowym badaniom udało się ustalić wpływ danej modyfikacji na specyficzne oddziaływanie z PABP, nie tylko ze względu na rodzaj użytej modyfikacji, ale również jej umiejscowienie w kieszeni wiążącej białka. Przeprowadziłam również badania odporności enzymatycznej wspomnianych analogów poli(A) z udziałem specyficznej deadenylazy. Możliwe było wyszczególnienie chemicznie modyfikowanych oligonukleotydów poli(A) wykazujących równocześnie wysokie powinowactwo do PABP oraz odporność na enzymatyczną degradację. Z udziałem wybranych oligonukleotydów przeprowadzono następnie badania translacji w lizatach komórkowych, które wykazały, że wybrane przeze mnie związki wykazują potencjał inhibitorowy i specyficznie hamują proces translacji. Na podstawie niniejszej części badań wyciągnęłam szereg wniosków dotyczących wpływu struktury fragmentów poli(A) na ich powinowactwo do PABP. Między innymi owe badania dowiodły, że wszelkiego rodzaju modyfikacje chemiczne łańcucha poli(A) są najlepiej tolerowane, kiedy modyfikowana podjednostka znajduje się na końcu sekwencji wiązanej przez białko. Z tego względu w dalszej części badań skupiłam się na wprowadzaniu modyfikacji w obrębie samego końca 3' RNA.

Drugą część projektu doktorskiego poświęciłam na opracowanie metody pozwalającej na chemo-enzymatyczną modyfikację końca 3' syntetycznych mRNA. Modyfikacja ta miała na celu zwiększenie stabilności cząsteczek mRNA poprzez poprawę ich odporności na degradację przez egzonukleazy 3'-5', przy jednoczesnym zachowaniu możliwości oddziaływania z białkiem PABP. Poprawa stabilności przyczynia się następnie do wydłużenia czasu życia modyfikowanych mRNA w komórkach i skutkuje zwiększoną produkcją kodowanych przez mRNA białek. Opracowana przeze mnie metoda modyfikacji zakłada ligację enzymatyczną chemicznie 5'-fosforylowanych modyfikowanych dinukleotydów do końca 3' cząsteczki RNA. Do struktury

wspomnianych dinukleotydów wprowadzone zostały modyfikacje chemiczne, które w trakcie pierwszej części badań zidentyfikowane zostały jako najoptymalniejsze z punktu widzenia oddziaływania z PABP oraz stabilności enzymatycznej. Metoda modyfikacji końca 3' RNA wykorzystana została do otrzymania reporterowych cząsteczek mRNA o zwiększonej stabilności. Modyfikowane mRNA zostały następnie zbadane w trzech różnych liniach komórkowych pod kątem ich potencjału translacyjnego. Zidentyfikowane zostały dwa typy modyfikacji mRNA, które skutkowały nawet kilkukrotnie zwiększoną produkcją białka w komórkach.

Opracowane przeze mnie metody mogą przyczynić się do dalszych badań nad modyfikacjami ogona poli(A) mRNA. Z jednej strony, metoda pozwalająca na badanie oddziaływania między PABP a analogami poli(A) znajdzie zastosowanie w dalszych badaniach nad potencjalnie korzystnymi modyfikacjami poli(A). Z kolei metoda chemo-enzymatycznej modyfikacji końca 3' RNA może być stosowana w otrzymywaniu dowolnych cząsteczek RNA o zwiększonej stabilności, w szczególności mRNA o potencjale terapeutycznym.