

STRESZCZENIE

Kap jest strukturą znajdującą się na 5' końcu eukariotycznego mRNA mającą istotną rolę w metabolizmie komórki. Białka usuwające strukturę kapu takie jak kompleks Dcp1/2 mają natomiast znaczącą funkcję procesach degradacji mRNA. Jednak do tej pory ich mechanizm działania oraz sposoby regulacji aktywności nie zostały dokładnie poznane. Badania biochemiczne nad Dcp1/2 pokazały, że oddziałuje on specyficznie z m⁷GDP – produktem reakcji hydrolizy kapu. Zasugerowało to, że struktura m⁷GDP może być punktem wyjściowym dla syntezy nukleotydów mających większe powinowactwo do Dcp1/2, które mogą być wartościowymi narzędziami w badaniach biochemicznych. Przeprowadzono syntezy chemiczne oraz przebadano właściwości biologiczne serii analogów kapu opartych na strukturach nukleotydów takich jak m⁷GDP, m⁷GTP, oraz m⁷Gppppm⁷G. Związki te posiadają różnorodne modyfikacje w łańcuchu fosforanowym, takie jak grupa borano- lub tiofosforanowa, mające zwiększyć ich powinowactwo do białek wiążących kap. Otrzymano także szereg fluorescencyjnie znakowanych analogów kapu posiadające fluorofor o niewielkiej zawadzie sterycznej jako sondy molekularne w badaniach biofizycznych oraz narzędzia do syntezy fluorescencyjnego RNA. Po wykonaniu badań przesiewowych odkryto, że część z związków to inhibitory kompleksu Dcp1/2. Dalsze badania biochemiczne i strukturalne wykonano na najsilniejszym z inhibitorów (m⁷Gp_sppp_sm⁷G izomer D3). Eksperymenty NMR pokazały położenie miejsca wiążącego inhibitor oraz powinowactwo tego związku do Dcp2. Badania kinetyczne pokazały, że badany inhibitor wiąże się zarówno z wolnym enzymem jak i kompleksem ES. Zaobserwowano też, że analogi kapu o wydłużonym łańcuchu fosforanowym są hydrolizowane przez Dcp2. Inne badania biochemiczne pokazały, że część z uzyskanych analogów kapu wykazuje silne powinowactwo do białka inicjującego translację eIF4E oraz posiadają obniżoną podatność na degradację enzymatyczną. Otrzymane fluorescencyjne analogi kapu są pierwszymi tego rodzaju związkami, które są inkorporowane do RNA *in vitro*. Niektóre z nich są także selektywnie odporne na działanie enzymów dekapujących Dcp1/2 bądź DcpS. Wstępne rezultaty badań biochemicznych świadczą, że znakowane fluorescencyjnie analogi kapu mogą być pomocne w badaniach oddziaływań kap-białko. W pracy opisano także przykładowe zastosowania modyfikowanych chemicznie analogów kapu w badania nad degradacją eukariotycznego mRNA. W ramach tych badań wykorzystano egzogenne mRNA zawierającego niehydrolizowany kap do śledzenia mechanizmów degradacji mRNA histonów w komórkach ssaczych. Dzięki temu poznano lepiej rolę Dcp1/2 w tym procesie oraz wpływie poliurydylacji 3' końca mRNA na jego stabilność.