

Streszczenie

Struktura trimetylokapu (TMG kap) obecna na 5' końcu łańcucha niektórych małych jądrowych RNA (snRNA) bierze udział w procesach biologicznych związanych m.in. z transportem i dojrzewaniem pre-mRNA. TMG kap rozpoznawany jest przez białko adaptorowe - snurportynę, które w kompleksie z importyną β transportuje snRNA zakończone TMG kapem do jądra komórkowego. Analogi kapu TMG stosowano jako żywice powinowactwa przy rozdzielaniu i oczyszczaniu białek z ekstraktów lub jako sygnał lokalizacji jądrowej poprawiający import jądrowy niektórych polarnych i dużych biocząsteczek (DNA, streptawidyna), jednak można je również stosować w złożonych eksperymentach biochemicznych oraz biologicznych jako narzędzia molekularne zastępujące naturalne 5'-TMG kap-RNA.

Fluorescencyjne molekularne rotory (FMR) są dwu- lub wielosegmentowymi cząsteczkami, w których jeden segment obraca się swobodnie względem drugiego. Zahamowanie wewnętrzcząsteczkowej rotacji jednego z segmentów znacznika wokół wiązania σ skutkuje promienistym (fluorescencja) procesem relaksacji. Taka wewnętrzcząsteczkowa rotacja jest silnie zależna od oddziaływań między strukturą fluoroforu a jego mikrootoczeniem (rodzaju rozpuszczalnika, polarności, tworzących się wiązań wodorowych, izomeryzacji, etc.), dlatego zastosowanie FMR w badaniach biologicznych opiera się na zahamowaniu rotacji w wyniku wiązania się z białkiem, co umożliwia „włączenie” fluorescencji i może posłużyć np. do śledzenia transportu snRNA.

Głównym celem mojej pracy była synteza, charakterystyka wł. fizykochemicznych (wolne związki) i biofizycznych (kompleksy białkowe) serii dinukleotydowych analogów kap TMG i ich koniugatów z FMR w eksperymentach ze snurportyną zarówno *in vitro*, jak i w komórkach. Ta funkcjonalizacja miała na celu otwarcie możliwości wykrywania interakcji snurportyna–ligand *in vitro* i potencjalnie *in vivo*. Uzyskałem duży zestaw (>50) końcowych koniugatów z FMR w różnych pozycjach, z różnymi strukturami nukleotydów i oceniłem ich użyteczność jako sondy molekularne dla snurportyny. Niektóre związki zostały dodatkowo zmodyfikowane w regionie mostkowym (metylenobisfosfonian, CH_2), przez wydłużenie do tetrafosforanu lub w pozycjach 5'-O przez zmianę O na S. Oczekiwano, że te modyfikacje zapewnią odporność na degradację enzymatyczną przez ludzkiego Nudt16 i/lub utrzymają lub wzmocnią powinowactwo do snurportyny.

Wśród FMR przetestowałem pięć analogów chromoforu podobnych do GFP (pochodzących z białka zielonej fluorescencji) i dwie pochodne julolidyny. Ocena powinowactwa wiązania dla snurportyny nieoczekiwanie wykazała silnie stabilizujący efekt dla dinukleotydów TMGpppG zawierających GFP-podobny FMR w pozycji 2'-O guanozyny. Te nowo odkryte związki są silnymi ligandami snurportyny z nanomolowymi wartościami K_D (stałej dysocjacji), które są o dwa rzędy wielkości niższe niż w przypadku naturalnego TMGpppG. Efekt ten jest zmniejszony ~50-krotnie dla odpowiadających im 3'-regioizomerów. Aby pogłębić zrozumienie zależności między strukturą a aktywnością, zsyntetyzowałem i przetestowałem koniugaty FMR pozbawione fragmentu TMG kapu, co ujawniło w teście ze snurportyną, że ten nowo zaobserwowany efekt utrzymuje się również w przypadku $m^7\text{G}$ kapu i w mniejszym stopniu również w przypadku analogów GMP, ale z niespecyficznymi interakcjami (wykazałem, że koniugaty $m^7\text{G}$ kap-FMR wiążą się konkurencyjnie również z eIF4E). Te badania eksperymentalne zostały poparte dokowaniem molekularnym i oba sugerują, że zwiększone powinowactwo wynika z dodatkowych hydrofobowych kontaktów i oddziaływań zapewnianych przez fragment FMR,

niezależnie od grup funkcyjnych w pierścieniu fenylowym. Najsilniejszy ligand snurportyny, który również dawał największe wzmocnienie fluorescencji (F_m/F_0) po nasyceniu snurportyną, został przetestowany w żywych komórkach w celu wykrycia i wizualizacji interakcji w kompleksach poprzez monitorowanie czasu życia fluorescencji FMR. To podejście ma potencjalne zastosowania w badaniu monitorowania dojrzewania i procesowania RNA lub interakcji RNA–białko, które są również omawiane. Wreszcie, w moich badaniach zidentyfikowano 9 koniugatów TMG kap-FMR jako silne i specyficzne ligandy snurportyny, a wśród nich 4 koniugaty z DMHBI wykazały korzystne właściwości fluorescencyjne w kompleksach ze snurportyną *in vitro*. Jednocześnie, jeden z tych koniugatów został przetestowany w żywych komórkach i stwierdzono, że łączy się w kompleksy o porównywalnych rozmiarach do snurportyny.