

mRNA to ła cuchowa cz steczka, która przenosi informację o budowie danego białka (po jej przepisaniu z DNA na RNA w procesie transkrypcji) do rybosomów, które wykorzystują ją do syntezy tego białka, czyli translacji. Na jednym z końców łaucha mRNA, tzw. końcu 5', znajduje się struktura kapu (czapeczki), która bierze udział w wymienionych procesach, jak również odpowiedzialna jest za stabilność mRNA w środowisku komórkowym pełnym degradujących je enzymów. **Ze względu na ważną rolę biologiczną czapeczki, zmienione chemicznie czeczki kapu mogą stanowić doskonałe narzędzia do oddziaływania na wspomniane procesy translacji, degradacji i transportu mRNA oraz zmieniania ich w podobny sposób.**

Łaucha mRNA utworzony jest przez szereg podjednostek zwanych nukleozydami, które połączone są między sobą za pomocą tzw. reszt fosforanowych występujących pojedynczo. Naturalna struktura kapu składa się ze zmodyfikowanego nukleozydu, 7-metyloguanozyny, który połączony jest z pierwszym nukleozydem łaucha mRNA na jego 5' końcu poprzez łaucha składający się z trzech takich reszt fosforanowych. Dinukleotydowe analogi kapu składają się więc z trzech elementów: 7-metyloguanozyny, która decyduje o specyficzności oddziaływania z białkami, z typowego nukleozydu łaucha mRNA, czyli guanozyny, oraz z mostka oligofosforanowego, który łączy te dwa elementy i jest miejscem ataku przez enzymy degradujące kap np. DcpS czy Dcp2.

**Głównym celem projektu jest otrzymanie nowej klasy dinukleotydowych analogów kapu zmodyfikowanych w obrębie mostka oligofosforanowego oraz zbadanie ich właściwości zarówno jako odrębnych czeczki, jak i po wprowadzeniu na 5' koniec mRNA.** Wyniki eksperymentów biologicznych pozwolą ocenić potencjał aplikacyjny nowych analogów zarówno w badaniach podstawowych, jak i w terapiach chorób o podłożu genetycznym.

W syntezie analogów kapu zostanie wykorzystana tzw. reakcja „click” – szybka, prosta i wydajna metoda łączenia dwóch charakterystycznych ugrupowań z utworzeniem tzw. pierścienia triazolowego (triazolu). Na drodze tej reakcji łączy się dwie czeczki składowe kapu, z których każda zawiera jedno z tych charakterystycznych ugrupowań, co w efekcie daje analogi zawierające triazol w obrębie mostka oligofosforanowego. Planowane jest uzyskanie szeregu analogów różniących się m.in. długością łaucha oligofosforanowego i lokalizacją triazolu w mostku, czyli reprezentujących różne typy modyfikacji. **Ta nowa klasa związków będzie stanowiła pierwszy przykład wykorzystania strategii chemii „click” do zastąpienia przez pierścień triazolowy reszty fosforanowej w strukturze kapu.**

**Istotnym etapem projektu będzie zbadanie wpływu takiej modyfikacji na tempo degradacji kapu przez enzym DcpS**, którego naturalną rolę jest hydroliza analogów kapu pozostałych po degradacji mRNA. Planowane badania pozwolą zidentyfikować typy modyfikacji odpowiedzialne za odporność na atak przez to białko. Jest to ważne z punktu widzenia poszukiwania jego inhibitorów, czyli związków hamujących jego aktywność. Hamowanie aktywności enzymu DcpS skorelowane jest bowiem z ograniczeniem rozwoju choroby w Rdzeniowym Zaniku Mięśni (SMA). Ważne jest, aby nowe inhibitory działały w sposób selektywny, bo tylko wtedy nie zostaną zaburzone inne procesy komórkowe. Po danych jest więc zmniejszone powinowactwo do pozostałych białek oddziałujących ze strukturą kapu np. białka eIF4E biorącego udział w procesie translacji. Wyniki naszych badań wstępnych pokazują, że istnieje przynajmniej kilka typów modyfikacji w postaci triazolu w obrębie mostka oligofosforanowego kapu, które z jednej strony decydują o słabym powinowactwie do eIF4E, z drugiej zaś o odporności na atak przez enzym DcpS. Z kolei analogi o wysokim powinowactwie do eIF4E to prawdopodobnie małe czeczki inhibitory translacji, również ciekawe w wymiarze poznawczym co do inhibitorów DcpS.

**Projekt zakłada również wbudowanie wybranych analogów kapu na 5' koniec mRNA.** Wykorzystana w tym celu zostanie strategia tzw. ko-transkrypcyjnego „kapingu”, która polega na transkrypcji in vitro (przeprowadzanej w próbówce syntezy RNA na matrycy DNA przez polimerazę, enzym naturalnie przeprowadzający ten proces w komórce) z udziałem analogów kapu. Modyfikowane transkrypty powstałe na matrycy zawierającej gen białka lucyferazy zostaną wprowadzone do komórek, aby można było zbadać wpływ modyfikacji na efektywność procesu translacji. Pomocne w wyborze analogów, które mają być wbudowane na 5' koniec takich transkryptów, będą wyniki wspomnianych już badań powinowactwa do eIF4E – tylko związki, które oddziałują z eIF4E z siłą podobną lub znacznie większą od naturalnego analogu kapu m<sup>7</sup>GpppG mają szansę inicjować proces biosyntezy białka. Wydajność translacji będzie mierzona poprzez badanie intensywności światła emitowanego w katalizowanej przez lucyferazę reakcji przemiany lucyferyny. W ten prosty sposób oceniona zostanie funkcjonalność analogów kapu jako mimików naturalnej struktury końca 5' mRNA, a co za tym idzie ich aplikacyjność w badaniach biologicznych nad najwęższymi procesami komórkowymi związanymi z ekspresją genów.