

POPULARNONAUKOWE STRESZCZENIE PROJEKTU (W JĘZYKU POLSKIM)

Metody wykorzystujące zjawisko fluorescencji są często wykorzystywane w badaniach biochemicznych. Techniki te charakteryzują się wysoką czułością, w związku z tym nie zużywa się dużych ilości reagentów. Obiektami badań mogą być zarówno cząsteczki, które posiadają naturalne właściwości fluorescencyjne jak również związki chemiczne znakowane odpowiednimi fluoroforami.

W projekcie planujemy opracowanie metody opartej na polaryzacji fluorescencji do poszukiwania inhibitorów białek wiążących nukleotydy 7-metyloguaninowe (m^7G). Proponowana technika wykorzystuje ligand znakowany fluorescencyjnie oraz specyficzne dla niego białko. W eksperymencie śledzi się zmianę polaryzacji fluorescencji pod wpływem powstawania kompleksu białko-ligand. Obserwowana zmiana sygnału jest związana z tym, że fluoryzujący ligand związany z białkiem charakteryzuje się mniejszą rotacją, co wpływa na wzrost polaryzacji fluorescencji.

Interesującymi nas celami molekularnymi są białka wiążące nukleotydy zawierające m^7G . Białka te pełnią szczególną funkcję, gdyż ten unikalny nukleozyd występuje tylko na końcu 5' mRNA jako element struktury kapu (m^7GpppN_n) lub występuje w komórce w postaci małowczątkowego związku będącego produktem hydrolizy kapu. W związku z tym białka wiążące nukleotydy zawierające m^7G są zaangażowane we wszystkie etapy składające się na metabolizm mRNA, takie jak składanie pre-mRNA, translacja, transport oraz degradacja.

Do badań wybrano białko modelowe – czynnik inicjujący translację eIF4E. Wysoki poziom czynnika eIF4E zaobserwowano w komórkach nowotworowych. Jego nadekspresja przyczynia się do wzmożonej produkcji białka i rozwoju nowotworu. Związki o wysokim powinowactwie do eIF4E mają szansę znaleźć zastosowanie jako terapeutyki, których działanie polegałoby na ograniczeniu dostępności białka dla transkryptów. Wiele ligandów, w szczególności opartych o strukturę kapu, zostało scharakteryzowanych w literaturze za pomocą stałej asocjacji, dzięki czemu białko eIF4E w projekcie stanowi wzorzec, który umożliwi sprawdzenie wiarygodności otrzymywanych wyników.

Ponadto wybrano dwa enzymy, DcpS – uczestniczący w degradacji mRNA oraz nowoodkryty cN-IIIB – odpowiedzialny za metabolizm nukleotydów. Enzym DcpS został zidentyfikowany jako cel terapeutyczny w leczeniu rdzeniowej atrofii mięśniowej. W przypadku enzymu cN-IIIB znaczenie biologiczne nie jest znane, a znalezienie inhibitorów tego enzymu pozwoliłoby poznać bliżej jego komórkową funkcję.

Metoda oparta na polaryzacji fluorescencji stanowiłaby doskonałe narzędzie do poszukiwania ligandów o wysokim powinowactwie do badanych białek, którą można zastosować również w podejściu wysokoprzepustowym. Wykorzystanie płytek 96-dołkowych w połączeniu z czytnikiem mikropłytek umożliwia szybkie zbadanie wielu próbek jednocześnie w krótkim czasie. Dodatkową zaletą podejścia wysokoprzepustowego jest zbadanie wpływu wielu fragmentów strukturalnych związków na ich efektywność inhibitorową. Taka analiza daje możliwość zaprojektowania związku o pożądanych właściwościach i ukierunkowanego poszukiwania ligandów w przyszłości. W szczególności, mamy nadzieję, że proponowany projekt umożliwi znalezienie selektywnych inhibitorów dla poszczególnych białek. Inhibitory te mogą znaleźć zastosowanie jako leki w chorobach nowotworowych i neurodegeneracyjnych.