

POPULARNONAUKOWE STRESZCZENIE PROJEKTU

Trimetylokap (TMG-kap) obecny na 5' końcu małych jądrowych RNA stanowi sygnał lokalizacji jądrowej (NLS, *ang. Nuclear Localization Signal*), który rozpoznawany jest przez białko snurportynę 1, która w kompleksie z białkiem – importyną β transportuje snRNA zakończone trimetylokapem do jądra komórkowego. Ta ścieżka transportu może być z powodzeniem wykorzystana do dostarczania terapeutycznych oligonukleotydów do jądra komórkowego. Podejście to zakłada wykorzystanie naturalnego systemu transportującego do przenoszenia modyfikowanych chemicznie struktur.

Aby transport jądrowy był efektywny ważne jest, aby zsyntetyzowane analogi TMG-kapu były stabilne w warunkach komórkowych oraz były rozpoznawane przez białka transportujące. Ponieważ struktura kapu zawiera wiązanie trifosforanowe, które jest bardzo szybko hydrolizowane przez enzymy dekapujące, które rozcinają owe wiązanie w pozycji α/β lub β/γ , niezbędne jest wprowadzenie modyfikacji w celu poprawy stabilności trimetylokapu *in vivo*. W projekcie planujemy syntezę analogów trimetylokapu modyfikowanych ugrupowaniem 5'-fosfotioestrowym, które jeszcze nigdy nie było badane w kontekście funkcji trimetylokapu. Oczekujemy, że oprócz stabilności wprowadzona modyfikacja będzie również korzystnie wpływała na oddziaływanie z białkami jądrowego układu transportującego.

Ponadto projekt zakłada znakowanie związków o największej stabilności molekularnymi rotorami. Związki te będą stanowiły narzędzia do badania oddziaływań syntetycznych analogów TMG-kapu z białkami metodami bazującymi na fluorescencji. Zastosowanie fluorescencyjnych molekularnych rotorów opiera się na „włączeniu” fluorescencji w wyniku oddziaływania z białkiem/enzymem. Taki system (zero, jedynkowy, On-Off), w którym to sygnał pojawia się dopiero wtedy, kiedy zachodzi interesujący nas proces jest niezwykle użyteczny w badaniach biologicznych. Przede wszystkim umożliwia pomiar pożądaných parametrów związków (K_{AS} , IC_{50}), dla których wyznaczenie standardowymi metodami jest trudne, czasochłonne lub skomplikowane. Na przykład sygnał fluorescencji znacznika może być maskowany fluorescencją białka lub wygaszany przez białko. Fluorescencja molekularnych rotorów opiera się na zjawisku wewnątrzcząsteczkowej rotacji jednego z segmentów znacznika wokół wiązania σ , co skutkuje, w zależności od struktury takiego rotora, bezpromienistym (brakiem fluorescencji, OFF) lub promienistym (fluorescencja, ON) procesem relaksacji. Taka wewnątrzcząsteczkowa rotacja jest silnie zależna od rodzaju rozpuszczalnika, jego polarności, tworzących się wiązań wodorowych, izomeryzacji oraz zawady przestrzennej a więc jest zależna od głównych form oddziaływań między cząsteczką a białkiem.

W projekcie planujemy zastosowanie związków znakowanych molekularnymi rotorami do badania oddziaływania analogów TMG-kapu ze snurportyną 1. Chcemy opracować metodę opartą na fluorescencji, którą można będzie użyć stosując podejście wysokoprzepustowe do szybkiego sprawdzenia energii oddziaływania zsyntetyzowanych związków ze snurportyną 1. Badania te pozwolą określić kluczowe elementy strukturalne niezbędne do silnego wiązania z białkiem i będą stanowiły podstawę do racjonalnego projektowania nowych analogów TMG-kapu jako sygnałów transportu jądrowego.

Co więcej, związki znakowane molekularnymi rotorami mogą znaleźć zastosowanie do wizualizacji funkcjonalnych kompleksów analogów TMG-kap-białko za pomocą mikroskopii obrazowania czasów życia fluorescencji FCS-FLIM (*ang. Fluorescence Correlation Spectroscopy-Fluorescence Life-time Imaging Microscopy*). Badania te pozwolą stwierdzić czy zsyntetyzowane przez nas oligonukleotydy, zakończone analogami TMG-kapu są funkcjonalne i czy mają zdolność wnikania do jądra komórkowego z pomocą naturalnych systemów transportujących.