

## **Popularnonaukowe streszczenie projektu**

Eukariotyczny mRNA posiada na swoim końcu 5' unikatową strukturę ( $m^7GpppN$ ), zwaną kapem. Tworzy ją 7-metyloguanozyna ( $m^7G$ ) połączona nietypowym dla kwasów nukleinowych wiązaniem 5',5'-trifosforanowym z kolejnym nukleozydem (N). Kap pełni niezwykle ważną rolę na różnych etapach funkcjonowania mRNA w komórce: od roli ochronnej przed działaniem enzymów degradujących, poprzez splicing i transport wewnątrzkomórkowy aż po syntezę białka. Doniesienia ostatnich kilku lat wskazują na występowanie ogromnej różnorodności struktur kapu oraz czynników białkowych, które z nimi oddziałują w procesach komórkowych.

Usunięcie kapu powoduje progresywną degradację transkryptu przez specyficzne egzonukleazy. Jednym z najlepiej dotychczas poznanych enzymów odcinających kap z końca 5' mRNA jest białko Dcp2, posiadające motyw Nudix odpowiedzialny za wiązanie substratów oraz ich efektywną hydrolizę. Ostatnio opisano w literaturze szereg innych białek należących do rodziny Nudix, które wykazują aktywność podobną do Dcp2, ale ich rola w procesie degradacji mRNA jest bardzo słabo poznana. Celem niniejszego projektu jest pogłębienie wiedzy dotyczącej molekularnych podstaw degradacji mRNA, procesu, który ma znaczący wpływ na stabilność tej cząsteczki w komórkach. Informacje, które uzyskamy, będą miały istotny wymiar praktyczny związany z zastosowaniem mRNA w biotechnologii i medycynie. W ostatnich latach mRNA jest intensywnie badany pod kątem terapeutycznego wykorzystania jako leku, który po dostarczeniu do komórek stanowi matrycę do wytwarzania określonego białka, uzupełniając jego brak lub zastępując нефunkcjonalną formę. Strategia ta ma w konsekwencji doprowadzić do cofnięcia się objawów chorobowych. Jednym z ważniejszych zastosowań, będącym obecnie w zaawansowanej fazie testów klinicznych, są tzw. „szczepionki mRNA” kodujące antygeny mające na celu pobudzenie/mobilizowanie układu immunologicznego do walki z komórkami nowotworowymi. Warunkiem efektywności terapeutycznej mRNA jest odporność na degradację w warunkach komórkowych, co powoduje wydłużenie czasu jego działania.

Stosując szerokie spektrum metod biofizycznych i biochemicznych planujemy w ramach niniejszego projektu zbadać reprezentatywne białka Nudix pod kątem ich cech strukturalnych istotnych dla specyficznego oddziaływania z naturalnymi oraz syntetycznymi strukturami kapu wykorzystując zasoby naszego unikalnego zbioru modyfikowanych analogów kapu. Aktywność białek Nudix zostanie przebadana względem serii naturalnie występujących, zróżnicowanych struktur kapu, co pozwoli na określenie ich preferencji substratowych. W celu pełniejszej charakterystyki specyficzności enzymów Nudix wykorzystane zostaną metody miareczkowania fluorescencyjnego i mikrokalorymetrycznego, pozwalające precyzyjnie określić efektywność ich oddziaływania z różnymi analogami kapu. Istotnym kierunkiem badań będzie również określenie struktury białek Nudix na podstawie analizy rentgenograficznej uzyskanych kryształów. Badania krystalograficzne zostaną uzupełnione badaniami struktury i dynamiki białek w roztworach, z wykorzystaniem szeregu unikalnych technik, takich jak małokątowe rozpraszanie promieni rentgenowskich, ultrawirowanie, czy dichroizm kołowy. Ciekawym wyzwaniem będzie próba analizy puli dinukleotydowych struktur kapu izolowanych z ekstraktów komórkowych, gdzie ekspresja wybranych białek Nudix została zwiększona lub wyciszona. Porównanie takiej puli kapów z próbą kontrolną będzie podstawą poszukiwania struktur, których zawartość w komórkach najbardziej się zmienia w wyniku braku lub nadekspresji danego enzymu. W ramach projektu zostanie również przeprowadzona analiza mononukleotydowych analogów kapu jako potencjalnych inhibitorów jednego z białek Nudix, które jest zaangażowane w procesie degradacji nukleotydów 6-tiopuryn, stosowanych jako leki przeciwnowotworowe oraz immunosupresyjne.

Badania zrealizowane w ramach projektu dostarczą wielu istotnych informacji dotyczących mechanizmu oddziaływania białek Nudix z analogami kapu, co umożliwi dokładniejsze poznanie funkcji tych enzymów. Uzyskane wyniki będą też miały znaczenie aplikacyjne. Zostaną wykorzystane do planowania najbardziej efektywnych modyfikacji końca 5' cząsteczki mRNA tak, aby była odporna na degradację przez szerokie spektrum enzymów, co pozwoli na szersze zastosowanie w badaniach procesów biologicznych oraz w dalszej perspektywie w medycynie.