

Popularnonaukowy opis badań

Celem mojego projektu jest stworzenie narzędzi do monitorowania w czasie rzeczywistym reakcji enzymatycznych w których zaangażowane są nukleotydy. Związki te są bardzo istotnymi elementami metabolizmu komórkowego. Biorą udział w syntezie DNA i RNA, są kofaktorami wielu enzymów, a także przenoszą energię niezbędną w reakcjach komórkowych. Z uwagi na centralną funkcję w metabolizmie, jakiegokolwiek dysfunkcje enzymów katalizujących reakcje nukleotydów mogą skutkować poważnymi chorobami. Jedną z klas enzymów powiązanych z poważnymi chorobami są fosfohydrolazy – enzymy katalizujące degradację łańcucha oligofosforanowego w nukleotydzie.

Z tego względu bardzo istotne są badania, które umożliwią stworzenie narzędzi do monitorowania aktywności fosfohydrolaz zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Śledzenie aktywności enzymów w warunkach komórkowych (*in vivo*) pozwoliłoby na określenie miejsca w komórce, w którym są one aktywne. Z kolei możliwość monitorowania reakcji w warunkach *in vitro*, pozwoliłaby na wysokoprzepustowe poszukiwania inhibitorów enzymów oddziałujących z nukleotydami. Szybka metoda pozwalająca odkrywać nowe inhibitory fosfohydrolaz, ułatwi znajdowanie leków przydatnych w terapii chorób, w których funkcje tych enzymów zostały zaburzone.

Przedstawiony projekt ma na celu opracowanie wydajnej i szybkiej syntezy sond nukleotydowych, które mogłyby służyć w monitorowaniu aktywności enzymatycznej (część chemiczna), a następnie przebadanie i opracowanie metody wykorzystania tych sond w badaniach enzymatycznych (część biofizyczna). Ostatecznie sondy zostaną sprawdzone jako narzędzia w badaniu postępu degradacji nukleotydów *in vivo*, w środowisku komórki eukariotycznej.

W swoich badaniach do tej pory opracowałem prostą i wydajną syntezę nukleotydów, które mogą być wyznakowane różnymi znacznikami fluorescencyjnymi na drodze reakcji CuAAC (*copper-catalysed alkyne-azide cycloaddition*). Otrzymaliśmy szereg znakowanych nukleotydów, których fluorescencja znacząco różniła się przed oraz po degradacji enzymatycznej. Właściwość ta pozwoliła na wykorzystanie ich jako sondy fluorescencyjne, użyteczne w śledzeniu postępu reakcji enzymatycznych, co zostało potwierdzone w reakcjach z modelowym enzymem PDE-I.

Wstępne badania sugerują, że otrzymane sondy nukleotydowe nie tylko mają oczekiwane właściwości fluorescencyjne, ale także są rozpoznawane przez bardziej specyficzne enzymy. Dowiedliśmy tego badając kinetykę reakcji enzymu DcpS. Jest to hydrolaza specyficzna wobec nukleotydów zawierających 7-metyloguaninę, a jej dysfunkcje powiązano m. in. z rdzeniowym zanikiem mięśni. Wykorzystując nasze sondy byliśmy w stanie w czasie rzeczywistym obserwować działanie enzymu DcpS. W następnym kroku sonda ta może zostać użyta w wysokoprzepustowych poszukiwaniach inhibitorów DcpS, które mogą okazać się terapeutykami w chorobach spowodowanych dysfunkcją tego enzymu.

Wstępne badania *in vivo* w komórkach HeLa pokazały, że sondy projektowane w ramach niniejszego projektu są w stanie same pokonać barierę błony komórkowej i umiejscowić się w środku komórki, co pozwala na obserwację w czasie rzeczywistym procesów, którym ulegają nukleotydy w komórce. Obserwacje takie mogą wnieść dużo wiedzy na temat komórkowego metabolizmu nukleotydów.