

Modyfikowane nukleozydy występujące w cząsteczkach mRNA i tRNA są ważnymi elementami komórkowej maszyneryi odpowiedzialnej za wydajną i prawidłową biosyntezę białek. Szczególnie istotną rolę odgrywają modyfikowane nukleozydy bezpośrednio zaangażowane w oddziaływania kodon-anty kodon. Należy tu wymienić modyfikowane nukleozydy zlokalizowane w kodującym rejonie mRNA oraz w domenie ramienia antykodonu (ASL) cytozolowych i mitochondrialnych (mt) cząsteczek tRNA. Ponieważ mitochondria produkują ok. 90% energii wykorzystywanej przez komórkę stąd jakiegokolwiek zakłócenia struktury mt-tRNA mogą być przyczyną poważnych chorób mitochondrialnych (np. MERRF, MELAS, LHON). W przeciwieństwie do cząsteczek tRNA, matrycowy RNA (mRNA) zawiera stosunkowo niewielką ilość modyfikowanych nukleozydów, jednakże ich znaczenie - zwłaszcza w regulacji procesów komórkowych jest szeroko dyskutowane w literaturze. Niezwykle istotną grupą takich modyfikacji są odkryte w ostatnim czasie modyfikacje epigenetyczne; ich dynamiczny i odwracalny charakter nasuwa przypuszczenie, że mogą one pełnić rolę regulatorową w procesie biosyntezy białek na poziomie mRNA.

Cele i opis projektu. Wykorzystując chemicznie zsyntetyzowane oligomery RNA planujemy rozwiązać dwa złożone problemy naukowe dotyczące roli modyfikowanych nukleozydów mRNA i mt-tRNA w procesie translacji. Pierwszym celem projektu są epigenetyczne modyfikacje, zidentyfikowane w kodującym rejonie mRNA, wywodzące się z 5-metylocytydyny: 5-hydroksymetylocytydyna (hm^5C), 5-formylocytydyna (f^5C) i 5-karboksycytydyna (ca^5C). Brak systematycznych badań nad regulatorową rolą tych modyfikacji w procesie translacji oraz ważność tego problemu skłoniły nas do przeprowadzenia kompleksowych badań biofizycznych i strukturalnych, umożliwiających określenie wpływu wymienionych cytydyn na właściwości i aktywność biologiczną modyfikowanych nimi cząsteczek RNA.

W ramach Projektu planujemy potwierdzić eksperymentalnie zaproponowaną przez nas ścieżkę przemian hm^5C -RNA, która wyjaśniłaby raportowany w literaturze spadek hm^5C w komórkach nowotworach. Ponieważ hm^5C pełni rolę regulatorową wydaje się, że zaobserwowany metabolizm może mieć istotne znaczenie biologiczne lub patogenne w kancerogenezie. Stosując syntetyczny hm^5C -RNA oraz enzymy A3A, hSMUG1 i APE1 planujemy w warunkach *in vitro* wykonać trzy-etapową konwersję hm^5C -RNA prowadzącą ostatecznie do rozszczepienia łańcucha RNA.

Drugie zadanie Projektu koncentruje się wokół patogennych nukleozydów zidentyfikowanych w pozycji 37 hmt-tRNA^{Met} w wyniku mutacji A4435→G w ludzkim mt-DNA. Zaobserwowano, że patogenna guanozyna G₃₇ w kolejnym etapie ulega enzymatycznej metylacji do 1-metyloguanozyny (m^1G). Oba patogenne nukleozydy są przyczyną poważnych dysfunkcji mitochondriów, które w przypadku niektórych pacjentów dają objawy nadeśnienia, cukrzycy typu 2 lub dziedzicznej neuropatii nerwu wzrokowego Lebera (LHON). Ostatnio udowodniliśmy, że podstawienie A₃₇→G₃₇, a następnie m^1G_{37} zmienia stabilność termiczną spinek ASL [ChemCommun, 2021, 57, 12540]. Postawiliśmy hipotezę, że oligomer G₃₇-ASL tworzy super-stabilną spinę z 4-nukleotydową pętlą, która (jeśli hipoteza jest słuszna) byłaby nieaktywna w procesie rozpoznania antykodon-kodon i hamowałaby biosyntezę białek. W Projekcie zaplanowaliśmy syntezę odpowiednio modyfikowanych oligonukleotydów w większej skali i ich wykorzystanie w kompleksowych badaniach biochemicznych i strukturalnych w celu określenia właściwości uszkodzonych cząsteczek hmt-ASL^{Met}.

Powody podjęcia tematu badawczego. Określenie regulacyjnej roli pochodnych m^5C w procesie translacji jest ważne z kilku powodów: proces biosyntezy białek jest fundamentalny dla prawidłowego funkcjonowania komórek; zakłócenia tego procesu są przyczyną poważnych dysfunkcji w komórkach (zwłaszcza mózgu); obniżona zawartość hm^5C w RNA komórek nowotworowych może się okazać patogenna i stymulować powstawanie nowotworu; biologiczna rola f^5C i ca^5C nie została jak dotąd przedstawiona w literaturze. Z kolei badania nad patogennymi cząsteczkami mt-tRNA^{Met} są istotne dla wyjaśnienia molekularnych przyczyn opisywanych dysfunkcji mitochondriów jak również objawów klinicznych jakie im towarzyszą. Mamy przekonanie, że udzielenie odpowiedzi na pytanie w jaki sposób wadliwe nukleozydy zmieniają strukturę/właściwości RNA umożliwi w przyszłości odkrycie nowych metod leczenia ludzi.

Oczekiwane rezultaty. Biofizyczne i strukturalne badania z udziałem oligomerów zawierających epigenetyczne cytydyny poszerzą wiedzę na temat ich wpływu na właściwości hybrydazyjne RNA, selektywność parowania zasad oraz zmianę lokalnej/globalnej struktury RNA. Te dane pozwolą nam ocenić różnice pomiędzy poszczególnymi cytydynami, istotne dla określenia regulatorowej funkcji tych modyfikacji w komórce. Potwierdzenie zaproponowanej przez nas drogi metabolicznej hm^5C w komórkach nowotworowych rzuci nowe światło na rolę modyfikacji w kontroli ekspresji informacji genetycznej w komórkach nowotworowych i/lub nieznaną do tej pory funkcję regulatorową enzymów A3A i hSMUG1. Badania strukturalne zdefektowanych hmt-ASLs^{Met} oraz badania efektywności wiązania do mityribosomu pomogą nam wyjaśnić udział patogennych nukleozydów w patogenezie chorób mitochondrialnych na poziomie molekularnym. Ponadto, w Projekcie planujemy opracować kilka nowych metod syntezy modyfikowanych oligomerów RNA których dostępność jak ważna nie tylko dla realizacji Projektu.