

Kwasy rybonukleinowe (RNA) stanowią jedną z najważniejszych biomolekuł. Ich funkcje biologiczne RNA są bardzo różne i w dużej części powiązane z ich strukturą. W RNA, oprócz kanonicznych zasad występuje ponad 140 modyfikowanych nukleotydów. Najczęściej występującymi są N6-metyloadenozyna i pseudourydyna. Modyfikowane nukleotydy wpływają na strukturę i funkcje biologiczne RNA. Powiązanie struktury RNA z jego właściwościami biologicznymi sprawia, że wiedza o strukturze RNA zawierających modyfikowane nukleotydy jest bardzo pożądana. Oprócz wielu metod chemicznego mapowania struktury RNA istnieje także metoda przewidywania fałdowania się RNA w oparciu o znajomość reguł termodynamicznych dotyczących oddziaływań w obrębie różnych motywów strukturalnych RNA. Służą do tego odpowiednio skonstruowane programy komputerowe, a jednym z najlepszych jest RNAstructure. Celem projektu badawczego jest wyznaczenie parametrów termodynamicznych określających wpływ na fałdowanie RNA następujących naturalnych modyfikacji RNA: pseudourydyny, N1-metylopseudourydyny, 5-metoksyurydyny i 5-metylocytydyny. Wyznaczone eksperymentalnie parametry termodynamiczne zostaną wprowadzone do programu RNAstructure. Następnym etapem projektu będzie mapowanie chemiczne kilku RNA zawierających wymienione modyfikowane nukleotydy i porównanie struktur RNA wygenerowanych za pomocą zmodyfikowanego programu RNAstructure i określonych eksperymentalnie poprzez mapowanie chemiczne.

Projekt jest również ważny z innych powodów. Wydaje się, że świat dzięki szczepionkom powoli wychodzi z pandemii spowodowanej wirusem SARS-CoV-2. Najskuteczniejsze szczepionki firm Pfizer i Moderna zawierają mRNA białka kolca (ang. *spike*), w których wszystkie urydyny zostały zastąpione N1-metylopseudourydyną. Wcześniejsze badania wykazały, że wprowadzenie do *szczepionkowych RNA* N1-metylopseudourydyny najbardziej zwiększa ekspresję mRNA oraz jego stabilność w środowisku komórkowym, ponadto wykazuje najlepsze parametry immunologiczne. Innymi modyfikowanymi nukleotydami, które również dawały bardzo obiecujące wyniki były właśnie: pseudourydyna, 5-metoksyurydyna i 5-metylocytydyna. To było również powodem wyboru do badań wymienionych modyfikowanych nukleotydów RNA.

Plan badań obejmuje następujące etapy: (1) synteza koniecznych modyfikowanych amidofosforynów oraz oligonukleotydów RNA zawierających w określonych pozycjach pseudourydyny, N1-metylopseudourydyny, 5-metoksyurydyny oraz 5-metylocytydyny, (2) pomiary trwałości termodynamicznej komplementarnych dupleksów oraz dupleksów zawierających modyfikacje w obrębie niehelikalnych motywów strukturalnych RNA. Obliczenie parametrów termodynamicznych dla każdego typu modyfikacji RNA oraz wprowadzenie ich do programu RNAstructure, (3) mapowanie chemiczne dwóch dużych fragmentów podjednostki 28S rybosomalnego RNA (rRNA) z człowieka. Oba modelowe rRNA zawierają odpowiednio 5 i 13 reszt pseudourydyny i są wybrane z rejonu rRNA, w którym zachodzi autokatalityczne tworzenie wiązania peptydowego na rybosomie. W oparciu o wyniki mapowania chemicznego zostanie określona jego struktura drugorzędowa i porównana ze strukturą wygenerowaną za pomocą zmodyfikowanego programu RNAstructure. Porównanie obu struktur drugorzędowych posłuży także do ewentualnej poprawy modyfikowanych parametrów termodynamicznych programu RNAstructure korygujących program, (4) ponieważ określone parametry termodynamiczne dotyczyć będą także *szczepionkowych RNA*, również strukturę takich RNA będziemy badali. Wybranymi RNA są: sgRNA M z wirusa SARS-CoV-2 (fragment około 800 nt) oraz segment 4 z RNA wirusa grypy (fragment mRNA kodujący białko powierzchniowe – hemaglutyninę o długości około 1800 nt). Dla pierwszego modelowego RNA badane będą struktury zawierające jedną z czterech modyfikacji, natomiast dla RNA segmentu 4 tylko struktury zawierające odpowiednio pseudourydynę i N1-metylopseudourydynę. Następnie porównane zostaną ich struktury wygenerowane za pomocą RNAstructure oraz wynikające z ich mapowania chemicznego, (5) określenie, za pomocą NMR oraz metodami krystalograficznymi, struktury małych fragmentów RNA zawierających pseudourydynę. Badania te mają na celu określenie oddziaływań odpowiedzialnych za znaczącą stabilizację struktur RNA przez pseudourydynę.

Reasumując, projekt ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia funkcji biologicznych i wpływu na strukturę RNA jego modyfikacji. Równie ważny jest aspekt *szczepionkowych RNA*, bo skuteczność szczepionek Pfizer oraz Moderna wskazuje, że jest to właściwy na przyszłość kierunek rozwoju szczepionek typu IVT mRNA.