

Tytuł rozprawy doktorskiej: 5' terminalny nukleotyd moduluje immunogenność RNA

Streszczenie

Wrodzona odpowiedź immunologiczna stanowi pierwszą linię obrony w komórkach ssaków przed różnymi patogenami, w tym wirusami RNA. Choć jej aktywacja jest kluczowa dla wytwarzania czynników przeciwwirusowych, takich jak interferony, nadmierna stymulacja może prowadzić do chorób autoimmunologicznych. Jednym z głównych regulatorów odporności wrodzonej przeciwko wirusom RNA jest cytoplazmatyczny receptor – RIG-I (ang. *retinoic acid-inducible gene 1*). RIG-I rozpoznaje dwuniciowe RNA (dsRNA) zawierające grupę 5'-trifosforanową (5'-ppp) lub 5'-difosforanową (5'-pp), co uruchamia kaskadę sygnałową obejmującą fosforylację IRF3 oraz produkcję interferonów typu I.

RIG-I wykrywa nie tylko wirusowe i niektóre endogenne transkrypty polimerazy RNA III, ale również dwuniciowe produkty uboczne powstające podczas reakcji transkrypcji *in vitro* (IVT), szeroko stosowanej metody wytwarzania terapeutycznych cząsteczek mRNA. Istotnie, IVT z użyciem polimerazy RNA T7 wytwarza wyłącznie transkrypty rozpoczynające się od nukleotydu 5'-pppA lub 5'-pppG. Jednak immunogenny potencjał zależny od nukleotydu na końcu 5' nie został dotychczas zbadany. W pierwszej części mojej rozprawy doktorskiej wykazuję, że produkty IVT rozpoczynające się od 5'-pppA wykazują wyższą immunogenność niż te inicjowane przez 5'-pppG. Ten potencjał immunogeny RNA inicjowanych od 5'-pppA wynika z większej ilości produktów ubocznych dsRNA powstających podczas reakcji IVT.

Naturalnie występujące agonisty RIG-I również różnią się pod względem nukleotydu końcowego 5'. Wiele wirusowych genomów RNA zaczyna się od 5'-pppA, natomiast większość transkryptów polimerazy III u organizmów wyższych inicjuje od 5'-pppG. Biologiczne znaczenie tej różnicy pozostaje nieznane. Moje badania pokazują, że dsRNA z końcem 5'-pppA silniej aktywują szlak RIG-I/IFN niż dsRNA z końcem 5'-pppG, w stężeniach reprezentujących wczesne fazy infekcji wirusowej. Ponadto przedstawiam potencjalne wyjaśnienie tego zjawiska, wskazując, że białka wiążące GTP selektywnie oddziałują z dsRNA 5'-pppG, a tym samym hamują działanie RIG-I.

Reasumując, niniejsze badania pokazują techniczne i biologiczne aspekty wpływu nukleotydu końcowego 5' na potencjał immunogeny RNA. Technicznie zidentyfikowano cechy transkrypcji IVT sprzyjające aktywacji układu odpornościowego, a biologicznie wykazano, że zmienność struktury końca 5' dsRNA moduluje rozpoznawanie przez odporność wrodzoną, ustanawiając bezpośredni związek między sekwencją RNA a jej detekcją przez układ odpornościowy. Charakterystyka mechanizmów IVT wywołujących immunogenność stanowi podstawę do optymalizacji terapii mRNA nowej generacji. Zaobserwowane obniżenie immunogenności dsRNA 5'-pppG sugeruje strategię unikania odpowiedzi immunologicznej stosowaną przez wirusy i transkrypty polimerazy III poprzez rekrutację białek wiążących GTP

do końców 5'-pppG. Wyniki te ujawniają dotąd niedocenianą rolę nukleotydów końcowych 5' w modulowaniu przeciwwirusowych odpowiedzi immunologicznych.