

# Badania strukturalne RNA o znaczeniu w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych

mgr inż. Marcin Ryczek

## Streszczenie

Wiele chorób człowieka zwłaszcza chorób neurodegeneracyjnych i neuromuskularnych jest wywoływanych przez ekspansję powtórzeń nukleotydów zwanych mikrosatelitami w różnych genach. Transkrypty powstające na matrycy tych genów ze względu na posiadanie zwielokrotnionych powtórzeń nukleotydowych mogą formować różne struktury. Badanie struktur RNA związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi stanowi ważny etap w zrozumieniu mechanizmów działania tych chorób oraz może przyczynić się do wyłonienia potencjalnych nowych terapeutyków celowanych.

W niniejszej rozprawie doktorskiej postawiłem przed sobą dwa cele. Moim pierwszym zadaniem było opracowanie protokołu produkcji RNA o strukturze spinki, stabilizacja tego RNA do krystalizacji oraz wyznaczenie struktury przestrzennej RNA w formie spinki stabilnej w warunkach krystalizacyjnych. Drugie zadanie dotyczyło wyznaczenia struktury przestrzennej kompleksu RNA zawierającego sekwencję  $G_2C_4$  z syntetyczną cząsteczką ANP77. Na podstawie tej struktury chciałem określić potencjał terapeutyczny cząsteczki ANP77 oraz czy ta cząsteczka mogłaby posłużyć do stabilizacji struktur RNA.

W ramach pierwszego zadania opracowałem protokół produkcji RNA w formie spinki do badań krystalograficznych. Krótkie cząsteczki RNA (o długości do 10 nukleotydów) mogą być wydajnie produkowane za pomocą syntezy chemicznej na podłożu stałym. Natomiast RNA dłuższy niż 40 nukleotydów powinien być syntetyzowany na drodze transkrypcji *in vitro* przy użyciu rybozymów lub modyfikowanej matrycy DNA. Zaprojektowałem szereg konstruktów związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi, dla których chciałem określić strukturę przestrzenną. Konstrukty zawierające powtórzenia trójnukleotydowe CUG (biorące udział w rozwoju dystrofii miotonicznej) stabilizowałem poprzez cyrkularyzację, a ich potencjał krystalizacyjny chciałem zwiększyć poprzez oddziaływanie RNA z domeną oddziałującą z RNA białka U1a.

W ramach drugiego zadania udało mi się uzyskać struktury przestrzenne dla konstruktu  $G_2C_4$  z i bez cząsteczki ANP77. Opisałem sposób fałdowania się RNA, oddziaływania RNA z ligandem ANP77 oraz oddziaływania cząsteczek w sieci krystalicznej. Przy użyciu skaningowej kalorymetrii różnicowej w zakresie pH 5,2–7,0 określiłem poziom stabilizacji struktury  $G_2C_4$  przez cząsteczkę ANP77.

Badania przedstawione w tej pracy ukazują potencjał RNA zawierającego sekwencję G<sub>2</sub>C<sub>4</sub> do formowania tripleksów złożonych z trójek nukleotydowych C-C-C, oraz C-G-C. Stanowi to ważny element w rozwoju wiedzy na temat mechanizmów związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi opisywanymi w pracy.