

Charakterystyka strukturalna cząsteczek RNA pozostaje wyzwaniem ze względu na wysoką elastyczność konformacyjną reszt nukleotydowych skłonność do przyjmowania wielu struktur drugorzędowych i trzeciorzędowych oraz podatność na rearanżacje strukturalne indukowane np.: warunkami eksperymentalnymi. Chociaż krystalografia rentgenowska jest skuteczną metodą wyznaczania struktury RNA o wysokiej rozdzielczości, krystalizacja cząsteczek RNA jest często trudna i limitująca cały proces analizy strukturalnej. Przykładowo, struktury spinek RNA mają dużą tendencję do rozplatania się i tworzenia alternatywnych struktur dupleksów przy wysokich stężeniach RNA i soli, typowo stosowanych podczas krystalizacji. W konsekwencji, wielu biologicznie istotnych natywnych motywów RNA nie można uchwycić w jednorodnym stanie krystalicznym bez dodatkowych strategii stabilizacyjnych.

Celem niniejszej rozprawy było opracowanie nowych strategii stabilizacji struktur cząsteczek RNA. Zastosowano dwa podejścia: kowalencyjna stabilizacja za pomocą nienukleozydowych linkerów oraz stabilizacja z użyciem małowcząsteczkowego ligandu.

W przypadku pierwszej strategii zaprojektowano, zsyntetyzowano i włączono do łańcucha RNA serię aromatycznych linkerów, mających na celu kowalencyjne połączenie końców 3' i 5' przy jednoczesnym zachowaniu natywnej geometrii RNA. W drugim podejściu przebadano zdolność stabilizacji RNA za pomocą dimeru karbaminianu naftyrydyny (NCD). Wykazano, że wiązanie małowcząsteczkowego ligandu może stabilizować strukturę RNA poprzez mechanizmy zasadniczo odmienne od metod kowalencyjnych. NCD działa jak klamra spinająca reszty nukleotydowe zarówno w obrębie tej samej jak i dwóch sąsiednich cząsteczek RNA działając jako „klej molekularny”.

Ostatnia część pracy koncentruje się na ocenie fizykochemicznej i biochemicznej konstruktów RNA, obejmującej badania denaturacji termicznej monitorowane spektroskopią UV, pomiary dichroizmu kołowego oraz analizy cięcia RNA in vitro z użyciem nukleazy Dicer. Techniki te pozwoliły ocenić wpływ zastosowanych strategii stabilizacji na integralność strukturalną RNA, jego właściwości fałdowania oraz aktywność biologiczną.

Podsumowując, niniejsza rozprawa przedstawia dwie strategie ukierunkowane na stabilizację cząsteczek RNA w badaniach strukturalnych. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę na temat możliwości wykorzystania zarówno kowalencyjnych łączników nienukleozydowych, jak i ligandów małowcząsteczkowych w pokonywaniu barier krystalizacji RNA.