



UNIWERSYTET OPOLSKI

Instytut Biologii

PRACA DOKTORSKA

Rafał Mańka

**BADANIE ODDZIAŁYWANIA APTAMERÓW RNA
Z BŁONAMI PEŁCZERZYKÓW LIPIDOWYCH**

**A STUDY OF THE INTERACTION OF RNA APTAMERS
WITH THE MEMBRANES OF LIPID VESICLES**

Praca napisana pod kierunkiem
prof. dr hab. Tadeusz Janas

Opole 2023

Podziękowania

Dziękuję promotorowi, Panu prof. dr hab. Tadeuszowi Janasowi za zaangażowanie mnie w projekt badawczy oraz opiekę merytoryczną.

Wyrazy podziękowania dla Pani prof. dr hab. Teresy Janas za udostępnienie kolekcji aptamerów RNA i inspirujące uwagi.

Dziękuję również dr Karolinie Sapoń za możliwość wykorzystania w badaniach izolowanych przez Nią egzosomów oraz okazaną pomoc i zachętę.

Serdecznie dziękuję żonie Joannie za nieocenione wsparcie.

Dziękuję Bogu za nadzieję.

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI	- 3 -
WYKAZ SKRÓTÓW	- 6 -
STRESZCZENIE	- 7 -
ABSTRACT	- 9 -
- CZĘŚĆ TEORETYCZNA -	- 11 -
1. WSTĘP LITERATUROWY	- 11 -
1.1. BŁONY I TRATWY LIPIDOWE.....	- 11 -
1.1.1. Budowa błon komórkowych.....	- 11 -
1.1.2. Funkcje tratw lipidowych.....	- 14 -
1.1.3. Metody badania tratw i błony modelowe	- 15 -
1.2. EGZOSOMY	- 17 -
1.2.1. Egzosomy i inne zewnątrzkomórkowe pęcherzyki błonowe.....	- 17 -
1.2.2. Budowa egzosomów.....	- 18 -
1.2.3. Formowanie i biodystrybucja egzosomów	- 19 -
1.2.3.1. Powstawanie pęcherzyków intraluminarnych	- 19 -
1.2.3.2. Włączanie ładunku do egzosomów	- 21 -
1.2.3.3. Interakcje egzosomów z komórkami docelowymi	- 21 -
1.2.4. Rola egzosomów w organizmie.....	- 22 -
1.2.5. Wykorzystanie egzosomów terapii.....	- 23 -
1.3. RNA	- 24 -
1.3.1. RNA w komórce.....	- 24 -
1.3.2. Funkcje egzosomowego RNA	- 25 -
1.3.3. Motywy egzosomowe i tratwowe w RNA	- 26 -
1.3.4. Aptamery RNA.....	- 27 -
1.4. SPEKTROSKOPIA FLUORESCENCYJNA	- 27 -
- BADANIA WŁASNE –	- 29 -
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	- 29 -
3. MATERIAŁY I METODY	- 30 -
3.1. MATERIAŁY	- 30 -
3.1.1. Roztwory podstawowe i bufony.....	- 30 -
3.1.2. Żele.....	- 32 -
3.1.3. Enzymy.....	- 33 -
3.1.4. Oligonukleotydy	- 33 -
3.1.4.1. Aptamery RNA.....	- 33 -
3.1.4.2. Mutanty RNA	- 35 -
3.1.4.3. Startery	- 38 -

3.1.4.4.	Markery długości.....	- 38 -
3.1.5.	Lipidy	- 39 -
3.1.6.	Egzosomy	- 39 -
3.1.7.	Sondy fluorescencyjne.....	- 39 -
3.1.8.	Pozostałe odczynniki	- 41 -
3.1.9.	Sprzęt i inne materiały.....	- 42 -
3.2.	METODY	- 43 -
3.2.1.	Analiza bazy aptamerów RNA	- 43 -
3.2.2.	Określenie struktury drugorzędowej RNA	- 44 -
3.2.3.	Przygotowanie aptamerów RNA	- 44 -
3.2.3.1.	Wstępny PCR w małej skali	- 44 -
3.2.3.2.	Elektroforeza DNA w żelu poliakrylamidowym niedenaturującym	- 45 -
3.2.3.3.	PCR	- 46 -
3.2.3.4.	Oczyszczanie DNA po PCR	- 46 -
3.2.3.5.	Transkrypcja in vitro	- 46 -
3.2.3.6.	Elektroforeza RNA w żelu poliakrylamidowym	- 47 -
3.2.3.7.	Elucja RNA z żelu	- 47 -
3.2.3.8.	Precypitacja RNA	- 47 -
3.2.3.9.	Oznaczanie czystości i stężenia otrzymanych transkryptów RNA.....	- 47 -
3.2.4.	Przygotowanie mutantów RNA.....	- 49 -
3.2.4.1.	Zaprojektowanie mutantów RNA.....	- 50 -
3.2.4.2.	Przygotowanie mutantów do badań.....	- 51 -
3.2.5.	Preparacja liposomów	- 52 -
3.2.6.	Znakowanie i oczyszczanie egzosomów	- 53 -
3.2.6.1.	Izolacja egzosomów	- 53 -
3.2.6.2.	Inkubacja egzosomów z sondami	- 53 -
3.2.6.3.	Oczyszczanie egzosomów	- 53 -
3.2.7.	Pomiary kontrolne	- 55 -
3.2.7.1.	Dobór zakresu stężeń lipidów dla miareczkowania liposomami.....	- 55 -
3.2.7.2.	Kontrola wartości pozornej fluorescencji liposomów	- 55 -
3.2.7.3.	Kontrola sond fluorescencyjnych	- 56 -
3.2.7.4.	Wyznaczanie korekty crosstalk donora w układzie pomiarowym egzosomów z RNA	- 58 -
3.2.8.	Pomiary fluorescencji i wyznaczenie stałej dysocjacji dla kompleksu RNA-liposomy....	- 59 -
3.2.8.1.	Przygotowanie próbek do pomiarów	- 59 -
3.2.8.2.	Pomiary fluorescencyjne	- 60 -

3.2.8.3.	Wyznaczanie stałej dysocjacji.....	- 61 -
3.2.9.	Pomiary fluorescencji i wyznaczenie stałej dysocjacji dla kompleksu RNA-egzomy .	- 62 -
3.2.9.1.	Przygotowanie próbek do pomiarów.....	- 62 -
3.2.9.2.	Pomiary fluorescencyjne	- 63 -
3.2.9.3.	Wyznaczenie stałej dysocjacji.....	- 64 -
3.2.10.	Metody statystyczne	- 64 -
4.	WYNIKI.....	- 66 -
4.1.	PROFIL MOTYWÓW RNA W BAZIE APTAMERÓW	- 66 -
4.2.	CHARAKTERYSTYKA APTAMERÓW RNA WYKORZYSTANYCH W BADANIACH	- 72 -
4.2.1.	Występowanie motywów struktury 2-rzędowej w cząsteczkach aptamerów.....	- 72 -
4.2.2.	Występowanie motywów sekwencyjnych RNA w strukturze 2-rzędowej aptamerów-	73 -
4.2.3.	Karty charakterystyk aptamerów RNA	- 76 -
4.3.	ODDZIAŁYWANIE APTAMERÓW RNA Z BŁONAMI MODELOWYMI	- 95 -
4.4.	ODDZIAŁYWANIE APTAMERÓW RNA Z LIPOSOMAMI TRATWOWYMI.....	- 110 -
4.5.	ODDZIAŁYWANIE APTAMERÓW RNA Z EGZOSOMAMI.....	- 112 -
4.6.	CHARAKTERYSTYKA MUTANTÓW RNA WYKORZYSTANYCH W BADANIACH .	- 117 -
4.6.1.	Karty charakterystyki mutantów aptamerów.....	- 117 -
4.7.	ODDZIAŁYWANIE MUTANTÓW APTAMERÓW Z LIPOSOMAMI TRATWOWYMI .	- 143 -
4.8.	ODDZIAŁYWANIE MUTANTÓW APTAMERÓW Z EGZOSOMAMI	- 147 -
5.	DYSKUSJA.....	- 150 -
5.1.	ZNACZENIE TRATW LIPIDOWYCH W ODDZIAŁYWANIU APTAMERÓW RNA Z BŁONAMI	- 150 -
5.2.	ZNACZENIE MOTYWÓW SEKWENCYJNYCH I STRUKTURALNYCH W ODDZIAŁYWANIU APTAMERÓW RNA Z BŁONAMI	- 151 -
5.2.1.	Znaczenie motywów sekwencyjnych RNA.....	- 151 -
5.2.2.	Znaczenie motywów strukturalnych.....	- 157 -
5.2.3.	Znaczenie innych czynników	- 159 -
5.3.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	- 162 -
	BIBLIOGRAFIA.....	- 165 -
	SPIS RYSUNKÓW	- 172 -
	SPIS TABEL.....	- 173 -
	ZAŁĄCZNIKI.....	- 174 -
	Załącznik 1. Lista wszystkich oryginalnych sekwencji RNA	175
	Załącznik 2. Tabela wariantów faldowania badanych RNA	186

WYKAZ SKRÓTÓW

BS – błąd standardowy

Chl – cholesterol

DMSO – dimetylosulfotlenek

DOPC – dioleoilofosfatydylocholina

ESCRT – endosomalny kompleks sortujący konieczny do transportu białek (ang. endosomal sorting complex required for transportation)

Eth Abs.[99,9%] – etanol absolutny

EtOH – etanol

EV – zewnątrzkomórkowe pęcherzyki błonowe (ang. Extracellular Vesicles)

FRET - rezonansowe przeniesienie energii Förstera (ang. Förster Resonance Energy Transfer)

H₂O HPW – HyPure Molecular Biology Grade Water (ThermoFisher Scientific)

ILV – pęcherzyki intraluminalne (ang. intraluminal vesicles)

j.a. – jednostka arbitralna

K_D – stała dysocjacji

L.nt. – liczba nukleotydów

LUV – duże jednowarstwowe liposomy (ang. Large Unilamellar Vesicles)

LUV_{DOPC} – duże jednowarstwowe liposomy, składające się z DOPC

LUV_{RAFT} – duże jednowarstwowe liposomy, składające się z DOPC, sfingomieliny i cholesterolu

MLV – pęcherzyki wielowarstwowe (ang. Multilamellar Vesicles)

MVB – ciała wielopęcherzykowe (ang. multivesicular bodies)

NaOAc – octan sodu CH₃COONa

nt. – nukleotyd

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)

RBP – białka wiążące RNA (ang. RNA-binding proteins)

SM – sfingomielina

ΔG – zmiana energii swobodnej Gibbsa

λ_{em} – długość fali emisji fluorescencji

λ_{wz} – długość fali wzbudzenia fluorescencji

STRESZCZENIE

Wytwarzanie przez komórkę składających się z dwuwarstwy lipidowej pęcherzyków błonowych, spotykane jest zarówno u bakterii, archeonów jak i eukariontów. Komórki eukariotyczne wytwarzają różnorodne pęcherzyki, które przenoszą substancje wewnątrz komórki czy też wydzielane są na zewnątrz. Właśnie pośród tych zewnątrzkomórkowych pęcherzyków błonowych (ang. Extracellular Vesicles) wyróżnić można egzosomy. Egzosomy to zbudowane dwuwarstwy lipidowej i białek błonowych pęcherzyki, których specyficzny skład lipidowy może wpływać na powstawianie domen w błonach egzosomów tzw. tratw lipidowych. Owe tratwy to „małe (10–200 nm), heterogeniczne, wysoce dynamiczne, wzbogacone w sterole i sfingolipidy domeny, które przedzielają procesy komórkowe” [Pike 2006]. Obecność tych domen w błonach egzosomów, może wspomagać stabilność pęcherzyków. Egzosomy, transportując wytworzone w komórkach molekuly takie jak kwasy nukleinowe, białka czy lipidy, pośredniczą w sygnalizacji komórkowej. W pęcherzykach pochodzących z różnorodnych komórek znaleziono podobne grupy RNA, co może sugerować, że istnieje wspólny mechanizm selektywnego wprowadzania RNA do egzosomów. W tym kontekście czynione są próby wyjaśnienia procesu ładowania RNA do egzosomów. Oprócz opisów tego mechanizmu opartych o kompleksy białkowe, pojawiają się hipotezy o możliwym oddziaływaniu cząsteczek RNA z błonami pęcherzyków bez pośrednictwa białek. W procesie tym, wskazuje się na czynniki takie jak: obecność regionu tratwowego w błonie ciałek wielopecherzykowych czy też występowanie specyficznych motywów nukleotydowych w sekwencji RNA takich jak: motywy egzosomowe (CCCU, GGAG, UGAG i UCCU) czy motywy tratwowe (CCCU, UCCC, CUCC i UUGU). Celem niniejszej pracy było zbadanie udziału tych czynników w oddziaływaniach oligonukleotydów RNA z błonami pęcherzyków lipidowych.

Materiałem do badań były pęcherzyki liposomalne modelujące błonę tratwową i nie-tratwową oraz izolowane z surowicy bydłej egzosomy. Z kolei materiał RNA stanowiły aptamery RNA pochodzące z badań [Janas i in., 2020] oraz zaprojektowane mutanty tych aptamerów z wprowadzonymi modyfikacjami nukleotydowymi.

W toku prac w bazie oryginalnych aptamerów oraz mutantów znalezione zostały motywy sekwencyjne RNA: egzosomowe, tratwowe oraz 5-nukleotydowe wraz z ich prawdopodobną lokalizacją w cząsteczkach badanych RNA. W przewidzianych za pomocą programu Mfold fałdowaniach cząsteczek RNA, zostały zidentyfikowane motywy struktury drugorzędowej: sparowany odcinek (trzon), wyrzuszenia, pętle wewnętrzne, pętle wieloramienne, pętle typu spinki do włosów oraz odcinki jednoniciowe przy końcach cząsteczki. Na podstawie wyników przeszukiwań motywów oraz przewidzianych struktur drugorzędowych sporządzono karty charakterystyki analizowanych aptamerów RNA oraz mutantów RNA.

Badania oddziaływań RNA-błona prowadzone były w oparciu o pomiary fluorescencyjne z wykorzystaniem metody rezonansowego przeniesienia energii Förstera (FRET). Przeprowadzone zostały badania poziomu oddziaływania aptamerów RNA z błonami liposomów i egzosomów, jak również mutantów RNA z liposomami tratwowymi i egzosomami. Na podstawie przeprowadzonych pomiarów uzyskano wartości stałej dysocjacji (K_D) dla większości badanych RNA.

Porównanie wartości K_D dla oddziaływania aptamerów RNA w kompleksach z błoną tratwową i nie-tratwową wykazało istnienie znaczących różnic w poziomie powinowactwa

RNA-błona w zależności od fazy błony. Wartości K_D były średnio prawie dwukrotnie niższe dla oddziaływań aptamerów z liposomami tratwowymi w porównaniu z liposomami nie-tratwowymi. Wyniki pomiarów potwierdzają więc, że stan błony może regulować powinowactwo RNA-błona. Generalna tendencja wskazuje, że domeny tratwowe sprzyjają interakcji badanych aptamerów RNA z cząsteczkami lipidów i mogą stanowić potencjalne miejsce wiązania cząsteczek RNA z błonami pęcherzyków.

Przy badaniach z wykorzystaniem egzosomów, różnice w poziomach powinowactwa RNA do błon egzosomów przypominały różnice uzyskane dla tych samych RNA w interakcjach z liposomami tratwowymi. Wartości K_D dla oddziaływania RNA z egzosomami charakteryzowały się jednak dużym rozrzutem, dlatego też w przyszłości można by powtórzyć tę część eksperymentu.

Dla uzyskanych w badaniach wartości K_D oddziaływania RNA-błona tratwowa, przeprowadzone zostały analizy zależności między zmiennością K_D , a występowaniem czynników takich jak: motywy sekwencyjne, motywy strukturalne występujące w przewidzianym fałdowaniu, a także innych czynników jak długości łańcucha RNA, skład nukleotydowy oraz energia swobodna fałdowania. Przeprowadzone analizy sugerują że:

- Niektóre motywy sekwencyjne jak CCCU, GGAG czy UCCC mogą promować oddziaływanie RNA-błona. Mutanty wzbogacone o te motywy zasadniczo wykazywały wzrost powinowactwa w porównaniu z RNA bez modyfikacji.
- Chociaż słaba, otrzymana korelacja między wartością K_D , a liczbą spinek oraz wartością K_D i obliczonym parametrem świadczącym o występowaniu małych spinek mogą sugerować, że motyw strukturalny spinki do włosów sprzyja powinowactwu RNA-błona.
- Obecność długiego jednoniciowego odcinka przy końcu cząsteczki oligonukleotydu, może osłabiać oddziaływanie aptameru RNA z tratwami błonowymi.
- Wydaje się również, że skrócenie pętli spinki do włosów (delecje) oraz wprowadzenie motywu przez substytucję może zwiększać powinowactwo, z kolei powiększenie pętli (insercja) przy wprowadzeniu motywu RNA, nie zwiększa powinowactwa RNA-błona.

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

1. RNA ma zdolność do bezpośrednio oddziaływania z regionem tratw lipidowych, a obecność domen tratwowych w błonach pęcherzyków sprzyja powinowactwu badanych aptamerów RNA do błon pęcherzyków lipidowych.
2. Na poziom oddziaływania aptamerów RNA z błonami mogą wpływać pewne sekwencje nukleotydowe (motywy RNA), przy czym wpływ tych motywów wydaje się być powiązany z występowaniem motywów strukturalnych.
3. Obecność motywów struktury drugorzędowej może mieć znaczenie w regulacji poziomu powinowactwa RNA-błona. Występowanie motywu spinki do włosów (mała spinka na stabilnym trzonie) może sprzyjać oddziaływaniu RNA z błoną, z kolei obecność długiego jednoniciowego odcinka przy końcu cząsteczki aptameru prawdopodobnie nie sprzyja oddziaływaniom RNA-błona.

Podsumowując, poziom powinowactwa aptamerów RNA do błon pęcherzyków wydaje się być efektem współdziałania różnych czynników, takich jak analizowane w tej pracy motywy sekwencyjne czy motywy strukturalne, a przypuszczalnie i innych. W przyszłości warto by znaleźć bardziej złożony model, który mógłby pełniej wyjaśnić zmienność powinowactwa RNA-błona pęcherzyków.

ABSTRACT

The production of membrane vesicles consisting of a lipid bilayer occurs in bacteria, archaea and eukaryotes. Eukaryotic cells produce a variety of vesicles that carry substances within the cell or are secreted outside the cell. Among these extracellular vesicles (EVs) are also exosomes. Exosomes are vesicles, composed of a lipid bilayer and membrane proteins, and their specific lipid composition may influence the formation of domains in the vesicle's membranes called lipid rafts. These membrane rafts are 'small (10–200 nm), heterogeneous, highly dynamic, sterol- and sphingolipid-enriched domains that compartmentalize cellular processes' [Pike 2006].

The presence of these domains in exosome membranes may support vesicle stability. Exosomes mediate cell signalling by transporting molecules produced in cells, such as nucleic acids, proteins or lipids. Similar groups of RNA have been found in vesicles from a variety of cells, suggesting that there is a common mechanism for selectively introducing RNA into exosomes. In this context, some attempts have been made to explain the process of RNA loading into exosomes. Apart from explanations of this mechanism based on the involvement of protein complexes, there are also other hypotheses of the possible interaction of RNA molecules with vesicle membranes which do not depend on protein mediation. In these processes the following factors are considered: the presence of a raft region in the membrane of multivesicular bodies or the presence of specific nucleotide motifs in the RNA sequence, namely the exosome motifs (CCCU, GGAG, UGAG and UCCU) or raft motifs (CCCU, UCCC, CUCC and UUGU). The aim of this study was to investigate the influence of these factors on RNA interactions with lipid vesicle membranes.

The materials for the study were liposomal vesicles modelling raft and non-raft membranes and exosomes isolated from bovine serum. The RNA material consisted of oligonucleotides obtained in the research of [Janas *in.*, 2020] as well as specifically designed mutants with introduced nucleotide modifications.

In the database of original oligonucleotides and mutants RNA sequence motifs were found, along with their probable location in the RNA molecules. In the folding of the RNA molecules predicted by the Mfold program, the following secondary structure motifs were identified: a stem, bulges, internal loops, multi-branch loops, hairpin loops and single-stranded regions at the ends of the molecule. Based on the results of the motif searches and the predicted secondary structures, characterization sheets of the analysed RNA aptamers and mutants were created.

The study of the RNA-membrane interaction was based on fluorescence measurements using the Förster resonance energy transfer (FRET) method. Studies of the level of interaction between RNA aptamers with model membranes and exosome membranes, as well as RNA mutants with raft liposomes and exosomes, were carried out. On the basis of the measurements, the values of the dissociation constant (K_D) were obtained for most of the tested RNAs.

A comparison of the K_D values for the interaction of RNA aptamers in complexes with raft and non-raft membranes indicated significant differences in the level of RNA-membrane affinity depending on the membrane phase. The K_D values were on average almost two times lower for the interactions of aptamers with raft liposomes compared to non-raft liposomes. The results of the K_D measurements for RNA-membrane complexes confirm that the membrane

state can regulate RNA membrane affinity. A general trend indicates that raft domains favour the interaction of the studied RNA aptamers with lipid molecules and may be a potential binding site for RNA molecules.

When tested with exosomes, the differences in the affinity of RNAs for exosome membranes appear to be similar to the differences in affinities obtained for the same RNAs in interactions with raft liposomes. The K_D values for the interaction of RNA with exosomes were characterized by a large scatter, therefore this part of the experiment could be repeated in the future.

For the K_D values of the RNA-raft membrane interaction obtained in the studies, analyses of the relationship between K_D variability and the presence of factors such as sequence motifs, structural motifs occurring in the expected folding, as well as RNA chain length, nucleotide composition and the free energy of folding. The analyses may suggest that:

- Some sequence motifs such as CCCU, GGAG or UCCC may promote RNA-membrane interaction. The motif-inserted mutants generally showed an increase in affinity compared to unmodified RNA.
- Although weak, the obtained correlation between the K_D value and the number of hairpins and the correlation between the K_D and the calculated parameter (that indicates the small hairpins), may suggest that the hairpin structural motif favours RNA-membrane affinity.
- The presence of a long single-stranded section at the end of the oligonucleotide molecule may diminish the interaction of the RNA aptamer with membrane rafts.
- It also appears that shortening the loops (deletions) and introducing the motif by substitution increases the affinities. Conversely the enlargement of the loop (insertion) even with the introduction of the motif, does not appear to increase the RNA-membrane affinity.

Based on the conducted research, the following conclusions were formulated:

1. RNA has the ability to directly interact with the region of lipid rafts, and the presence of raft domains in vesicle membranes favours the affinity of the tested RNA aptamers for membranes.
2. The level of interaction of RNA aptamers with the membrane can be influenced by certain nucleotide sequences (RNA motifs), and the influence of these motifs seems to be related to the occurrence of structural motifs.
3. The presence of secondary structure motifs may be important in regulating the level of RNA-membrane affinity. The presence of a hairpin motif (a small hairpin on a stable shaft) may favour RNA-membrane interactions, while the presence of a long single-stranded region at the end of the aptamer molecule probably does not favour RNA-membrane interactions.

In conclusion, the level of affinity of RNA aptamers to vesicle membranes seems to be the result of the coexistence of various factors, among these are the sequence motifs or structural motifs analysed in this work. In the future, it would be interesting to develop a more complex model that could more fully explain the variation in RNA-membrane affinity.

- CZĘŚĆ TEORETYCZNA -

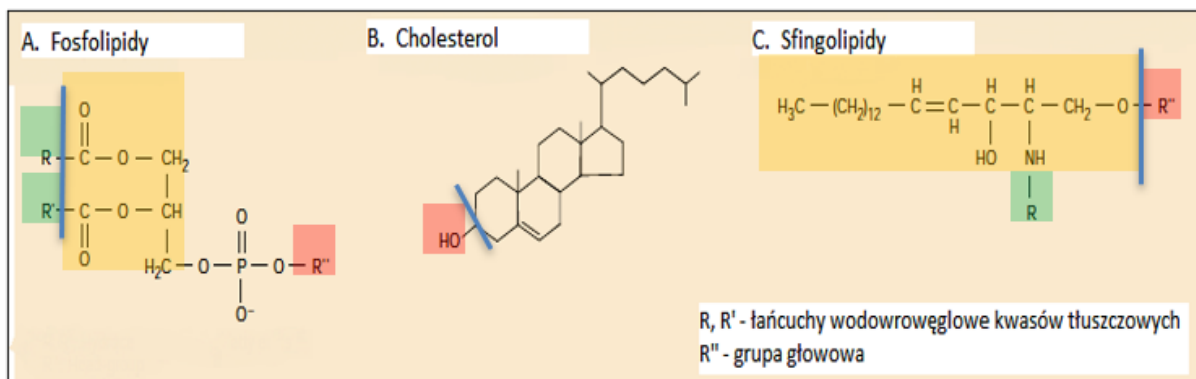
1. WSTĘP LITERATUROWY

1.1. BŁONY I TRATWY LIPIDOWE

Błony biologiczne są podstawowymi strukturami komórek wszystkich organizmów żywych. Błona komórkowa oddzielająca środowisko wewnętrzne komórki od otoczenia, występuje zarówno w komórkach prokariotycznych jak i eukariotycznych. U niektórych bakterii może ona tworzyć wypustki do wnętrza komórki, w celu zwiększenia „powierzchni oddechowej”, zaś u bakterii gram-ujemnych występuje po obu stronach ściany komórkowej. U eukariotów, poza błoną plazmatyczną na powierzchni, dodatkowo środowisko wewnętrzne komórki jest podzielone błonami śródkomórkowymi, otaczającymi organelle oraz system różnego rodzaju pęcherzyków.

1.1.1. Budowa błon komórkowych

Błony mają budowę lipidowo-białkową, lipidy błonowe tworzą podwójną warstwę, w której ulokowane są białka integralne i peryferyjne, jak również zakotwiczone są białka powierzchniowe. Lipidy błonowe są molekułami amfifilowymi, składającymi się z części hydrofilowej (tzw. główki) oraz regionu hydrofobowego. Do głównych lipidów błonowych można zaliczyć fosfolipidy, sfingolipidy i cholesterol (Rys. 1).



Rysunek 1. Struktura głównych lipidów błonowych.

Na rysunku część hydrofilową i hydrofobową oddzielono niebieską linią.

A. Fosfolipidy (glicerofosfolipidy): składają się rdzenia glicerolowego (zaznaczone na żółto), do którego, przez resztę fosforanową, może być dołączony np. aminokwas czy amina (zaznaczone na czerwono), co razem stanowi hydrofilową głowę. Z przeciwnej strony do glicerolu mogą dołączyć się reszty wyższych kwasów tłuszczowych (zaznaczone na zielono), tworząc hydrofobowy ogon. Glicerofosfolipidy mogą się różnić grupą głowową, typem połączenia łańcucha węglowodorowego do glicerolu, jak i długością czy stopniem nasycenia łańcucha kwasów tłuszczowych.

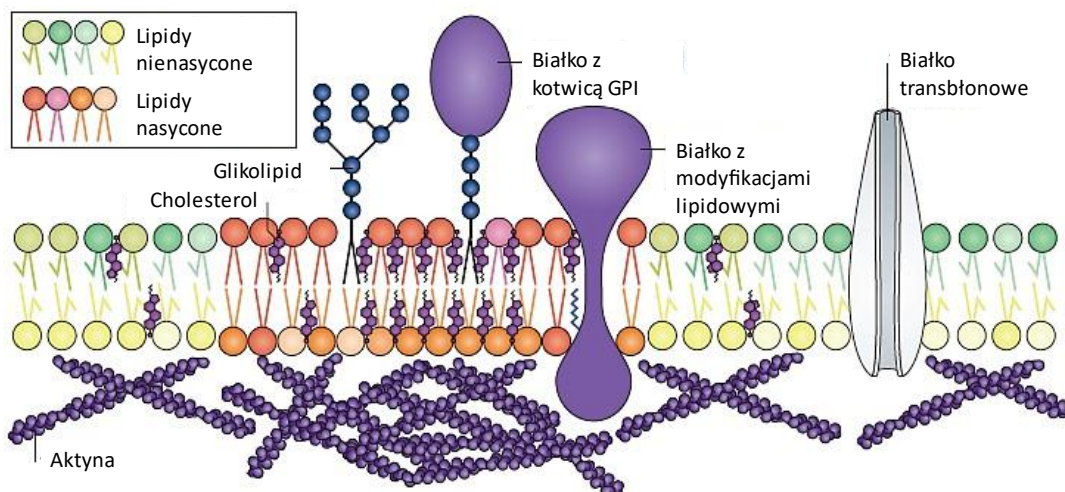
- B. Cholesterol: zbudowany jest z hydrofilowej główki, jest nią grupa hydroksylowa (czerwony) oraz części hydrofobowej, na którą składa się steran (węglowy szkielet złożony z czterech sprzężonych pierścieni) oraz niepolarny węglowodorowy ogon, którym cząsteczka ustawia się do wnętrza dwuwarstwy.
- C. Sfingolipidy: składają się ze sfingozynowego rdzenia (żółty), który jedną grupą hydroksylową może połączyć się z etanolaminą, seryną lub choliną, tworząc hydrofilową głowę (czerwony). Druga grupa hydroksylowa może połączyć się z kwasem tłuszczowym (zielony), tworząc w ten sposób ceramid – część hydrofobową sfingolipidu. Sfingolipidy mogą różnić się między sobą typem kręgosłupa ceramidowego oraz rodzajem kwasu tłuszczowego w hydrofobowym ogonie. Zmodyfikowano z [Simons i in., 2000].

W 1972 roku zaproponowany został model błony komórkowej jako płynnej mozaiki, który przedstawiał błonę komórkową jako nieuporządkowaną, dynamiczną strukturę z białkami błonowymi swobodnie unoszącymi się w dwuwarstwie lipidowej [Singer i Nicolson, 1972]. Szybko jednak zauważono nieprecyzyjność tego modelu, gdy w błonie ludzkich erytrocytów odkryte zostały odporne na detergenty kompleksy o wysokiej zawartości sfingolipidów i białek nieglikozylowanych [Yu i in., 1973]. Kompleksy te zostały później sklasyfikowane jako błony odporne na detergenty (DRM – ang. Detergent resistant membranes), w przeciwieństwie do błon rozpuszczalnych w detergentach (DSM – ang. Detergent soluble membranes) [London i in., 2000]. Na przestrzeni lat badacze dostarczali kolejnych argumentów za obecnością w błonie specyficznych frakcji wzbogaconych w sfingolipidy, cholesterol czy białka zakotwiczone przez GPI (glikozylofosfatydyloinozytol) [Varma i in., 1998; Friedrichson i in., 1998].

Aby wyjaśnić to zjawisko, w 1997 roku Kai Simons i Elina Ikonen przedstawili hipotezę tratw lipidowych (ang. lipid rafts), w której to zaproponowali występowanie w błonie specyficznych mikrodomen lipidowych z selektywnie włączonymi do nich białkami [Simons i Ikonen 1997]. W 2006 roku na sympozjum w Keystone (USA) zaproponowano następującą definicję tratw lipidowych: „Tratwy błonowe są to małe (10–200 nm), heterogeniczne, wysoce dynamiczne, wzbogacone w sterole i sfingolipidy domeny, które przedzielają procesy komórkowe” [Pike 2006].

Początkowo obecność tratw postulowana była jedynie w błonach komórkowych. Jednak z czasem domeny te odkryto również w błonach organelli wewnątrzkomórkowych takich jak aparat Golgiego, retikulum endoplazmatyczne czy wczesne endosomy [Hullin-Matsudaa i in., 2007; Sobo i in., 2007; Wang i in., 2020]. Występowanie tratw potwierdzono również w komórkach zwierzęcych [Varma i in., 1998] i drożdżach [Bagnat i in., 2000], natomiast w komórkach roślinnych odkryto biochemiczny odpowiednik tratw lipidowych [Mongrand i in., 2004].

Domeny tratwowe (Rys. 2) w porównaniu do reszty błony, charakteryzują się gęściej upakowanymi lipidami ze zwiększoną ilością cholesterolu i glikolipidów. Cholesterol jest obecny zarówno w tratwowej (uporządkowanej) jak i nie-tratwowej frakcji błony, przy czym obszary uporządkowane zawierają go więcej, powyżej 40 % [Kaiser i in., 2009]. Łańcuchy kwasów tłuszczowych lipidów wchodzących w skład tratw są dłuższe i bardziej nasycone, domeny te zawierają również zagęszczone niektóre białka błonowe i są mniej płynne w danej temperaturze, w porównaniu z błonami nie-tratwowymi.



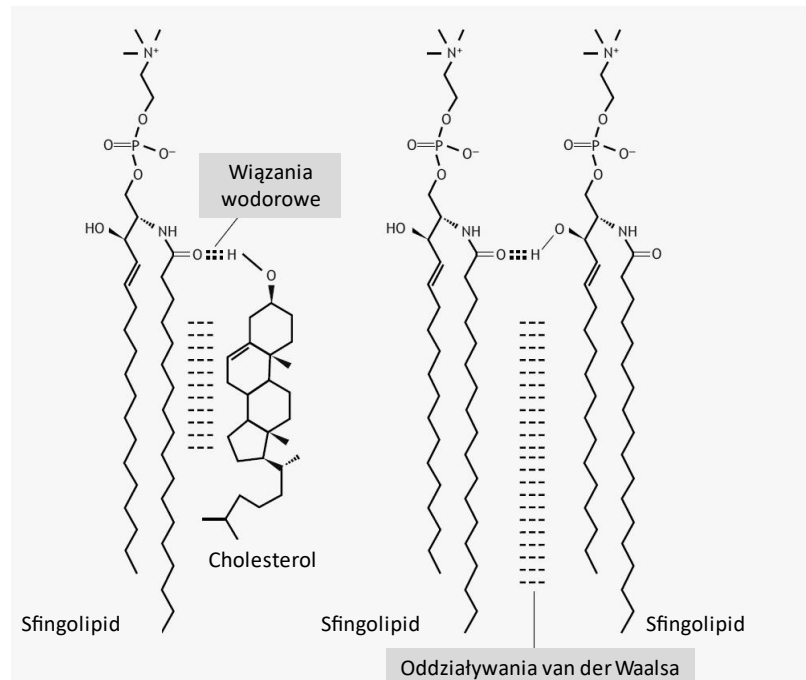
Rysunek 2. Schemat błony plazmatycznej z obszarem tratw lipidowych.

Zmodyfikowano z [Sezgin i in., 2017].

Domeny tratwowe zostały znalezione zarówno w wewnętrznej, jak i zewnętrznej warstwie błony [Kiessling i in., 2009]. Warstwa zewnątrzkomórkowa może zawierać głównie sfingolipidy z nasyconymi łańcuchami węglowodorowymi z cząsteczkami cholesterolu znajdującymi się pomiędzy nimi, natomiast warstwa cytoplazmatyczna, oprócz wzbogacenia w cholesterol, zawiera fosfolipidy z nasyconymi kwasami tłuszczowymi [Simons i in., 2000]. Charakterystyczny skład zewnętrznych i wewnętrznych warstw błony sugeruje, że tratwy mogą być strukturami dwuwarstwowymi [Pike 2003].

Istnieją różne doniesienia dotyczące powierzchni błony zajmowanej przez tratwy. Na podstawie składu frakcji po ekstrakcji detergentem zasugerowano, że większa część błony plazmatycznej znajduje się w frakcji tratwowej [Hao i in., 2001]. Dane uzyskane za pomocą mikroskopii obrazowania czasu życia fluorescencji (FLIM ang. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) wykazały, że frakcja uporządkowana może zajmować do 76% powierzchni błony [Owen i in., 2012]. Z kolei dzięki wykorzystaniu mikroskopowej techniki śledzenia pojedynczego barwnika SDT (ang. Single dye tracing) oszacowano, że powierzchnia tratwy pokrywa 13% powierzchni błony [Schutz i in., 2000].

W tworzeniu tratw kluczową rolę odgrywają oddziaływania między łańcuchami nasyconych kwasów tłuszczowych sfingolipidów a cholesterolem (Rysunek 3.) [Simons i Ikonen 1997; Dietrich i in., 2001; Hirano i in., 2022]. Interakcje te są wystarczające do utworzenia frakcji ciekło-uporządkowanej w błonach modelowych, jednak w warunkach fizjologicznych w tworzenie tratw lipidowych zaangażowane są również oddziaływania między lipidami i białkami wchodzącymi w skład błony biologicznej [Kaiser i in., 2009]. W kształtowaniu domen tratwowych, wskazuje się również na znaczenie oddziaływań gangliozydów z cholesterolem [Harder i in., 1998]. Interakcje między gangliozydem GM1, cholesterolem i fosfosfingomieliną prowadzą do powstawania domen wzbogaconych w cholesterol w błonach modelowych [Lozano i in., 2016]. Inne badania wskazują także na udział oddziaływań hydrofobowych między lipidami o różnym stopniu nasycenia łańcucha węglowodorowego [Heberle i in., 2013].



Rysunek 3. Przykład interakcji lipid – lipid w tworzeniu domen tratwowych.

Na rysunku przedstawione jest wiązanie wodorowe oraz oddziaływania van der Waalsa między sfingolipidem a cholesterolem oraz sąsiadującymi sfingolipidami. Zmodyfikowano z [Sapoń i in., 2023].

1.1.2. Funkcje tratw lipidowych

Specyficzne właściwości domen tratwowych pozwalają im na segregację cząsteczek oddziałujących z błoną w zależności od ich powinowactwa do tratw. Białka palmitoilowane, białka transbłonowe z motywem wiążącym cholesterol czy białka ulokowane w błonie poprzez kotwicę GPI mogą być „wychwytywane” przez tratwy dzięki ich powinowactwu do tych domen. Tratwy mogą również oddziaływać z włóknami aktynowymi cytoszkieletu [Sezgin i in., 2017]. Niektóre białka, takie jak kaweolina, mają zdolność bezpośredniego wiązania się z cholesterolem, zaś białko p24 (należące do kompleksu białkowego COPI) może bezpośrednio oddziaływać ze sfingomielinom, co sprzyja lokalizacji tych białek w obszarach tratwowych [Contreras i in., 2012].

Obszary tratwowe są platformami regulującymi aktywność cząsteczek, które stykają się z błonami biologicznymi w licznych procesach komórkowych. Domeny te zaangażowane są m.in. w takie procesy jak:

- (1) Transport błonowy – tratwy są zaangażowane w segregację molekuł błonowych. Biorą udział w sortowaniu cząsteczek w celu załadowania ich do pęcherzyków, pośredniczą również w tworzeniu, zakotwiczeniu i fuzji pęcherzyków z błoną docelową.
- (2) Sygnalizacja komórkowa – tratwy biorą udział w aktywowaniu receptorów, wpływając w ten sposób na przewodzenie sygnałów w komórkach.

(3) Metabolizm komórki i migracja – do tratw wiążą się różne błonowe molekuly (cytokiny, receptory czynników wzrostu czy receptory śmierci). Tratwy biorą również udział w regulacji cytoszkieletu.

(4) Rozwój chorób i inwazja patogenów – domeny tratwowe odgrywają rolę w wielu procesach patologicznych, w tym w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych i nowotworowych. Mogą być również wykorzystywane do infekcji komórek przez niektóre wirusy.

W ostatnich latach dużą uwagę zwrócono na rolę tratw lipidowych w cyklu życiowym wirusów ze względu na pojawienie się koronawirusa SARS-CoV-2 (koronawirus zespołu ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej) wywołującego chorobę koronawirusową (COVID-19). Wskazuje się, że tratwy lipidowe są regionami, w których dochodzi do infekcji komórek gospodarza przez wirus SARS-CoV-2 [Li i in., 2021; Sorice i in., 2021]. Postuluje się również, że domeny tratwowe są potencjalnym celem terapeutycznym w leczeniu infekcji koronawirusem [Fecchi i in., 2020; Sviridov i in., 2020].

1.1.3. Metody badania tratw i błony modelowe

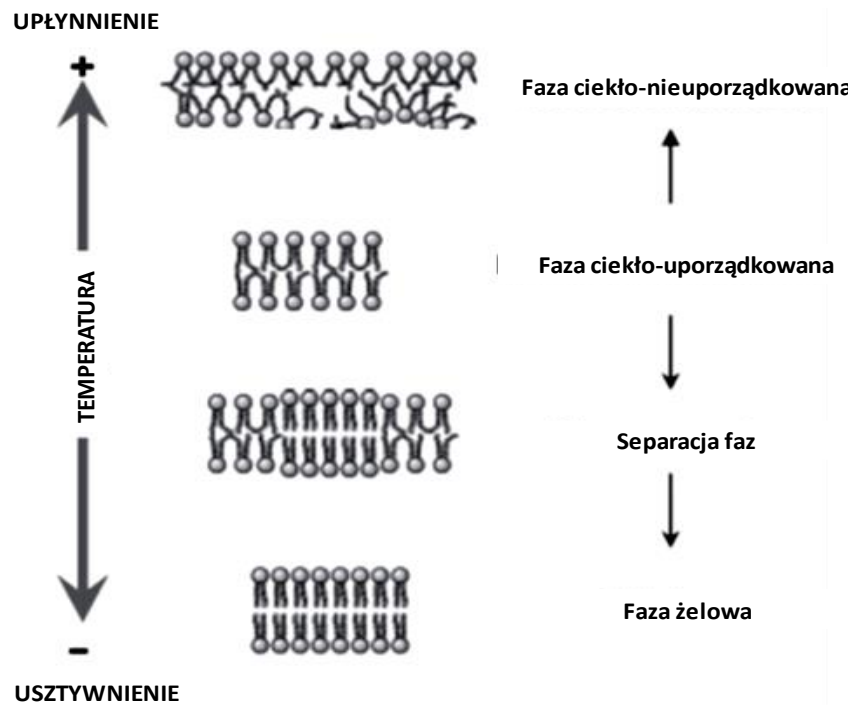
Precyzyjne badania obszarów tratw w błonach żywych komórek są trudne ze względu na małe rozmiary tych domen oraz ich dynamikę. Z tego powodu, początkowo, techniki mikroskopowe nie były w stanie potwierdzić obecności tych domen w błonach biologicznych i istniały wątpliwości co do faktycznego istnienia regionów tratwowych w błonach *in vivo*.

Jak wspomniano wcześniej, pierwszą metodą badania tratw była ekstrakcja komórek przy użyciu niejonowych detergentów, takich jak Triton X-100 w niskiej temperaturze [Yu i in., 1973; Brown i in. 1992]. Prowadziło to do rozdzielenia błon na dwie frakcje: błony odporne na detergenty (DRM) i błony rozpuszczalne w detergentach (DSM). Dalsze badania zidentyfikowały pewne wady tej metody (np. różnice w składzie domen w zależności od rodzaju użytego detergentu) i zdano sobie sprawę, że DRM nie są równoważne tratwom lipidowym [Schuck i in., 2003; Lichtenberg i in., 2005].

Wielkość tratw (do 200 nm) sprawia, że nie można ich zaobserwować standardowymi metodami mikroskopii optycznej, ze względu na granicę dyfrakcji mikroskopii świetlnej. Jednak nowe techniki wysokiej rozdzielczości umożliwiają pokonanie tego ograniczenia i obserwację błon w wyższej rozdzielczości. Jedną z takich technik jest Mikroskopia wymuszonego wygaszania emisji (STED ang. STimulated Emission Depletion), która została wykorzystana do wykrywania pojedynczych cząsteczek lipidów w nanometrowych obszarach błony komórkowej żywej komórki. Metoda ta pozwoliła na badanie pojedynczych punktów błony 70 razy poniżej bariery dyfrakcyjnej i wykazała, że sfingolipidy i białka zakotwiczone przez GPI, w przeciwieństwie do fosfoglicerolipidów, są czasowo (10-20 ms, milisekund) uwięzione przez cholesterol w kompleksach molekularnych o średnicy 20 nm [Eggeling i in., 2009].

Do badań tratw lipidowych wykorzystuje się również modele błon. Mieszanina lipidów o nienasyconych łańcuchach kwasów tłuszczowych, nienasyconych fosfolipidów oraz cholesterolu, w zależności od proporcji lipidów i temperatury może przyjmować różne stany płynności. W temperaturach zbliżonych do fizjologicznych można wyróżnić cztery główne stany błony charakteryzujące się wzrastającym stanem uporządkowania [Veatch i in., 2003; Janas i in., 2006]:

- (1) Faza ciekło-nieuporządkowana ($L\alpha$, Ld ang. Liquid disordered), najbardziej płynna frakcja zawierająca głównie nienasycone lipidy.
- (2) Faza ciekło-uporządkowana (L_o , ang. Liquid-ordered), lipidy są w niej bardziej uporządkowane i wzbogacone lipidami nasyconymi i cholesterolem. Frakcja ta została uznana za model tratw lipidowych.
- (3) Faza żelowa uporządkowana pomarszczona ($P\beta$ ang. Ripple gel), stanowiąca frakcję pośrednią.
- (4) Faza żelowa ($L\beta$ ang. Lamellar gel state), jest najbardziej uporządkowana.



Rysunek 4. Fazy bony lipidowej

Zmodyfikowano z [Los 2009]

Wraz ze spadkiem temperatury wzrasta uporządkowanie błony, zaś dodatek cholesterolu sprzyja przechodzeniu błon zarówno z fazy żelowej jak i z ciekłej do fazy ciekło-uporządkowanej. Liposomy będące mieszaniną trzech lipidów (lipidu nasyconego, nienasyconego oraz cholesterolu) wykazują separację faz i mogą być wykorzystywane jako modele błon z separacją faz takich jak tratwy lipidowe [Janas i in., 2006]. Wykorzystanie modeli błonowych oczywiście nie oddaje w pełni ich złożoności fizjologicznej, jednak jest bardzo pomocne w badaniu właściwości błon.

1.2. EGZOSOMY

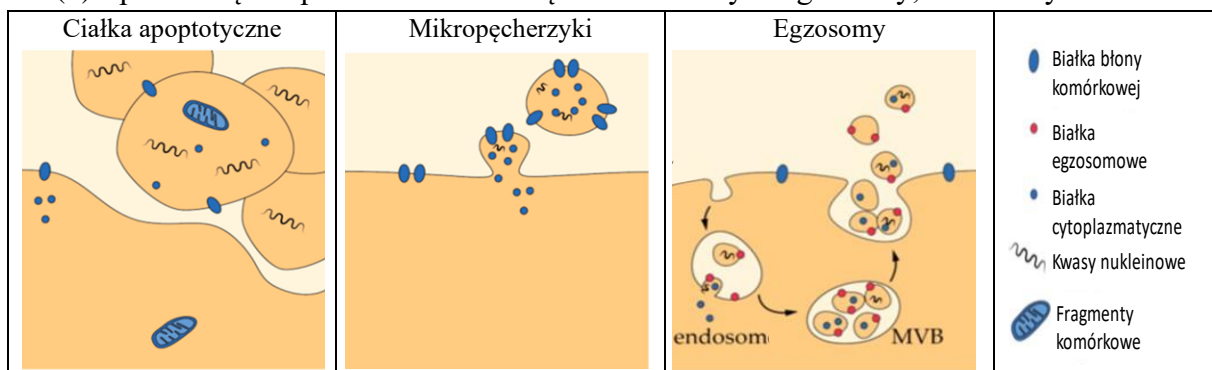
W świecie organizmów żywych wytwarzanie składających się z dwuwarstwy lipidowej pęcherzyków błonowych, jest wspólną cechą bakterii, archeonów i eukariontów, jednak w zależności od grupy organizmów, skład oraz mechanizm tworzenia tych pęcherzyków wykazuje pewne różnice. Bakterie i archeony wytwarzają pęcherzyki na powierzchni błony komórkowej, podczas gdy w przypadku eukariontów pęcherzyki lipidowe mogą być wydzielane zarówno z błony komórkowej, jak przez system błon wewnętrznych [Deatherage i in., 2012]. Komórki eukariotyczne wytwarzają całą gamę pęcherzyków, takich jak pęcherzyki transportujące, które przenoszą substancje między organellami, pęcherzyki endocytotyczne pączkujące z błony komórkowej do wnętrza komórki, jak i pęcherzyki pączkujące z błon wewnętrznych i wydzielane na zewnątrz komórki, czyli pęcherzyki egzocytotyczne. Do tych ostatnich zaliczyć można pęcherzyki synaptyczne i zewnątrzkomórkowe pęcherzyki błonowe, wśród których z kolei wyróżnić można egzosomy. Badania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych skoncentrowane są głównie na pęcherzykach ssaczych, przeważnie pochodzących od człowieka lub myszy, przy czym wydaje się, że są one produkowane przez prawie wszystkie badane organizmy i typy komórek [Théry i in., 2018].

1.2.1. Egzosomy i inne zewnątrzkomórkowe pęcherzyki błonowe

Kiedy w 1967r. brytyjski lekarz Peter Wolf opisał występujące w ludzkiej krwi małe struktury wytwarzane przez płytki krwi, przejawiające działanie prokoagulacyjne [Wolf, 1967] zainicjowało to wzmożone zainteresowanie naukowców tymi nanometrowej wielkości pęcherzykami, nazwanymi później zewnątrzkomórkowymi pęcherzykami błonowymi (EVs – ang. Extracellular Vesicles) [György i in., 2001].

W ludzkim organizmie większość komórek uwalnia te pęcherzyki i można je wykryć w większości płynów ustrojowych [Coumans i in., 2017]. Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki błonowe najczęściej dzieli się na trzy klasy (Rysunek 5.):

- (1) największe, to ciała apoptotyczne (apoptyczne), o średnicy 500-1000 nm, wydzielane przez komórkę podczas apoptozy,
- (2) mikropęcherzyki błonowe (MV – ang. microvesicles) to pęcherzyki o średnicy 50-1500 nm, utworzone przez pączkowanie błony plazmatycznej,
- (3) i pochodzące z przedziałów wewnątrzkomórkowych egzosomy, o średnicy 40-100 nm.

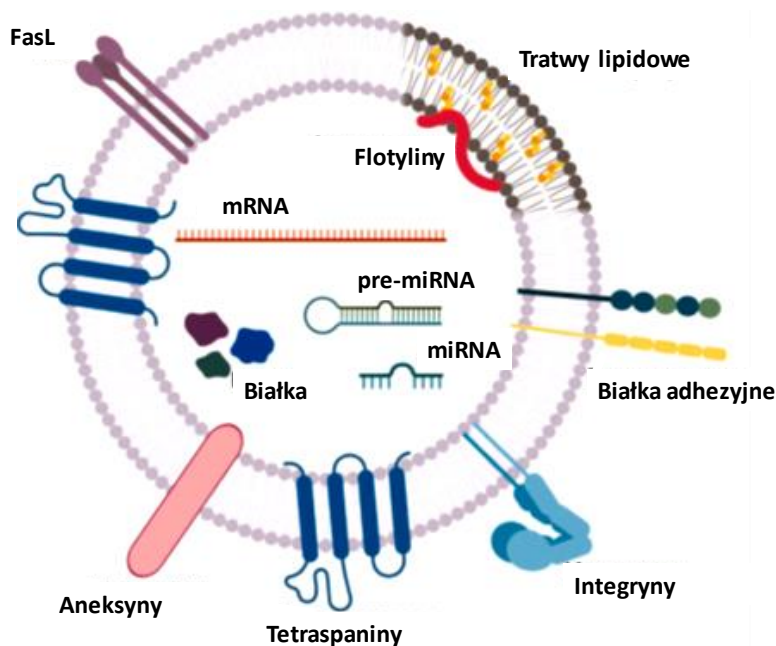


Rysunek 5. Klasy zewnątrzkomórkowych pęcherzyków błonowych.

Zmodyfikowano [Pollet i in., 2018]

1.2.2. Budowa egzosomów

Egzosomy zbudowane są z dwuwarstwy lipidowej i białek błonowych (Rysunek 6.) Chociaż obserwuje się zróżnicowanie składu lipidów między populacjami egzosomów, wykazano pewną specyficzność składu błon egzosomów w porównaniu z błoną plazmatyczną. Błona egzosomów zawiera mniej strukturalnych lipidów błonowych, takich jak fosfatydyloglicerole, fosfatydyloinozytyle czy fosfatydyloetanolaminy [Haraszi i in., 2016], wzbogacona zaś jest w cholesterol, sfingomielinę, fosfatydyloserynę i glikosfingolipidy (np. ceramid) [Trajkovic i in., 2008]. Taki skład lipidowy może sprzyjać powstawaniu tratw lipidowych w błonach egzosomów [de Gassart i in., 2003]. Sugeruje się również, że w odróżnieniu od błon plazmatycznych, błona egzosomalna nie wykazuje asymetryczności pod względem składu fosfolipidów w zewnętrznej i wewnętrznej warstwie [Sakai-Kato i in., 2020].



Rysunek 6. Schemat budowy egzosomu.

Przedstawione na rysunku białka błonowe to: FasL – białko transbłonowe należące do cytokin; oddziałując z receptorem Fas w błonie komórek docelowych może indukować apoptozę, brać udział w immunoregulacji i progresji nowotworów. Flotyliny – tworzą oligomery w cytoplazmatycznej warstwie błony; oddziałując z innymi białkami ułatwiają ich akumulację w obrębie tratw błonowych. Białka adhezyjne – pośredniczą w procesie wiązania egzosomów do powierzchni komórek docelowych. Integryny – są glikoproteinowymi receptorami transbłonowymi; uczestniczą w migracji i agregacji pęcherzyków. Tetrspaniny – składają się z czterech hydrofobowych domen transbłonowych, dwóch pętli zewnątrzkomórkowych oraz pętli wewnątrzkomórkowej; pośredniczą w transdukcji sygnału, adhezji komórek i przerzutach nowotworów. Aneksyny – białka wiążące jony wapniowe; biorą udział w procesach endo- i egzocytocy. Zmodyfikowano z [Skryabin i in., 2020].

Błony egzosomów zawierają białka zarówno powierzchniowe jak i transbłonowe, ze wzbogaceniem w stosunku do błon komórek w tetraspaniny (CD63, CD81), białka towarzyszące, takie jak integryny, immunoglobuliny i receptory czynników wzrostu, jak również białka kompleksu ESCRT, białka szoku cieplnego i białka zaangażowane w transport pęcherzyków [Villarroya-Beltri i in., 2014]. Z kolei wewnątrz pęcherzyków mogą być transportowane

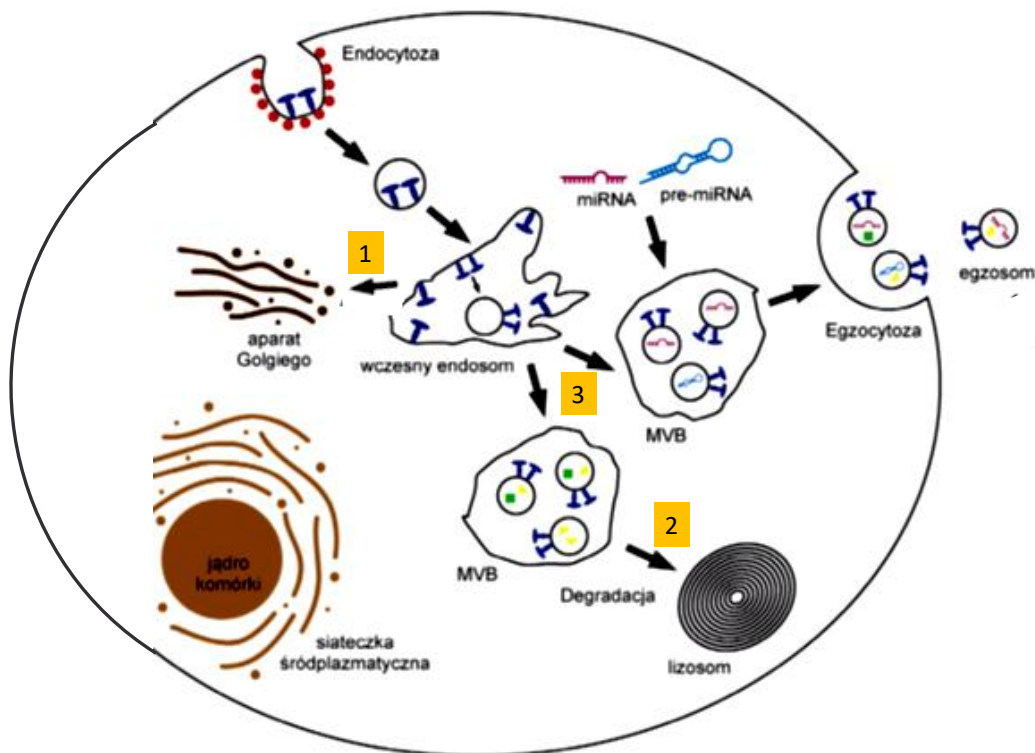
zróżnicowane ładunki (ang. cargo) takie jak: białka, różne rodzaje kwasów nukleinowych, a także lipidy [Xu i in., 2016].

1.2.3. Formowanie i biodystrybucja egzosomów

Właśnie biogeneza jest tym, co odróżnia egzosomy od innych zewnątrzkomórkowych pęcherzyków błonowych. W odróżnieniu do mikropęcherzyków czy ciałek apoptotycznych, egzosomy nie są bezpośrednio wydzielane z błony plazmatycznej komórki rodzicielskiej ale tworzone są w wewnątrzkomórkowym systemie pęcherzyków błonowych, a następnie uwalniane poza komórkę [Skryabin i in., 2020]. Mianem „*egzosomy*” zasadniczo nazywa się pęcherzyki uwolnione z komórki do przestrzeni międzykomórkowej, zaś do tego czasu nazywa się je „*pęcherzykami intraluminarnymi*” (ILVs – ang. intraluminal vesicles) [Ha i in., 2016].

1.2.3.1. Powstawanie pęcherzyków intraluminarnych

Dzięki wpukleniu błony komórkowej w procesie endocytozy powstaje wczesny endosom (Rysunek 7.), którego dojrzewanie może przebiegać w kilku kierunkach: (1) Może być on przetransportowany do sieci trans aparatu Golgiego (TGN – ang. Trans-Golgi Network), (2) skierowany do lizosomów w celu degradacji lub też (3) przekształcony w ciało wielopęcherzykowe (MVB – ang. multivesicular body) [Janas i in., 2015].



Rysunek 7. Formowanie, wydzielanie i pobieranie egzosomów.

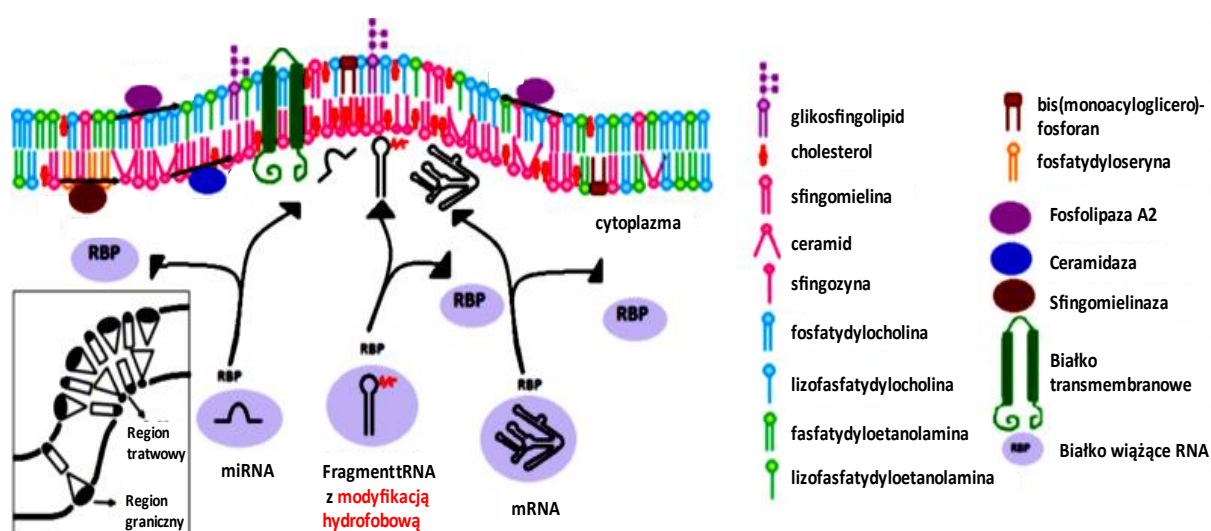
Numerami oznaczono możliwe scenariusze dojrzewania wczesnego endosomu: (1) skierowanie do sieci trans aparatu Golgiego, (2) transport do lizosomów, (3) przekształcenie w ciało wielopęcherzykowe. Zmodyfikowano z [Wesołowska i in., 2017]

Pączkowanie do wewnątrz, błony ciałek wielopęcherzykowych (MVB) powoduje wytworzenie pęcherzyków intraluminarnych. Pęcherzyki ILV mogą być formowane zasadniczo

dwiema drogami: zależnie lub niezależnie od kompleksu białkowego ESCRT (ang. Endosomal Sorting Complex Required For Transport) [Rajagopal i in., 2018].

W przypadku formowania pęcherzyków zależnego od ESCRT, białka tego kompleksu rozpoznają ubikwitynowane białka błonowe i promują ich wprowadzanie do wnętrza MVB. Można tu wyróżnić kilka etapów: (1) białka ESCRT-0 – dołączają do endosomu ubikwitynowane białka, (2) białka ESCRT-1 – stanowią pomost między białkami ESCRT 0 a 2, (3) kompleks białkowy ESCRT-2 – indukuje pączkowanie błony MVB do wewnątrz, (4) białka ESCRT-3 – rekrutują inne białka w czasie formowania endosomu i podziału pęcherzyków [Darband i in., 2018].

W szlaku formowania pęcherzyków niezależnym od ESCRT (Rysunek 8.), podkreśla się znaczenie regionów tratw lipidowych w błonie ciałek wielopęcherzykowych, które stanowią centra generowania pęcherzyków intraluminarnych [Tan i in., 2013]. Mechanizm ten obejmuje utworzenie regionu tratw w cytoplazmatycznej warstwie błony MVB, co związane jest z działalnością enzymu neutralnej sfingomielinazy białkowej 2 (ang. nsMase 2), która to wiąże się z błoną MVB od strony cytoplazmatycznej i katalizuje rozkład sfingomieliny na fosfocholiny i ceramid [Börtlein i in., 2019]. Cząsteczki ceramidu oddziałując ze sobą poprzez wiązania wodorowe, indukują powstawanie obszarów tratw, które mogą następnie łączyć się w większe domeny błonowe. Stożkowy kształt cząsteczek ceramidu w obszarze tratw po cytoplazmatycznej stronie błony, w połączeniu cząsteczkami z lizofolipidów i glikosfingolipidów (w kształcie odwróconego stożka) w wewnętrznej warstwie błony, może indukować krzywiznę dwuwarstwy lipidowej i prowadzić do spontanicznego procesu pączkowania do wewnątrz regionu tratwowego błony MVB (ang. budding-in process), w wyniku czego tworzone są pęcherzyki intraluminarne [Trajkovic i in., 2008; Janas i in., 2015; Anand i in., 2019]. Tak więc domeny tratwowe mogą służyć jako platformy do pączkowania pęcherzyków ILV z błony ciałek wielopęcherzykowych.



Rysunek 8. Mechanizm pączkowania regionu tratwowego do wnętrza MVB

Zmodyfikowano z [Janas i in., 2015].

Sugeruje się, że obydwa mechanizmy zależny i niezależny od ESCRT mogą być aktywne w tworzeniu egzosomów, w zależności od ładunku i typu komórki [Wei i in., 2021]

1.2.3.2. Włączanie ładunku do egzosomów

Podobnie jak w procesie formowania ILV, tak jeśli chodzi o wprowadzanie ładunku do tych pęcherzyków proponuje się na mechanizmy sortowania zależne i niezależne od ESCRT [Villarroya-Beltri i in., 2014]. Proces ładowania cargo będzie się też różnił w zależności od tego jaki rodzaj ładunku jest wprowadzany do pęcherzyków. Jeśli chodzi o ładowanie białek wskazuje się na znaczenie ich ubikwitynacji czy fosforylacji [Zuccato i in., 2007], które służą jako sygnał do transportu białka do ciałek wielopęcherzykowych, który to transport kontrolowany jest przez kompleks ESCRT [Katzmann i in., 2002]. W przypadku wprowadzania do pęcherzyków kwasów nukleinowych, wydaje się, że egzosomalne RNA nie są ładowane w sposób losowy. Badania transportowanego przez egzosomy RNA wskazują, że zawartość egzosomalnego RNA różni się od jego zawartości w komórce rodzicielskiej [Pigati i in., 2010; Singh i in., 2015; Garcia-Martin i in., 2022], co sugeruje, że sortowanie RNA do egzosomów jest raczej selektywne. Jako czynniki wpływające na sortowanie RNA wskazuje się takie elementy jak: neutralna sfingomielinaza 2 (nSMaza2) [Kosaka i in., 2013], białko AGO2 [Guduric-Fuchs i in., 2012], białka wiążące RNA [Statello i in., 2018] czy addycje 3'-końcowe nukleotydów RNA [Koppers-Lalic, i in., 2014].

Sugeruje się również, że regiony tratw lipidowych w błonie MVB są zaangażowane w proces włączania RNA do egzosomów. Zaproponowano selektywny, mechanizm ładowania RNA do egzosomów, w którym pośredniczą lipidy [Janas i in., 2015]. W tym modelu (Rysunek 8.), wiązanie cząsteczki RNA do regionu tratwowego błony ciała wielopęcherzykowego następuje przed pączkowaniem błony MVB. RNA jest dostarczane na zewnętrzną (cytoplazmatyczną) powierzchnię błony MVB przez białka wiążące RNA (RBP – ang. RNA-binding proteins,) [Shurtleff i in., 2016; Lee i in., 2019; Fabbiano i in., 2020]. Sugeruje się, że może istnieć kilka różnych sposobów oddziaływania RNA z błoną MVB [Janas 2020]:

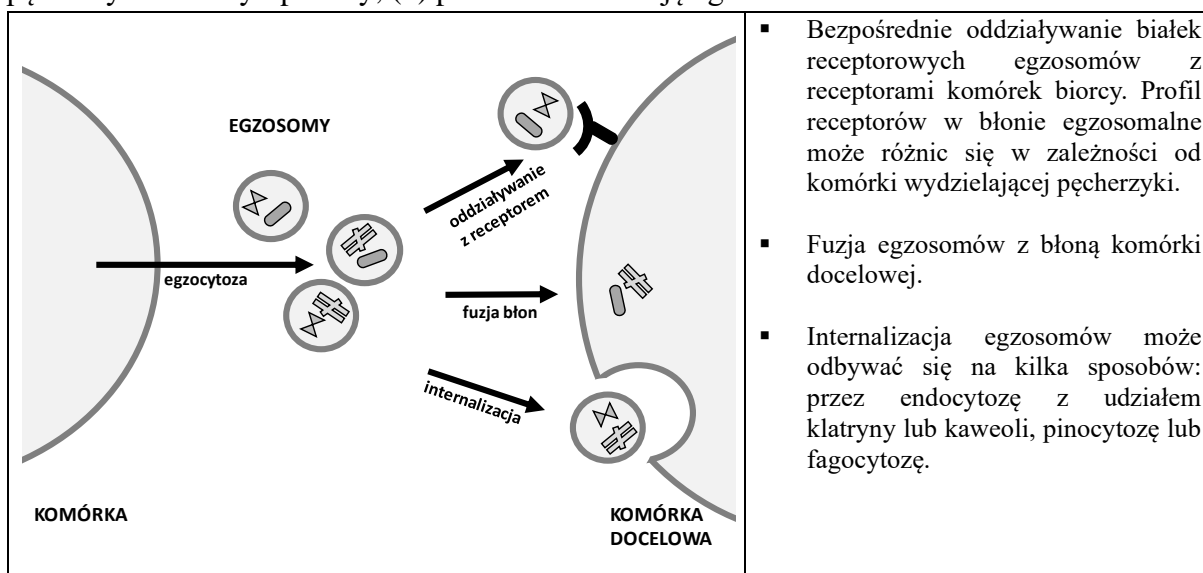
- (1) RNA może wiązać się bezpośrednio z regionem tratwy błonowej i oddzielić się od białka RBP,
- (2) RNA może wiązać się bezpośrednio z regionem tratw błony i pozostać związane z białkiem, lub
- (3) RNA może być przyłączone do powierzchni błony przez wiązanie białka niosącego RNA z regionem tratwowym.

Na oddziaływanie RNA z regionami tratw lipidowych może mieć również wpływ obecność specyficznych motywów nukleotydowych w sekwencji RNA, takich jak motywy egzosomalne [Villarroya-Beltri i in., 2013] czy motywy tratwowe [Janas i in., 2020] omówione szerzej w sekcji 1.3.3.

1.2.3.3. Interakcje egzosomów z komórkami docelowymi

Znajdując się nadal wewnątrz MVB, pęcherzyki intraluminarne z załadowanym cargo transportowane są w kierunku błony komórkowej z udziałem białek z rodziny RAB (ang. Ras-like proteins from rat brain). Po fuzji MVB z błoną komórkową ILV uwalniane są jako egzosomy do przestrzeni międzykomórkowej. Fuzja pęcherzyka MVB z błoną komórkową regulowana jest przez kompleks białkowy SNARE [Darband i in., 2018; Turchinovich i in., 2016].

Egzosomy, po wydostaniu się z komórki, są tymczasowo dostępne w przestrzeni międzykomórkowej i płynach ustrojowych zanim dotrą do komórek docelowych [Darband i in., 2018]. W wiązaniu się egzosomów z błonami komórkowymi komórek docelowych zaangażowane są białka adhezyjne takie jak integryny i białka ICAM (ang. IntraCellular Adhesion Molecule). Egzosomy mogą oddziaływać z komórkami docelowymi na kilka sposobów (Rysunek 9.): (1) Poprzez bezpośrednie oddziaływanie białek egzosomów z receptorami komórek biorcy, (2) przez fuzję egzosomów z błoną docelowej komórki, co prowadzi do uwolnienia zawartości pęcherzyków do cytoplazmy, (3) przez internalizację egzosomów



Rysunek 9. Możliwe interakcje egzosomów z komórkami docelowymi.

Schemat przygotowany na podstawie [Wesołowska i in., 2017]

1.2.4. Rola egzosomów w organizmie

Początkowo uważano, że zewnątrzkomórkowe pęcherzyki błonowe, do których zalicza się egzosomy, stanowią wyłącznie mechanizm służący do pozbywania się нефunkcyjnych składników komórkowych, które to po załadowaniu do wnętrza pęcherzyków są usuwane poza komórkę. Z czasem okazało się że ich rola jest bardziej znacząca, a pęcherzyki te zaangażowane są w szereg procesów fizjologicznych.

Bezpośrednią funkcją egzosomów jest transport molekuł powstających w komórce i ich ochrona przed działaniem czynników środowiska pozakomórkowego. Podobnie jak i inne zewnątrzkomórkowe pęcherzyki przenoszą zróżnicowane ładunki takie jak: białka, różne rodzaje RNA (mRNA, miRNA, lncRNA), DNA (mtDNA, ssDNA, dsDNA) i lipidy, które mogą być transportowane do specyficznego typu komórki i wymieniane między komórkami jako środek komunikacji międzykomórkowej [Xu i in., 2016]. Pęcherzyki te mogą transportować molekuly na krótkie lub długie dystanse w przestrzeniach zewnątrzkomórkowych i płynach ustrojowych pozostając stabilnymi jednostkami, co jest związane z ich specyficznym składem lipidowym. Obecność na powierzchni egzosomów rozmaitych cząsteczek adhezyjnych, takich jak integryny, tetraspaniny, cząsteczki MHC, pozwala tym pęcherzykom na interakcję z błonami komórek docelowych [Darband i in., 2018].

Pośrednio, dostarczając do miejsc docelowych rozmaite molekuly, egzozomy wpływają na wiele procesów w organizmie co związane jest właśnie z wpływem transportowanego przez nie ładunku. Przykłady wpływu transportowanego przez egzozomy cargo zebrano w tabeli poniżej.

Tabela 1. Rola egzozomów w zależności od przenoszonego ładunku.

Rodzaj ładunku	Rola
miRNA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Indukcja angiogenezy – egzozomy wydzielane przez komórki nowotworowe transportują miRNA, które moduluje mikrośrodowisko nowotworu, prowadząc do powstawania nowych naczyń krwionośnych. ▪ Powstawanie przerzutów – nowotworowe miRNA może być transportowane przez egzozomy na znaczne odległości, sprzyjając inwazji nowotworowej. ▪ Modułacja odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko nowotworowi – egzozomalne miRNA może wpływać na hamowanie syntezy białek odpowiedzialnych za działanie przeciwko komórkom nowotworowym.
mRNA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Transportowane przez egzozomy mRNA może pełnić funkcje regulatorowe w komórkach biorcy.
białka	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Egzozomy pośredniczą w międzykomórkowym transporcie białek odpowiedzialnych za prezentację antygenów drugiej klasy (MHCII). Komórki T zarówno otrzymują, jak i dostarczają informacje poprzez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. ▪ Transportowane w egzozomach białka biorą udział w komunikacji międzykomórkowej w układzie nerwowym. ▪ W przypadku chorób neurodegeneracyjnych, za pośrednictwem egzozomów, toksyczne białka mogą rozprzestrzeniać się do sąsiednich komórek nerwowych.

1.2.5. Wykorzystanie egzozomów terapii

W stanie homeostazy organizmu, poziom uwalnianych do różnych płynów ustrojowych egzozomów służy eliminacji resztek komórkowych, a także komunikacji międzykomórkowej. Zwiększona ilość lub skład egzozomów może wskazywać na zmiany normalnego stanu fizjologicznego [Maas i in., 2017; Rajagopal i in., 2018]. Stąd egzozomy mogą stanowić biomarkery stanów chorobowych. Ze względu na to, że pęcherzyki te są obecne praktycznie we wszystkich płynach ustrojowych, jest do nich stosunkowo łatwy dostęp. Egzozomy wykorzystywane są m.in. w diagnostyce takich chorób nowotworowych jak: gruczolak przewodowy trzustki, rak jamy ustnej, czy glejak wielopostaciowy [Xu i in., 2016; Liu i in., 2022], a także chorób ośrodkowego układu nerwowego [Fan i in., 2022]

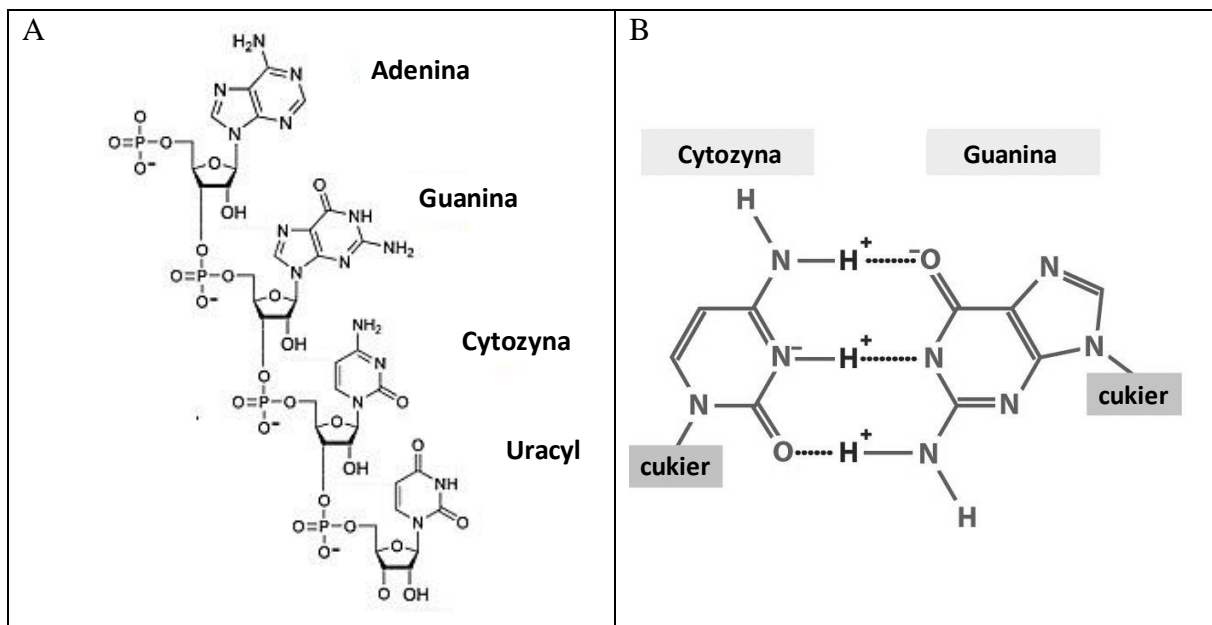
Dzięki zdolności do przenikania przez bariery tkankowe, także barierę krew-mózg, egzozomy mogą znaleźć również zastosowanie jako nośnik leków czy innych czynników terapeutycznych jak miRNA czy siRNA [Liu i in., 2015; Zhang i in., 2018]. Ich zastosowanie może umożliwić przezwycięzenie pewnych problemów terapii, takich jak np.: niespecyficzne dostarczanie czynnika terapeutycznego do tkanek lub komórek, pobudzanie immunogeniczności przez dostarczany lek lub jego nośniki (szczególnie w przypadku powtarzalnego dawkowania) czy ryzyko degradacji przez enzymy zewnątrzkomórkowe.

1.3. RNA

Kwas rybonukleinowy (RNA) stanowi istotny czynnik w funkcjonowaniu wszystkich organizmów żywych, łącznie z niektórymi wirusami. Jako że geny znajdują się w jądrze komórkowym, a synteza białek zachodzi w cytoplazmie, RNA pełni rolę „strukturalnego posłańca”, pośrednicząc między informacją zakodowaną na DNA, a wytwarzaniem białek, zaś poszczególne rodzaje RNA odgrywają unikalne role w regulacji tych procesów.

1.3.1. RNA w komórce

RNA jest polimerem zbudowanym z rybonukleotydów połączonych wiązaniami fosfodiastrowymi (między atomem 3' węgla jednego nukleotydu, a atomem 5'węgla sąsiedniego nukleotydu) (Rysunek 10.). Przy węglu 2' rybozy znajduje się grupa hydroksylowa (-OH) co odróżnia ten związek od cukru DNA – deoksyrybozy.



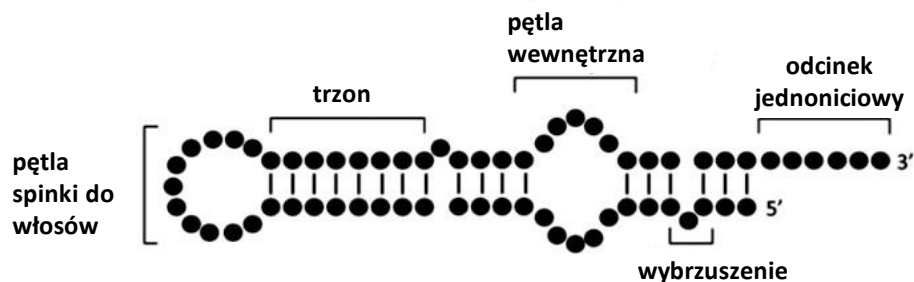
Rysunek 10. Budowa RNA

A. Schemat cząsteczki RNA zbudowanej z czterech nukleotydów (źródło: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/38/RNA_polinukleotido.PNG). B. Schemat wiązań wodorowych między cytozyną a guaniną. Zmodyfikowano z [Brown, 2009].

Cząsteczki RNA zwykle zbudowane są z pojedynczej nici (za wyjątkiem dwuniciowego RNA występującego u niektórych wirusów) o strukturze podobnej do struktury DNA typu A. Dzięki tworzeniu się wiązań wodorowych między parami zasad (Rysunek 10. B), a także innym czynnikiem (kationy metali dwuwartościowych, interakcje z białkami czy alternatywny splicing), łańcuch RNA może ulec sfaldowaniu. W wiązaniu wodorowym atom wodoru może stać się wspólny dla dwóch innych atomów. Donorem wodoru w komplementarnych zasadach RNA i DNA jest atom azotu, kowalencyjnie związany z atomem wodoru, zaś akceptorem wodoru jest tlen lub azot. Wiązanie między nukleotydami A z U oraz C z G czyli parami zasad Watson'a-Crick'a zwane jest parowaniem kanonicznymi, przy czym wiązania wodorowe mogą tworzyć się również między innymi parami np. G i U (parowanie niekanoniczne).

Utworzone przez pary zasad fragmenty dwuniciowe, jak również pozostałe fragmenty jednoniciowe aranżują sfałdowanie cząsteczki RNA (Rysunek 11). Do podstawowych motywów struktury drugorzędowej RNA można zaliczyć:

- (1) Trzon (ang. stem) – motyw dwuniciowej helisy utworzonej przez fragmenty nukleotydów o komplementarnych sekwencjach, sparowanych wiązaniami wodorowymi.
- (2) Wybrzuszenie (ang. bulge) – może powstać kiedy we fragmentach helikalnych RNA pojawi się jeden lub kilka niesparowanych nukleotydów.
- (3) Pętla wewnętrzna (ang. internal loops) – utworzona przez fragmenty nici o niesparowanych nukleotydach oskrzydłone fragmentami dwuniciowymi.
- (4) Pętla spinki do włosów (ang. hairpin loop) – zbudowana jest z pętli terminalnej (ang. apical loop) – kilkunukleotydowego fragmentu jednoniciowego łączącego dwa komplementarne fragmenty RNA. Do pętli zwykle przylega fragment dwuniciowy trzonu (ang. stem).
- (5) Jednoniciowe odcinki zawierające końce cząsteczki RNA, które mogą przyjmować czasem formę pętli końcowej (ang. external loop).



Rysunek 11. Schemat głównych motywów struktury drugorzędowej RNA.

Zmodyfikowano z [Flores i in., 2018]

1.3.2. Funkcje egzosomalnego RNA

RNA transportowane przez egzosomy odgrywa rolę zarówno w warunkach prawidłowego funkcjonowania organizmu jak i stanach chorobowych. Egzosomalne miRNA pośrednicząc w komunikacji międzykomórkowej, o krótkim jak i odległym zasięgu, może oddziaływać w różnych fizjologicznych i patologicznych procesach, poprzez wpływ na parakrynnie i endokrynnie szlaki [Turchinovich i in., 2016].

W warunkach fizjologicznych egzosomalne mRNA czy miRNA mogą służyć komunikacji komórkowej np. w synapsach immunologicznych czy komunikacji komórkowej układu sercowo-naczyniowego. Z kolei w przypadku wystąpienia choroby nowotworowej, egzosomalne miRNA mogą być dostarczane do komórek biorcy zarówno w mikrośrodowisku guza jak i być transportowane do odległych miejsc w organizmie, gdzie będą wpływały na regulację ekspresji docelowych genów, promowanie angiogenezy i przerzuty [Hu i in., 2020].

1.3.3. Motywy egzosomalne i tratwowe w RNA

Jak już wspomniano wcześniej, specyficzne motywy w sekwencji nukleotydowej RNA mogą mieć wpływ na regulację ładowania RNA do egzosomów. Na przestrzeni lat badacze izolowali RNA transportowane przez egzosomy aby analizując sekwencje tych egzosomalnych RNA, dowiedzieć się czy istnieją układy sekwencji nukleotydów, które mogą promować wprowadzanie RNA do egzosomów.

Właśnie takie krótkie sekwencje nukleotydowe w łańcuchu RNA, które występowały liczniej w egzosomalnym RNA w porównaniu z RNA komórkowym, nazwano motywami egzosomalnymi (ang. EXOmotifs) [Villarroya-Beltri i in., 2013]. W egzosomalnym RNA pochodzącym z różnych komórek badacze wykazali występowanie różnych motywów, których przykłady zebrano w tabeli poniżej.

Tabela 2. Przykłady motywów RNA oznaczonych w egzosomalnych RNA

Typ RNA	Motywy RNA	Materiał/ metoda	Odniesienie literaturowe
mRNA i lncRNA	ACCAGCCU, CAGUGAGC, UAAUCCCA	metody bioinformatyczne	Batagov i in., 2011
miRNA	GGAG, UGAG, CCCU, UCCU	egzosomy pochodzące z limfoblastów T	Villarroya-Beltri i in., 2013
miRNA	CCCG, CCCT	egzosomy pochodzące z zarażonych herpeswirusami komórek chłoniaka	Hoshina i in., 2016
miRNA	GGCU	egzosomy pochodzące z hepatocytów	Santangelo i in., 2016
lncRNA	UGUUUU, CCUCCC	egzosomy z komórek raka prostaty	Ahadi i in., 2016

W 2013 r. zespół Villarroya-Beltri zidentyfikował cztery krótkie motywy sekwencyjne (GGAG, UGAG, CCCU i UCCU) obecne w końcowym regionie sekwencji miRNA, które wskazano jako czynniki wspierające ładowanie RNA do egzosomów w ludzkich pierwotnych limfocytach T. Motywy te były rozpoznawane przez białko hnRNPA2B1, które wiązało się do miRNA i kontrolowało jego ładowanie do egzosomów [Villarroya-Beltri i in., 2013].

Zaproponowane zostały również tzw. motywy tratwowe (ang. raft-motifs) czyli motywy, które potencjalnie mogą promować wiązanie się RNA z regionem tratw lipidowych błon liposomalnych [Janas i in., 2020]. Po przeprowadzeniu selekcji oligonukleotydów RNA, które wykazywały najlepsze wiązanie z liposomami zawierającymi regiony tratw lipidowych, znaleziono czteronukleotydowe sekwencje: CCCU, UCCC, CUCC oraz UUGU. Sekwencje te były najczęściej pojawiającymi się motywami nukleotydowymi zarówno w wyselekcjonowanych aptamerach RNA jak i egzosomalnych miRNA, które przenoszone są w egzosomach z komórek nowotworowych do komórek odpornościowych [Janas i in., 2020].

1.3.4. Aptamery RNA

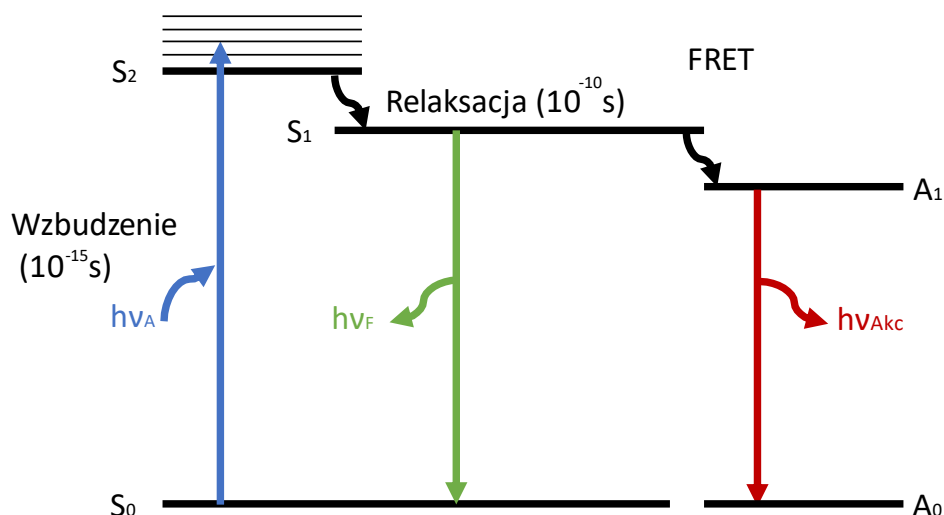
Aptamery RNA są to albo małe jednoniciowe oligonukleotydy, składające się z 20 do 100 nukleotydów. Są one selekcyjonowane na podstawie ścisłego wiązania się z określonymi celami molekularnymi. Aptamery RNA są generowane *in vitro* w procesie zwanym „systematyczną ewolucją ligandów w technologii wzbogacenia wykładniczego” (SELEX – ang. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). W metodzie tej pula losowych sekwencji RNA przechodzi szereg rund selekcji, dzięki czemu otrzymuje się sekwencje o wysokim powinowactwie do wybranej cząsteczki docelowej [Wang i in., 2020].

Stosunkowo niewielki rozmiar aptamerów (przeciętny aptamer jest około 10 do 15 razy mniejszy niż przeciwciało monoklonalne) stanowi zaletę wykorzystania tych oligonukleotydów zarówno w celach diagnostycznych, jak i terapeutycznych. Jeśli chodzi o diagnostykę kliniczną zastosowania aptamerów może zapewnić korzyści, takie jak wysoka specyficzność i selektywność, łatwość syntezy oraz stosunkowo niskie koszty produkcji w porównaniu z przeciwciałami wytwarzanymi z surowicy zwierzęcej [Lin i in., 2021]. Aptamery wiążące się do białek błony komórkowej mogą być internalizowane do komórek i służyć jako nośniki leków, które charakteryzują się niską immunogennością, mniejszymi rozmiarami niż przeciwciała i zdolnością adaptacji do produkcji chemicznej [Tanaka i in., 2021].

1.4. SPEKTROSKOPIA FLUORESCENCYJNA

Metody spektroskopii fluorescencyjnej znajdują szerokie zastosowanie w badaniach biologicznych [Lichtman i in., 2005; Algar i in., 2019]. Wykorzystując specyficzne sondy fluorescencyjne, które wiążą się selektywnie z danymi celami molekularnymi, możliwe jest obrazowanie struktur komórkowych, monitorowanie oddziaływań między białkami wewnątrz komórek, czy też molekuł oddziałujących z błonami biologicznymi. Cząsteczki sond fluorescencyjnych zawierają fluorofory (zwykle złożone z pierścieni aromatycznych), które mają zdolność absorpcji energii i jej emisji przy charakterystycznej długości fali.

Podczas naświetlania sondy fluorescencyjnej oddziaływanie fotonów z molekułami fluoroforu powoduje absorpcję kwantu energii poprzez fluorofor i wzbudzenie elektronów walencyjnych fluoroforu ze stanu podstawowego (S_0) do wyższych poziomów energetycznych S_1 lub S_2). Obraz względnego rozmieszczenia poziomów energii elektronów cząsteczki fluoroforu przedstawia diagram Jabłońskiego na rysunku 12. Wzbudzone elektrony nie pozostają w takim stanie zbyt długo, lecz spontanicznie powracają do bardziej stabilnego stanu podstawowego (S_0). Niektóre wzbudzone molekuly powracają do stanu podstawowego emitując nadmiar energii w postaci fluorescencji. Jeśli w układzie znajdzie się drugi fluorofor, część energii emisji może być przekazana na tę drugą sondę (może zajść zjawisko FRET).



Rysunek 12. Diagram Jabłońskiego z rezonansowym przeniesieniem energii Förstera (FRET).

Skróty używane na rysunku oznaczają: S₀ – stan podstawowy fluoroforu; S₁ i S₂ – Stany wzbudzone fluoroforu; hv_A – energia wzbudzenia absorbowana przez fluorofor; hv_F – energia fluorescencji fluoroforu; hv_{Akc} – energia fluorescencji akceptora; FRET - przeniesienie energii z jednego fluoroforu na drugi (akceptor); A₁ – stan wzbudzony akceptora; A₀ – stan podstawowy akceptora. Schemat przygotowano na podstawie [Lakowicz, 2006].

Zjawisko rezonansowego przeniesienia energii wzbudzenia fluorescencji (FRET ang. Förster Resonance Energy Transfer) między dwoma sondami zachodzi, kiedy widmo emisji jednej sondy (donora), pokrywa się z widmem wzbudzenia drugiej sondy (akceptora), a odległość między nimi nie jest większa niż 10 nm. Dzięki zjawisku FRET możliwe jest badanie poziomu oddziaływania między molekułami z dołączonymi do nich sondami fluorescencyjnymi. Dane literaturowe wskazują, że pomiary fluorescencyjne oparte o zjawisko FRET mogą być wykorzystywane do badań oddziaływania cząsteczek RNA z błonami lipidowymi [Kamat i in., 2015; Lin i in., 2017; Janas i in., 2020; Janas i in., 2021].

- BADANIA WŁASNE -

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Transport molekuł za pośrednictwem egzosomów jest istotnym procesem w komunikacji międzykomórkowej. Z kolei idea zaangażowania egzosomów jako naturalnych nośników czynników terapeutycznych (np. miRNA) stanowi atrakcyjną perspektywę w wykorzystaniu ich w terapii. Pojawiające się na przestrzeni lat propozycje opisu ładowania RNA do egzosomów, wciąż nie wyjaśniają w satysfakcjonujący sposób mechanizmu tego procesu. Istnieją dwie główne hipotezy co do tego, w jaki sposób RNA wprowadzane jest do egzosomów:

- (1) Według pierwszej, ładowanie RNA zachodzi poprzez oddziaływanie między kompleksem białek wiążących RNA (wraz z przyłączonym do niego RNA), a błoną ciałek wielopęcherzykowych.
- (2) Według drugiej hipotezy, wprowadzanie RNA do egzosomów, może odbywać się przez bezpośrednią interakcję pomiędzy cząsteczką RNA, a regionem tratw lipidowych błony ciałek wielopęcherzykowych.

Odnosząc się do tej drugiej hipotezy, sugeruje się, że selektywne wiązanie RNA z błoną ciałek wielopęcherzykowych może być regulowane przez aktywność regionu tratwowego w błonie MVB oraz obecnością motywów RNA w sekwencji nukleotydowej wprowadzających RNA. W tej pracy podjęto się zbadania znaczenia tych czynników w interakcji RNA-błona.

Celem pracy było lepsze poznanie mechanizmu oddziaływania RNA z błoną pęcherzyków lipidowych, jako elementu procesu ładowania RNA do egzosomów i określenie znaczenia czynników, które mogą regulować poziom oddziaływania RNA-błona. Analizowanymi czynnikami były: domeny tratwowe błony lipidowej, motywy sekwencyjne RNA oraz elementy struktury drugorzędowej RNA.

W związku z tym sformułowano następujące hipotezy badawcze:

- I. Aptamery RNA mają zdolność do bezpośredniego oddziaływania z regionem tratw lipidowych błony pęcherzyków.
- II. Oddziaływanie aptamerów RNA z błoną regulowane jest przez specyficzne sekwencje nukleotydowe (motywy RNA).
- III. Obecność motywów struktury drugorzędowej może regulować poziom powinowactwa RNA-błona.

W celu weryfikacji postawionych hipotez badawczych zaplanowane zostały następujące zadania badawcze:

- 1) Identyfikacja motywów strukturalnych oraz sekwencyjnych oraz ich lokalizacji w badanych aptamerach RNA.
- 2) Pomiar stałej dysocjacji (K_D) dla oddziaływania aptamerów RNA z błonami modelowymi oraz z błonami egzosomów.
- 3) Weryfikacja znaczenia tratw w procesie oddziaływania RNA z błonami.
- 4) Przeprowadzenie analizy dotyczącej istnienia korelacji między powinowactwem badanych aptamerów RNA do błon lipidowych, a występowaniem motywów strukturalnych i sekwencyjnych w cząsteczkach RNA.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. MATERIAŁY

3.1.1. Roztwory podstawowe i bufony

W opisach przygotowywanych roztworów używana woda HyPure Molecular Biology Grade Water (ThermoFisher Scientific) oznaczana jest jako „H₂O HPW”, zaś woda destylowana i przefiltrowana w aparacie do oczyszczania wody Simplicity® UV Water Purification System (Millipore) oznaczana jest jako „H₂O ultraczysta”. Podane w nawiasach kwadratowych wartości stężeń oznaczają stężenia końcowe poszczególnych składników w przygotowanych roztworach.

Roztwory soli

Roztwory soli: NaCl [50 mM], MgCl₂ [5 mM], CaCl₂ [2 mM] przygotowano z odczynników firmy Chemipur w H₂O HPW i przefiltrowano próżniowo do sterylnych butelek przez filtry 0,1 μm (VWR). Przechowywano w lodówce w -4°C.

Roztwór HEPES pH 7,0

Skład: HEPES (Sigma Aldrich HEPES >99,5 %) [1 M], H₂O HPW. Roztwór doprowadzony został do pH 7 przez miareczkowanie zasadą azotową NaOH [0,087 M]. Przechowywano w -4°C.

Roztwór Mocznika

Skład: Urea High Purity M = 60,01 g/mol (VWR) [18,7 M], H₂O ultraczysta. Mocznik rozpuszczono w H₂O HPW w zlewce umieszczonej w ciepłej łaźni wodnej, a następnie przefiltrowano do sterylnej butelki przez filtr 0,1 μm (VWR) i przechowywano w -4°C. Roztwór mocznika służył do przygotowania roztworu akrylamidu z mocznikiem.

Roztwór bromku etydyny [0,5 mg/mL]

Skład: Bromek etydyny (Sigma Aldrich), Bufor TBE 10x (VWR).
Roztwór przygotowywano każdorazowo przed użyciem. Służył do wizualizacji DNA na żelu poliakrylamidowym po PCR w małej skali i elektroforezie.

Roztwór 8% Akrylamidu z 7M Mocznikiem

Skład: Acryl/Bis 19:1 (VWR) [8%], Bufor TBE 10x (VWR) [1X], Mocznik [7M], H₂O ultraczysta.
Roztwór przefiltrowano do sterylnej butelki przez filtr 0,2 μm (VWR) i przechowywano w -4°C. Roztwór służył do przygotowania denaturujących żeli poliakrylamidowych do elektroforetycznego oczyszczania produktów transkrypcji.

Roztwór 8% Akrylamidu bez mocznika

Skład: Acryl/Bis 19:1 (VWR) [8%]; Bufor TBE 10x (VWR) [1X], H₂O ultraczysta.
Roztwór przefiltrowano w do sterylnej butelki przez filtr 0,2 μm (VWR) i przechowywano w -4°C. Roztwór służył do przygotowania żeli poliakrylamidowych niedenaturujących przy elektroforezie produktów PCR w małej skali.

Roztwór APS [10%]

Skład: Ammonium persulfate Proteomic grade, M = 228,19 g/mol (VWR) [10%], H₂O (HPW).

Przygotowany roztwór był porcjowany i przechowywany w zamrażalce (-20°C). Służył do inicjacji polimeryzacji akrylamidu przy przygotowywaniu żeli do elektroforezy.

Roztwór octanu sodu NaOAc [3M] i [0,3M]

Skład: Octan sodu hydrat CH₃COONa * 3H₂O, M =136,08 g/mol (Chemipur), H₂O HPW.

Roztwór po przygotowaniu był przechowywany w -4°C. Roztwór [3M] był używany do wytrącania DNA po PCR. Roztwór [0,3 M] był używany do wytrącenia RNA po transkrypcji.

Bufor RNA

Skład: HEPES pH 7,0 [50 mM], NaCl [50 mM], MgCl₂ [5 mM], CaCl₂ [2 mM], H₂O HPW.

Po przygotowaniu bufor RNA był przechowywany w temperaturze pokojowej 20°C. Bufor służył do preparacji liposomów, elucji kolumny chromatograficznej przy oczyszczaniu egzosomów, w tym buforze również prowadzone były badania oddziaływania RNA z błonami lipidowymi.

Bufor RNA 10x

Skład: HEPES pH 7,0 [500 mM], NaCl [500 mM], MgCl₂ [50 mM], CaCl₂ [20 mM], H₂O HPW.

Dziesięciokrotnie stężony bufor RNA po przygotowaniu był przechowywany w temperaturze pokojowej 20°C. Był dodawany do RNA podczas fałdowania.

Bufor do elektroforezy TBE (Tris-borate-EDTA)[1X]

Skład: TBE 10x (VWR), H₂O ultraczysta

Bufor był przygotowywany każdorazowo przed przeprowadzaną elektroforezą zarówno w warunkach denaturujących jak i nie denaturujących.

Bufor obciążający do elektroforezy RNA [2x]

Skład: EDTA [50 mM], mocznik [9 M], TBE [1x], sacharoza [0,4 mg/mL], błękit bromofenolowy [0,5 mg/mL], H₂O HPW.

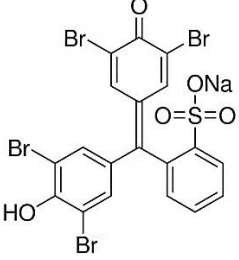
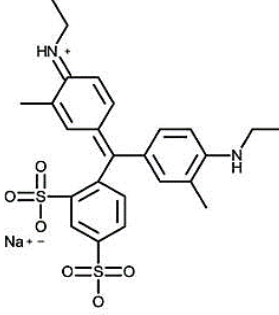
Mieszaninę składników z dodatkiem NaOH (5,6 %v/v) podgrzano z mieszaniem w ciepłej łaźni wodnej do rozpuszczenia. Po przygotowaniu, roztwór był przechowywany w -4°C. Bufor był dodawany do próbek RNA po transkrypcji przed nałożeniem do kieszonek w żelu poliakrylamidowym. Wzory i szybkości migracji markerów błękitu bromofenolowego podano w tabeli poniżej.

Bufor obciążający 6X Loading Dye (Fermantas)

Skład: Tris-HCl [10 mM] (pH 7,6), błękit bromofenolowy [0,03 %], cyjanol ksylenu FF [0,03 %], glicerol [60 %], EDTA [60 mM].

Odczynnik był gotową mieszaniną o podanym wyżej składzie. Przechowywany był w -20°C. Był używany jako bufor obciążający do próbki w czasie PCR w małej skali. Wzory i szybkości migracji markerów elektroforetycznych podano w tabeli poniżej.

Tabela 3. Markery elektroforetyczne używane w badaniach

Nazwa odczynnika	Masa molowa	Wzór strukturalny	Szybkość migracji w 8% żelu poliakrylamidowym [Sambrook i in., 2001]	
			denaturującym	niedenaturującym
Błękitu bromofenolowy C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S (bromophenol blue)	691,94 g/mol		20 nt	45 pz
Cyjanol ksylenu C ₂₅ H ₂₇ N ₂ NaO ₆ S ₂ (xylene cyanol FF)	538,62 g/mol		74 nt	160 pz

3.1.2. Żele

Żel poliakrylamidowy denaturujący

Skład: Roztwór [8%] Akrylamidu z Mocznikiem [7M] 30 mL, APS [10%] 300 µL, TEMED (M= 116,21 g/mol) (VWR) 30 µL.

Mieszaninę żelową przygotowano każdorazowo przed elektroforezą denaturującą przygotowano w objętości 30,33 mL na jedną płytkę żelową. Żel służył do oczyszczenia RNA po transkrypcji.

Żel natywny, nie denaturujący*

Skład: Roztwór [8%] Akrylamidu, APS [10%], TEMED

Żel służył do rozdzielania produktów PCR w małej skali i określenia na tej podstawie ilości cykli dla PCR w dużej skali.

* Żel natywny nie zawiera czynnika denaturującego (mocznika), dlatego DNA zachowuje swoją dwuniciową strukturę. Rozdział na tym żelu jest niezależny od rozmiaru molekuly, zaś zależny od masy cząsteczkowej.

3.1.3. Enzymy

Polimeraza DNA

Polimeraza GoTaq® DNA (5u/μL) była częścią zestawu GoTaq® PCR Core System I (Promega)

Polimeraza RNA T7 oraz DNAza

Enzymy pochodziły z zestawu AmpliScribe™ T7-Flash™ High Yield Transcription Kit (Lucigen).

3.1.4. Oligonukleotydy

3.1.4.1. Aptamery RNA

Oryginalne aptamery RNA pochodziły z selekcji przeprowadzonej przez prof. dr hab. Teresę Janas wykonanej metodą SELEX [Janas i in., 2020]. Analizowana baza aptamerów RNA składała się z 148 oligonukleotydów RNA (wszystkie sekwencje znajdują się w załączniku 1). Oligonukleotydy miały przeważnie długość 91 lub 111 nukleotydów (z kilkoma krótszymi wyjątkami). W sekwencjach można było wyróżnić 50-nukleotydowy lub 70-nukleotydowy region losowy oraz fragmenty stałe przy końcach 5' i 3'.

Cała baza 148 sekwencji RNA była przeszukana pod względem występowania motywów RNA, zaś do przeprowadzonych badań eksperymentalnych wykorzystano 19 różnych oligonukleotydów z tej puli, których sekwencje zestawione są w tabeli poniżej. Aptamery z selekcji prof. Janas przechowywane były w zamrożeniu jako wodne roztwory plazmidowego DNA lub DNA po PCR, dlatego przed wykorzystaniem ich do pomiarów wykonywano reakcję PCR (dla plazmidów DNA) oraz transkrypcję. Opis wszystkich tych metod znajduje się w rozdziale 3.2.3.

Tabela 4. Sekwencje RNA badanych aptamerów i ich formy przechowywania.

Sekwencje stałe przy końcach 5' i 3' zostały zapisane kursywą i podkreślone. Ciąg dalszy tabeli na następnej stronie.

Nr RNA	Sekwencja	Forma przechowywania
10	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAU</u> AGUGAAAGGAGUCGUACUUUCUCUUCGUGU GUGUGCCUCGUCUUCUUCUCCCGUUUGUCUCCCCUUCGCU <u>CAUACGCC</u> <u>GAUCACAUGACCA</u> -3'	plazmid DNA
13	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAU</u> AAGUGCUUCUAUGGGUUUGCAGUAAGUUCG UGUCUGGACCUUCCUUCGCU <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA</u> -3'	DNA-PCR
19	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAU</u> ACCGCCCUUGCUCGUUUCGGAUCCCUCCA CCUUGCUGAAGUCGUCCUAUCGCUCAUCCAUCCUCAUGUU <u>CAUACGCCG</u> <u>AUCACAUGACCA</u> -3'	DNA-PCR

20	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUA</u> GCCCGUAAUGUGGGUUGGUUCUCUACGUUC AACGCUCGUUCUACUCGUAUCCACAAUCUAACCCUGCC <u>CAUACGCCGA</u> <u>UCACAUGACCA-3'</u>	plazmid DNA
24	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUA</u> CGCACUACUAUGGCCCGUGUGGUUGCGAA CCUCCCCUCCCCUGUGUCAUGAUGAGAUCGGUCUUCUGG <u>CAUACGCCG</u> <u>AUCACAUGACCA-3'</u>	plazmid DNA
34	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUA</u> AGUUGUGUUGACCUAGCGUAUUAACUGGU CCGUCUUUGAUAGCGUUGCGU <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA-3'</u>	DNA-PCR
54	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUA</u> ACCCCUUCGCCCCUCCUUGUUACACUAUCC UCCAUUGUACUCCUCCUG <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA-3'</u>	plazmid DNA
59	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUA</u> GCGCUAUUCCCCUCUGGCGUUCGUCUCAAC GUCUGGCCAAGACCCGAUAUA <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA-3'</u>	plazmid DNA
64	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUA</u> UGUAGGAUGACGGUCCACCUAUUAUUCGU GCCUAUUUCUCCUUGCGU <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA-3'</u>	DNA-PCR
78	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUA</u> UUGCUCUAGUGAUCCACUUGCGUCUAUUGA GCGGCCUUUGCCACGGGUC <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA-3'</u>	DNA-PCR
90	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUA</u> AACGAUUAGUGGAGUUUACCUUCUCAUUU GUCGGGUCACUUCGGCAAGUG <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA-3'</u>	plazmid DNA
93	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUA</u> UCCGUCAAGGCGGUUGCAAUCCCGAGGU CUGUAUUUUCUUCGUUAGUCCUGCACAUCUCCUCGAAC <u>CAUACGCCG</u> <u>AUCACAUGACCA-3'</u>	DNA-PCR
102	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUA</u> CCAAUACCAUGGAUUGGUCCUUUAUCCAG CUUCUUAACCCUACCCUGU <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA-3'</u>	plazmid DNA
109	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUA</u> ACGCGACAGGGUCUGACAGGCGUCUCCUUC CCUUUUGCAUAUUCUCCCGU <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA-3'</u>	plazmid DNA
111	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUA</u> CUAUCAGAAUAAUGUGUUCUUGGUUCUG UGCACACGCUGUUUCAGGGCU <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA-3'</u>	plazmid DNA
119	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUA</u> UUUUCCCUCAUGUAUUCGUAUUGGCCGUUG UCCUGCUCAUCCCCUGGU <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA-3'</u>	plazmid DNA
145	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUA</u> GACAUAUAUUGGGUGCUGUCGACGUGUUU AUUAAUCGCCUUUUG <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA-3'</u>	plazmid DNA
146	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUA</u> AUGUGAGGAGUCGCGGUUUCUUCUGGUUU UGGUCCAUUGGCCGAGUCA <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA-3'</u>	plazmid DNA
157	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUA</u> UGUACCAUGGCAUAUCAGCUCACAUCUUC CUGCGCCCUCCUCCUCCUGCU <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA-3'</u>	DNA-PCR

Wybrane aptamery były wykorzystywane do badań w czterech układach:

- (1) Wszystkie 19 aptamerów służyło do badania ich oddziaływanie z liposomami tratwowymi (LUV_{RAFT})
- (2) Dla 16 aptamerów RNA o numerach: 10, 13, 19, 20, 24, 34, 54, 59, 64, 78, 90, 93, 102, 109, 146 i 157 badano ich oddziaływanie z liposomami nie-tratwowymi (LUV_{DOPC})
- (3) Dla 10 aptamerów o numerach: 10, 13, 19, 24, 54, 64, 78, 90, 93 i 102 badano ich oddziaływanie z egzosomami
- (4) 6 aptamerów o numerach: 10, 13, 90, 102, 111 i 145 służyło jako baza do przygotowania mutantów.

3.1.4.2. Mutanty RNA

Mutant RNA zostały zaprojektowane na bazie oryginalnych sekwencji aptamerów RNA z wprowadzonymi modyfikacjami (opis wprowadzonych modyfikacji znajdują się w sekcji 3.2.4.1.). Przygotowano w sumie 25 mutantów będących modyfikacjami 6 oryginalnych aptamerów: RNA 10, RNA 13, RNA 90, RNA 102, RNA 111 i RNA 145, sekwencje wszystkich mutantów zostały podane w tabeli poniżej. Mutanty zostały zamówione jako oligonukleotydy DNA w Integrated DNA Technologies, BVBA (Belgia) i dostarczone w formie liofilizowanej (sekwencje DNA podano w tabeli). Mutanty RNA otrzymane zostały poprzez transkrypcję in vitro, opis metod znajduje się w sekcji 3.2.4.2.

Tabela 5. Sekwencje RNA i DNA badanych mutantów

Sekwencje stałe przy końcach 5' i 3' RNA zostały wyróżnione kursywą i podkreśleniem. Odwrotnie komplementarne do RNA sekwencje zamówionych DNA zestawione są po prawej stronie tabeli. Ciąg dalszy tabeli znajduje się na następnej stronie.

Nr RNA	Docelowa sekwencja RNA	Sekwencja zamówionego DNA
10A	5'- <i>GGGACGACGAUGACACGAUAGUGAAAGGAGC</i> CCUACUUUCUCUUCGUGUGUGGCCUCGUC UUCUUCUCCCGUUUGUCUCCCUUUCGCU <u>CA</u> <u>UACGCCGAUCACAUGACCA</u> -3'	TGG TCA TGT GAT CGG CGT ATG AGC GAA AGG GGA GAC AAA CGG GAG AAG AAG ACG AGG CAC ACA CAC GAA GAG AAA GTA GGG CTC CTT TCA CTA TCG TGT CAT CGT CGT CCC
10B	5'- <i>GGGACGACGAUGACACGAUAGUGAAAGGAGC</i> CCUACUUUCUCUUCGUGUGUGGCCUCGUC UUCUUCUCCCGUUUGUCUCCCUUUCGCCCC <u>UCAUACGCCGAUCACAUGACCA</u> -3'	TGG TCA TGT GAT CGG CGT ATG AGG GGC GAA AGG GGA GAC AAA CGG GAG AAG AAG ACG AGG CAC ACA CAC GAA GAG AAA GTA GGG CTC CTT TCA CTA TCG TGT CAT CGT CGT CCC
10C	5'- <i>GGGACGACGAUGACACGAUAGUGAAAGGAGU</i> CCUACUUUCUCUUCGUGUGUGGCCUCGUC UUCUUCUCCCGUUUGUCUCCCUUUCGCU <u>CA</u> <u>UACGCCGAUCACAUGACCA</u> -3'	TGG TCA TGT GAT CGG CGT ATG AGC GAA AGG GGA GAC AAA CGG GAG AAG AAG ACG AGG CAC ACA CAC GAA GAG AAA GTA GGG ACT CCT TTC ACT ATC GTG TCA TCG TCG TCC C
10D	5'- <i>GGGACGACGAUGACACGAUAGUGAAAGGAGC</i> UCCACUUUCUCUUCGUGUGUGGCCUCGUC UUCUUCUCCCGUUUGUCUCCCUUUCGCU <u>CA</u> <u>UACGCCGAUCACAUGACCA</u> -3'	TGG TCA TGT GAT CGG CGT ATG AGC GAA AGG GGA GAC AAA CGG GAG AAG AAG ACG AGG CAC ACA CAC GAA GAG AAA GTG GGA GCT CCT TTC ACT ATC GTG TCA TCG TCG TCC C

13A	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUAAGUGCUUCUAU</u> GGGUUUGCAGUAAGUUCGUGUCUGGACCUU UACCUUCGU <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA</u> -3'	GGT CAT GTG ATC GGC GTA TGA CGA AGG TAA AGG TCC AGA CAC GAA CTT ACT GCA AAC CCA TAG AAG CAC TTA TCG TGT CAT CGT CGT CCC
13B	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUAAGUGCUUCUAU</u> GGGUUUGCAGUAAGUUCGUGUCUGGACCUU UCCUUCGU <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA</u> -3'	TGG TCA TGT GAT CGG CGT ATG ACG AAG GAA AGG TCC AGA CAC GAA CTT ACT GCA AAC CCA TAG AAG CAC TTA TCG TGT CAT CGT CGT CCC
90A	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUAAACGAUUAGUG</u> GAGUUUACCUUCUCAUAUGUCGGGUCACUU CGGCAAGUG <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA</u> -3'	GGT CAT GTG ATC GGC GTA TGC ACT TGC CGA AGT GAC CCG ACA TAT GAG AAG GTA AAC TCC ACT AAT CGT TTA TCG TGT CAT CGT CGT CCC
90B	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUAAACGAUUAGUG</u> GAGUUUACCUUCUCAUGUCGGGUCACUUCG GCAAGUG <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA</u> -3'	TGG TCA TGT GAT CGG CGT ATG CAC TTG CCG AAG TGA CCC GAC ATG AGA AGG TAA ACT CCA CTA ATC GTT TAT CGT GTC ATC GTC GTC CC
90C	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUAAACGAUUAGUG</u> GUUUACCUUCUCAUUUGUCGGGUCACUUCG GCAAGUG <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA</u> -3'	TGG TCA TGT GAT CGG CGT ATG CAC TTG CCG AAG TGA CCC GAC AAA TGA GAA GGT AAA CCA CTA ATC GTT TAT CGT GTC ATC GTC GTC CC
102A	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUACCAAUACCAUG</u> GAUUGGUACCUUUU <u>AUCCAGCUUCUUAACC</u> UUACCUUU <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA</u> -3'	GGT CAT GTG ATC GGC GTA TGA ACA GGT AAG GTT TAA GAA GCT GGA TAA AGG TAC CAA TCC ATG GTA TTG GTA TCG TGT CAT CGT CGT CCC
102B	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUACCAAUACCAUG</u> GAUUGGUAAAAUU <u>AUCCAGCUUCUUA</u> AAAA AUACCUUU <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA</u> -3'	GGT CAT GTG ATC GGC GTA TGA ACA GGT ATT TTT TAA GAA GCT GGA TAA TTT TAC CAA TCC ATG GTA TTG GTA TCG TGT CAT CGT CGT CCC
102C	5'- ' <u>GGGACGACGAUGACACGAUACCAAUACCAUG</u> GAUUGGUCCUUU <u>AUCCAGCUUCUUAACC</u> UU ACCUGUU <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA</u> -3'	TGG TCA TGT GAT CGG CGT ATG AAC AGG TAA GGT TAA GAA GCT GGA TAA AGG ACC AAT CCA TGG TAT TGG TAT CGT GTC ATC GTC GTC CC
102D	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUACCAAUACCAUG</u> GAUUGGUCUUU <u>AUCCAGCUUCUUAAC</u> UUAC CUGUU <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA</u> -3'	TGG TCA TGT GAT CGG CGT ATG AAC AGG TAA GTT AAG AAG CTG GAT AAA GAC CAA TCC ATG GTA TTG GTA TCG TGT CAT CGT CGT CCC
111A	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUACUAUCAGAAUA</u> ACCCUGUGUUCUUUGGUUCUGUGCACACGC UGUUUCAGGGCU <u>CAUACGCCGAUCACAUGAC</u> <u>CA</u> -3'	GGC GTA TGA GCC CTG AAA CAG CGT GTG CAC AGA ACC AAA GAA CAC AGG GTT ATT CTG ATA GTA TCG TGT CAT CGT CGT CCC
111B	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUACUAUCAGAAUA</u> ACCCUUGUGUUCUUUGGUUCUGUGCACACG CUGUUUCAGGGCU <u>CAUACGCCGAUCACAUGA</u> <u>CCA</u> -3'	GGC GTA TGA GCC CTG AAA CAG CGT GTG CAC AGA ACC AAA GAA CAC AAG GGT TAT TCT GAT AGT ATC GTG TCA TCG TCG TCC C
111C	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUACUAUCAGAAUA</u> AUCCCUGUGUUCUUUGGUUCUGUGCACACGC UGUUUCAGGGCU <u>CAUACGCCGAUCACAUGAC</u> <u>CA</u> -3'	GGC GTA TGA GCC CTG AAA CAG CGT GTG CAC AGA ACC AAA GAA CAC GGG ATT ATT CTG ATA GTA TCG TGT CAT CGT CGT CCC

111D	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUACUAUCAGAAUA</u> AUUCCCGUGUUCUUUGGUUCUGUGCACACG CUGUUUCAGGGGCU <u>CAUACGCCGAUCACAUGA</u> <u>CCA-3'</u>	GGC GTA TGA GCC CTG AAA CAG CGT GTG CAC AGA ACC AAA GAA CAC GGG AAT TAT TCT GAT AGT ATC GTG TCA TCG TCG TCC C
111E	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUACUAUCAGAAUA</u> AUGCUCUGUUCUUUGGUUCUGUGCACACG CUGUUUCAGGGGCU <u>CAUACGCCGAUCACAUGA</u> <u>CCA-3'</u>	GGC GTA TGA GCC CTG AAA CAG CGT GTG CAC AGA ACC AAA GAA CAG GAG CAT TAT TCT GAT AGT ATC GTG TCA TCG TCG TCC C
111F	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUACUAUCAGAAUA</u> AUUGUUGUGUUCUUUGGUUCUGUGCACACG CUGUUUCAGGGGCU <u>CAUACGCCGAUCACAUGA</u> <u>CCA-3'</u>	GGC GTA TGA GCC CTG AAA CAG CGT GTG CAC AGA ACC AAA GAA CAC AAC AAT TAT TCT GAT AGT ATC GTG TCA TCG TCG TCC C
111G	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUACUAUCAGAAUA</u> AUGGAGUGUUCUUUGGUUCUGUGCACACGC UGUUUCAGGGGCU <u>CAUACGCCGAUCACAUGAC</u> <u>CA-3'</u>	GGC GTA TGA GCC CTG AAA CAG CGT GTG CAC AGA ACC AAA GAA CAC TCC ATT ATT CTG ATA GTA TCG TGT CAT CGT CGT CCC
145A	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUAGACAUUAUUAUUC</u> CCUGGGUGCUGUCGACGUGUUUAUUAUUCG CCUUUUG <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA-3'</u>	GGC GTA TGC AAA AGG CGA TTA ATA AAC ACG TCG ACA GCA CCC AGG GAA TAT ATG TCT ATC GTG TCA TCG TCG TCC C
145B	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUAGACAUUAUUAUU</u> CCCGGGUGCUGUCGACGUGUUUAUUAUUCG CCUUUUG <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA-3'</u>	GGC GTA TGC AAA AGG CGA TTA ATA AAC ACG TCG ACA GCA CCC GGG AAA TAT ATG TCT ATC GTG TCA TCG TCG TCC C
145C	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUAGACAUUAUUAUUC</u> UCCGGGUGCUGUCGACGUGUUUAUUAUUCG CCUUUUG <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA-3'</u>	GGC GTA TGC AAA AGG CGA TTA ATA AAC ACG TCG ACA GCA CCC GGA GAA TAT ATG TCT ATC GTG TCA TCG TCG TCC C
145D	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUAGACAUUAUUAUU</u> GUUGGGUGCUGUCGACGUGUUUAUUAUUCG CCUUUUG <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA-3'</u>	GGC GTA TGC AAA AGG CGA TTA ATA AAC ACG TCG ACA GCA CCC AAC AAA TAT ATG TCT ATC GTG TCA TCG TCG TCC C
145E	5'- <u>GGGACGACGAUGACACGAUAGACAUUAUAGGA</u> GUUGGGUGCUGUCGACGUGUUUAUUAUUCG CCUUUUG <u>CAUACGCCGAUCACAUGACCA-3'</u>	GGC GTA TGC AAA AGG CGA TTA ATA AAC ACG TCG ACA GCA CCC AAC TCC TAT ATG TCT ATC GTG TCA TCG TCG TCC C

Mutanty RNA były wykorzystywane do badań w dwóch układach:

- (1) Dla wszystkich 25 mutantów RNA badane było ich oddziaływanie z liposomami tratwowymi (LUV_{RAFT})
- (2) 5 spośród z nich: 13A, 13B, 90A, 90B oraz 102D służyło do również do badania ich oddziaływanie z egzosomami.

3.1.4.3. Startery

Startery do reakcji PCR zostały zamówione w firmie Integrated DNA Technologies, BVBA (Belgia). W tabeli poniżej podane zostały sekwencje starterów.

Tabela 6. Sekwencje starterów

Rodzaj startera	Sekwencja zamówionego DNA
Starter 5' 5'T7Phe- Leu	5'-TAATACGACTCACTATAGGGACGACGATGACACGAT A-3'
Starter posiada przy końcu 5' RNA 17-nukleotydowy odcinek komplementarny do sekwencji promotora dla polimerazy T7 (wyróżniony odcinek). Za nim znajduje się 20-nukleotydowy odcinek odwrotnie komplementarny do końca 3' DNA.	
Starter 3' 3'PheLeu	5'-TGGTCATGTGATCGGCGTATG-3'
Składa się z 21-nukleotydów o takiej samej sekwencji jak region stały 5' DNA	

Startery dostarczone były w formie liofilizowanej. Próbkę były rozpuszczane w 400 μ L H₂O HPW (roztwór wyjściowy), następnie pobierano 20 μ L i rozcieńczano jeszcze 10 x (roztwór pośredni). Z tego rozcieńczenia pobierano 1 μ L w celu oznaczenia stężenia na podstawie pomiarów absorbancji $\lambda=260$ na spektrometrze V-550 (Jasco) (metoda wyliczania stężenia podana jest w sekcji 3.2.3.9). Oznaczone stężenia wynosiły [106 μ M] dla startera 5'T7PheLeu oraz [172 μ M] dla startera 3'PheLeu oraz. Ostatecznie, po oznaczeniu stężenia, z roztworów pośrednich przygotowywano roztwory właściwe o stężeniu [50 μ M] w H₂O HPW. Startery wykorzystywane były do przeprowadzenia reakcji PCR zamówionych mutantów oraz plazmidowych DNA aptamerów.

3.1.4.4. Markery długości

Marker Perfect Plus 50-500 DNA Ladder (EURx)

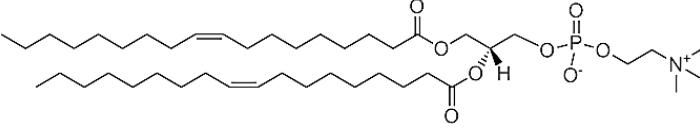
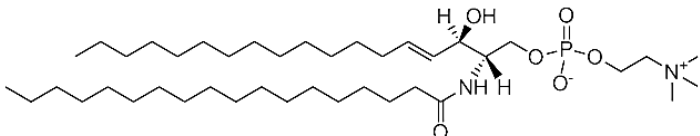
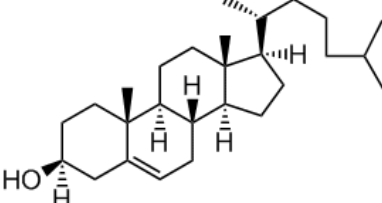
Marker Bench Top 100 bp DNA Ladder (PROMEGA)

Markery były dodawane do jednej z kieszonek niedenaturującego żelu poliakrylamidowego przy elektroforezie, jako odnośnik długości dla DNA po PCR w małej skali.

3.1.5. Lipidy

Wszystkie używane lipidy pochodziły z firmy Avanti Polar Lipids. W tabeli poniżej zestawiono lipidy używane do przygotowanie liposomów.

Tabela 7. Lipidy używane w badaniach

Nazwa lipidu, forma	Masa molowa	Wzór strukturalny
DOPC (1,2-dioleilo-sn-glicero-3-fosfocholina) Roztwór [20 mg/mL] w chloroformie	786,1 g/mol	
Posiada dwa 18-węglowe łańcuchy nienasycone z jednym wiązaniem podwójnym w każdym łańcuchu 18:1 / 18:1. Lipid służył do przygotowania zarówno liposomów tratwowych jak i nie-tratwowych.		
Sfingomielina (SM) (N-stearoilo-D-erytro-sfingozylfosforylocholina) Sfingomielina z mózgu świnińskiego roztwór [25 mg/mL] w chloroformie	731,1 g/mol	
Posiada jeden łańcuch nasycony 18:0 i jeden nienasycony 18:1. Lipid służył do przygotowywania liposomów tratwowych.		
Cholesterol (Chl) owczy, oryginalnie w formie proszku.	386,7 g/mol	
Z oryginalnego proszku przygotowano roztwór [10 mg/mL] w mieszaninie metanolu z chloroformem 1:1. Lipid służył do przygotowywania liposomów tratwowych.		

3.1.6. Egzosomy

Egzosomy używane w badaniach pochodziły z surowicy cielęcej (CBS – ang. calf bovine serum) (ThermoFisher Scientific). Były każdorazowo izolowane przez dr Karolinę Sapoń w Zakładzie Cytobiochemii, Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego i transportowane w pojemniku chłodzącym (ok 4°C) do Opola w celu oczyszczenia i wykorzystania do badań (opis procedury przygotowania egzosomów znajduje się w sekcji 3.2.6).

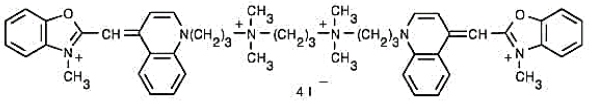
3.1.7. Sondy fluorescencyjne

Sondy fluorescencyjne używane do badania oddziaływania RNA z błonami lipidowymi pochodziły z firmy ThermoFisher Scientific. Wszystkie używane w badaniach sondy zestawione są w tabeli poniżej.

Tabela 8. Sondy fluorescencyjne używane w badaniach.

Kontynuacja tabeli na następnej stronie.

Nazwa sondy, forma	Masa molowa	Wzór strukturalny	Długość fal wzbudzenia/emisji
<p>CTB-555 (Cholera Toxin Subunit B (Recombinant), Alexa Fluor™ 555 Conjugate), Liofilizowany proszek</p>			555/565 pomarańczowa
<p>Sonda CTB-555 jest koniugatem złożonym z rekombinowanej podjednostki B toksyny cholery oraz sondy Alexa fluor 555. Koniugaty podjednostki B toksyny cholery przygotowywane są z rekombinowanej podjednostki B toksyny cholery, która jest wolna od toksycznej podjednostki A, eliminując w ten sposób ryzyko jej toksyczności. Podjednostka B jest składana w pentamer, który wiąże się z łańcuchem pentasacharydowym gangliozydu GM1 błony lipidowej. Alexa fluor 555 charakteryzuje się czerwono-pomarańczową fluorescencją [Wiederschain i in., 2011].</p>			
<p>DiI (FAST DiI™; (1,1'-Dilinoylel-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate))</p>			550/560 pomarańczowa
<p>Jest nienasyconym analogiem sondy DiI. Wykazuje słabą fluorescencję w wodzie, zaś po włączeniu do wnętrza błony lipidowej silny i dość fotostabilny wzrost fluorescencji [https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D7756?SID=srch-srp-D7756#/D7756?SID=srch-srp-D7756].</p>			
<p>LisRh-PE (Lissamine™ Rhodamine B 1,2-Dihexadecanoyl-<i>sn</i>-Glycero-3-Phosphoethanolamine, Triethylammonium Salt (rhodamine DHPE)), Proszek</p>	193 g/mol		560/580 pomarańczowa
<p>Sonda składa się z pomarańczowej sondy rodaminy B przyłączonej do główki fosfatydyloetanolaminy [Sapoń i in., 2019]. Sonda ta była dodawana w trakcie preparacji liposomów, w ten sposób wbudowywała się w błonę pęcherzyków lizosomalnych.</p>			
<p>Ribo Green (RiboGreen™ RNA Reagent)</p>			500/525 zielona
<p>Jest czułym barwnikiem fluorescencyjnym wykazującym fluorescencję w zakresie barwy zielonej. Może służyć do ilościowego oznaczania RNA w roztworze, z liniową detekcją fluorescencji w zakresie 1-200 ng RNA [Wiederschain i in., 2011].</p>			

SYTO 61 (SYTO™ 61 Red Fluorescent Nucleic Acid Stain), Roztwór [5 mM] w DMSO			628/645 czerwona
Sonda wykazuje czerwoną fluorescencję po związaniu z kwasami nukleinowymi. Większość barwników SYTO preferencyjnie znakuje dwuniciowy DNA, ale mogą też wiązać się z jednoniciowym DNA i RNA. Ich struktury są elastyczne w roztworach wodnych (mają bardzo niską fluorescencję, gdy są niezwiązane), a po związaniu z kwasami nukleinowymi stają się sztywne (wykazują bardzo duży wzrost fluorescencji po związaniu w kompleksie z kwasami nukleinowymi) [Johnson i in., 2011; Tárnok, 2008]			
YOYO-1 (YOYO™-1 Iodide), Roztwór [1 mM] w DMSO	270,65 g/mol		491/509 zielona
Jest cyjankowym barwnikiem kationowym, dimerem żółcieni oksazolowej. Ma jeden atom węgla mostkujący pierścienie aromatyczne. Nie przenika przez błony. Charakteryzuje się niską wewnętrzną fluorescencją gdy nie jest związany, zaś dużym wzmocnieniem fluorescencji po interkalacji w struktury nukleotydowe [Janas i in., 2003; Wiederschain i in., 2011]. Z [1 mM] roztworu YOYO-1 przygotowywano do badań rozcieńczenie [250 μM], porcjowano do osobnych próbek i przechowywano w zamrożeniu.			

W zależności od układu pomiarowego sondy były używane do znakowania: (1) Błon pęcherzyków: sondy LisRh-PE, CTB 555, fDiI oraz (2) cząsteczek RNA: sondy YOYO-1, Ribo Green, SYTO 61.

3.1.8. Pozostałe odczynniki

DMSO, Dimetylosulfotlenek

Stosowany do przygotowania rozcieńczeń sond fluorescencyjnych.

Etylowy alkohol bezwodny 99,8%, (POCH)

Używany podczas oczyszczania RNA po transkrypcji.

Sephacryl S-1000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Materiał służył jako złożo do filtracji żelowej czasie oczyszczania egzosomów.

Zestaw odczynników do transkrypcji *AmpliScribe™ T7-Flash™ High Yield Transcription Kit* (Lucigen)

Skład zestawu: AmpliScribe T7 RNA Polymerase, AmpliScribe T7 10X Reaction Buffer, ATP [100 mM], GTP [100 mM], CTP [100 mM], UTP [100 mM], DTT (Ditio-treitol) [100 mM], RiboGuard™ RNase Inhibitor [40 U/μL], Woda wolna od nukleaz, Nuclease-Free Water, Sterile, RNase-Free DNase I [1 U/μL].

Zestaw odczynników do PCR *GoTaq® PCR Core System I* (Promega)

Skład zestawu: Polimeraza Taq – 250 u GoTaq® DNA Polymerase, 2 × 1 mL 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer, Mg-Free, 2 × 1 mL 5X Green GoTaq® Flexi Buffer, Mg-Free, 1,2 mL MgCl₂, 25 mM, 200 μL PCR Nucleotide Mix, [10 mM]

3.1.9. Sprzęt i inne materiały

Aparat do oczyszczania wody *Simplicity® Water Purification System* (Millipore).

System do oczyszczania wody z wkładem oczyszczającym SimpliPak®. Służył do wytwarzania wody ultraczystej używanej w toku badań.

Aparat do elektroforezy *STANDARD 2* (Krzysztof Kucharczyk Techniki Elektroforetyczne Sp.z o.o.)

Aparat do podwójnej pionowej elektroforezy płytowej 19x19 cm, z rozprawdaniem ciepła ze środkowej części żelu. Aparat używany był do wszystkich przeprowadzanych procesów elektroforezy.

Blok grzejny *TDB-120, Dry block thermostat* (Biosan)

Wykorzystywany do podgrzewania i inkubacji próbek w określonej temperaturze.

Filtry do ekstrudera *PC Membranes 0,1µm* (Avanti Polar Lipids)

Filtry z membran poliwęglanowych o rozmiarze porów (0,1 µm), używane przy ekstruzji liposomów.

Filtry z mikrowłókien szklanych *Glass Microfibre Ters* (Whatman International)

Filtry używane do zatkania wylotu kolumny przy filtracji żelowej egzosomów.

Kolumnienki filtracyjne *Spin-X Centrifuge Tube Filter* (Costar)

Kolumnienki z filtrem o porach 0,22 µm używane do oczyszczania próbek z resztek żelu w trakcie izolacji RNA.

Lampa *UVP UVGL-15* (Analytik Jena, US)

Używana do uwidaczniania RNA po transkrypcji. Żel umieszczony na płytce TLC podświetlany był od góry lampą 254 nm.

Płytki z żelem krzemionkowym *Flexible Plates for TLC PE SIL G/UV* (Whatman)

Elastyczne płytki 20 x 20 cm z żelu krzemionkowego do chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na podkładzie poliestrowy. Warstwa adsorpcyjna zawiera związek, który fluoryzuje po oświetleniu światłem UV o krótkiej długości fali (254 nm). Wykorzystywane do wizualizacji RNA po transkrypcji za pomocą cieniowania UV.

Termocykler *LightCycler® 96* (Roche)

Wykorzystywany do przeprowadzenia wszystkich reakcji PCR.

Transiluminator *UVP UV/White Transilluminator* (Analytik Jena US LLC)

Używany do uwidaczniania prążków DNA po PCR w małej skali, przy wybarwieniu roztworem bromku etydyny. Żel podświetlany od dołu lampą 365 nm.

Ultrawirówka *Micro Star 17R* (VWR)

Wykorzystywana do wszelkiego rodzaju odwirowań próbek.

Spektrofotometr fluorescencyjny *Varian Cary Eclipse* (Agilent Technologies)

Wykorzystywany we wszystkich pomiarach fluorescencji wraz z mikrokuwetą kwarcową z adapterem (minimalna objętość pomiarowa 80 µL).

Spektrometr *V-550* (Jasco)

Wykorzystywany do pomiarów widma absorbancji RNA i oznaczania stężenia RNA po transkrypcji. Używany wraz z 1 mL kuweta kwarcową (minimalna objętość pomiarowa 150 µL).

Wytrząsarka termiczna *Thermomikser lite* (VWR)

Używana do wytrząsania probówek z żelem po elektroforezie.

Zestaw mini-ekstrudera *Avanti MiniExtruder* (Avanti Polar Lipids).

Zestaw zawierał: mini-ekstruder, dwie strzykawki 1000 µL, podkładki do filtrów i blok grzejny

3.2. METODY

3.2.1. Analiza bazy aptamerów RNA

Celem tej części pracy było sprawdzenie czy w analizowanej bazie sekwencji aptamerów RNA występują motywy RNA oraz gdzie mogą być ulokowane w strukturze 2-rzędowej cząsteczki. Bazę sekwencji wszystkich 148 aptamerów analizowano pod względem następujących parametrów:

- (1) Zapis sekwencji (region losowy + fragmenty stałe przy końcach 5' i 3') wszystkich oligonukleotydów z bazy został przeanalizowany pod kątem obecności 10 motywów sekwencyjnych RNA należących do trzech grup podanych w tabeli poniższej.

Tabela 9. Wyszukiwane motywy RNA

Grupa motywów RNA	Motyw	Uwagi
Motywy egzosomowe 4-nukleotydomotywy opisane jako często występujące w egzosomalnym miRNA [Villarroya-Beltri i in., 2013]	CCC <u>U</u>	Jest wspólnym motywem egzosomowym i tratwowym
	GGAG	
	UGAG	
	UCCU	
Motywy tratwowe 4-nukleotydomotywy [Janas i in., 2020]	CCC <u>U</u>	Wchodzi w skład motywu 5-nukleotydomotywu UUGUU
	UCC <u>C</u>	
	CUCC	
	UUG <u>U</u>	
Motywy 5-nukleotydomotywy dodatkowo wyszukiwane motywy	UCC <u>CU</u>	Zawiera zachodzące na siebie sekwencje CCCU i UCCC
	CUCC <u>U</u>	Zawiera zachodzące na siebie motywy CUCC i UCCC
	UUG <u>UU</u>	Zawiera motyw UUGU

- (2) Wyszukiwane motywy RNA były zliczane w każdym aptamerze osobno i razem w całej bazie.
- (3) Zliczane były wszystkie wystąpienia każdego motywu, nawet jeśli w danym aptamerze ten sam motyw powtarzał się lub gdy sekwencje motywów zachodziły na siebie.

Znalezione motywy RNA zostały oznaczone na liście sekwencji wszystkich badanych aptamerów w załączniku 1 oraz w karach charakterystyki badanych aptamerów (sekcja 4.2.3), zaś wyniki zliczeń poszczególnych motywów zestawiono w sekcji 4.1.

3.2.2. Określenie struktury drugorzędowej RNA

Sekwencje aptamerów oraz mutantów RNA zostały sfałdowane w programie mFold [Zuker, 2003] dla ustalonej temperatury 37° C. Metoda przewidywania fałdowania cząsteczek RNA opiera się na założeniu, że termicznie najtrwalsze struktury drugorzędowe to te, o najniższej energii swobodnej Gibbsa (ΔG), tak więc zmiana energii swobodnej, służy jako miara stabilności struktury drugorzędowej RNA [Taylor i in., 2020].

Dla wszystkich badanych aptamerów i mutantów RNA w uzyskanych wizualizacjach struktury drugorzędowej o najniższej ΔG , zaznaczone zostały prawdopodobne lokalizacje motywów RNA (karty charakterystyki sekcje 4.2.3 i 4.6.1). Jeśli dla danej sekwencji występowały alternatywne fałdowania o wyższej ΔG , podane zostały one w tabeli w załączniku numer 2.

3.2.3. Przygotowanie aptamerów RNA

Wybrane do badań aptamery, które przechowywane były jako plazmidowe DNA (numery: 10, 20, 24, 54, 59, 90, 102, 109, 111, 119, 145 i 146) poddane zostały amplifikacji metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Pozostałe wybrane aptamery (numery: 13, 19, 34, 64, 78, 93 i 157) przechowywane były jako DNA już po PCR. Dla wszystkich DNA po PCR przeprowadzono reakcję transkrypcji wraz z oczyszczaniem powstałego RNA na żelu poliakrylamidowym.

3.2.3.1. Wstępny PCR w małej skali

W celu określenia liczby cykli dla reakcji amplifikacji DNA przeprowadzana była reakcja PCR w małej skali (ssPCR – ang. small scale PCR). Wszystkie odczynniki do reakcji pochodziły z zestawu *GoTaq® PCR Core System I* (Promega) zaś matrycowe DNA stanowiły plazmidy DNA lub zamówione mutanty DNA. Skład mieszaniny reakcyjnej dla jednego nukleotydu podany został w Tabeli 10. Mieszanina reakcyjna przygotowywana była w objętości 100 μL (na wszystkie warianty ssPCR oraz do właściwego PCR w większej skali).

Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR

Odczynnik [stężenie dodawanego odczynnika]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej	Dodawana objętość	
		Dla plazmidowego DNA	Dla mutantów DNA
Wolna od nukleaz H ₂ O		59,5 µL	61,5 µL
Bufor Taq [5x stężony]	[1 x]	20 µL	20 µL
dNTPs [10 mM]	[0,2 mM]	2 µL	2 µL
MgCl ₂ [25 mM]	[1,5 mM]	6 µL	6 µL
Starter Oligo 3' [50 µM]	[2 µM]	4 µL	4 µL
Starter Oligo 5' [50 µM]	[2 µM]	4 µL	4 µL
Matryca DNA (aptamer lub mutant [500 nM])	[10 nM] (stężenie dla mutantów DNA)	4 µL	2 µL
Polimeraza Taq (3x rozcieńczona)		0,5 µL	
		Całkowita objętość = 100 µL	

Przed dodaniem polimerazy, z przygotowanej mieszaniny pobierano po 10 µL dla kolejnych wariantów ilości cykli, tj. 14, 16 oraz 18 cykli. Kolejne 10 µL było zachowywane jako próbka kontrolna (0 cykli). Bezpośrednio przed każdym cyklem dodawano 0,5 µL trzykrotnie rozcieńczonej polimerazy Taq. Reakcję przeprowadzano w termocyklerze LightCycler® 96 (Roche) w następujących parametrach czasu i temperatury:

Tabela 11. Parametry reakcji PCR

Etap PCR	Temperatura	Czas
Wstępna denaturacja	94 °C	2 min
Powtarzające się cykle reakcji (14, 16 lub 18 cykli)		
▪ Rozfałdowanie DNA	94 °C	30 s
▪ Przyłączenie starterów	62 °C	40 s
▪ Synteza DNA	72 °C	90 s
Końcowe wydłużanie	72 °C	2 min
Schładzanie	37 °C	30 s

Pozostałe po PCR w małej skali 59,5 µL mieszaniny reakcyjnej (bez enzymu) zachowywano do właściwej procedury PCR.

3.2.3.2. Elektroforeza DNA w żelu poliakrylamidowym niedenaturującym

Produkty reakcji PCR w małej skali wraz z próbką kontrolną (0 cykli), poddawane były rozdzielni elektroforetycznej w 8% żelu poliakrylamidowym niedenaturującym. Przygotowywano 1 mm żel o składzie podanym w sekcji 3.1.2. Rozdział prowadzono z użyciem aparatu do elektroforezy *STANDARD 2* buforze TBE [1x] przy napięciu 300 V i natężeniu 40 mA. Rozdział poprzedzony był fazą wstępną z samym żelem bez załadowanych próbek (250 V, 40 mA, 30 min).

Przed nałożeniem na żel, do każdej próbki (10 µL z każdego wariantu cykli ssPCR) dodawano 2 µL buforu obciążającego *6X DNA Loading Dye* (ThermoFisher Scientific). Do pierwszej kieszonki żelu nanoszono marker długości *Perfect Plus™ 50-500 bp DNA Ladder* (EURX Sp. z o.o.), do kolejnych dołków ładowano próbki po kolejnych wariantach cykli PCR. Po zakończeniu elektroforezy (3-4 godziny), produkty rozdzielu, wybarwiano roztworem bromku etydyny [0,5 mg/mL] i uwidaczniano umieszczając w świetle UV (lampa 365 nm). W oparciu o analizę wyników rozdzielu określano liczę cykli PCR dla danego oligonukleotydu.

3.2.3.3. PCR

Pozostała po PCR w małej skali część mieszaniny reakcyjnej (59,5 μL , bez enzymu), amplifikowano w reakcji PCR. Jeśli dla danej próbki DNA nie przeprowadzono wcześniej ssPCR, to próbkę do właściwego PCR (59,5 μL) przygotowano bezpośrednio przed reakcją w takich samych stężeniach jak podano w Tabeli 10. Przed rozpoczęciem reakcji do każdej próbki dodawano 0,5 μL Polimerazy Taq i rozdzielano do probówek po 30 μL . Reakcję przeprowadzano w termocyklerze LightCycler® 96 (Roche) w takich samych parametrach jak dla PCR w małej skali, z określoną dla danych RNA liczbą cykli.

3.2.3.4. Oczyszczanie DNA po PCR

Próbki DNA po PCR (60 μL) poddawane były wytrącaniu w mieszaninie zimnego (4°C) etanolu [99,9%] (200 μL) i octanu sodu [3M] (6,6 μL) z dodatkiem 1 μL glikogenu [20 mg/mL], przeważnie ok. 12 godzin w temperaturze -20°C. Po precypitacji DNA próbki były odwirowywane przez 20 minut w 4°C (14.000 x g). Po odciążeniu supernatantu osadzony na dnie pellet zawierający DNA przemywany był etanolem [70%], po czym etanol był odciągany. Próbki pozostawiano na kilka minut w otwartej probówce dla odparowania resztek alkoholu. Ostatecznie DNA było zawieszane w 20 μL H₂O HPW i przechowywane w zamrożeniu (-20°C). Otrzymany w ten sposób zamplifikowany DNA (oznaczany jako DNA-PCR) służył jako matryca do reakcji transkrypcji.

3.2.3.5. Transkrypcja in vitro

Oczyszczone DNA zarówno aptamerów jak i mutantów było przepisywane na RNA w reakcji transkrypcji. W reakcji korzystano z odczynników z zestawu *AmpliScribe™ T7-Flash™ High Yield Transcription Kit* (Lucigen). Przed skompletowaniem mieszaniny reakcyjnej przygotowano mieszaninę nukleotydów GTP, CTP, ATP i UTP w równych objętościach o stężeniu [25 mM]. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiony został w tabeli poniżej.

Tabela 12. Skład mieszaniny do reakcji transkrypcji.

Odczynnik	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej	Dodawana objętość
Woda wolna od nukleaz		7,5 μL (12,5 μL)*
Bufor reakcyjny <i>T7 Reaction Buffer</i> [10x]	[1x]	4 μL
Mieszanina nukleotydów <i>NTP Mix</i> [25 mM]	[7,5 mM]	12 μL
DTT [100 mM]	[10 mM]	4 μL
Matryca DNA po PCR		10 μL (5 μL)*
Polimeraza T7		2,5 μL
		Całkowita objętość = 40 μL

* Objętości wody i matrycy DNA podane w nawiasie oznaczają objętości jakie dodawano początkowo dla aptamerów DNA, na późniejszym etapie badań, w celu zwiększenia wydajności reakcji zwiększono objętość matrycy DNA kosztem wody.

Reakcja przeprowadzona była w probówkach umieszczonych w bloku grzejnym *TDB-120, Dry block thermostat* (Biosan) w temperaturze 37°C przez 4 godziny dla aptamerów RNA. W dalszym etapie badań, dla otrzymania mutantów RNA, w celu zwiększenia ilości otrzymanego produktu, czas reakcji został wydłużony do 10 godzin. Po zakończeniu reakcji, celem usunięcia DNA, do próbki dodawane były 2 µL DNAzy (Lucigen), po czym próbki inkubowano w 37°C przez 15 min.

3.2.3.6. Elektroforeza RNA w żelu poliakrylamidowym

W celu oczyszczenia RNA po transkrypcji stosowano metodę elektroforezy w denaturującym żelu poliakrylamidowym. Przygotowywano 8% żel poliakrylamidowy o grubości 1 mm o składzie podanym w sekcji 3.1.2. Przed nałożeniem próbek na żel przeprowadzana była faza wstępną 280 V, 40 mA przez 30 min. Następnie do 40 µL mieszaniny potranskrypcyjnej dodawano 40 µL buforu obciążającego [2x] o składzie podanym w sekcji 3.1.1 i próbki наносono do kieszonek żelowych po 40 µL na jeden dołek. Rozdział prowadzony był w buforze TBE, zwykle przez 3-4 godziny, przy napięciu 300 V i natężeniu 40 mA. Po zakończeniu elektroforezy fragmenty żelu zawierające RNA były wizualizowane przez oświetlanie lampą UV (254 nm) i zaznaczane.

3.2.3.7. Elucja RNA z żelu

W celu elucji RNA z żelu, obszary żelu zawierające RNA były wycinane, rozdrabniane i zalewane 1 mL NaOAc [0,3 M]. Próbki były zamrażane (-20°C) przeważnie do następnego dnia lub od razu poddawane wytrząsaniu. Kawalki żelu były wytrząsane co najmniej 6/8 godzin w 4°C na wytrząsarce termicznej (VWR). Po zakończeniu wytrząsania, próbki odwirowywano (1000 x g, 4°C, 1 min). Supernatant był odciągany i filtrowany w kolumie filtracyjnej Spin-X (Costar) w czasie ultrawirowania (16.000 x g, 4°C, 1 min). Przesącz zbierany był do osobnych probówek i poddawany precypitacji. Reszta żelu w próbówce zalewana była 0,5 mL NaOAc [0,3M] i zamrażana.

3.2.3.8. Precypitacja RNA

W celu wytrącenia RNA po elucji z żelu, do każdej próbki (ok. 480 µL) zawierającej RNA w NaOAc dodawano 1 µL glikogenu [20 mg/mL] oraz 1,5 mL zimnego (4°C) etanolu [99,9%]. Następnie próbki były mieszane i zamrażane (-20°C) przeważnie na noc lub co najmniej na 3/4 godziny. Po precypitacji próbki były odwirowywane (14.000 x g, 4°C, 15-30 min) i supernatant odciągano. Pozostały osad zawierający RNA był przepłukiwany 20 µL etanolu [70%], po czym alkohol był odciągany, a próbka pozostawiana na kilka minut do odparowania resztek alkoholu. Ostatecznie RNA było zawieszane w 20 µL H₂O HPW i przechowywane w zamrożeniu (-20°C).

3.2.3.9. Oznaczanie czystości i stężenia otrzymanych transkryptów RNA

Czystość oraz stężenie otrzymanego RNA były oznaczane z wykorzystaniem spektrometru V-550 (Jasco). Przeprowadzany był pomiar widma absorbancji roztworu RNA w zakresie długości fal 220-320 nm oraz pomiar punktowy wartości absorbancji przy długościach fal

260, 280 i 320 nm. Otrzymane wartości absorbancji korygowane były o wartości tła (H₂O HPW).

Czystość RNA wyznaczana była jako stosunek wartości absorbancji przy długości fali 260 nm (A_{260}) do wartości absorbancji przy długości 280 nm (A_{280}).

$$\text{Czystość RNA} = A_{260}/A_{280} \quad (1)$$

W celu oznaczenia stężenia RNA najpierw obliczana była masa RNA (m_{RNA}) ze wzoru:

$$m_{\text{RNA}} = A_{260} * 40 \mu\text{g/mL} * D * V \text{ mL} \quad (2)$$

gdzie:

A_{260} – to wartość absorbancji przy długości fali $\lambda = 260$ nm

40 $\mu\text{g/mL}$ – to stężenie RNA, przy którym $A_{260} = 1$

D – rozcieńczenie próbki (150-krotne)

V – objętość próbki RNA (20 μL)

Następnie wyliczono masę molową RNA (M_{RNA}) ze wzoru:

$$M_{\text{RNA}} \text{ g/mol} = (X \text{ nt} + 20_{\text{P1}} + 21_{\text{P2}}) * 340 \text{ g/mol*nt} \quad (3)$$

gdzie:

X nt – to liczba nukleotydów odcinka losowego dla danego RNA

20_{P1} i 21_{P2} – liczby nukleotydów w odcinkach stałych na końcach 5' i 3'

340 g/mol*nt – masa jednego nukleotydu

Liczba moli (n) RNA obliczana była ze wzoru:

$$n = m / M \quad (4)$$

gdzie:

m [g] – masa RNA

M [g/mol] – masa molowa RNA

Wreszcie na podstawie powyższych danych można było obliczyć stężenie RNA (C_{RNA}) ze wzoru:

$$C_{\text{RNA}} = n / V \quad (5)$$

gdzie:

n [mol] – liczba moli RNA

V [litr] – objętość próbki z RNA

Zestawienie wyznaczonych stężeń i czystości aptamerów wraz z datami transkrypcji zestawiono poniżej w Tabeli 13.

Tabela 13. Stężenia aptamerów RNA po transkrypcji

Dla niektórych aptamerów powtarzano transkrypcję jeśli otrzymane stężenie RNA było bardzo niskie, lub gdy otrzymana porcja RNA została wykorzystana.

Nr RNA	Data transkrypcji	Liczba nukleotydów	Czystość RNA	Masa [μg]	Masa molowa [g/mol]	Liczba moli [pmol]	Stężenie [μM]
10	22.11.2019	70	1,5	47,0	37740	1245	62,3
10	13.04.2022	111	1,5	46,4	37740	1230	61,5
13	22.11.2019	50	1,7	39,2	30940	1266	63,3
19	03.06.2019	70	2,3	26,8	37740	709	35,4
20	20.08.2019	70	1,7	12,5	37740	330	16,5
24	26.04.2019	70	1,7	34,1	37740	903	45,2
24	22.11.2019	70	1,6	94,4	37740	2502	125,1
34	30.11.2018	50	1,6	16,1	30940	521	26,0
54	26.04.2019	50	1,5	17,6	30940	570	28,5
59	22.11.2019	51	1,6	39,6	31280	1267	48,7
64	03.06.2019	49	1,5	39,4	30600	1289	64,4
78	15.12.2018	50	1,3	3,0	30940	97	9,7
78	15.12.2018	50	1,6	5,9	30940	191	19,1
90	22.11.2019	50	1,7	42,8	30940	1382	69,1
90	14.12.2021	91	1,7	33,2	30940	1074	53,7
93	03.06.2019	70	1,6	8,8	37740	233	11,6
93	22.11.2019	70	1,6	33,4	37740	885	44,3
102	22.11.2019	50	1,5	29,7	30940	961	48,1
109	22.11.2019	50	1,4	56,0	30940	1809	90,5
111	12.12.2021	78	1,8	6,5	26520	245	12,3
111	14.12.2021	78	1,5	4,5	26520	170	8,5
119	13.04.2022	49	1,3	44,6	30600	1457	72,9
145	12.12.2021	72	1,6	14,6	24480	597	29,9
145	13.04.2022	72	1,5	40,5	24480	1654	82,7
146	20.08.2019	50	1,6	17,9	30940	578	28,9
157	14.02.2019	50	1,4	30,6	30940	988	49,4

3.2.4. Przygotowanie mutantów RNA

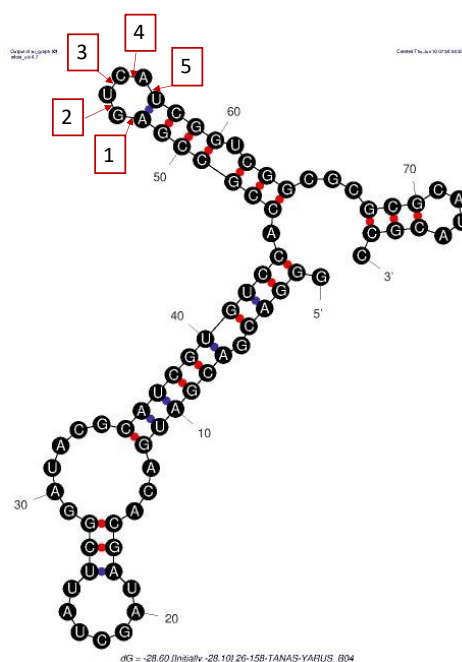
W celu porównania wartości powinowactwa do błon tratwowych aptamerów oraz mutantów tych aptamerów o zmienionej liczbie motywów RNA, przygotowano dwie grupy mutantów:

- (1) grupa – powstała na bazie sekwencji aptamerów RNA zawierających motywy RNA, gdzie w mutantach dany motyw (lub motywy) był modyfikowany,
- (2) grupa – powstała, na bazie sekwencji RNA nie zawierających motywów RNA, gdzie dany motyw był wstawiany

3.2.4.1. Zaprojektowanie mutantów RNA

Mutanty z pierwszej grupy zostały zaprojektowane na bazie trzech badanych wcześniej aptamerów (RNA 13, 90 i 102), które charakteryzowały obecnością kilku motywów RNA i we wstępnych badaniach wykazywały się stosunkowo dobrym poziomem oddziaływania z błonami tratwowymi (sekcja 4.4). Oryginalne sekwencje RNA zawierające motywy RNA były modyfikowane, w ten sposób aby zaburzyć sekwencję danego motywu RNA. Modyfikacje polegały na: substytucji nukleotydem adeninowym od jednego do 4 nukleotydów z motywu RNA, lub delecji od 1 do 4 nukleotydów z motywu. Poszukiwane były zmodyfikowane oligonukleotydy, które zachowywały podobną przewidywaną strukturę 2-rzędową co oryginalny aptamer.

Jeśli chodzi o drugą grupę mutantów, z bazy aptamerów wybrano początkowo 5 aptamerów RNA bez motywów tratwowych i bez motywów egzosomalych: RNA 111, 133, 145, 152, 158 oraz dodatkowo RNA 10 (spośród badanych aptamerów RNA), który we wstępnych badaniach wykazywał słabe powinowactwo do tratw (sekcja 4.4). Do RNA wstawiane były 4 główne motywy tratwowe CCCU, UCCC, CUCC, UUGU oraz motyw egzosomalowy GGAG, a także w przypadku RNA 10, motywy 5-nukleotydowe: UCCCU i CUCUU. Każdy motyw wstawiany był do fragmentu pętli spinki do włosów, między każde dwa kolejne nukleotydy z pętli. Przykładowe miejsca wstawiania motywów przedstawiono na rysunku poniżej. Jeśli dla oryginalnego aptameru RNA istniały różne przewidziane warianty struktury 2-rzędowej i pętli spinki różniły się, to wybierano warianty gdzie wstawiane motywy znajdowały się zawsze w pętli przynajmniej w dwóch pierwszych wariantach strukturalnych.



Rysunek 13. Przykładowe miejsca wstawiania motywów RNA do pętli.

Numerami 1-5 oznaczono miejsca wstawiania motywów między dwa sąsiadujące nukleotydy.

Ostatecznie do badań z wybrano mutanty pochodzące od 6 oryginalnych aptamerów: RNA 13, 90 i 102 dla zaburzania motywów oraz RNA 10, 111 i 145 dla wstawiania motywów, gdzie motywy wstawiane do pętli w fałdowaniach oryginalnych aptamerów, utrzymywały się nadal w pętli także w mutantach.

3.2.4.2. Przygotowanie mutantów do badań

Po zaprojektowaniu mutantów RNA, zostały one zamówione jako oligonukleotydy DNA o sekwencji odwrotnie komplementarnej i zsyntezowane przez firmę Integrated DNA Technologies, BVBA (Belgia). Dostarczone zostały w formie zliofilizowanej z oznaczoną przez producenta liczbą moli. Jako że z kontrolnych pomiarów stężeń starterów wynikało, iż faktyczna liczba moli DNA jest niższa niż ta podana w karcie charakterystyki, przyjęto że liczba moli jest połową niższą niż podana w karcie charakterystyki. Do oryginalnej probówki dodawano odpowiednią objętość H₂O HPW, tak aby uzyskać roztwory wyjściowe mutantów DNA o stężeniu [100 μM]. Następnie przygotowywano roztwory pośrednie o stężeniu [500 nM]. Te stężenia służyły następnie do przygotowania mieszaniny reakcyjnej PCR.

Mutanty DNA, poddawane były amplifikacji w reakcji PCR, dostarczając w ten sposób matryc DNA dla reakcji transkrypcji. Parametry reakcji zostały już podane w sekcji 3.2.3 przy omawianiu przygotowywania aptamerów RNA.

Transkrypcja przeprowadzana była według takiej samej procedury jak w przypadku aptamerów RNA (sekcja 3.2.3.5). Transkrypty oczyszczano w procesie elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, eluowano RNA z żelu i wytrącano według tej samej procedury jak w przypadku aptamerów RNA. Następnie oznaczane było stężenie otrzymanego RNA. Poniżej znajduje się tabela mutantów wraz oznaczonymi stężeniami. Oczyszczone RNA przechowywane było w jako roztwór w H₂O HPW.

Tabela 14. Stężenia mutantów RNA po transkrypcji

Kontynuacja tabeli na następnej stronie.

Numer RNA	Data transkrypcji	Liczba nukleotydów	Czystość RNA	Masa RNA [μg]	Masa molowa [g/mol]	Liczba moli [pmole]	Stężenie [μM]
10A	13.04.2022	111	1,42	86,46	37740	2291	114,5
10B	13.04.2022	114	1,35	74,44	38760	1920	96,0
10C	13.04.2022	112	1,34	77,45	38080	2034	101,7
10D	13.04.2022	112	1,32	69,64	38080	1829	91,4
13A	22.10.2021	91	1,89	103,85	30940	3356	167,8
13B	22.10.2021	90	1,67	77,94	30600	2547	127,4
90A	14.12.2021	91	2,81	42,89	30940	1386	69,3
90B	14.12.2021	89	1,65	21,89	30260	723	36,2
90C	14.12.2021	89	1,67	14,57	30260	481	24,1
102A	22.10.2021	91	1,58	85,60	30940	2767	138,3
102B	22.10.2021	91	1,71	98,93	30940	3197	159,9
102C	22.10.2021	89	1,71	163,84	30260	5414	270,7
102D	22.10.2021	87	1,66	142,94	29580	4832	241,6
111A	12.12.2021	94	1,58	92,52	31960	2895	144,7
111B	12.12.2021	95	1,52	37,58	32300	1164	58,2
111C	12.12.2021	94	1,49	25,88	31960	810	40,5
111D	12.12.2021	95	1,85	59,72	32300	1849	92,5
111E	12.12.2021	95	1,5	44,26	32300	1370	68,5
111F	12.12.2021	95	1,59	24,37	32300	755	37,7

111G	12.12.2021	94	1,63	95,63	31960	2992	149,6
145A	13.04.2022	89	1,66	3,70	30260	122	6,1
145B	13.04.2022	89	1,49	33,70	30260	1114	55,7
145C	13.04.2022	89	2,31	0,86	30260	28	2,8
145C	27.06.2022	89	1,71	80,97	30260	2676	133,8
145D	11.07.2022	89	1,84	51,35	30260	1697	84,8
145E	11.07.2022	89	1,76	61,09	30260	2019	100,9

3.2.5. Preparacja liposomów

W celu przeprowadzenia badań oddziaływania RNA z błonami pęcherzyków lipidowych przygotowano dwie pule dużych jednowarstwowych liposomów (LUV – ang. Large Unilamellar Vesicles) o stężeniu lipidów 20 mM z sondą Lizamina Rodamina B [0,2 % mol] :

- (1) LUV_{RAFT} – Duże jednowarstwowe liposomy, które składały się z DOPC, sfingomieliny oraz cholesterolu w stosunku molowym odpowiednio 6:3:1. Liposomy te stanowiły modele błony imitujące składem tratwy lipidowe. Skład tej puli liposomów został wybrany na podstawie badań prof. Teresy Janas [Janas i in., 2006], gdzie właśnie ten stosunek molowy trzech lipidów (DOPC, SM i Chl) wykazywał maksymalny poziom oddziaływania RNA-błona.
- (2) LUV_{DOPC} – Duże jednowarstwowe liposomy złożone z samej DOPC, służyły jako modele błony nie-tratwowej. Pula ta stanowiła kontrolę przy analizie znaczenia tratw lipidowych w oddziaływaniu z RNA z błonami.

W toku badań kilkakrotnie przygotowywano liposomy w objętości 0,5 mL metodą hydratacji cienkiego lipidowego filmu i ekstruzji. Opis preparatyki liposomów obejmował przedstawione poniżej etapy:

1. Do okrągłodennej probówki 2 mL pobierano odpowiednie objętości roztworów DOPC, sfingomieliny i cholesterolu (dla liposomów tratwowych) lub jedynie DOPC (dla liposomów DOPC), tak by stężenie lipidów wynosiło 20 mM.
2. Dodawano roztwór sondy Lizamina Rodamina B (LissRh-PE), tak aby jej stężenie wynosiło 0,2 % mol.
3. Probówkę z roztworami lipidu(-ów) i sondy umieszczano pod strumieniem azotu, do momentu odparowania rozpuszczalników.
4. Osadzony na dnie film lipidowy zawieszano w 0,5 mL ogrzanego (60°C) buforu RNA i inkubowano w temperaturze 60°C przez 3 minuty. Następnie próbkę wytrząsano ręcznie około 30 s, tak aby cząsteczki lipidów mogły oderwać się od dna probówki, tworząc dwuwarstwowe pęcherzyki wielowarstwowe (MLV – ang. Multi Lamellar Vesicles).
5. Następnie próbkę poddawano działaniu pięciu cykli zamrażania-rozmrażania poprzez zanurzenie w ciekłym azocie lub umieszczenie w zamrażalce oraz ogrzewanie w bloku grzejnym do 60°C i zworteksowanie.
6. Duże jednowarstwowe pęcherzyki (LUV) przygotowywano poprzez ekstruzję (15 cykli) przy użyciu mini-ekstrudera Avanti MiniExtruder (Avanti Polar Lipids) z filtrem Millipore Ultrafree-MC Centrifugal Filter Devices (VWR) o średnicy porów

100 nm. Rozmiar średnicy porów filtra został wybrany w celu upodobnienia wielkości powstałych pęcherzyków do średniej wielkości egzosomów.

Przygotowane liposomy LUV_{RAFT} i LUV_{DOPC} z sondą LissRh-PE, były porcjowane po 5,5 µL (objętość potrzebna na jedną serię pomiarową) i przechowywane w zamrażalce. Dla pomiarów kontrolnych, przygotowano również dwie dodatkowe pule LUV_{DOPC} i LUV_{RAFT} bez sondy fluorescencyjnej według takiej samej procedury jak wyżej (z pominięciem punktu 2).

3.2.6. Znakowanie i oczyszczanie egzosomów

3.2.6.1. Izolacja egzosomów

Egzosomy izolowane były z surowicy cielęcej (CBS – ang. calf bovine serum) (ThermoFisher Scientific) metodą wirowania różnicowego [Sapoń i in., 2020]. Procedura izolacji przeprowadzana była w Zakładzie Cytobiochemii, Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego przez dr Karolinę Sapoń. Izolacja obejmowała trzy etapy: (1) wirowanie próbki surowicy (30 mL) przez 20 minut z prędkością 2 tys x g. zakończone usunięciem pelletu i zebraniem supernatantu do dalszych kroków; (2) wirowanie supernatantu (zawiesina pęcherzyków) przez 18 godzin przy 126 tys. x g., zakończone usunięciem supernatantu i zawieszeniem osadu z pęcherzykami w buforze PBS, worteksowanie próbki przez godzinę; (3) ultrawirowanie przez 70 minut przy 126 tys. x g w 4°C, zakończone ponownym usunięciem supernatantu i zawieszeniem pelletu w 80 µL buforu PBS i zworteksowaniem. Tak przygotowana próbka była transportowana w pojemniku chłodzącym (ok. 4°C) do Opola i poddawana dalszym procedurom.

3.2.6.2. Inkubacja egzosomów z sondami

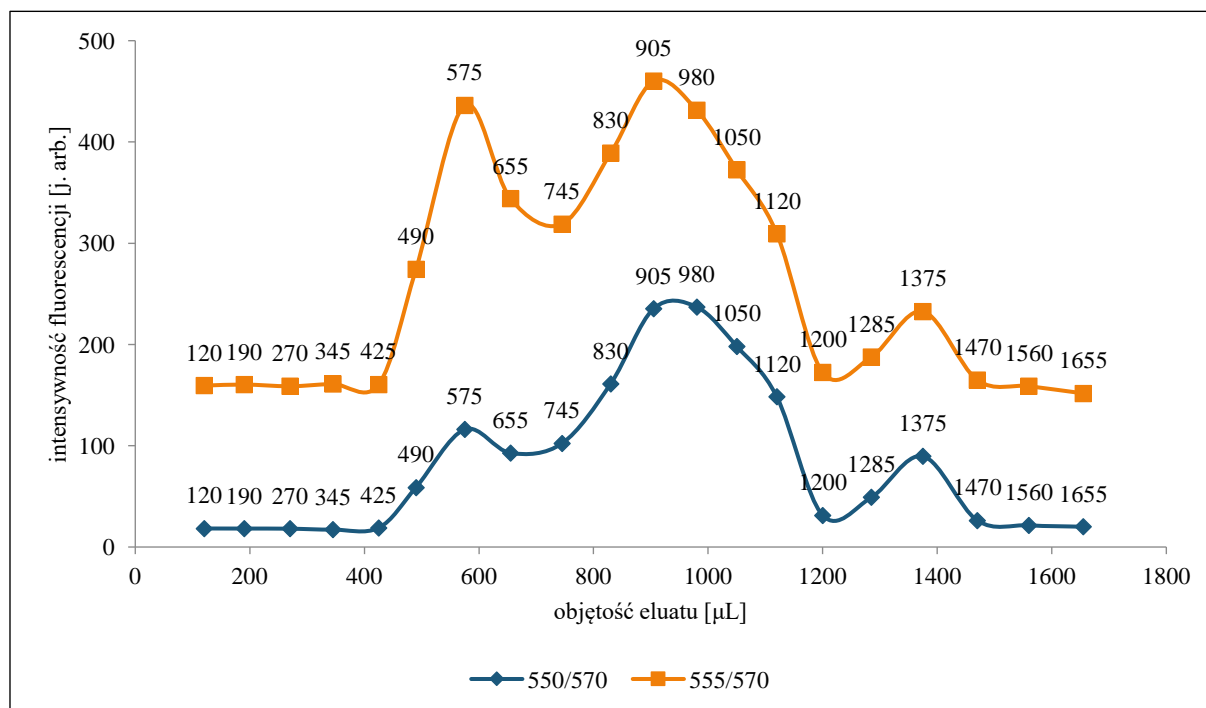
Po dostarczeniu egzosomów do laboratorium, pęcherzyki te były znakowane dwoma sondami fluorescencyjnymi CTB-555 i fDiI. Do zawiesiny egzosomów dodawano najpierw porcję sondy CTB-555 [200 µg/mL] tak aby końcowe stężenie sondy w 80 µL próbki wynosiło 2 µg/mL i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej, w ciemności. Następnie do tej samej próbki dodawano sondę fDiI [80 µM] (końcowe stężenie sondy 1 µM – przy pomiarach z aptamerami RNA i 2 µM – przy pomiarach z mutantami) i inkubowano 60 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Po inkubacji, jeśli nie było możliwe wykonanie kolejnych etapów od razu, próbki były przechowywane do następnego dnia w lodówce.

3.2.6.3. Oczyszczanie egzosomów

W celu usunięcia małych kompleksów białkowo lipidowych, a także pozostałości nie związanych sond przeprowadzano filtrację żelową próbki po inkubacji z sondami. Kolumna filtracyjną (1 mL) była wypełniana złożem Sephacryl S-1000 (Sigma-Aldrich) i przepłukiwana buforem RNA. Przed nałożeniem właściwej próbki, kolumnę wysycano dodając 40 µL

liposomów LUV_{DOPC} bez sond (dla pomiarów z mutantami; we wcześniejszych pomiarach z aptamerami RNA nie wysycano kolumny)*.

Właściwa próbka izolatu egzosomów z sondami była nanoszona na górę kolumny w objętości 40 μL i eluowana buforem RNA. Zbierano 15 frakcji eluatu po 2 krople (ok. 80 μL) i oznaczano dokładną objętość każdej frakcji. W przypadku stwierdzenia objętości poniżej minimalnej objętości pomiarowej, próbkę uzupełniano dodając buforu RNA do wymaganej objętości 80 μL . Profil elucji określano mierząc poziom fluorescencji (pomiar punktowy program Advanced Reeds, Slit 10,10) przy odpowiednich dla używanych sond długościach fal wzbudzenia i emisji. Przykładowy profil elucji przedstawiono na poniższym wykresie.



Rysunek 14. Profile elucji egzosomów.

Wykres przedstawia wartości poziomu fluorescencji otrzymanej dla pomiarów kolejnych frakcji eluatu, dla ustawionej wartości fal wzbudzenia i emisji sondy CTB-555 (wykres pomarańczowy 555/570) oraz fDiI (wykres niebieski 550/570). Pomiarów wykonywano początkowo w parametrach każdej z sond oddzielnie (tak jak na wykresie), jednak ze względu na wyraźniejszy sygnał dla wartości 555/570, ograniczono pomiary do tych wartości wzbudzenia i emisji.

Wzrost fluorescencji w okolicach 450 – 650 μL świadczy o obecności egzosomów ze związanymi sondami (frakcje numer 6-8). Ponowny wzrost fluorescencji przy objętościach powyżej 700 μL to frakcje zawierające niezwiązaną sondę. Frakcje egzosomowe (zwykle 3) zbierano razem i poddawano końcowemu ultrawiroowaniu w kolumnkach Spin-X z filtrem o wielkości porów 0,22 μm . Próbkę w kolumnkach wirowano 2 minuty przy 2 tys. x g w temperaturze pokojowej. Otrzymaną zawiesinę egzosomów w buforze RNA wykorzystywano następnie do badań oddziaływania błon egzosomów z RNA.

* Wysycanie kolumny liposomami bez sond zastosowano w celu zwiększenia odzysku oczyszczonych egzosomów po filtracji, jednak nie zaobserwowano znaczących różnic przy braku lub stosowaniu wysycania.

3.2.7. Pomiary kontrolne

3.2.7.1. Dobór zakresu stężeń lipidów dla miareczkowania liposomami

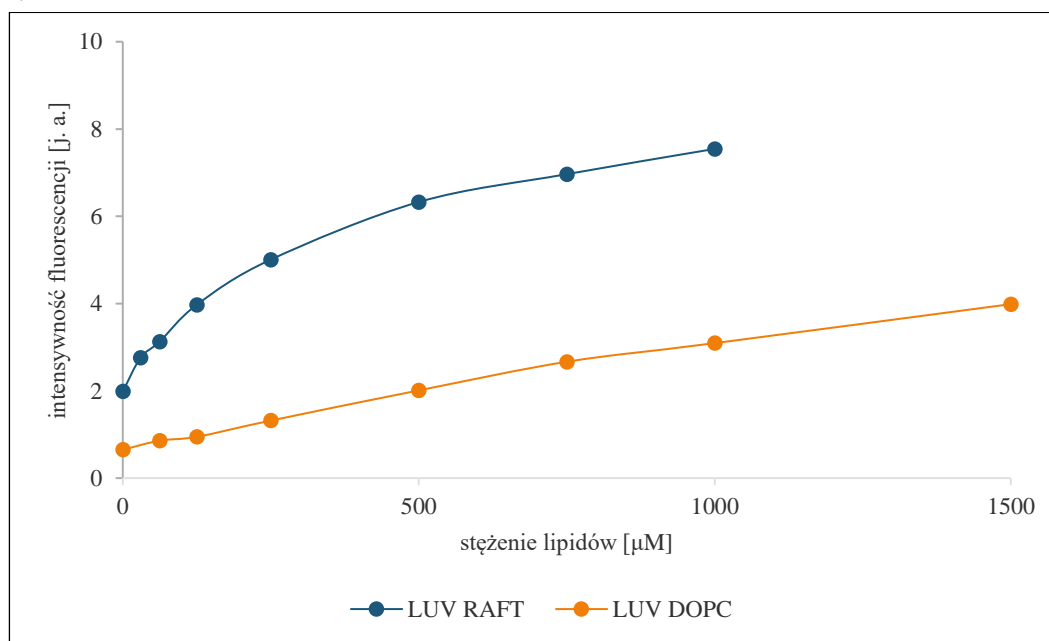
Procedura pomiarowa oddziaływań RNA- błona liposomów miała obejmować miareczkowanie stałego stężenia RNA, liposomami we wzrastającym szeregu stężeń lipidów liposomowych, tak więc podawane stężenia LUV_{RAFT} oraz LUV_{DOPC} będą się odnosić do stężenia lipidów, które budują błony tych liposomów. Przeprowadzono wstępne pomiary oddziaływania aptameru 64 RNA z błonami LUV_{RAFT} oraz LUV_{DOPC} w zakresie stężeń 62,5 μM – 1 mM (6 punktów pomiarowych ze wzrastającym stężeniem lipidów). Wyznaczona wartość stałej dysocjacji K_D była kilkakrotnie niższa dla oddziaływania RNA z liposomami tratwowymi, stąd dla wypośrodkowania zakresu mierzonych stężeń względem wartości K_D , dodano dla liposomów tratwowych dodatkowy punkt pomiarowy o najniższym stężeniu lipidów [30 μM] oraz dodatkowy punkt o najwyższym stężeniu [1,5 mM] dla pomiarów z liposomami DOPC. Ostatecznie stężenia lipidów dla 7 punktów pomiarowych miareczkowania liposomami wyniosły:

(1) LUV_{RAFT} = [30 μM , 62,5 μM , 125 μM , 250 μM , 750 μM i 1 mM]

(2) LUV_{DOPC} = [62,5 μM , 125 μM , 250 μM , 750 μM , 1 mM i 1,5 mM]

3.2.7.2. Kontrola wartości pozornej fluorescencji liposomów

W celu określenia wartości korekty dla właściwych pomiarów spektrofluorymetrycznych, przeprowadzono pomiary pozornej fluorescencji liposomów bez sond fluorescencyjnych. Analizy wykonano dla szeregu stężeń lipidów i w zakresie długości fal odpowiadających właściwym pomiarom oddziaływania RNA z liposomami (sekcja 3.2.8.2). Poniższy wykres przedstawia zmiany wartości pozornej fluorescencji w zależności od stężenia lipidów [0 – 1,5 mM] dla liposomów LUV_{RAFT} i LUV_{DOPC} przy długości fal wzbudzenia i emisji używanych w pomiarach.



Rysunek 15. Wykres zmian pozornej fluorescencji liposomów

Uzyskane wartości pozornej fluorescencji były odejmowane od wartości fluorescencji we właściwych pomiarach oddziaływania RNA z liposomami.

3.2.7.3. Kontrola sond fluorescencyjnych

W celu pomiaru oddziaływania błon lipidowych z cząsteczkami RNA potrzeba było dobrać sondy fluorescencyjne dla dwóch układów pomiarowych:

- (1) Aptamerów RNA i mutantów RNA z błonami liposomów
- (2) Aptamerów RNA i mutantów z egzosomami

Na wstępie przeprowadzono kontrolne pomiary optymalnych długości fal wzbudzenia (λ_{wz}) i emisji (λ_{em}) sond fluorescencyjnych, przy użyciu spektrofotometru fluorescencyjnego *Varian Cary Eclipse* (Agilent Technologies) w programie SCAN. Procedurę pomiarów podano poniżej na przykładzie próbki pomiarowej z sondą LissRh-PE

1. Pomiar widma emisji sondy przy optymalnych wartościach fali wzbudzenia (λ_{wz}) i emisji (λ_{em}) podanych przez producenta ($\lambda_{wz} / \lambda_{em} = 560/580$ nm):
 - Parametry pomiaru: $\lambda_{wz} = 560$ nm, zakres fal mierzonej emisji (λ_{em}) = 570-680 nm,
 - Wynik: maksymalna wartość przy $\lambda_{em} = 590$ nm (intensywność 606 j.a.)
2. Pomiar widma wzbudzenia dla otrzymanej wartości λ_{em} :
 - Parametry pomiaru: $\lambda_{em} = 590$ nm, zakres fal mierzonego $\lambda_{wz} = 480 - 580$ nm
 - Wynik: maksymalna wartość przy $\lambda_{wz} = 571$ nm (intensywność 838 j.a) (przyjęto $\lambda_{wz} 570$ nm)
3. Pomiar ostatecznego widma emisji dla otrzymanej wartości λ_{wz} :
 - Parametry pomiaru: $\lambda_{wz} = 570$, zakres fal mierzonej $\lambda_{em} = 580-680$ nm
 - Wynik: maksymalna wartość przy $\lambda_{em} = 590$ nm (intensywność 815 j.a)

Tak więc dla sondy LissRh-PE optymalne wartości fal wzbudzenia i emisji wyniosły $\lambda_{wz} / \lambda_{em} = 570/590$ nm. Jeśli długości różniły się od podanych przez producenta lub w literaturze, do dalszych pomiarów przyjęto te uzyskane eksperymentalnie. Ostateczne długości fal wzbudzenia i emisji zestawiono w tabeli poniżej.

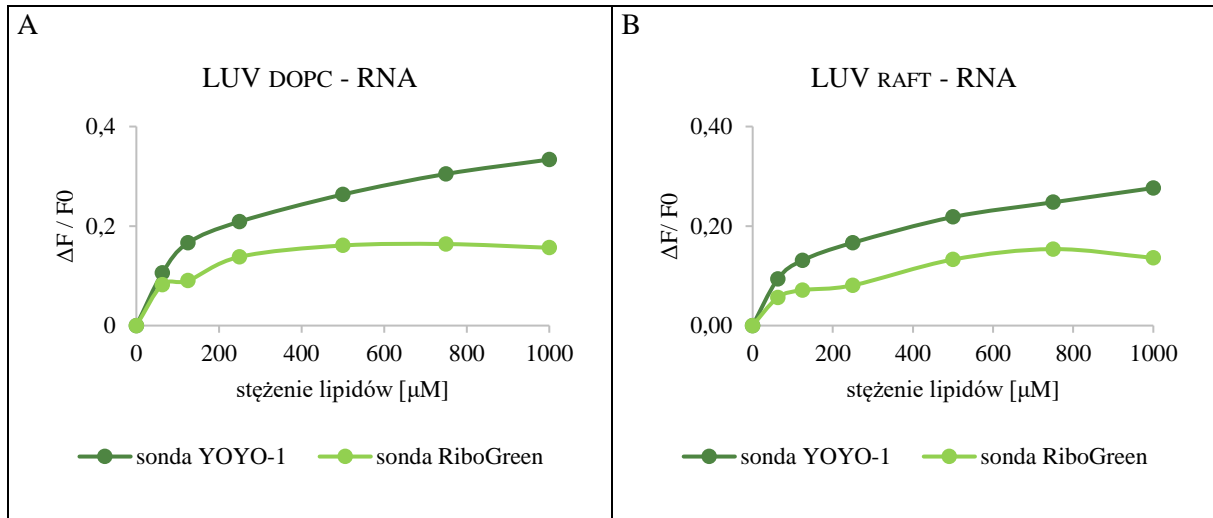
Tabela 15. Długości fal wzbudzenia i emisji używanych sond fluorescencyjnych

Sonda	Długości fal wzbudzenia/ emisji [nm]
YOYO-1	466/511 (pomiary aptamerów RNA) 483/513 (pomiary mutantów RNA)*
RiboGreen	500/520
fDiI	550/570
CTB-555	555/570
LissRh-PE	570/590
SYTO 61	620/645

W celu wyboru najlepszej sondy do znakowania RNA dla układu z liposomami, przeprowadzono kontrolne pomiary oddziaływania aptameru RNA o numerze 64 z sondą RiboGreen oraz sondą YOYO-1. Wykresy na Rysunku 16. przedstawiają zmianę fluorescencji YOYO-1

* Dla sondy YOYO-1 dla pomiarów z aptamerami RNA przyjęto wartości literaturowe 466/511. Przed rozpoczęciem pomiarów mutantów RNA przeprowadzono dodatkową kontrolę nowej sondy YOYO-1 i przyjęto otrzymane wartości $\lambda_{wz} / \lambda_{em} = 483/513$

oraz RiboGreen podczas miareczkowania RNA 64 liposomami DOPC (A) i liposomami trawowymi (B).

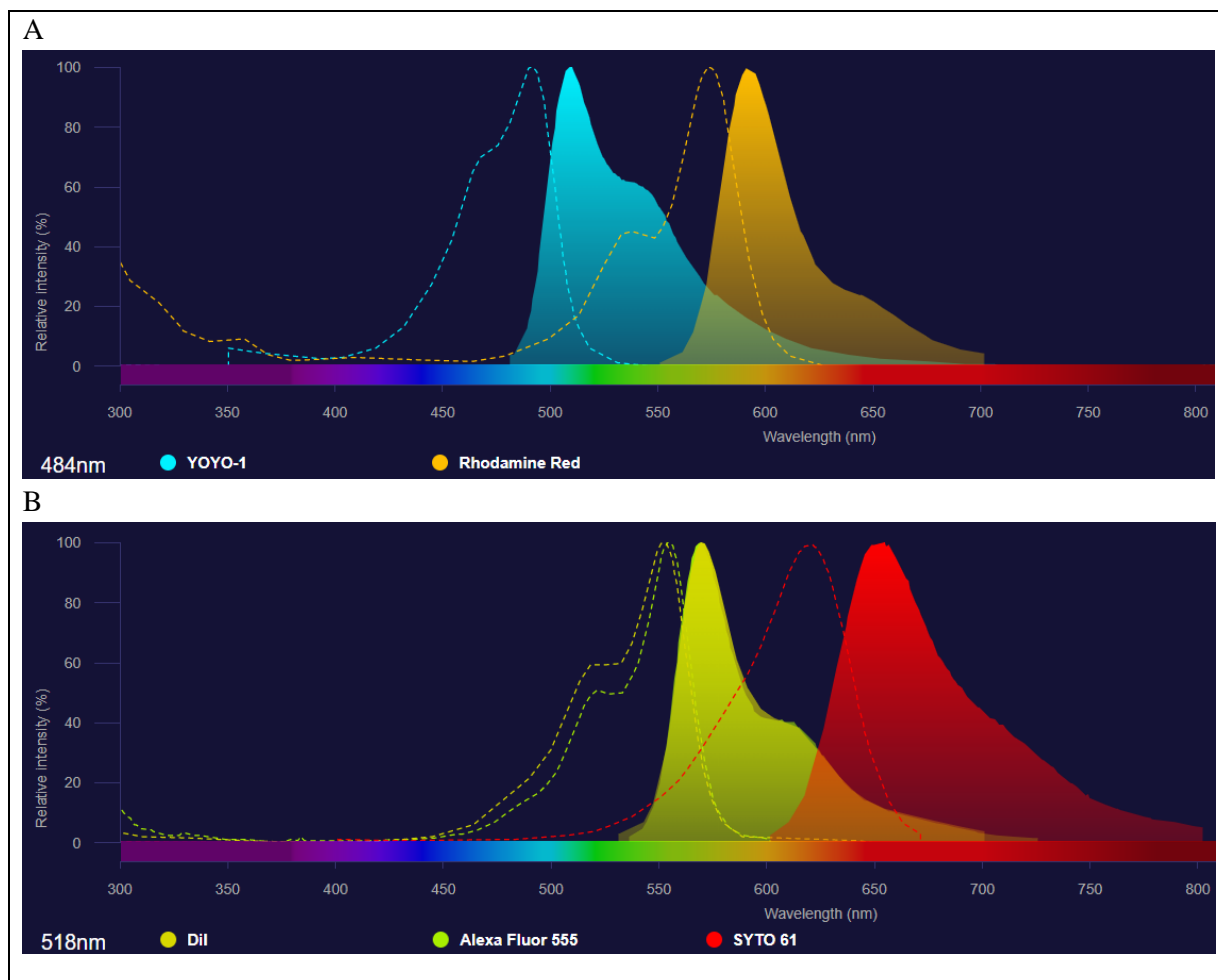


Rysunek 16. Porównanie zmian fluorescencji sond RNA w trakcie miareczkowania liposomami.

Zmiany fluorescencji są wartościami średnimi uzyskanymi dla trzech powtórzeń serii kontrolnej. F_0 to maksymalna wartość fluorescencji sondy przez dodaniem pierwszej porcji liposomów.

W wyniku przeprowadzonych kontroli stwierdzono, że sonda YOYO-1 wydaje się bardziej stabilna i daje większy sygnał po związaniu się z RNA, dlatego tę sondę wybrano do dalszych pomiarów oddziaływania aptamerów RNA z błonami.

Dla badań oddziaływania RNA z egzosomami, w związku z niewielką ilością izolowanych egzosomów, w celu wzmocnienia sygnału, zastosowano układ dwóch sond związanych z boną egzosomów: sondę CTB 555 wiążącą się do gangliozydu GM1 na powierzchni błony egzosomów oraz sondę fDiI wiążącą się do fazy hydrofobowej błony. Ostateczne układy pomiarowe sond dla pomiarów RNA z liposomami i egzosomami przedstawiono na Rysunku 17.



Rysunek 17. Układy sond używanych w badaniach.

- A. Układ sond dla pomiarów oddziaływania aptamerów RNA / mutantów RNA z liposomami:
- Donor: sonda YOYO-1 – związana z RNA (aptamery / mutanty)
 - Akceptor: sonda LissRh-PE* – związana z błonami liposomów
- B. Układ sond dla pomiarów oddziaływania aptamerów RNA / mutantów z egzosomami:
- Donor: sondy CTB-555 i fDiI – związane z błonami egzosomów
 - Akceptor: sonda SYTO 61 – związana z RNA

Widma uzyskane w kreatorze widm na stronie Thermofisher [https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer#!/]

3.2.7.4. Wyznaczanie korekty crosstalk donora w układzie pomiarowym egzosomów z RNA

W celu wyznaczenia korekty fluorescencji donora (sondy CTB-555 i fDiI związane z błonami egzosomów) o wartość crosstalk akceptora (sonda SYTO 61 związana z RNA) przeprowadzono pomiary kontrolne. Celem było określenie jaki procent fluorescencji donora

* Kreator widm fluorescencji na stronie Thermofisher nie zawierał dostępnego wyboru sondy LissRh-PE dlatego na rysunku przedstawione jest widmo sondy Rhodamine Red, która charakteryzuje się bardzo podobnym widmem wzbudzenia i emisji co sonda LissRh-PE.

stanowi fluorescencja wynikająca z nakładania się widma akceptora (crosstalk). W tym celu wykonano następujące kroki:

1. Wykonano kontrolne pomiary fluorescencji próbki RNA z sondą SYTO 61 w kanale donora (555/570) i kanale FRET (555/645).
2. Wyniki skorygowane zostały o wartości uzyskane dla samego buforu.
3. Obliczono procent crosstalk jako stosunek wartości fluorescencji w kanale donora do wartości fluorescencji w kanale FRET: % crosstalk = F_{570}/F_{645} . Wartość wyznaczonej korekty wynosiła 0,3.

3.2.8. Pomiary fluorescencji i wyznaczenie stałej dysocjacji dla kompleksu RNA-liposomy

Schemat układu pomiarowego sond dla pomiarów oddziaływania RNA z liposomami składał się z:

- Donora: Sonda YOYO-1 związana z RNA
- Akceptora: sonda LissRh-PE związana z błonami liposomów

Próbka RNA o stałym stężeniu donora (YOYO-1) była miareczkowana liposomami zawierającymi akceptor (LissRh-PE).

3.2.8.1. Przygotowanie próbek do pomiarów

Bezpośrednio przed pomiarami przygotowywano odpowiednie rozcieńczenia używanych odczynników i fałdowano RNA. Procedura ta przebiegała według schematu podanego poniżej:

1. Przygotowanie rozcieńczeń liposomów z sondą.

Z porcji sporządzonych wcześniej liposomów LUV_{DOPC} z sondą LissRh-PE [20 mM] przygotowywano rozcieńczenie [10 mM] buforze RNA. W przypadku LUV_{RAFT} przygotowywano rozcieńczenia dodatkowo rozcieńczenie [5 mM].

2. Przygotowanie roztworu RNA

W zależności od stężenia RNA otrzymanego po transkrypcji, pobierano odpowiednią objętość RNA, tak aby otrzymać stężenie [2,75 μ M] w określonej objętości (10 μ L na jedną serię). Zwykle przygotowywano od razu 40 μ L roztwory RNA w H₂O HPW, na cztery powtórzenia pomiarowe, a porcje na kolejne serie przechowywano do pomiaru w lodówce.

3. Sfałdowanie RNA

W celu sfałdowania RNA 10 μ L roztworu RNA [2,75 μ M] było podgrzewanych w bloku grzejnym *TDB-120, Dry block thermostat* (Biosan) do 65°C przez 1 minutę. Po czym dodawano 1 μ L ciepłego buforu RNA 10x zawierającego jony dwuwartościowe. Próbkę była mieszana i pozostawiana w temperaturze pokojowej na 15 minut, w trakcie których RNA ulegało sfałdowaniu w trakcie schładzania roztworu.

3.2.8.2. Pomiary fluorescencyjne

Pomiary oddziaływania RNA z błonami lipidowymi były przeprowadzane z wykorzystaniem spektrofotometru fluorescencyjnego *Varian Cary Eclipse* (Agilent Technologies) i mikrokwety kwarcowej o minimalnej objętości pomiarowej 80 μL *. Badania oddziaływania aptamerów RNA z błonami liposomowymi prowadzone były w większości w programach „SCAN” i „Advanced Reeds” dla trzech aptamerów RNA (111, 119, 145) pomiary zostały przeprowadzone w programie „Kinetics”. Szczegółowe ustawienia parametrów pomiarów przedstawiono w poniższej tabeli.

Tabela 16. Parametry pomiarów dla badań oddziaływania RNA-liposomy.

Program	Pomiary	Parametry
SCAN	Pomiar widma fluorescencji donora przy zadanej długości fali wzbudzenia i zakresie fal emisji, mierzony dla każdego punktu pomiarowego.	Pomiar fluorescencji dla $\lambda_{\text{wz}} = 483$, $\lambda_{\text{em}} = 495\text{-}600$ Napięcie: 600 V (Voltage -Medium) Rozmiar szczelin (Slit): 5,5, Czas naświetlania: 120 nm/min (Slow) Temperatura: 20°C
Advanced Reeds	Pomiar punktowy przy zadanych długościach fal wzbudzenia i emisji, mierzony w trzech kanałach dla każdego punktu pomiarowego.	Pomiar fluorescencji w trzech kanałach: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Kanał donora 466/511 (483/513)† ▪ Kanał akceptora 570/590 ▪ Kanał FRET 466/590 (483/590) Napięcie: 600 V (Voltage -Medium) Rozmiar szczelin (Slit): 5,5, Czas naświetlania: 10 s Temperatura: 20°C
Kinetics	Pomiar pozwalający na stałe śledzenie wartości fluorescencji w trzech kanałach w trakcie miareczkowania liposomami.	Pomiar fluorescencji w 3 kanałach ($\lambda_{\text{wz}} / \lambda_{\text{em}}$): <ul style="list-style-type: none"> ▪ Kanał donora: 483 / 513 ▪ Kanał akceptora: 570 / 580 ▪ Kanał FRET: 483 / 590 Napięcie: 600 V (Voltage -Medium) Rozmiar szczelin (Slit): 5,5, Czas naświetlania: 10 s Temperatura: 20°C

Prowadzono pomiary fluorescencji w trzech kanałach przy stałym stężeniu RNA [0,25 μM] i związanej z nim sondy YOYO-1 [2,5 μM] przy wzrastającym stężeniu lipidów [30 μM – 1 mM] dla LUV_{RAFT} lub [62,5 μM – 1,5 mM] dla LUV_{DOPC}. Po dodaniu RNA do kwety pomiarowej (zawierającej sondę YOYO-1 w buforze RNA), próbkę inkubowano przez 15

* W celu uzyskania poprawnych pomiarów dla małej objętości próbki (80 -100 μL) adapter z kwetą został podniesiony o 1,1 cm poprzez podstawienie plastikowych podkładek.

† Przy pomiarach punktowych (Advanced Reeds) podane wartości $\lambda_{\text{wz}} / \lambda_{\text{em}}$ w kanale donora 466/511 odnoszą się do pomiarów aptamerów RNA, zaś podane w nawiasie 483/513 do pomiarów mutantów RNA, analogicznie w kanale FRET.

minut przed dodaniem pierwszej porcji liposomów. Po dodaniu każdej kolejnej porcji liposomów próbkę inkubowano 5 minut. W tabeli poniżej podano schemat procedury pomiarowej dla pomiarów kinetycznych oddziaływania RNA z LUV_{RAFT}.

Tabela 17. Schemat pomiarów oddziaływania RNA z liposomami

Podany w tabeli skrót L-LR odnosi się do dodawanej porcji liposomów z dołączoną sondą LissRh-PE

Lp	Dodawane objętości odczynnika [stężenie dodawanego odczynnika]	Stężenie lipidów w kuwecie pomiarowej	Przedziały czasowe punktów pomiarowych	Pomiary
FB	100 µL Buforu RNA	-	0-5 min	Pomiar fluorescencji w 3 kanałach (λ_{wz} / λ_{em}) : K. Donora: 483/ 513 K. Akceptora: 570/ 580 K. FRET: 483 / 590
FS	1 µL YOYO [250 µM]	-	5-10 min	
F0	10 µL RNA [2,5 µM]	0 µM	10-25 min	
F1	0,6 µL L-LR [5 mM]	30 µM	25-30 min	
F2	0,65 µL L-LR [5 mM]	62,5 µM	30 -35 min	
F3	0,63 µL L-LR [10 mM]	125 µM	35-40 min	
F4	1,25 µL L-LR [10 mM]	250 µM	40-45 min	
F5	2,25 µL L-LR [10 mM]	500 µM	45-50 min	
F6	1,25 µL L-LR [20 mM]	750 µM	50-55 min	
F7	1,25 µL L-LR [20 mM]	1 mM	55-60 min	

Zachodzące pomiędzy sondą RNA na sondą błonową zjawisko FRET było monitorowane jako spadek intensywności emisji donora (YOYO-1) przy rosnącym stężeniu akceptora (związany z błoną LissRh-PE).

3.2.8.3. Wyznaczanie stałej dysocjacji

Na podstawie pomiarów fluorescencyjnych obliczano stałą dysocjacji K_D kompleksu aptamer RNA-błona przy użyciu równania izotermi Langmuira [Janas i in., 2006; Sapoń i in., 2020]. Poniżej podano sposób wyprowadzenia wzoru dla obliczeń K_D .

Punktem wyjściowym było równanie izotermi Langmuira:

$$\Delta F = \Delta F_0 * (x / (K_D + x)) \quad (6)$$

gdzie:

ΔF_0 to maksymalna zmiana fluorescencji,

x - stężenie lipidów w błonach liposomów LUV_{DOPC} lub LUV_{RAFT},

K_D - to stała równowagi dysocjacji dla kompleksu błona-RNA.

Odwrotność równania:

$$1/ \Delta F = 1/\Delta F_0 * (K_D + x / x) \quad (7)$$

Przekształcenie równania do równania funkcji liniowej:

$$1/\Delta F = (1/\Delta F_0 * K_D/x) + (1/\Delta F_0 * x/x) \quad (8)$$

$$1/\Delta F = 1 * K_D / \Delta F_0 * x + 1/ \Delta F_0 \quad (9)$$

$$1/ \Delta F = K_D / \Delta F_0 * 1/x + 1/\Delta F_0 \quad (10)$$

Równanie funkcji liniowej

$$y = ax + b \quad (11)$$

Zestawienie równania (10) i (11) umożliwia wyznaczenie współczynników „a” i „b”:

$$1/ \Delta F = K_D / \Delta F_0 * 1/x + 1/\Delta F_0$$

$$y = a * x + b$$

$$a = K_D/\Delta F_0 = K_D * 1/\Delta F_0 = K_D * b \quad (12)$$

$$K_D = a/b \quad (13)$$

Tak więc wartość K_D mogła być wyliczana na podstawie współczynników równania prostej odczytanej z wykresu odwrotności zmiany fluorescencji. Wartość stałej K_D była wyrażana w μM jako stężenie lipidów w liposomach, dla których układ znajdował się w równowadze (lipidy nie związane z RNA).

3.2.9. Pomiar fluorescencji i wyznaczenie stałej dysocjacji dla kompleksu RNA-egzosomy

Ze względu na to, że koncentracja egzosomów próbce po izolacji była nieznana, układ pomiarowy dla oznaczenia wiązania RNA z błoną został zmodyfikowany. Próbkę egzosomów miareczkowana była aptamerami RNA (odwrotnie niż w przypadku RNA-liposomy). Schemat układu pomiarowego sond dla pomiarów oddziaływania RNA z egzosomami składał się z:

- Donora: sondy CTB-555 i fDiI związane z błoną egzosomów
- Akceptora: sonda SYTO 61 związana z RNA

Próbka egzosomów o stałym stężeniu donora (CTB-555 i fDiI) była miareczkowana RNA zawierającym akceptor (SYTO 61).

3.2.9.1. Przygotowanie próbek do pomiarów

Procedurę przygotowania egzosomów do badań opisano w sekcji 3.2.6. Wyznaczona i oczyszczona porcja egzosomów była porcjowana i wykorzystywana do pomiarów przeważnie na drugi dzień po izolacji. Podobnie jak w przypadku pomiarów z liposomami przygotowywano roztwór RNA [2,75 μM] zwykle w objętości 30 μL na 3 serie pomiarowe, z

których następnie pobierano po 10 μL do fałdowania jak opisano w sekcji 3.2.8.1. Sfałdowane RNA [2,5 μM] było znakowane sondą SYTO 61. Dodawano 1,5 μL sondy SYTO 61 [500 μM], tak aby stężenie końcowe sondy w próbce z RNA wynosiło 25 μM . Następnie próbkę inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.

3.2.9.2. Pomiary fluorescencyjne

Pomiary oddziaływania aptamerów RNA z błonami egzosomów były prowadzone jako pomiary punktowe w programie „Advancer Reeds”. Dla oddziaływania mutantów RNA z egzosomami mierzono zmiany fluorescencji w programie „Kinetics”. Szczegółowe ustawienia parametrów pomiarów przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 18. Parametry pomiarów dla badań oddziaływania RNA-egzosomy

Program	Pomiary	Parametry
Advanced Reeds	Pomiar punktowy przy zadanych długościach fal wzbudzenia i emisji, mierzony w trzech kanałach dla każdego punktu pomiarowego.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kanał donora 550/570 ▪ Kanał akceptora 628/645 ▪ Kanał FRET 550/645 Napięcie: 600 V (Voltage -Medium) Rozmiar szczelin (Slit): 10, 10 Czas naświetlania: 10 s Temperatura: 20°C
Kinetics	Pomiar pozwalający na stałe śledzenie wartości fluorescencji w trzech kanałach w trakcie miareczkowania egzosomów RNA.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kanał donora 555/570 ▪ Kanał akceptora 620/645 ▪ Kanał FRET 555/645 Napięcie: 600 V (Voltage -Medium) Rozmiar szczelin (Slit): 10, 10 Czas naświetlania: 10 s Temperatura: 20°C

Pomiary prowadzono w trzech kanałach, przy stałej koncentracji egzosomów i wzrastającym stężeniu RNA. Dla pomiarów oddziaływania błon egzosomów z aptamerami RNA, pobierano 100 μL zawiesiny egzosomów z sondami, które miareczkowano RNA w zakresie stężeń 0,05 μM – 0,25 μM . Dla pomiarów z mutantami RNA wykorzystywano 80 μL zawiesiny egzosomów na jedną serię, które miareczkowane było RNA w zakresie stężeń 0,06 μM - 0,28 μM . Po dodawaniu kolejnych porcji RNA próbkę inkubowano 10 minut (pomiary z aptamerami) lub 5 minut (mutanty RNA). W Tabeli 19. podano schemat procedury pomiarowej pomiarów kinetycznych oddziaływania RNA z błonami egzosomów.

Tabela 19. Schemat pomiarów oddziaływania RNA z egzosomami

Lp	Dodawane objętości odczynnika (czas inkubacji)	Stężenie RNA w kuwecie pomiarowej	Przedziały czasowe punktów pomiarowych	Pomiar w trzech kanałach
FE	100 μ L (80 μ L) zawiesiny egzosomów	-	0-5	Pomiar fluorescencji w 3 kanałach (λ_{wz} / λ_{em}) : K. donora 555/570 K. akceptora 620/645 K. FRET 555/645
F1	2 μ L RNA	0,05 μ M (0,06 μ M)*	5-10	
F2	2 μ L RNA	0,10 μ M (0,12 μ M)	10-15	
F3	2 μ L RNA	0,15 μ M (0,17 μ M)	15-20	
F4	2 μ L RNA	0,20 μ M (0,23 μ M)	20-25	
F5	2 μ L RNA	0,25 μ M (0,28 μ M)	25-30	

Obserwacje zjawiska FRET pomiędzy związanymi z błoną egzosomów CTB-555 i fDiI (jako donor) oraz sondą RNA - SYTO 61 (jako akceptor) prowadzono w temperaturze pokojowej przez wzbudzenie sond CTB-555 i fDiI i obserwując spadek emisji przy zachodzeniu FRET, w trakcie miareczkowania akceptorem (5 punktów pomiarowych).

3.2.9.3. Wyznaczenie stałej dysocjacji

Stałą dysocjacji K_D kompleksu RNA-błona egzosomów obliczano w podobny sposób jak dla kompleksów aptamerów RNA z liposomami. Różnica polegały na tym, że w przypadku eksperymentów z egzosomami, w równaniu izotermi Langmuira (równanie 6) „x” oznaczał stężenie RNA. Finalnie K_D oznaczało tu stałą równowagi dysocjacji dla kompleksu RNA-błona egzosomalna. Wartości fluorescencji donora (CTB-555- fDiI) zostały skorygowane o wartości crosstalk akceptora (SYTO 61) w następujący sposób: dla każdego punktu pomiarowego obliczano iloczyn wartości fluorescencji w kanale FRET i wartości crosstalk równej 0,3 (sekcja 3.2.7.4). Następnie otrzymana wartość odejmowana była od wartości fluorescencji w kanale donora, odpowiednio dla każdego punktu pomiarowego.

3.2.10. Metody statystyczne

Wszystkie testy statystyczne przeprowadzane były w programie MS Excel, z wykorzystaniem dodatku Analysis ToolPak przy generowaniu statystyki opisowej i poszukiwaniach korelacji oraz odpowiednich tablic dla danych testów.

Testy rozkładu normalnego

Uzyskane wartości stałej dysocjacji K_D dla oddziaływania aptamerów RNA z błonami LUV_{DOPC} i LUV_{RAFT} zebrano w dwóch grupach w zależności od rodzaju liposomów: Grupa 1 – K_D RNA-DOPC oraz grupa 2 – K_D RNA-RAFT. W celu sprawdzenia normalności rozkładu wartości stałej dysocjacji uzyskanych w tych grupach przeprowadzono testy Shapiro-Wilka.

* Podane w nawiasach wartości (objętość i stężenia) odnoszą się do pomiarów mutantów RNA z egzosomami.

Wykonane testy przy poziomie istotności $\alpha=0,05$ wykazały niezgodność wartości K_D z rozkładem normalnym dla obydwu wariantów liposomów, dlatego dla dalszych analiz statystycznych tych grup używano testów nieparametrycznych. Histogramy rozkładów wartości K_D w obydwu wariantach liposomów przedstawione są na Rysunku 22. w rozdziale 4.3.

Testy różnic między grupami

W celu określenia czy istnieją statystycznie znaczące różnice w poziomie oddziaływania aptamerów RNA z LUV_{DOPC} i LUV_{RAFT} , przeprowadzono test U Manna-Whitneya dla wspomnianych wyżej dwóch grup wartości stałej dysocjacji (K_D RNA-DOPC oraz K_D RNA-RAFT). Różnice sprawdzano przy poziomach istotności $\alpha=0,05$, $\alpha=0,01$ i $\alpha=0,001$. Wyniki zamieszczono w opisie Rysunku 23.

Przy porównywaniu średnich wartości K_D uzyskanych dla oddziaływania z LUV_{RAFT} aptamerów RNA oraz mutantów tych aptamerów (sekcja 4.7), przeprowadzono testy Kruskala-Wallisa. Jeśli test wykazał występowanie różnic statystycznych (przy $\alpha=0,05$) przeprowadzono dodatkowo test U Manna-Whitneya aby stwierdzić, które mutanty wykazują różnice w powinowactwie do LUV_{RAFT} względem oryginalnego aptameru.

Analiza zależności zmienności K_D

Podjęto również próbę wyjaśnienia zależności zmienności średniej K_D oddziaływań RNA-błona względem danych czynników. W tym celu przeprowadzono testy korelacji wartości średniej K_D kompleksów RNA- LUV_{RAFT} od czynników takich jak: motywy sekwencyjne, motywy strukturalne czy inne czynniki (długości RNA, składu nukleotydowy, energia swobodna fałdowania, czy liczba wariantów strukturalnych). Wyniki analiz omówione zostały w dyskusji.

4. WYNIKI

W celu realizacji zadań badawczych, przeprowadzono szereg analiz, których wyniki zaprezentowane są w kolejnych sekcjach tego rozdziału. W sekcji 4.1 scharakteryzowany został profil motywów RNA w całej wyjściowej bazie aptamerów. Jako wstęp do wyników badań oddziaływań RNA-błona z wykorzystaniem aptamerów RNA, a następnie mutantów, przed każdą z tych części została umieszczona charakterystyka używanych oligonukleotydów. W sekcji 4.2 scharakteryzowano wykorzystywane do badań aptamery RNA, zaś w sekcji 4.6 scharakteryzowano mutanty aptamerów RNA. Pomiaru stałej dysocjacji (K_D) kompleksów RNA-błona prowadzone były w czterech układach:

- (1) Badanie oddziaływania aptamerów RNA z błonami liposomów (sekcje 4.3 i 4.4)
- (2) Badanie oddziaływania aptamerów RNA z błonami egzosomów (sekcja 4.5)
- (3) Badanie oddziaływania mutantów RNA z błonami liposomów (sekcja 4.7)
- (4) Badanie oddziaływania mutantów RNA z błonami egzosomów (sekcja 4.8)

4.1. PROFIL MOTYWÓW RNA W BAZIE APTAMERÓW

Wyjściowa baza aptamerów RNA składała się z 145 sekwencji oligonukleotydów. Aby sprawdzić w jakich aptamerach występują motywy RNA oraz gdzie w strukturze drugorzędowej RNA prawdopodobnie się znajdują, przeprowadzono wstępną analizę bazy RNA. Sekwencje RNA przeszukiwane były pod kątem obecności motywów egzosomowych: CCCU, GGAG, UGAG i UCCU, motywów tratwowych: CCCU, UCCC, CUCC i UUGU oraz motywów 5-nukleotydowych: UCCCU, CUCCC i UUGUU. W poniższej tabeli zestawiono, które motywy RNA występowały w kolejnych aptamerach i w jakiej liczbie, podana została również łączna liczba motywów egzosomowych, tratwowych, motywów 5-nukleotydowych oraz suma wszystkich motywów dla poszczególnych aptamerów. Sekwencje wszystkich aptamerów wraz z zaznaczonymi motywami RNA podano w załączniku 1.

Tabela 20. Profil motywów sekwencyjnych RNA w bazie aptamerów.

Numer aptameru	Liczba nukleotydów	CCCU	GGAG	UGAG	UCCU	UCCC	CUCC	UUGU	UCCCU	CUCCC	UUGUU	Suma motywów egzosomowych	Suma motywów tratwowych.	Suma motywów 5-nukleotydowych	Suma wszystkich motywów
1	91											0	0	0	0
3	91	1			1	1		1			1	2	3	1	5
4	91					1	1					0	2	0	2
5	91			1	1							2	0	0	2
6	91	1				1		1			1	1	3	1	4
7	91				1		1	1				1	2	0	3
8	91											0	0	0	0
9	91						1					0	1	0	1
10	111	1	1			2	2	1		2		2	6	2	9
11	91				1							1	0	0	1
13	91	1				1			1			1	2	1	3
14	91					1						0	1	0	1
15	91				1			1			1	1	1	1	3
17	111	1				1	1	4		1	1	1	7	2	9

Numer aptameru	Liczba nukleotydów	CCCU	GGAG	UGAG	UCCU	UCCC	CUCC	UUGU	UCCCU	CUCCC	UUGUU	Suma motywów egzozomowych	Suma motywów trawnych.	Suma motywów 5-nukleotydowych	Suma wszystkich motywów
19	111	2			3	1	1		1			5	4	1	8
20	111	1				1						1	2	0	2
21	91	1			1	1			1			2	2	1	4
22	90		1									1	0	0	1
23	91			1								1	0	0	1
24	111	2		1		2			1			3	4	1	6
25	91				3		1					3	1	0	4
27	91			1								1	0	0	1
29	91	1				1		2				1	4	0	4
30	91					1		1			1	0	2	1	3
31	91											0	0	0	0
32	91	1			1	1		1	1		1	2	3	2	6
33	91	1				1			1			1	2	1	3
34	91							1				0	1	0	1
35	91					1	1			1		0	2	1	3
36	110				2	1	1					2	2	0	4
37	88					1						0	1	0	1
38	90							1				0	1	0	1
39	111	1			2	2	3		1	1		3	6	2	10
40	90			1		1						1	1	0	2
41	91	1			1	1			1			2	2	1	4
42	111				1							1	0	0	1
43	90	1				2	2	1	1	2		1	6	3	9
44	91	1										1	1	0	1
45	91	1			2	1	1		1			3	3	1	6
46	111	2	1			2	1	1	1	1		3	6	2	9
47	91							1			1	0	1	1	2
48	111						1	3			2	0	4	2	6
49	91		1		1	1	1					2	2	0	4
50	91			1				2				1	2	0	3
51	91	1						1				1	2	0	2
52	91			1				1				1	1	0	2
53	111	1			1	2	1			1		2	4	1	6
54	91	3			3	1	2	2	1	1	1	6	8	3	14
55	90						1					0	1	0	1
56	91	1	1		1							3	1	0	3
59	92	1				1						1	2	0	2
60	90				2		1					2	1	0	3
61	111	2				2	1	1	1	1		2	6	2	8
62	111	1				1		1			1	1	3	1	4
64	90	1			1							2	1	0	2
66	91			1	1		1					2	1	0	3
67	90	1						1			1	1	2	1	3
68	91				1		2					1	2	0	3
69	90											0	0	0	0
70	90											0	0	0	0
71	91	2				1			1			2	3	1	4
73	91											0	0	0	0
74	91	1										1	1	0	1
75	91				1		1	1				1	2	0	3

Numer aptameru	Liczba nukleotydów	CCCU	GGAG	UGAG	UCCU	UCCC	CUCC	UUGU	UCCCU	CUCCC	UUGUU	Suma motywów egzozomowych	Suma motywów trawnych.	Suma motywów 5-nukleotydowych	Suma wszystkich motywów
76	111				1							1	0	0	1
77	91											0	0	0	0
78	91			1								1	0	0	1
79	111	1			2							3	1	0	3
82	111	1					1					1	2	0	2
83	91											0	0	0	0
84a	90				1		1					1	1	0	2
84b	91				1							1	0	0	1
86	91				2	1	1				1	2	2	0	4
87	91	1		1					1			2	1	0	2
88	110							1				0	1	1	2
89	91	1				1		1		1		1	3	1	4
90	91		1					1	1	1		1	1	0	2
92	91			1		1	1					1	2	1	4
93	111	1			1	2	1					2	4	2	7
94	91							1				0	1	0	1
96	87							1				0	1	0	1
97	91				1		1					1	1	0	2
98	111				1							1	0	0	1
99a	66	1							1			1	1	0	1
99b	90	1		1			1					2	2	0	3
100	91	1			1							2	1	0	2
102	91	2				1						2	3	1	4
103	91						1	1	1			0	2	0	2
104	91	1										1	1	0	1
106	111	1			1	1						2	2	1	4
107	91								1	1		0	0	0	0
108	91							1			1	0	1	0	1
109	91	1			1	2	2					2	5	2	8
110	91							1				0	1	1	2
111	91								1			0	0	0	0
112	91	1						1	1			1	2	0	2
113	91	1		1	1	1	1				1	3	3	1	6
114	91	1				1						1	2	1	3
115	91				1		1	1			1	1	2	1	4
116	91						1				1	0	1	0	1
117	91			1				1	2			1	1	1	3
118	111							2				0	2	1	3
119	90	3				3		1				3	7	2	9
120	91											0	0	0	0
121	91				1			1				1	1	0	2
122	95				1			1				1	1	0	2
123	91	1					1	1				1	3	0	3
124	91				2		1					2	1	0	3
125	91											0	0	0	0
126	91							2				0	2	0	2
127	91											0	0	0	0
128	91	1				1						1	2	0	2
129	111	1			1	1						2	2	0	3
131	91				1			1				1	1	0	2

Numer aptameru	Liczba nukleotydów	CCCU	GGAG	UGAG	UCCU	UCCC	CUCC	UUGU	UCCU	CUCC	UUGU	Suma motywów egzosomalych	Suma motywów tratwowych.	Suma motywów 5-nukleotydowych	Suma wszystkich motywów
132	91	1						1				1	2	0	2
133	91											0	0	0	0
134	90			2				2				2	2	0	4
135	91					1			1	1		0	1	0	1
136	91								1	1		0	0	0	0
137	109	1			1	2	1	1			1	2	5	2	8
138	91	2			1	2	1			1		3	5	2	8
139	91						1	2				0	3	1	4
140	111				2	2	3					2	5	1	8
141	91	1		1								2	1	0	2
142	91	1			1		2		1			2	3	0	4
143	91				1		1					1	1	0	2
144	91	1		1		1						2	2	1	4
145	85										1	0	0	0	0
146	91		1	1		1			1	1		2	1	0	3
148	111				2		1	1				2	2	1	5
149	91	1			1	1	1					2	3	2	6
151	91							1			2	0	1	0	1
152	111											0	0	0	0
153	111	1			1		1	2				2	4	2	7
154	91											0	0	0	0
155	89	1		1	1					2		3	1	0	3
156	91						1					0	1	0	1
157	91	2			2	1	2		1	1		4	5	2	9
158	91											0	0	0	0
159	90	1				3	1					1	5	2	7
160	91			1	1			1				2	1	0	3
161	91											0	0	0	0
162	91			1	1		1	1				2	2	0	4
163	91				1		1				1	1	1	0	2
164	111						1	2				0	3	0	3
165	91		1					1				1	1	1	3
166	91	1										1	1	0	1
167	91	1			1		1					2	2	0	3

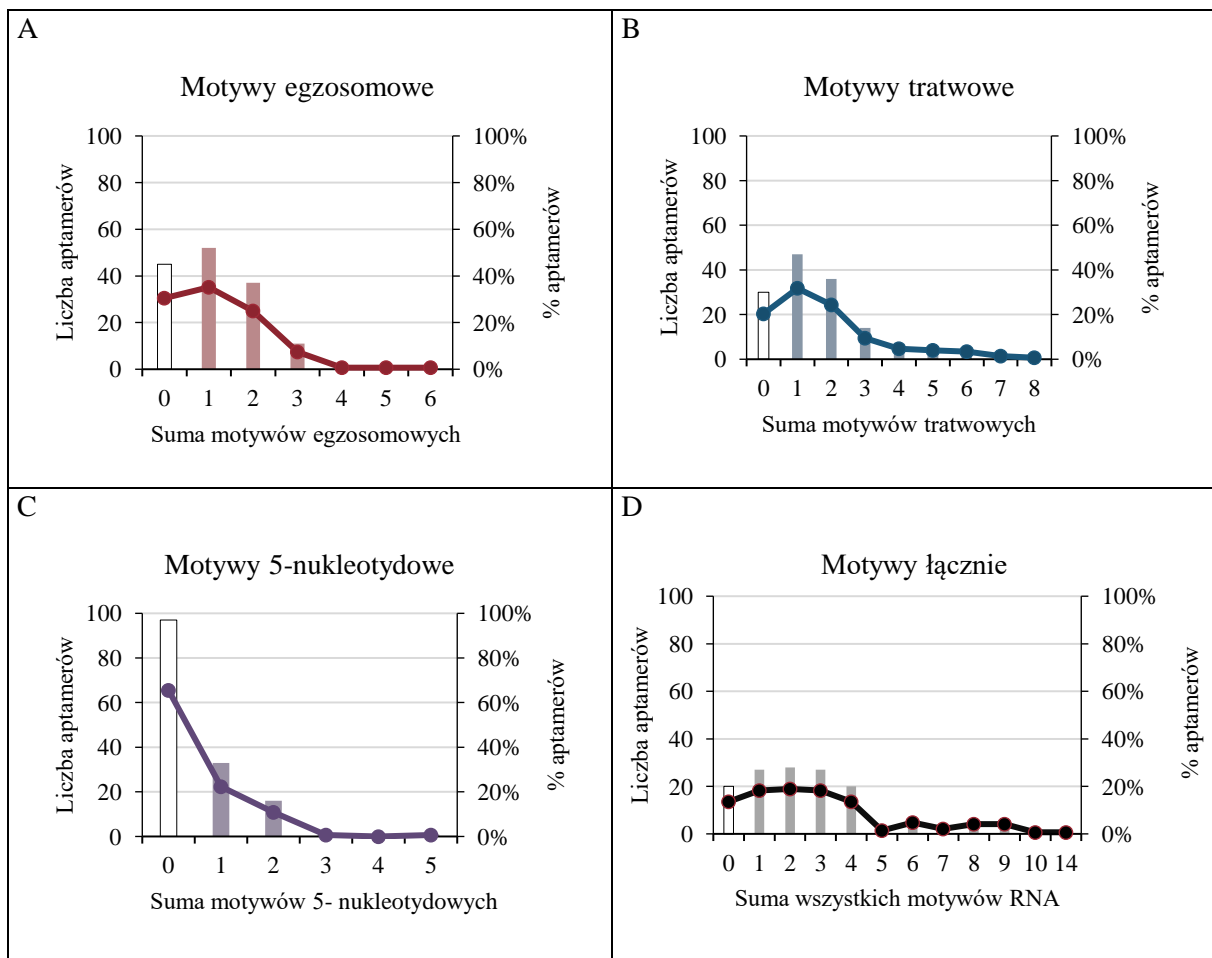
Częstość występowania motywów RNA

Jeśli chodzi o grupę motywów egzosomalych (Rysunek 18. A), to 103 aptamery (70%) zawierały przynajmniej jeden motyw (od jednego do 6 motywów sekwencji aptameru), z kolei 45 aptamerów (30%), nie posiadało żadnego motywu z tej grupy. Aptamerami z największą łączną liczbą motywów egzosomalych okazały się aptamery numer 157, 19 i 54, posiadały odpowiednio 4, 5 i 6 motywów z tej grupy.

W grupie motywów tratwowych (Rysunek 18. B) 118 aptamerów (80%) zawierało od jednego do 8 motywów tratwowych, a 30 aptamerów (20%) nie posiadało takich motywów. Aptamerami z największą liczbą motywów z tej grupy, były RNA o numerach: 17 i 119, posiadające po siedem motywów oraz aptamer 54 z ośmioma motywami.

Grupa motywów 5-nukleotydowych (Rysunek 18. C) była najmniej liczna. 51 aptamerów (34%) zawierało od jednego do 3 motywów 5-nukleotydowych, a 97 (66%) spośród wszystkich aptamerów nie posiadało motywów z tej grupy. Aptamerami z największą liczbą motywów 5-nukleotydowych były aptamery 43 i 54, posiadały po 3 motywy.

Biorąc pod uwagę wszystkie motywy RNA z powyższych grup (Rysunek 18. D), to 86% aptamerów (128 z 148 sekwencji) zawierała przynajmniej jeden motyw (ściślej od jednego do 14), zaś 20 aptamerów (14%) nie posiadało w sekwencji żadnego z analizowanych motywów. RNA z największą liczbą motywów RNA to aptamer numer 54, posiadał on w sumie 14 motywów RNA.



Rysunek 18. Częstość występowania motywów RNA w bazie aptamerów.

Wykresy przedstawiają liczebność poszczególnych grup motywów: Motywy egzozomowe – wykres A, Motywy trawowe – wykres B, Motywy 5-nukleotydowe – wykres C oraz łączną liczebność motywów RNA – wykres D, w odniesieniu do całej bazy 148 aptamerów. Liczby na osi X oznaczają sumę motywów z danej grupy (wykresy A-C) lub sumę wszystkich motywów (wykres D) jakie mogły wystąpić w sekwencjach aptamerów. Na osi Y podana jest liczba aptamerów, które charakteryzowały się daną łączną liczbą motywów (do tej osi odnoszą się słupki wykresu), zaś na osi pomocniczej podany jest % aptamerów z daną sumą motywów (do tej osi odnosi się linia wykresu).

RNA z największą liczbą motywów to aptamer numer 54, posiadał on w sumie 14 motywów RNA, w tym 6 motywów egzosomalych, 8 motywów tratwowych i 3 motywy 5-nukleotydowe. Aptamer ten był jednym z oligonukleotydów, dla których poprowadzone były badania oddziaływanie z błonami lipidowymi.

Frekwencja występowania motywów RNA

Biorąc pod uwagę aptamery, z przynajmniej jednym spośród wyszukiwanych motywów RNA da się zauważyć, że poszczególne motywy RNA występowały czasem kilka razy w sekwencji danego aptameru. W tabeli poniżej zestawione są frekwencje występowania poszczególnych motywów RNA w bazie aptamerów.

Tabela 21. Frekwencja występowania motywów RNA w bazie aptamerów

Motyw RNA	Łączna liczba aptamerów RNA z motywem	Liczba aptamerów, w których dany motyw występuje kilkukrotnie				Łączne występowanie danego motywu w bazie	% wszystkich motywów
		1 raz	2 razy	3 razy	4 razy		
CCCU	61	51	8	2	0	73	20%
GGAG	8	8	0	0	0	8	2%
UGAG	21	20	1	0	0	22	6%
UCCU	55	42	10	3	0	71	19%
UCCC	52	38	12	2	0	68	18%
CUCC	53	44	7	2	0	64	17%
UUGU	52	41	9	1	1	66	18%
UCCCU	27	26	1	0	0	28	8%
CUCCC	18	15	3	0	0	21	6%
UUGUU	20	18	2	0	0	22	6%

Najczęściej występującym motywem okazała się sekwencja CCCU (pojawiała się w 61 różnych cząsteczkach RNA, w niektórych kilku krotnie. Stąd w sumie, w całej bazie ten motyw egzosomalowo-tratwowy wystąpił 73 razy (20% wszystkich motywów). Spośród motywów egzosomalych również dość licznym okazał się motyw UCCU, występował on 71 razy (19%) aptamerów. Najmniej licznym motywem egzosomalym była sekwencja GGAG, występowała tylko u 8 aptamerów (2%). Motywy tratwowe (oprócz CCCU) występowały na podobnym poziomie od 64 do 68 (17-19%). Spośród motywów 5-nukleotydowych najliczniej występującym był motyw UCCCU (28 razy, 8%), zaś pozostałe dwa motywy CUCCC i UUGUU występowały praktycznie na tym samym poziomie (21-22 razy, 6%).

4.2. CHARAKTERYSTYKA APTAMERÓW RNA WYKORZYSTANYCH W BADANIACH

Do pomiarów oddziaływań aptamerów RNA z błonami lipidowymi wykorzystano 19 aptamerów zawierających motywy RNA w różnych lokalizacjach cząsteczki. Podobnie jak w wyjściowej bazie RNA, tak i w tej grupie oligonukleotydów, motyw CCCU był najczęściej występującą sekwencją (zestawienie znajduje się w tabeli poniżej). Jeśli chodzi o ten motyw egzosomalno-tratwowy, to siedem badanych aptamerów miało pojedynczy motyw CCCU (RNA o numerach 10, 13, 20, 59, 64, 93 i 109), cztery aptamery miały podwójne motywy CCCU (numery 19, 24, 102 i 157), wreszcie aptamery 54 i 119 zawierały po trzy motywy CCCU. Dla porównania wybrano 6 aptamerów bez motywu CCCU: RNA 34 (bez motywów egzosomalnych, tylko z jednym motywem tratwowym UUGU), RNA 78 (z jednym motywem egzosomalnym UGAG, bez motywów tratwowych), RNA 90 (z jednym motywem egzosomalnym GGAG i jednym tratwowym UUGU) oraz aptamery 111 i 145, które nie posiadały w ogóle żadnych spośród analizowanych motywów. Wszystkie motywy RNA dla każdego aptameru zostały wymienione w kartach charakterystyki RNA na końcu tego podrozdziału.

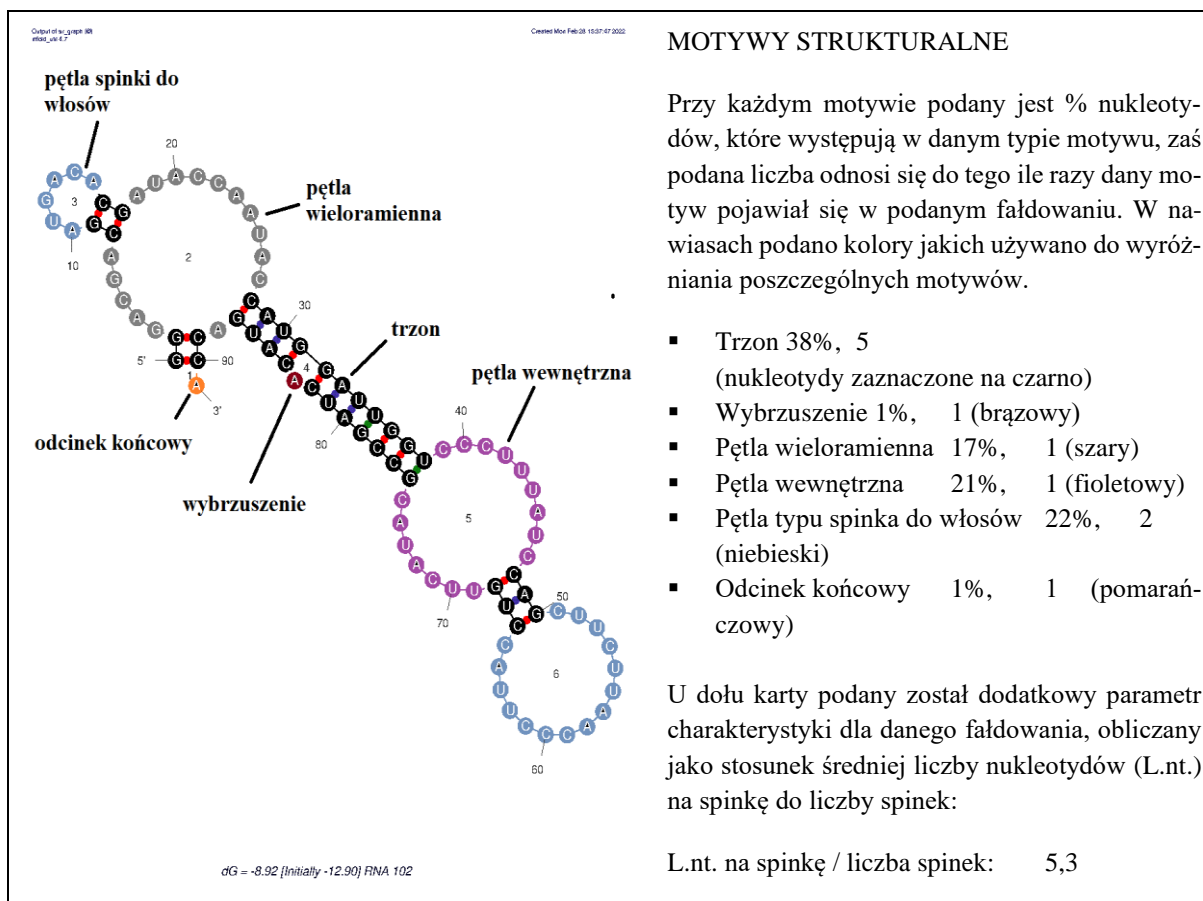
Tabela 22. Porównanie występowania motywów RNA w oryginalnej bazie 148 aptamerów RNA oraz w puli 19 badanych aptamerów.

Poszukiwane motywy RNA		% występowania motywu w całej puli aptamerów (148 RNA)	% występowania motywu w badanych aptamerach (19 RNA)
Motyw egzosomalno-tratwowy	CCCU	20%	30%
Motywy egzosomalne	GGAG	2%	4%
	UGAG	6%	4%
	UCCU	19%	16%
Motywy tratwowe	UCCC	18%	28%
	CUCC	17%	14%
	UUGU	18%	9%
Motywy 5-nukleotydowe	UCCCU	8%	13%
	CUCCC	6%	10%
	UUGUU	6%	1%

4.2.1. Występowanie motywów struktury 2-rzędowej w cząsteczkach aptamerów

Z wykorzystaniem programu Mfold [Zuker, 2003], przewidziana została struktura drugorzędowa badanych aptamerów. W analizach odnoszono się do zaproponowanej struktury 2-rzędowej o najniższej energii swobodnej spośród wariantów strukturalnych. Jeśli takie występowały, inne warianty strukturalne o wyższej energii swobodnej podane zostały w załączniku 2. Różnica energii swobodnej między pierwszą i drugą zaproponowaną strukturą wahała się zwykle od 0 do 1,3 kcal/mol, ze średnią różnicą 0,5 kcal/mol. Fałdowanie analizowano pod względem występowania motywów strukturalnych. Dla każdego badanego aptameru określano ile procent nukleotydów występowało w poszczególnych motywach strukturalnych: odcinku

podwójnej helisy (trzonu), wybrzuszeń, pętli wieloramiennych, pętli wewnętrznych, pętli typu spinki do włosów oraz odcinka przy końcach cząsteczki, który w różnych aptamerach przyjmował formę zbliżoną do pętli (pętla zewnętrzna) lub zwisu (ang. overhang). Zliczano też ile razy dany motyw pojawia się w przewidzianym fałdowaniu dla danego aptameru. Na Rysunku 19. przedstawiony został schemat charakterystyki lokalizacji motywów strukturalnych na przykładzie aptameru 102. Fałdowania badanych aptamerów z zaznaczonymi motywami strukturalnymi przedstawiono w kartach charakterystyki aptamerów w sekcji 4.2.3.

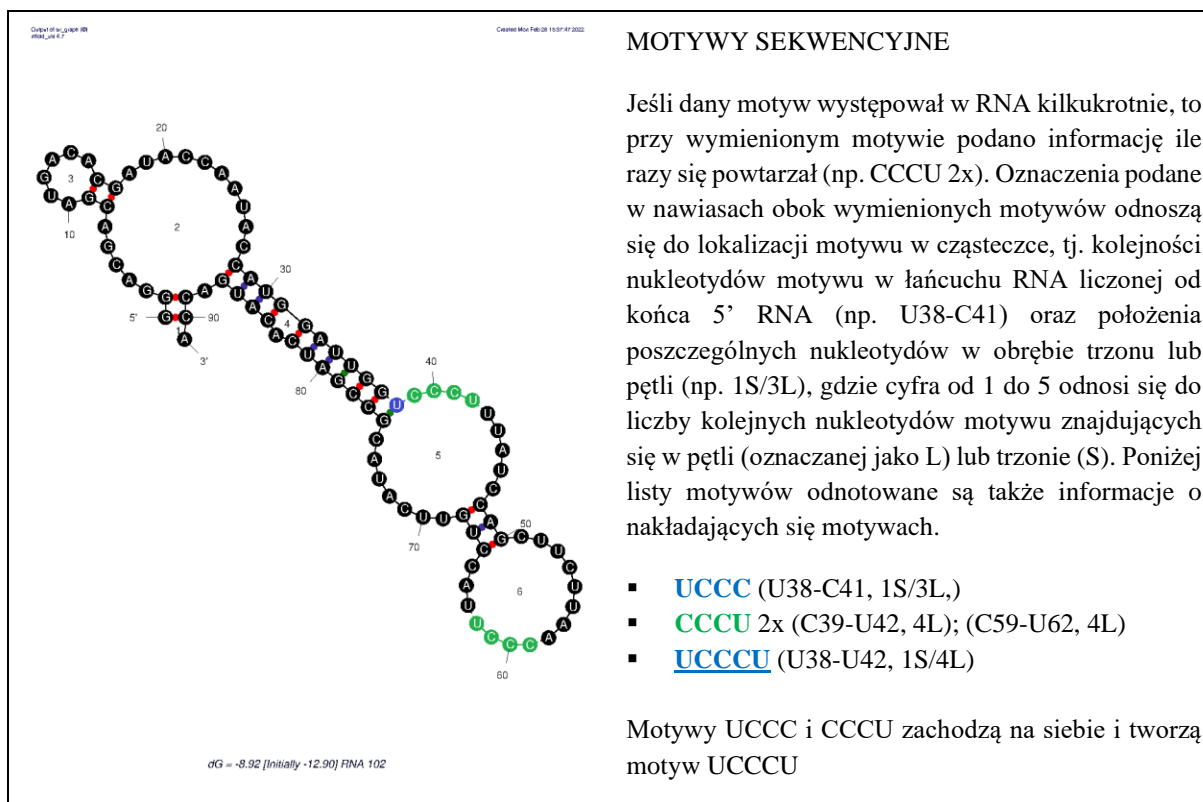


Rysunek 19. Struktura 2-rzędowa aptameru 102 z zaznaczonymi motywami strukturalnymi.

Sekwencje RNA zostały sfałdowane przy użyciu programu Mfold z ustaloną temperaturą fałdowania 37°C.

4.2.2. Występowanie motywów sekwencyjnych RNA w strukturze 2-rzędowej aptamerów

W przewidzianych strukturach drugorzędowych RNA oznaczano możliwą lokalizację motywów RNA. W celu analizy lokalizacji poszczególnych motywów w przewidzianych fałdowaniach określono, które nukleotydy z motywu znajdują się w odcinku sparowanym (oznaczone jako „S”, ang. stem), a które w niesparowanym (oznaczone jako „L”, ang. loop). Na Rysunku 20. przedstawiono przykład zapisu lokalizacji motywów RNA dla aptameru 102, zaś w kartach charakterystyki podano struktury z zaznaczonymi motywami RNA dla wszystkich badanych aptamerów.



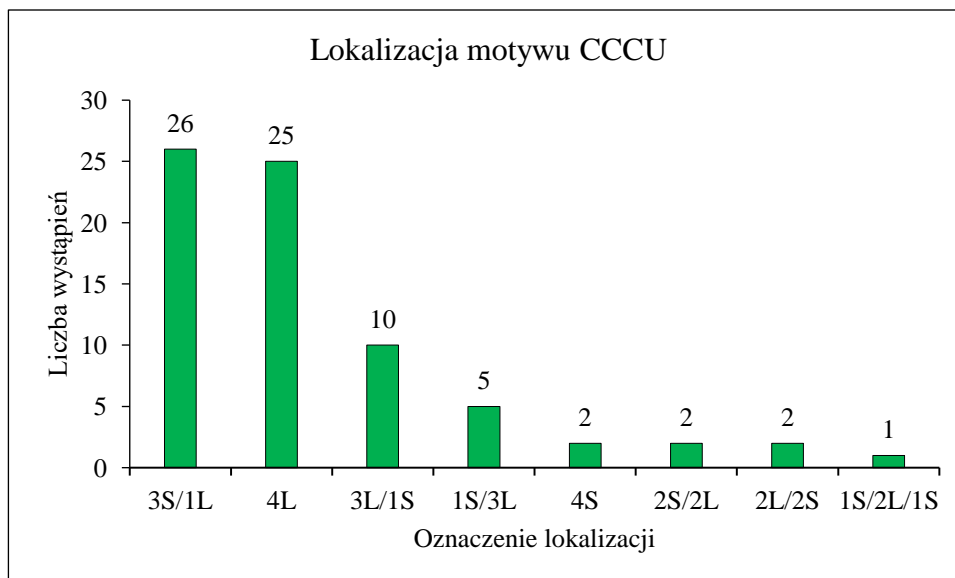
Rysunek 20. Struktura 2-rzędowa aptameru 102 z zaznaczonymi motywami sekwencyjnymi.

Motyw CCCU zaznaczano na zielono, pozostałe motywy egzosomalne (GGAG, UGAG i UCCU) na czerwono, motywy tratwowe (UCCC, CUCC, UUGU) na niebiesko, zaś motywy 5-nukleotydowe wyróżniano podkreśleniem. Podane w nawiasach oznaczenia, odnoszące się do lokalizacji nukleotydów w motywach 4-nukleotydowych*, obejmowały następujące warianty:

- 4L – oznacza, że wszystkie 4 nukleotydy z motywu znajdują się w pętli,
- 4S – wszystkie nukleotydy w odcinku sparowanym (trzonie)
- 3S/1L – trzy pierwsze nukleotydy znajdują się w odcinku sparowanym (3S), a ostatni w pętli (1L),
- 3L/1S – trzy pierwsze nukleotydy w pętli (3L), ostatni w trzonie (1S)
- 1S/3L – pierwszy nukleotyd w trzonie (1S), trzy kolejne w pętli (3L)
- 2S/2L – dwa nukleotydy w trzonie i dwa w pętli
- 2L/2S – dwa nukleotydy w pętli i dwa w trzonie
- 1S/2L/1S – jeden nukleotyd w trzonie, dwa w pętli i ostatni w trzonie.

Motywy strukturalne RNA były na ogół zlokalizowane w tym samym układzie trzonu/pętli w strukturze podstawowej (o najniższej energii swobodnej) i w alternatywnych fałdowaniach zaproponowanych przez program Mfold (tabela wariantów fałdowania znajduje się w załączniku 2). Analizy drugorzędowej struktury dostarczyły danych o możliwym położeniu motywów RNA. Na Rysunku 21. przedstawiono wykres obrazujący możliwe warianty lokalizacji motywu egzosomalno-tratwowego CCCU we wszystkich aptamerach bazy RNA, które zawierały ten motyw.

* Lokalizacja motywów 5-nukleotydowych oznaczana była w analogiczny sposób..



Rysunek 21. Lokalizacja motywu CCCU w aptamerach RNA

Na wykresie przedstawiono wszystkie warianty lokalizacji motywu CCCU jakie pojawiały się w 61 aptamerach z bazy RNA, które posiadały ten motyw (w niektórych aptamerach motyw CCCU występował kilka razy). Poniżej wyjaśniono użyte na wykresie oznaczenia:

- 3S/1L – trzy pierwsze nukleotydy znajdują się w odcinku sparowanym (trzonie) (3S), a ostatni w pętli (1L),
- 4L – oznacza, że wszystkie 4 nukleotydy z motywu znajdują się w pętli,
- 3L/1S – trzy pierwsze nukleotydy w pętli (3L), ostatni w trzonie (1S)
- 1S/3L – pierwszy nukleotyd w trzonie (1S), trzy kolejne w pętli (3L)
- 4S – wszystkie nukleotydy w odcinku sparowanym
- 2S/2L – dwa nukleotydy w trzonie i dwa w pętli
- 2L/2S – dwa nukleotydy w pętli i dwa w trzonie
- 1S/2L/1S – jeden nukleotyd w trzonie, dwa w pętli i ostatni w trzonie.

Na 73 wystąpienia motywu CCCU w aptamerach RNA, przeważająca część tej sekwencji występuje częściowo w odcinku sparowanym i niesparowanym (3S/1L = 26, 3L/1S = 10, 2S/2L i 2L/2S po 2 wystąpienia i 1S/2L/2S = 1). Również znaczna część motywów występuje całkowicie w pętlach (4L = 25), zaś niewiele całkowicie w odcinku sparowanym (4S = 2).

4.2.3. Karty charakterystyk aptamerów RNA

Aptamer 10

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAGUGAAA**GGAG**UCGUACUUUCUCUUCGUGUGUGGCCUCGUCUU
CUUCUCCCGUUUGUCUCCCGUUCGCUCAUACGCCGAUCAUGACCA

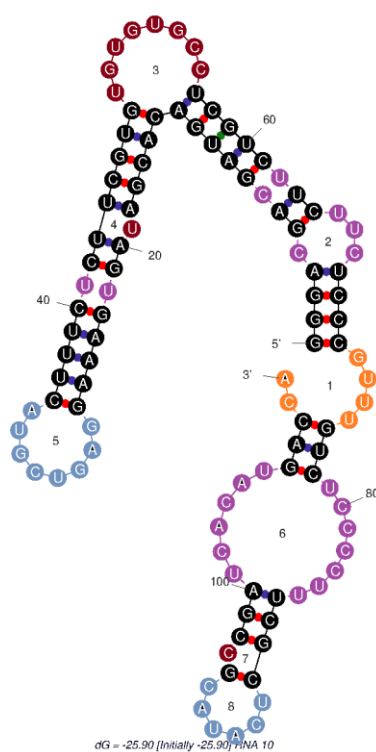
Liczba nukleotydów: 111

Skład nukleotydowy: 19 A, 33 C, 25 G, 34 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -25.90$ kcal/mol

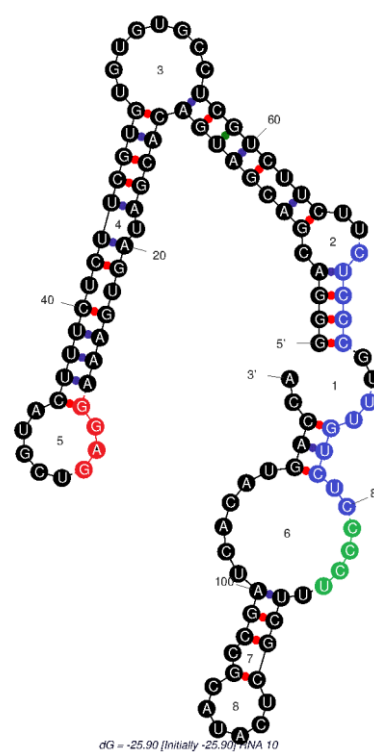
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 54% 9
- Wybrzuszenie 9% 3
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 19% 4
- Pętla spinki 13% 2
- Pętla końcowa 5% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 3,5

MOTYWY SEKWENCYJNE



- CCCU** (C81-U84, 4L)
- GGAG** (G27-G30, 1S/3L)
- UCCC** x2 (U68-C71, 4S); (U79-C82, 4L)
- CUCC** x2 (C67-C70, 1L/3S); (C78-C81, 1S/3L)
- UUGU** (U74-U77, 2L/2S)
- CUCCC** x 2 (C67-C71, 1L/4S); (C78-C82, 1S/4L)

Motywy CUCC i UCCC zachodzą na siebie i tworzą motyw CUCCC; CUCC, UCCC i CCCU zachodzą na siebie i tworzą motyw CUCCC

Aptamer 13

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAAGUGCUUCUAUGGGUUUGCAGUAAGUUCGUGUCUGGACCUUUC
CCUUCGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

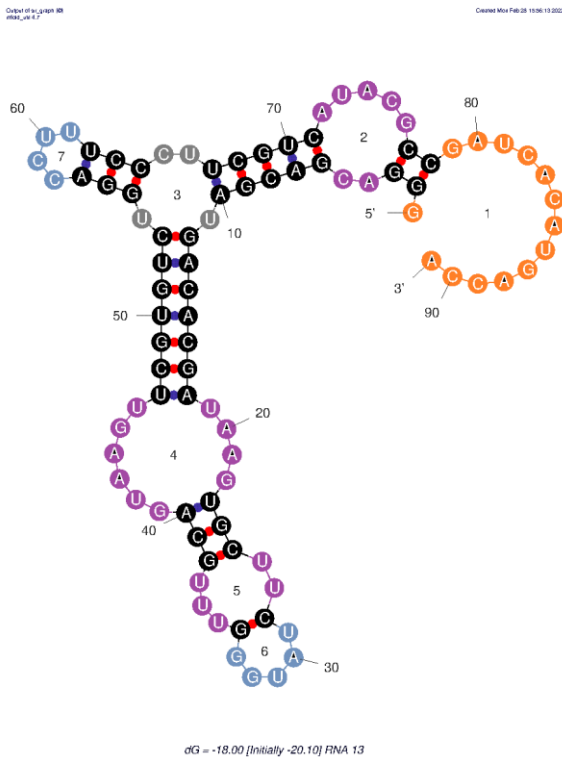
Liczba nukleotydów: 91

Skład nukleotydowy: 20 A, 23 C, 23 G, 25 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -20.10$ kcal/mol,
- Struktura 2 : $\Delta G = -19.80$ kcal/mol
- Struktura 3 : $\Delta G = -19.60$ kcal/mol,

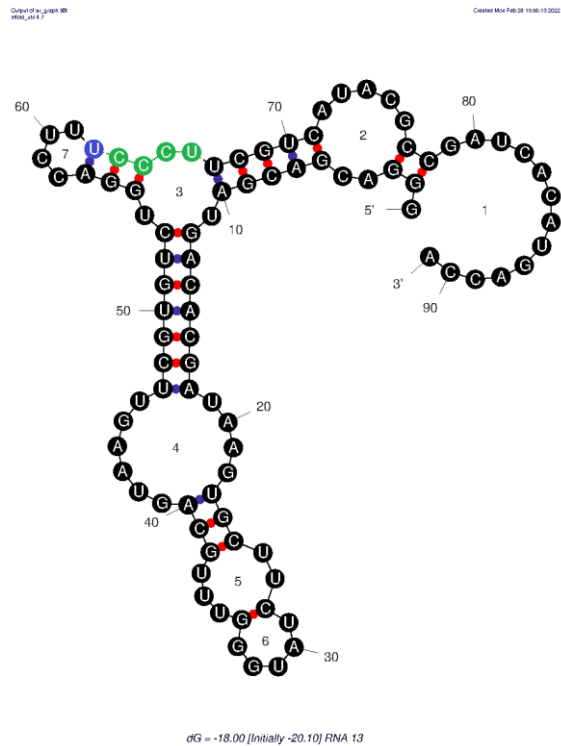
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 46% 6
- Wybrzuszenie 0% 0
- Pętla wieloramienna 4% 1
- Pętla wewnętrzna 24% 3
- Pętla spinki 10% 2
- Pętla końcowa 15% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 2,3

MOTYWY SEKWENCYJNE



- **CCCU** (C33-U36, 2S/2L)
- **UCCC** (UC2-C35, 3S/1L)
- **UCCCU** (U32-U36, 3S/2L)

Motywy UCCC i CCCU zachodzą na siebie, tworzą motyw UCCCU

Aptamer 19

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUACCG**CCCU**UGCUCGUUUCGGA**UCCCU**CCA**UCCU**UGCUGAAGUC
GUCCUAUCGCUCAUCCA**UCCU**CAUGUU**CAUACGCCGAUCA**CAUGACCA

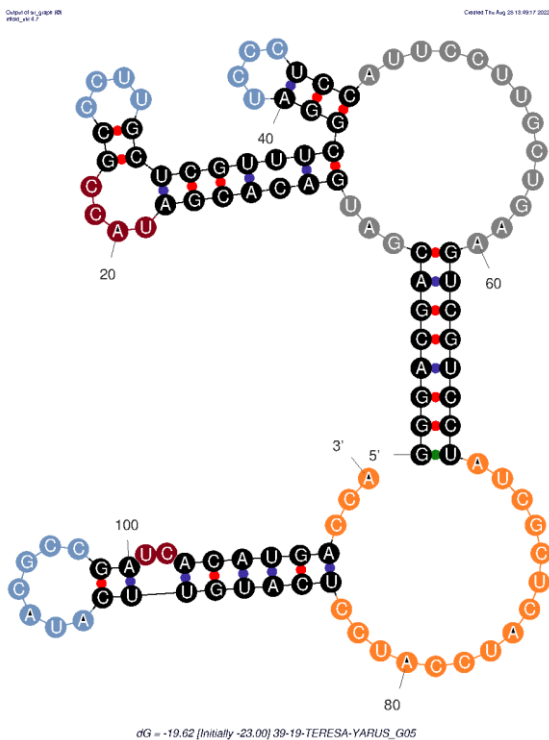
Liczba nukleotydów: 111

Skład nukleotydowy: 22 A, 39 C, 21 G, 29 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -23.00$ kcal/mol,
- Struktura 2 : $\Delta G = -22.50$ kcal/mol,
- Struktura 3 : $\Delta G = -22.50$ kcal/mol,
- Struktura 4 : $\Delta G = -22.40$ kcal/mol,

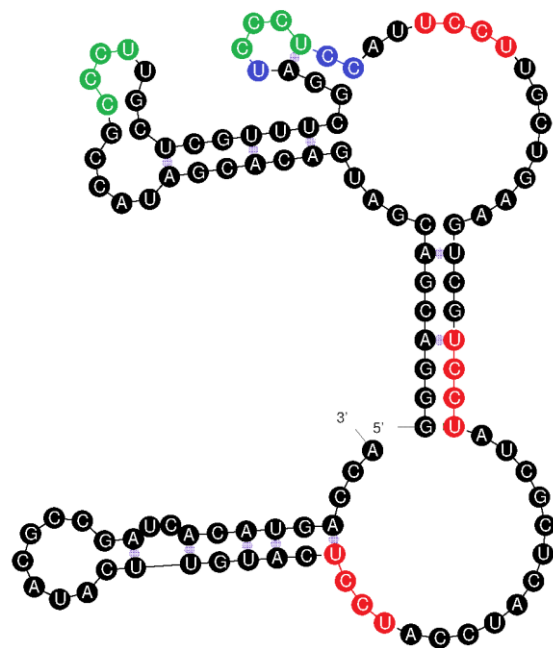
MOTYWY STRUKTURALNE



- | | | |
|-----------------------|-----|---|
| ▪ Trzon | 56% | 6 |
| ▪ Wybrzuszenie | 6% | 2 |
| ▪ Pętla wieloramienna | 16% | 1 |
| ▪ Pętla wewnętrzna | 0% | 0 |
| ▪ Pętla spinki | 15% | 3 |
| ▪ Pętla końcowa | 18% | 1 |

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 1,7

MOTYWY SEKWENCYJNE



- **CCCU** x2 (C24-U27, 1S/3L); (C42-U45, 3L/1S)
- **UCCU** x3 (U50-U53, 4L); (U65-U68, 4S); (U81-U84, 3L/1S)
- **UCCC** (U41-C44, 4L)
- **CUCC** (C44-C47, 1L/3S)
- **UCCCU** (U51-U45, 4L/1S)

Motywy UCCC, CCCU i CUCC zachodzą na siebie, tworzą motyw UCCCU

Aptamer 20

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAGCCCCGAAUGUGGGUUGGUUCUCUACGUUCAACGCUCGUUCU
ACUCGUAUCCCACAAUCUAACCCUGCCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

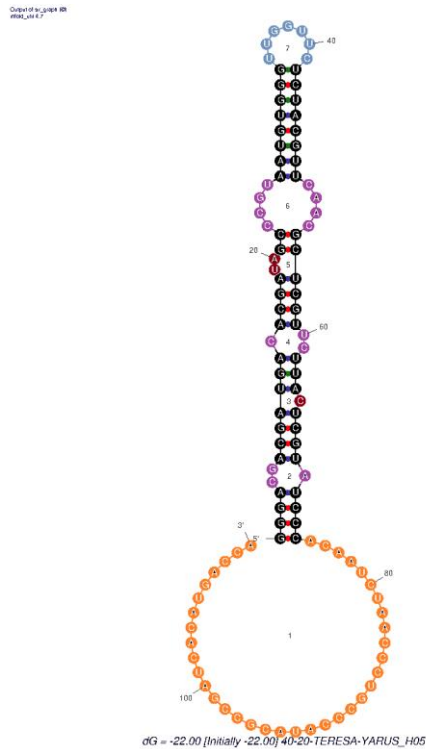
Liczba nukleotydów: 111

Skład nukleotydowy: 26 A, 35 C, 23 G, 27 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : -22.00 kcal/mol,

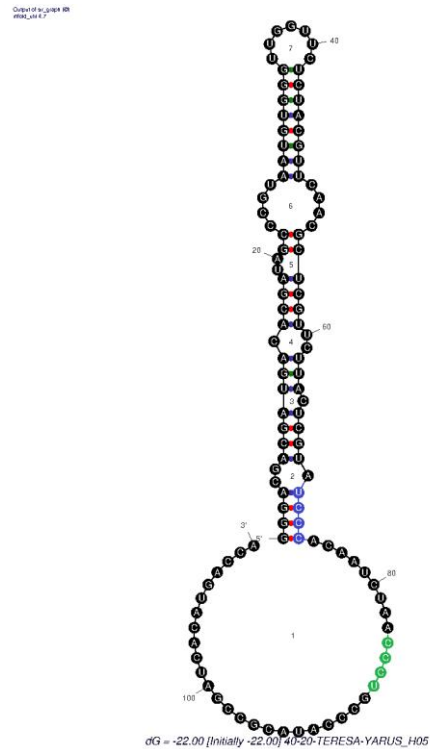
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 45% 6
- Wybrzuszenie 3% 2
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 13% 3
- Pętla spinki 6% 1
- Pętla końcowa 33% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 7,0

MOTYWY SEKWENCYJNE



- CCCU (C84-U87, 4L)
- UCCC (U71-C74, 4S)

Aptamer 24

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUACGCACUACUAUGGCCCGUGUGGUUGCGAACCUUCCCUUCCCC
UGUGUCAUGAUGAGAUCGGUCUUCUGGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

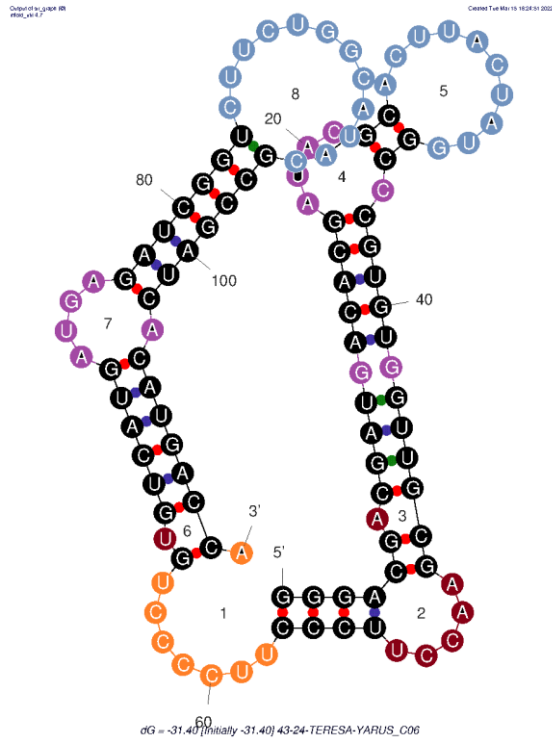
Liczba nukleotydów: 111

Skład nukleotydowy: 23 A, 33 C, 28 G, 27 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -31.40$ kcal/mol,
- Struktura 2 : $\Delta G = -30.10$ kcal/mol

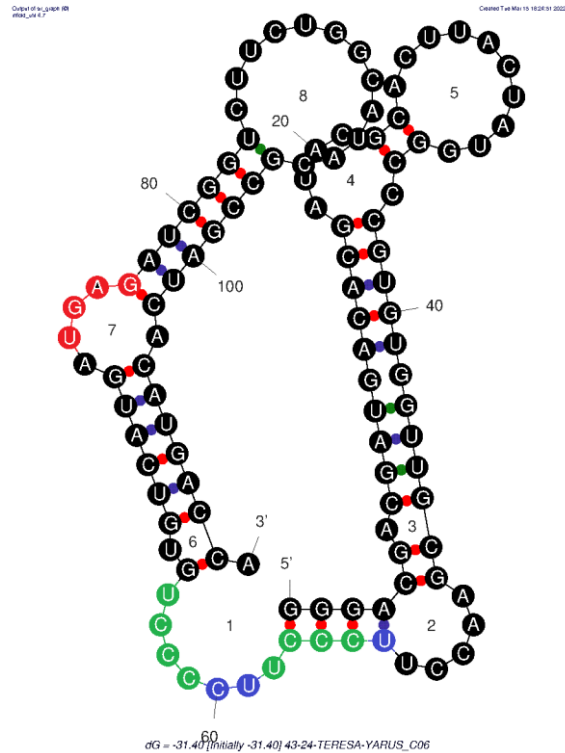
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 56% 8
- Wybrzuszenie 6% 3
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 11% 3
- Pętla spinki 20% 2
- Pętla końcowa 7% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 5,5

MOTYWY SEKWENCYJNE



- **CCCU** x2 (C55-U58, 3S/1L); (C61-U64, 4L)
- **UGAG** (U74-G77, 3L/1S)
- **UCCC** x2 (U54-C57, 4S); (U59-C62, 4L)
- **UCCCU** (U54-U58, 3S/1L)

Motywy UCCC i CCCU zachodzą na siebie, tworzą motyw UCCCU

Aptamer 34

Sekwencja (5' → 3') :

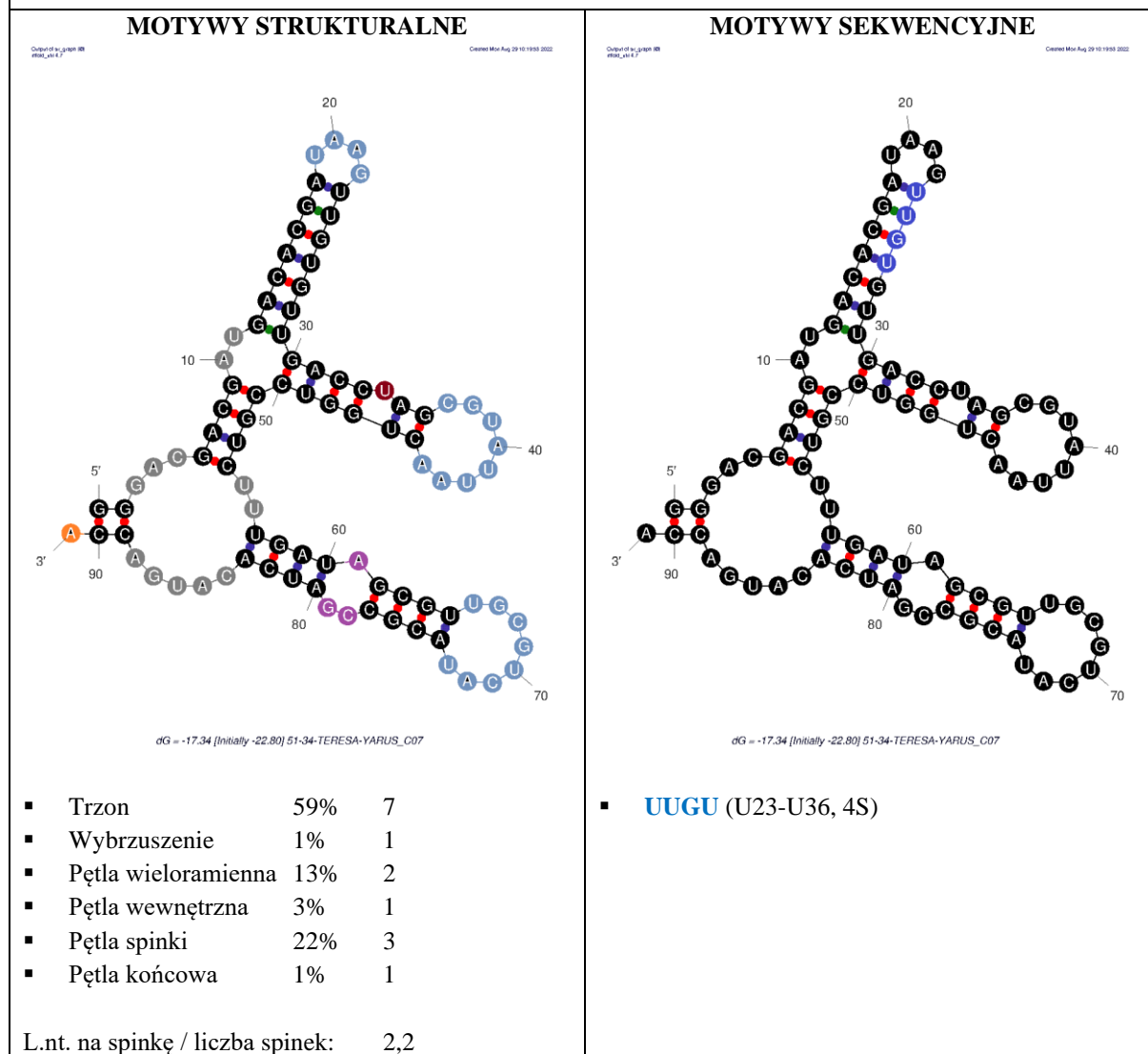
GGGACGACGAUGACACGAUAAGUUGUGUUGACCUAGCGUAUUAACUGGUC CGUCUUUGAUAGC
GUUGCGUCAUACGCCGAUCAUGACCA

Liczba nukleotydów: 91

Skład nukleotydowy: 22 A, 21 C, 24 G, 24 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -22.80$ kcal/mol,



Aptamer 54

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUACCCCUUCGCCCCUUCCUUGUUACACUAUCCUCCAUUGUACUC
CCUUCCUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

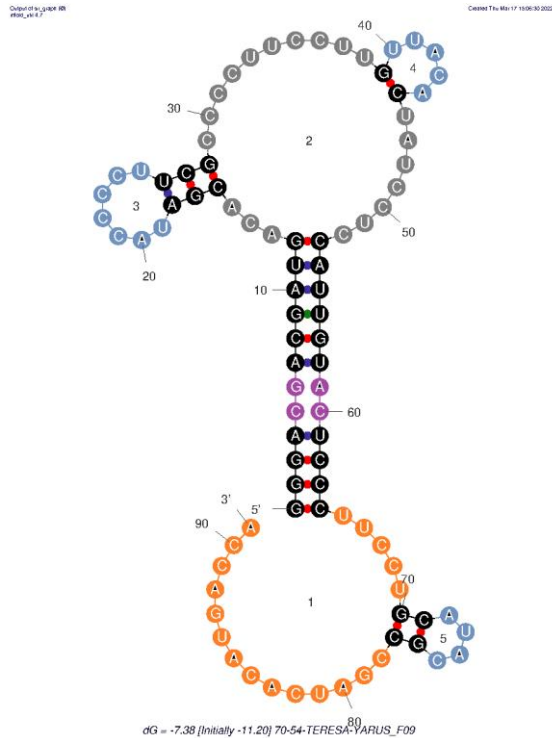
Liczba nukleotydów: 91

Skład nukleotydowy: 19 A, 35 C, 14 G, 23 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -11.20$ kcal/mol,
- Struktura 2 : $\Delta G = -10.80$ kcal/mol

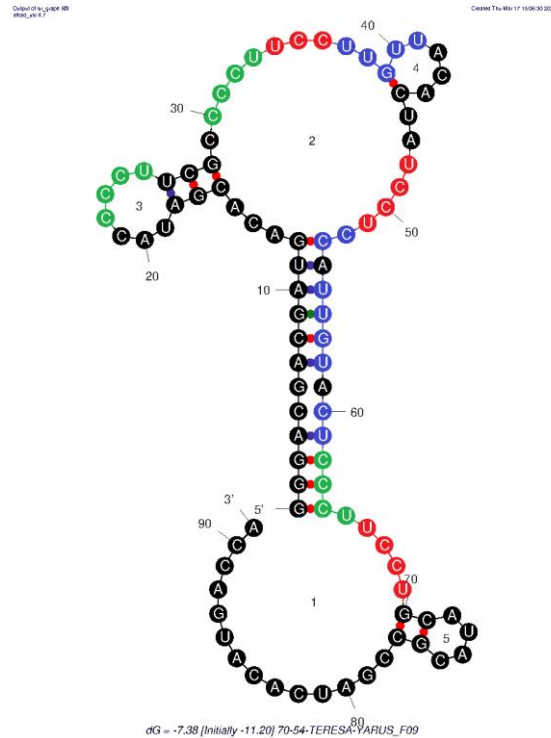
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 35% 5
- Wybrzuszenie 0% 0
- Pętla wieloramienna 22% 1
- Pętla wewnętrzna 4% 1
- Pętla spinki 18% 3
- Pętla końcowa 21% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 1,8

MOTYWY SEKWENCYJNE



- CCCU** x3 (C22-U25,4L); (C30-U33, 4L); (C62-U65, 3S/1L)
- UCCU** x3 (U34-U37, 4L); (U48-U51, 4L); (U66-U69, 4L)
- UCCC** (U61-C64, 4S)
- CUCC** x2 (C50-C53, 3L/1S); (C60-C63, 1L/3S)
- UUGU** x2 (U37-U40, 2L/1S/1L); (U55-U58, 4S)
- UUGUU** (U37-U41, 2L/1S/2L)
- CUCCC** (C60-C64, 1L/4S)
- UCCCU** (U61-U64, 4S/1L)

Motywy UCCU i UUGU oraz UCCU i CUCC zachodzą na siebie. Motywy CUCC, UCCC i CCCU zachodzą na siebie i tworzą motyw CUCCC

Aptamer 59

Sekwencja (5' → 3') :

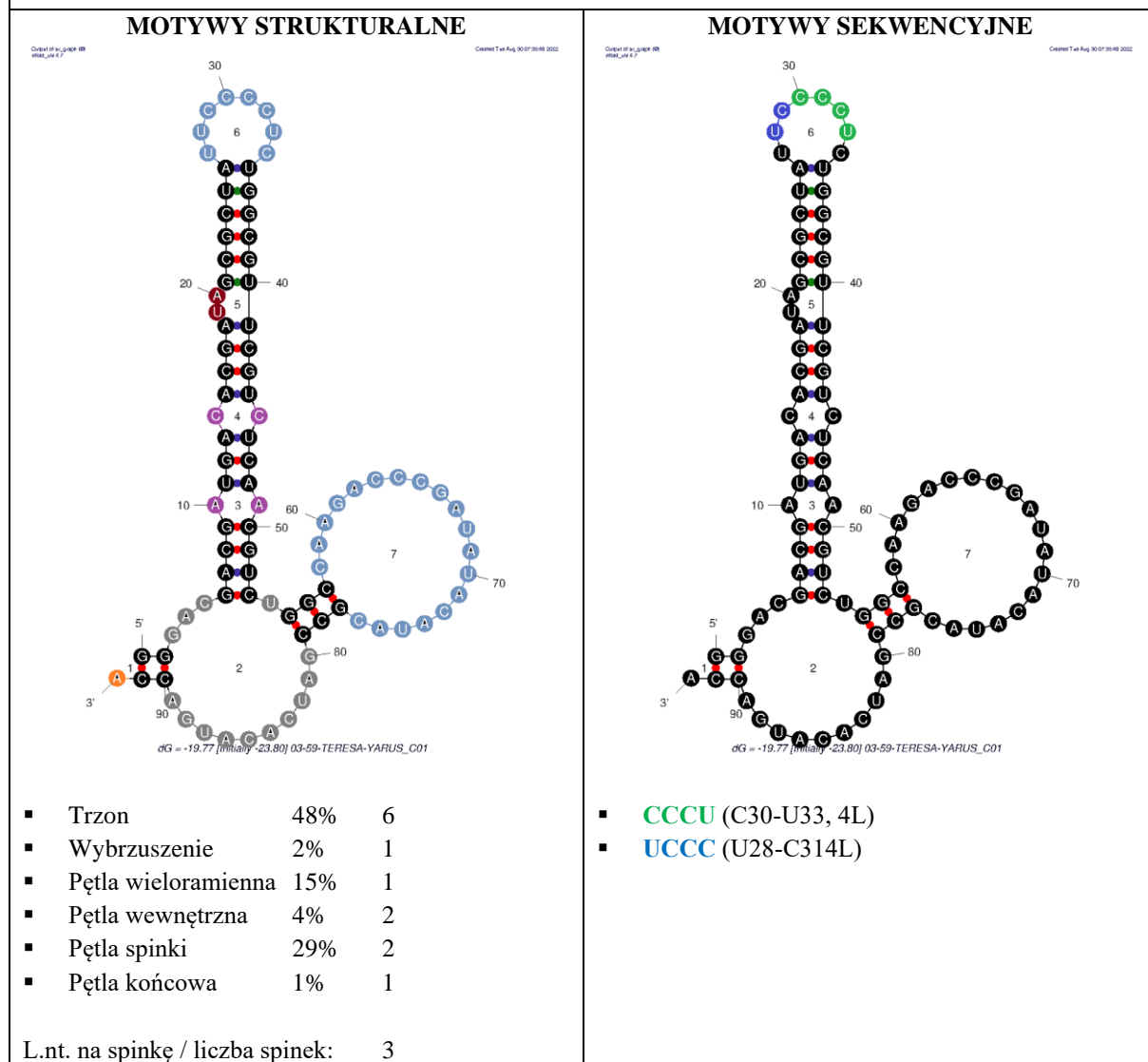
GGGACGACGAUGACACGAUAGCGCUAUU**UCCCU**CUGGGCGUUCGUCUCAACGUCUGGCCAAGAC
CCGAUAUA**CAUACG**CCGAUCACAUGACCA

Liczba nukleotydów: 92

Skład nukleotydowy: 23 A, 30 C, 21 G, 18 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -23.80$ kcal/mol



Aptamer 64

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAUGUAGGAUGACGGUCCACCUAUUAUUCGUG**CCCU**AUUUCU**UCC**
UUGCGUCAU**ACG**CCGAUCACAUGACCA

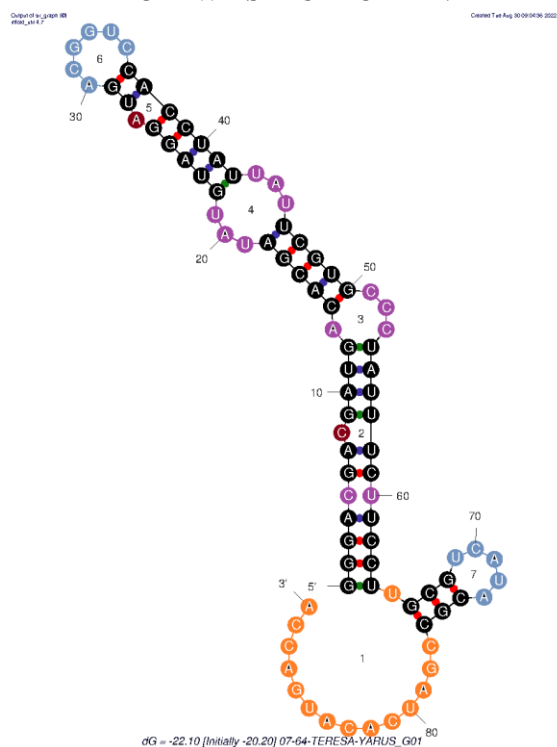
Liczba nukleotydów: 90

Skład nukleotydowy: 21 A, 25 C, 20 G, 24 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -20.20$ kcal/mol,
- Struktura 2 : $\Delta G = -20.00$ kcal/mol

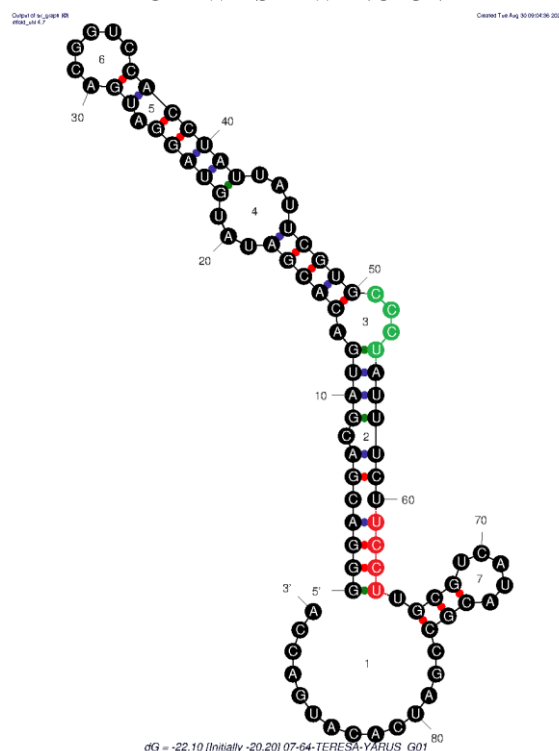
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 56% 7
- Wybrzuszenie 2% 2
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 13% 3
- Pętla spinki 12% 2
- Pętla końcowa 17% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 2,8

MOTYWY SEKWENCYJNE



- **CCCU** (C51-U54, 3L/1S)
- **UCCU** (U61-U64, 4S)

Aptamer 78

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAUUGCUCUAGUGAUCCACUUGCGUCUAUUGAGCGGCCUUUGCCA
CGGGUCACAUACGCCGAUCACAUGACCA

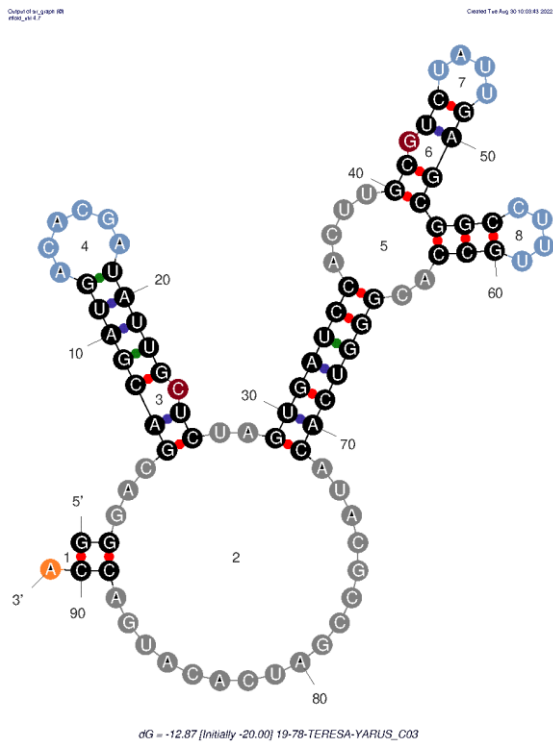
Liczba nukleotydów: 91

Skład nukleotydowy: 21 A, 26 C, 23 G, 21 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -20.00$ kcal/mol,
- Struktura 2 : $\Delta G = -19.90$ kcal/mol,
- Struktura 3 : $\Delta G = -19.20$ kcal/mol,
- Struktura 4 : $\Delta G = -19.10$ kcal/mol,
- Struktura 5 : $\Delta G = -19.10$ kcal/mol

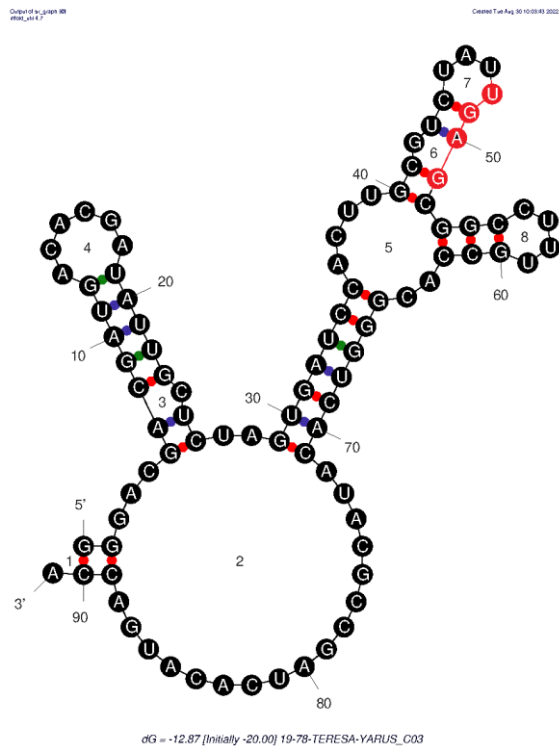
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 51% 7
- Wybrzuszenie 2% 2
- Pętla wieloramienna 31% 2
- Pętla wewnętrzna 0% 0
- Pętla spinki 15% 3
- Pętla końcowa 1% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 1,6

MOTYWY SEKWENCYJNE



- **UGAG** (U58-G51, 1L/3S)

Aptamer 90

Sekwencja (5' → 3') :

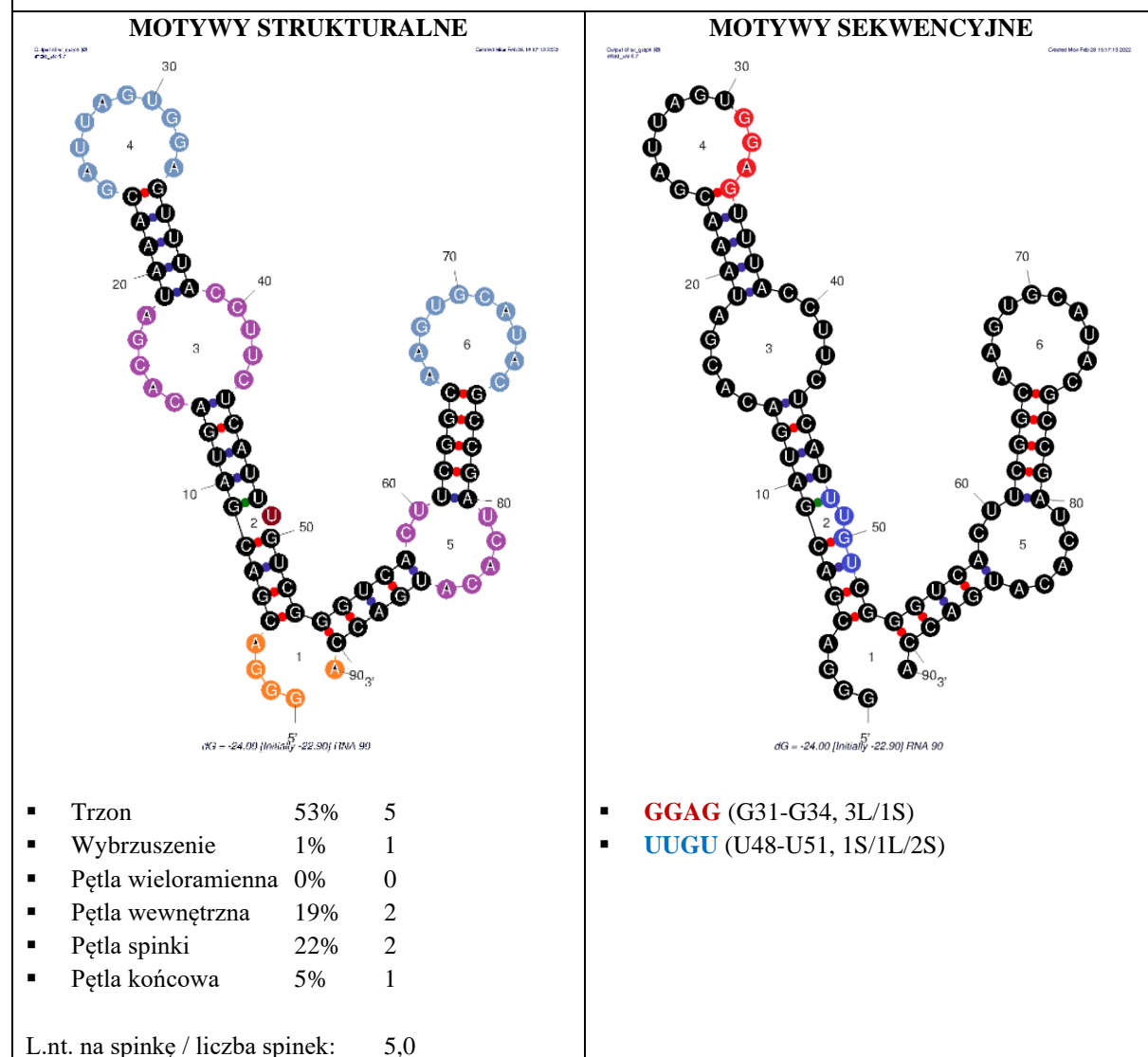
GGGACGACGAUGACACGAUAAACGAUUAGUGGAGUUUACCUUCUCAUUUGUCGGGUCACUUCG
GCAAGUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

Liczba nukleotydów: 91

Skład nukleotydowy: 24 A, 22 C, 23 G, 22 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -22.90$ kcal/mol
- Struktura 2 : $\Delta G = -22.10$ kcal/mol



Aptamer 93

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAUCCGUCAAGGCGCGUUGCAAAUCCCGAGGUCUGUAUUUUCUUC
GUUAGUCCUGCACAUUCUCCUCGAAACCAUACGCCGAUCACAUGACCA

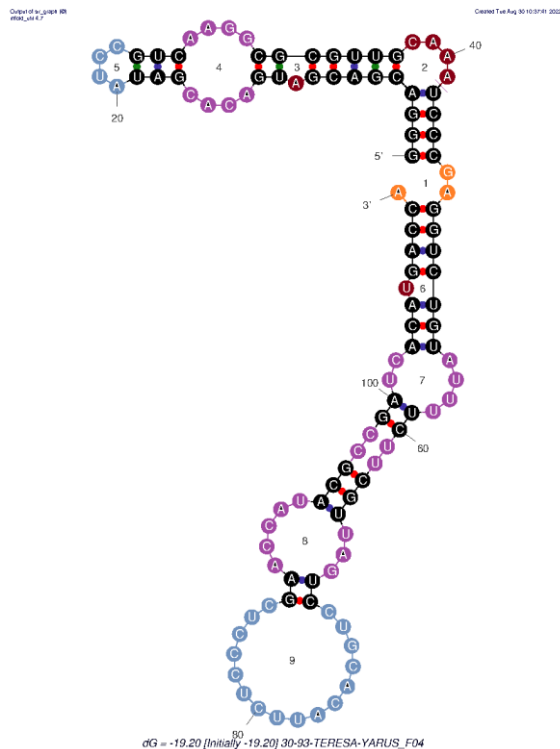
Liczba nukleotydów: 111

Skład nukleotydowy: 26 A, 34 C, 24 G, 27 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -19.20$ kcal/mol,
- Struktura 2 : $\Delta G = -19.10$ kcal/mol,
- Struktura 3 : $\Delta G = -19.10$ kcal/mol,
- Struktura 4 : $\Delta G = -19.00$ kcal/mol,
- Struktura 5 : $\Delta G = -18.90$ kcal/mol

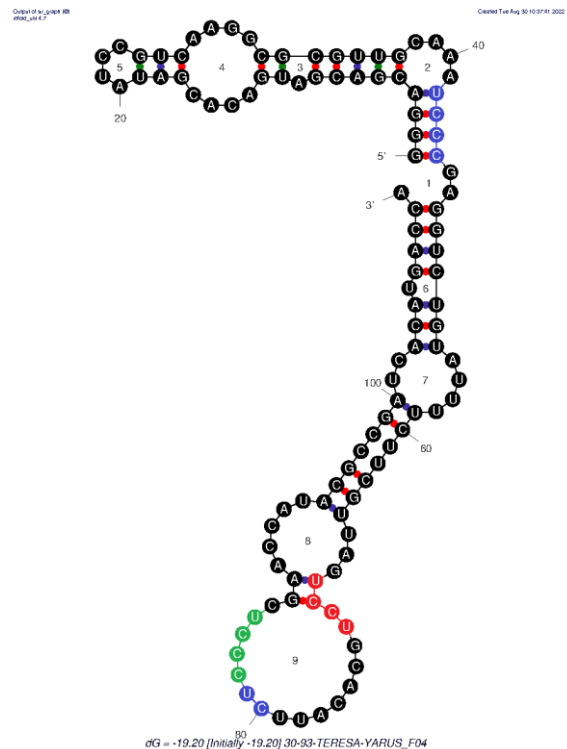
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 55% 9
- Wybrzuszenie 5% 3
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 23% 4
- Pętla spinki 18% 2
- Pętla końcowa 3% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 5,0

MOTYWY SEKWENCYJNE



- **CCCU** (C82-U85, 4L)
- **UCCU** (U69-U72, 2S/2L)
- **UCCC** x2 (U42-C45, 4S); (U81-C84, 4L)
- **CUCC** (C80-C83, 4L)
- **CUCCU** (C80-C84, 5L)
- **UCCCU** (C81-U85, 5L)

Motywy CUCC, UCCC i CCCU zachodzą na siebie, powstają motywy CUCCU i UCCCU, które też zachodzą na siebie

Aptamer 102

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUACCAAUACCAUGGAUUGGUCCCUUUAUCCAGCUUCUUAACCCUU
ACCUGUUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

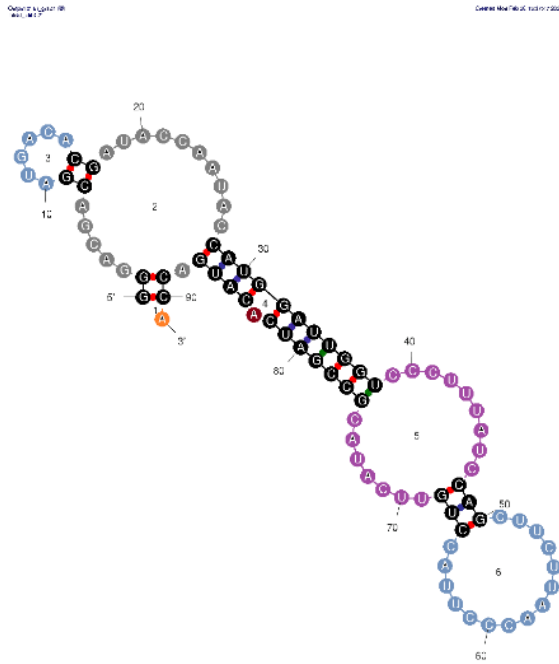
Liczba nukleotydów: 91

Skład nukleotydowy: 24 A, 28 C, 16 G, 23 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -12.90$ kcal/mol
- Struktura 2 : $\Delta G = -12.40$ kcal/mol

MOTYWY STRUKTURALNE

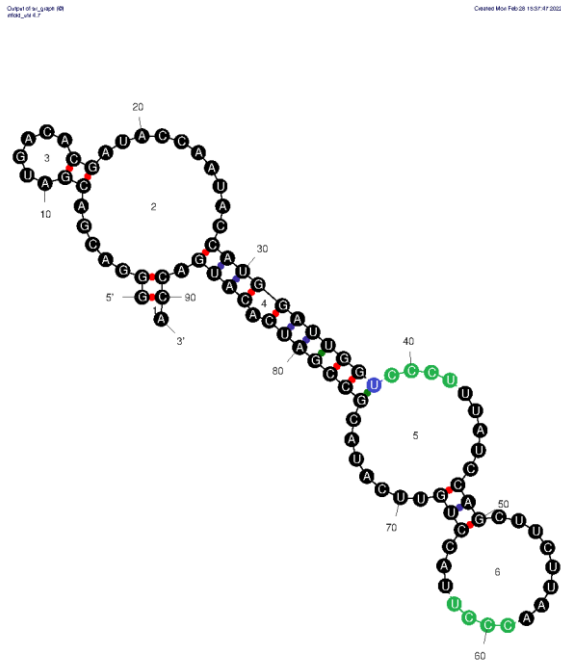


$\Delta G = -8.92$ [Initially -12.90] RNA 102

- Trzon 38% 5
- Wybrzuszenie 1% 1
- Pętla wieloramienna 17% 1
- Pętla wewnętrzna 21% 1
- Pętla spinki 22% 2
- Pętla końcowa 1% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 5,3

MOTYWY SEKWENCYJNE



$\Delta G = -8.92$ [Initially -12.90] RNA 102

- CCCU 2x (C39-U42, 4L); (C59-U62, 4L)
- UCCCU (U38-C41, 1S/3L)
- UCCCU (U38-U42, 1S/4L)

Motywy UCCCU i CCCU zachodzą na siebie i tworzą motyw UCCCU

Aptamer 109

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAACGCGACAGGGUCUGACAGGCGUCUCCUUCCCUUUUGCAUAAU
CUCCCGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

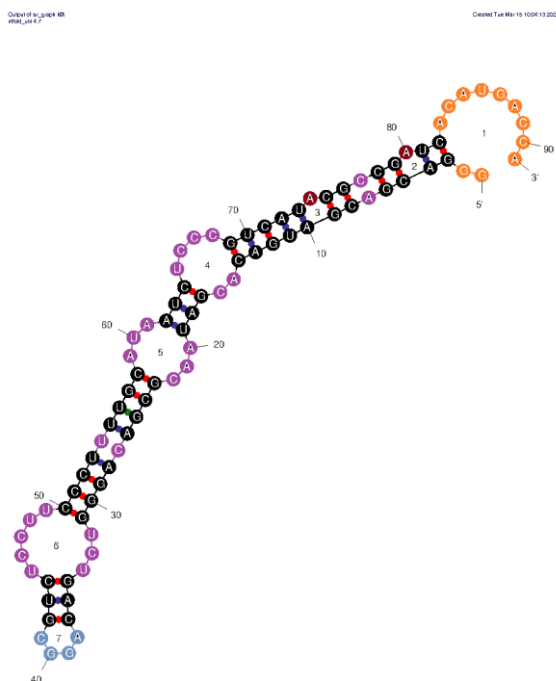
Liczba nukleotydów: 91

Skład nukleotydowy: 22 A, 29 C, 21 G, 19 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -22.80$ kcal/mol,
- Struktura 2 : $\Delta G = -21.70$ kcal/mol

MOTYWY STRUKTURALNE

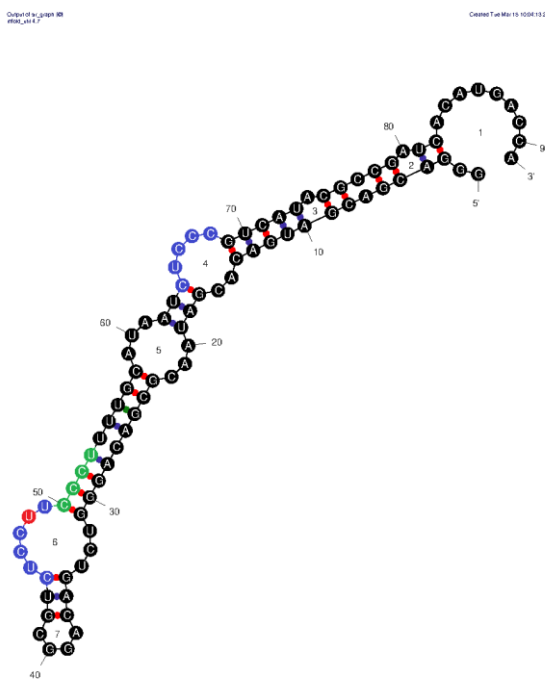


$\Delta G = -22.80$ [Initially -22.80] 43-109-TERESA-YARUS_C06

- Trzon 55% 8
- Wybrzuszenie 2% 2
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 26% 5
- Pętla spinki 4% 1
- Pętla końcowa 12% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 4,0

MOTYWY SEKWENCYJNE



$\Delta G = -22.80$ [Initially -22.80] 43-109-TERESA-YARUS_C06

- CCCU (C50-U53, 4S)
- UCCU (U45-U48, 4L)
- UCCC x2 (U49-C52, 1L/3S); (U65-C68, 4L)
- CUCC x2 (C44-C47, 1S/3L); (C64-C67, 1S/3L)
- UCCCU (U48-U53, 1L/4S)
- CUCCC (C64-C68, 1S/4L)

Motywy UCCC i CCCU zachodzą na siebie, tworząc motyw UCCCU. Motywy CUCC i CUCC zachodzą na siebie, tworząc motyw CUCCC.

Aptamer 111

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUCUAUCAGAAUAAUGUGUUCUUUGGUUCUGUGCACACGCUGUUU
CAGGGCUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

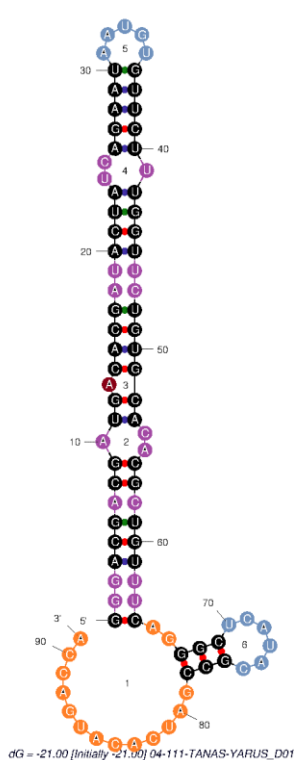
Liczba nukleotydów: 91

Skład nukleotydowy: 23 A, 22 C, 22 G, 24 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -21.00$ kcal/mol

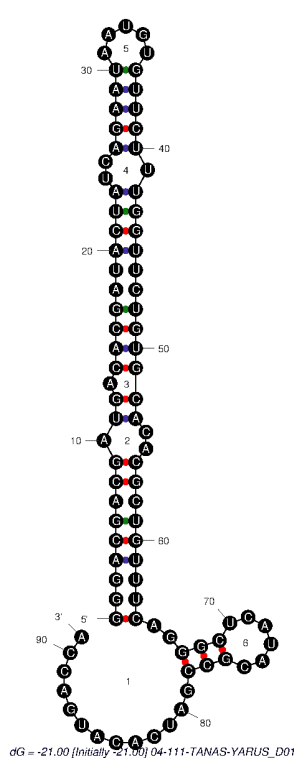
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 53% 8
- Wybrzuszenie 1% 1
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 18% 5
- Pętla spinki 12% 2
- Pętla końcowa 16% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 2,8

MOTYWY SEKWENCYJNE



Brak analizowanych motywów

Aptamer 119

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAUUUUCCCUCAUGUAUUCGUAUUGGCCGUUGUCCCUGCUCAUCC
CCUGGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

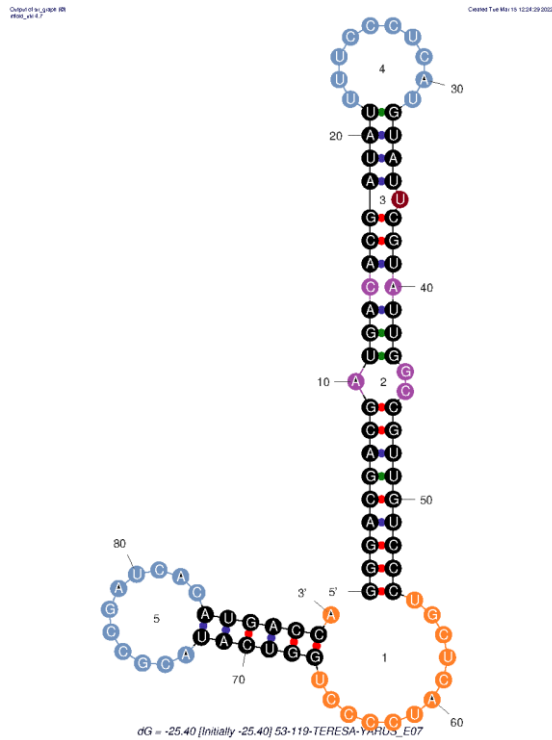
Liczba nukleotydów: 90

Skład nukleotydowy: 18 A, 28 C, 19 G, 25 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -25.40$ kcal/mol

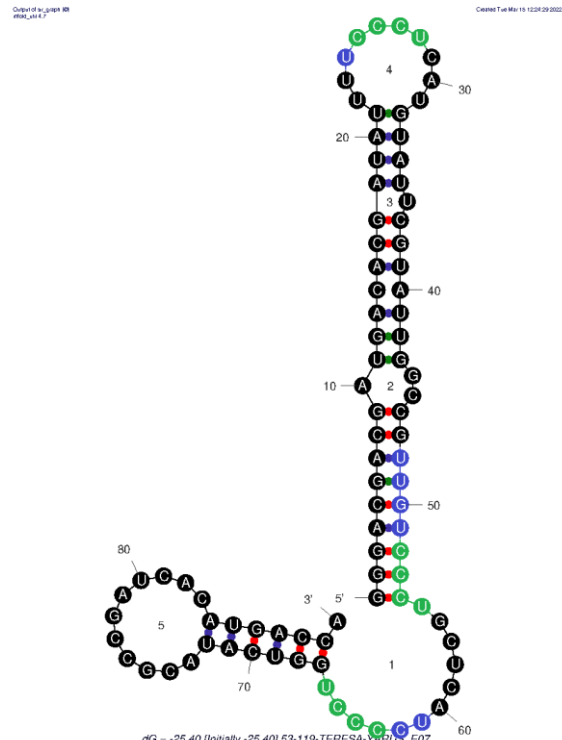
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 56% 5
- Wybrzuszenie 1% 1
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 6% 2
- Pętla spinki 23% 2
- Pętla końcowa 16% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 5,3

MOTYWY SEKWENCYJNE



- CCCU** x3 (C25-U28, 4L); (C52-U55, 3S/1L); (C63-U66, 4L)
- UCCC** x3 (U24-C27, 4L); (U51-C54, 4S); (U61-C64, 4L)
- UUGU** (U48-U51, 4S)
- UCCCU** x2 (U24-U28, 4L); (U51-U55, 4S/1L)

Dwukrotnie motywy UCCC i CCCU zachodzą na siebie, tworząc motyw UCCCU

Aptamer 145

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAGACAUAUAUUGGGUGCUGUCGACGUGUUUAUUAUCGCCUUU
GCAUACGCCGAUCACAUGACCA

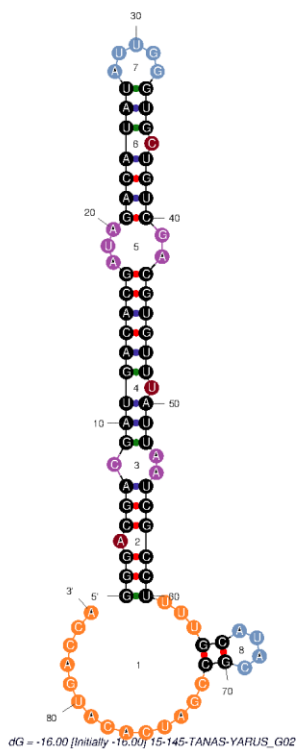
Liczba nukleotydów: 85

Skład nukleotydowy: 22 A, 19 C, 21 G, 23 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -16.00$ kcal/mol,
- Struktura 2 : $\Delta G = -15.40$ kcal/mol,
- Struktura 3 : $\Delta G = -15.00$ kcal/mol

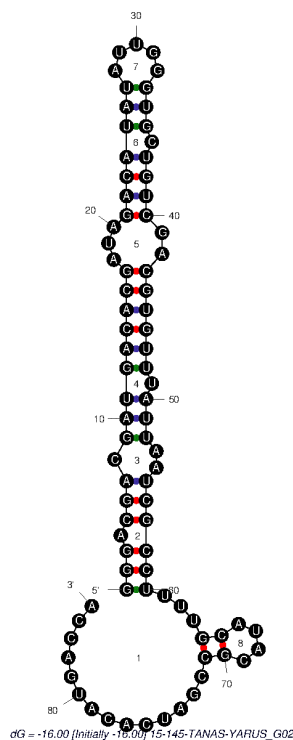
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 56% 7
- Wybrzuszenie 4% 3
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 9% 2
- Pętla spinki 11% 2
- Pętla końcowa 20% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 2,3

MOTYWY SEKWENCYJNE



Brak analizowanych motywów

Aptamer 146

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAAUGUGAGGAGUCGCGGUUUCUUCUGGUUUUGGUCCCAUUGGC
CGAGUCAACAUCGCCGAUCACAUGACCA

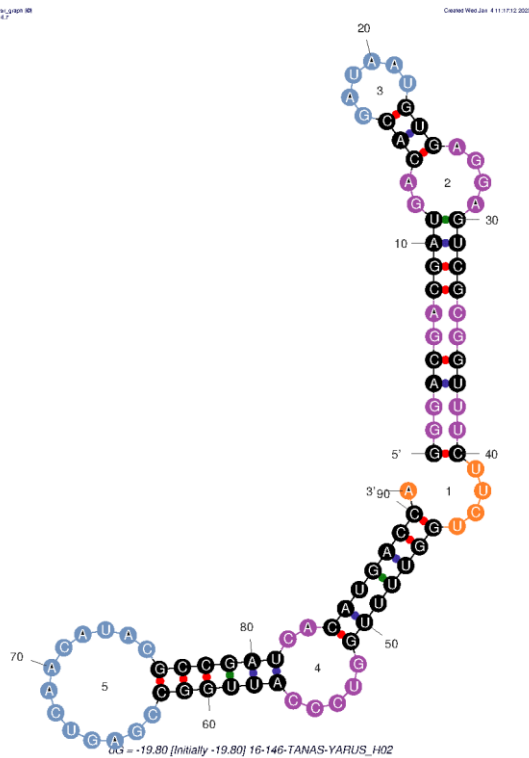
Liczba nukleotydów: 91

Skład nukleotydowy: 21 A, 22 C, 26 G, 22 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -19.80$ kcal/mol,
- Struktura 2 : $\Delta G = -19.50$ kcal/mol

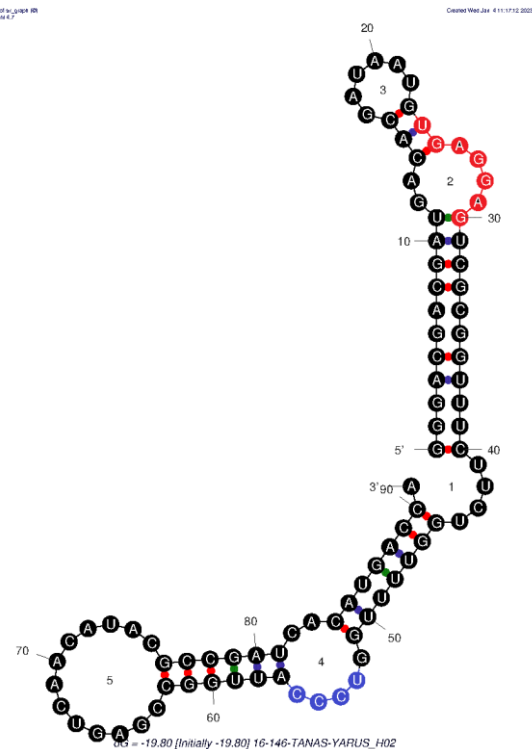
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 51% 5
- Wybrzuszenie 0% 0
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 23% 4
- Pętla spinki 21% 2
- Pętla końcowa 5% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 4,8

MOTYWY SEKWENCYJNE



- GGAG** (G27-G30, 3L/1S)
- UGAG** (G24-G27, 2S/2L)
- UCCC** (U53-C56, 4L)

Motywy UGAG i GGAG zachodzą na siebie

Aptamer 157

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAUGUACCAUGGCAUAUCAGCUCACAUUCU**UCCU**GCG**CCCU****UCCU****CUC**
CCCUGCU**CAUACGCCGAUCACAUGACCA**

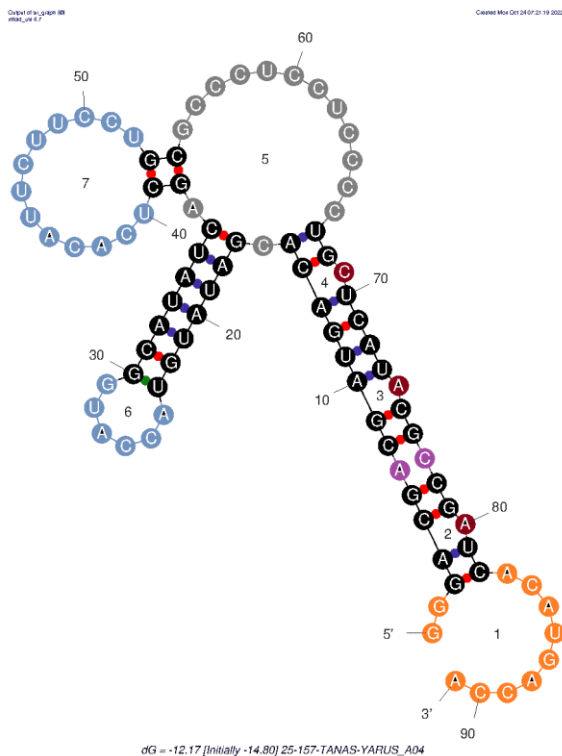
Liczba nukleotydów: 91

Skład nukleotydowy: 21 A, 33 C, 17 G, 20 U

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -14.80$ kcal/mol,
- Struktura 2 : $\Delta G = -14.80$ kcal/mol,
- Struktura 3 : $\Delta G = -14.50$ kcal/mol

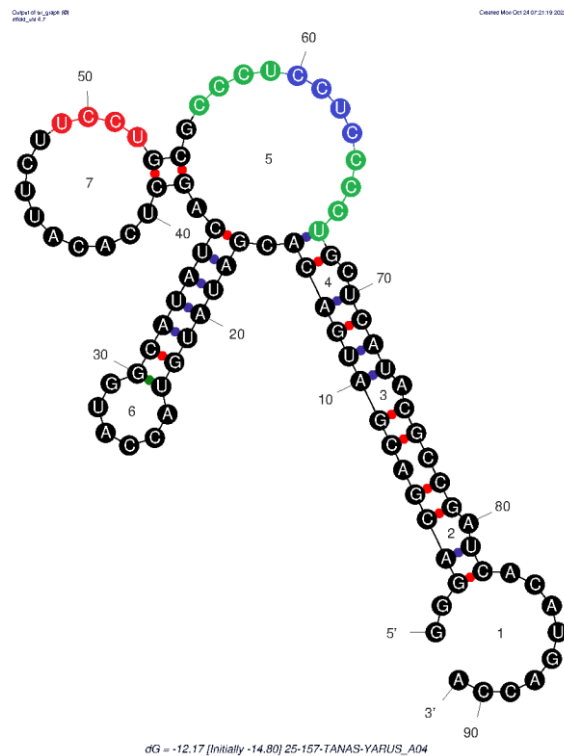
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 46% 7
- Wybrzuszenie 3% 3
- Pętla wieloramienna 15% 1
- Pętla wewnętrzna 2% 1
- Pętla spinki 21% 2
- Pętla końcowa 12% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 4,8

MOTYWY SEKWENCYJNE



- **CCCU** x2 (C56-U59, 4L); (C64-U67, 3L/1S)
- **UCCU** x2 (U49-U52, 4L); (U59-U62, 4L)
- **UCCC** (U62-U65, 4L)
- **CUCC** x2 (U58-C61, 4L); (C61-C64, 4L)
- **CUCCC** (5L)

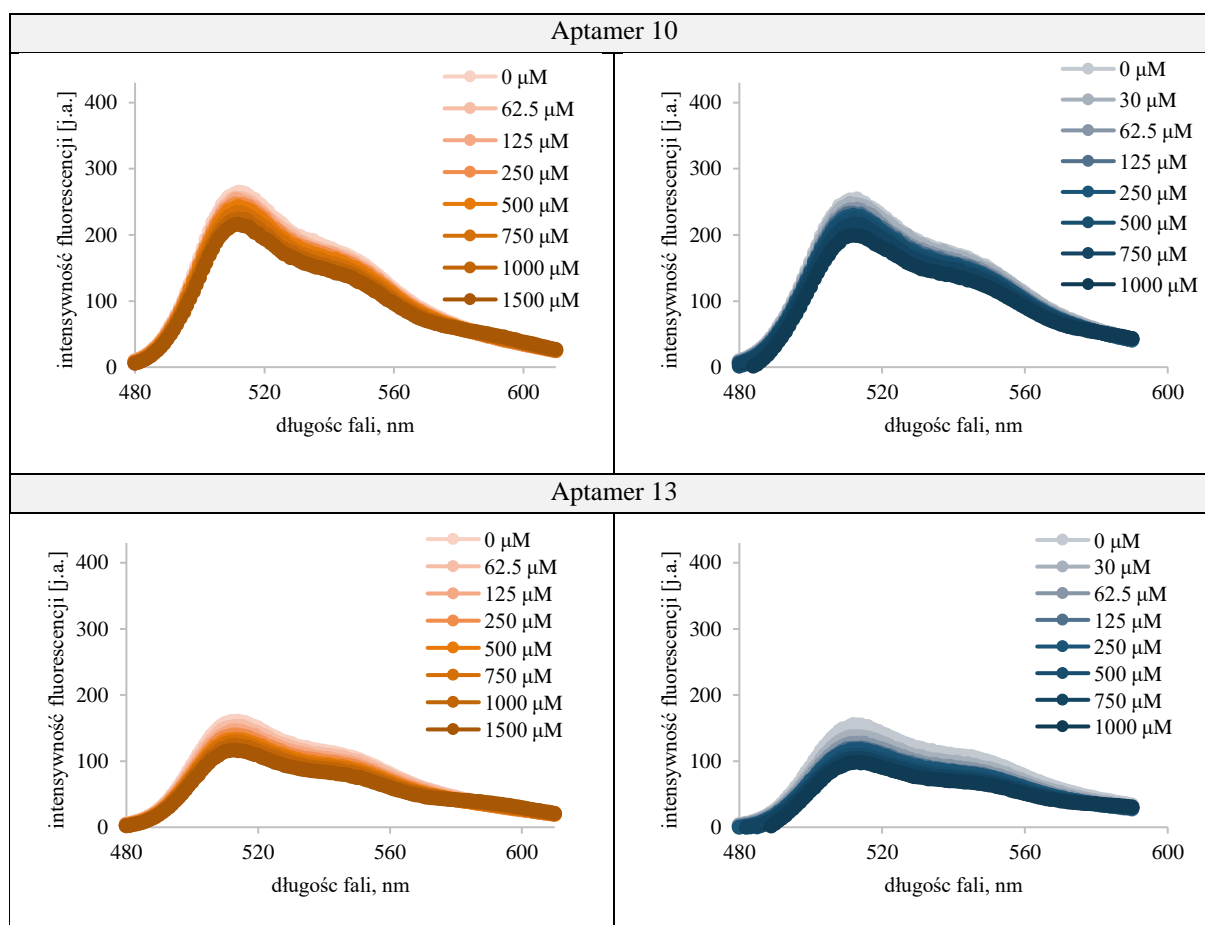
Motywy CUCC, UCCU i CCCU zachodzą na siebie tworzą motyw CUCCC

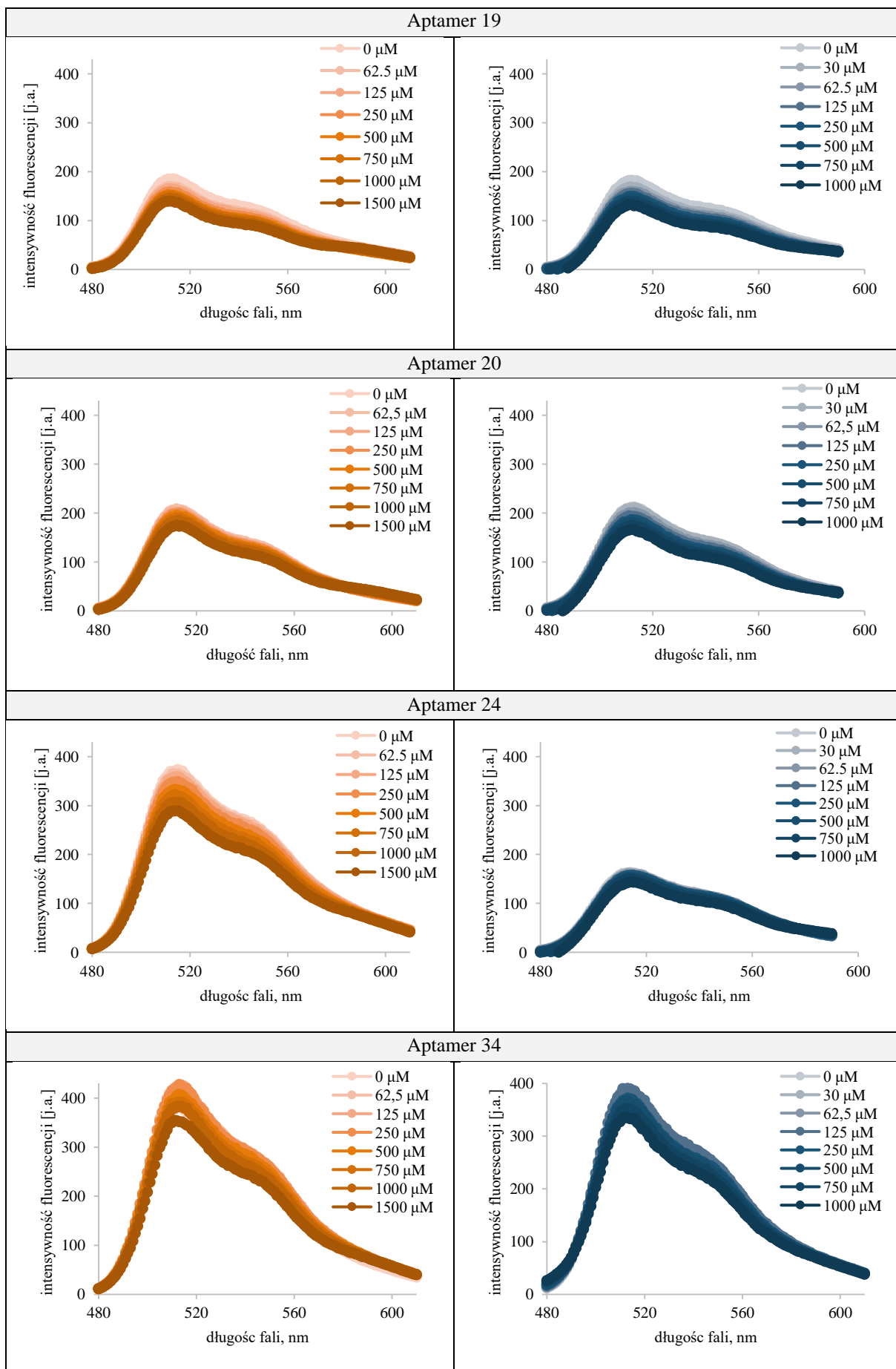
4.3. ODDZIAŁYWANIE APTAMERÓW RNA Z BŁONAMI MODELOWYMI

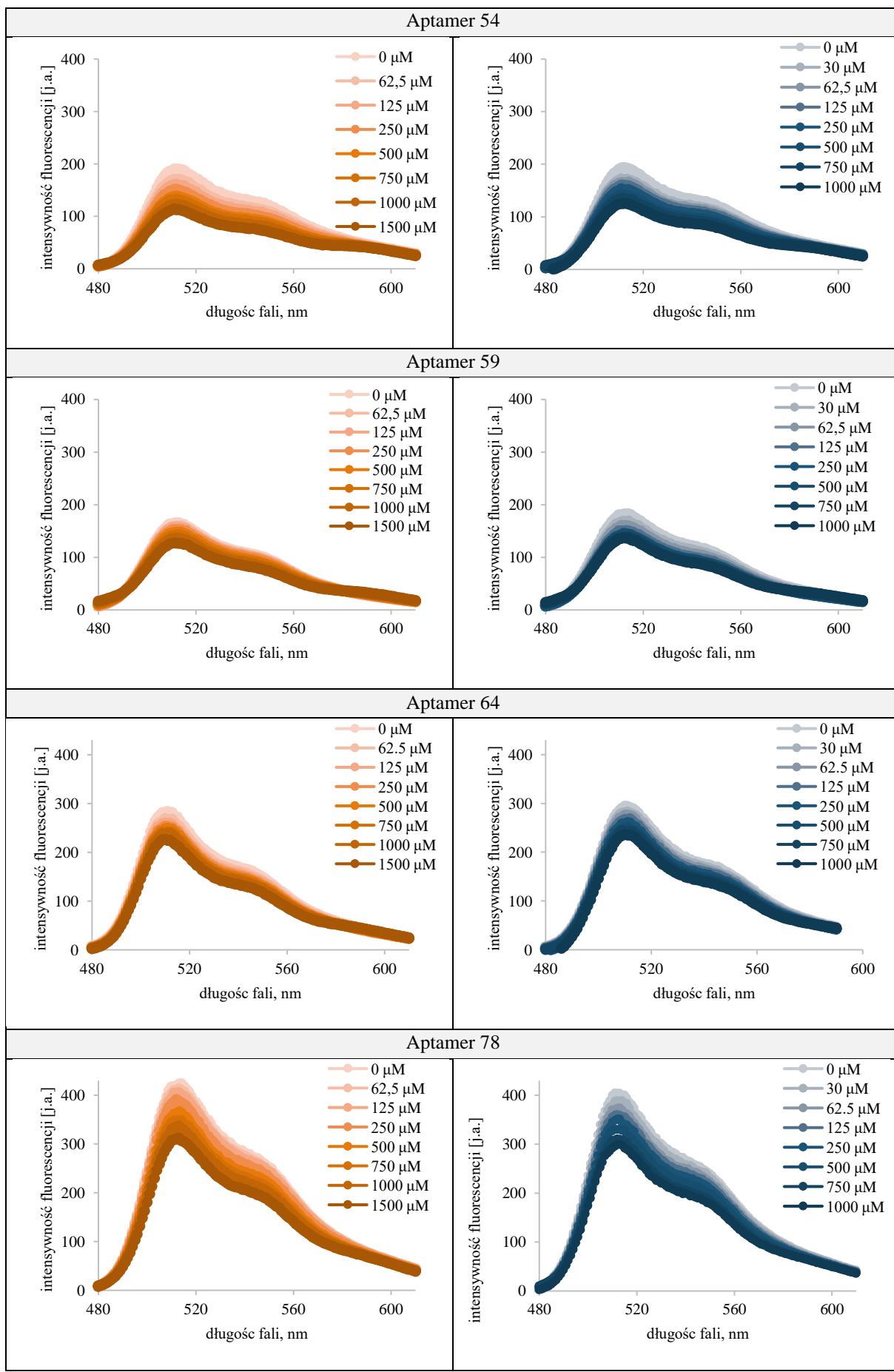
W celu zbadania znaczenia obecności traw lipidowych na poziom oddziaływania RNA z błoną pęcherzyków, przeprowadzono pomiary fluorescencyjne zgodnie z procedurą przedstawioną w rozdziale 3, „Metody”. Przy badaniu oddziaływania RNA-błona dla kolejnych aptamerów RNA obserwowano zmiany w intensywności emisji donora (związana z RNA sonda YOYO-1) podczas miareczkowania liposomami LUV_{RAFT} oraz LUV_{DOPC}. W poniższych tabelach (23 i 24) zestawione są przykładowe wyniki pomiarów dla 16 badanych aptamerów RNA z dwoma rodzajami liposomów, uzyskane w oddzielnych eksperymentach.

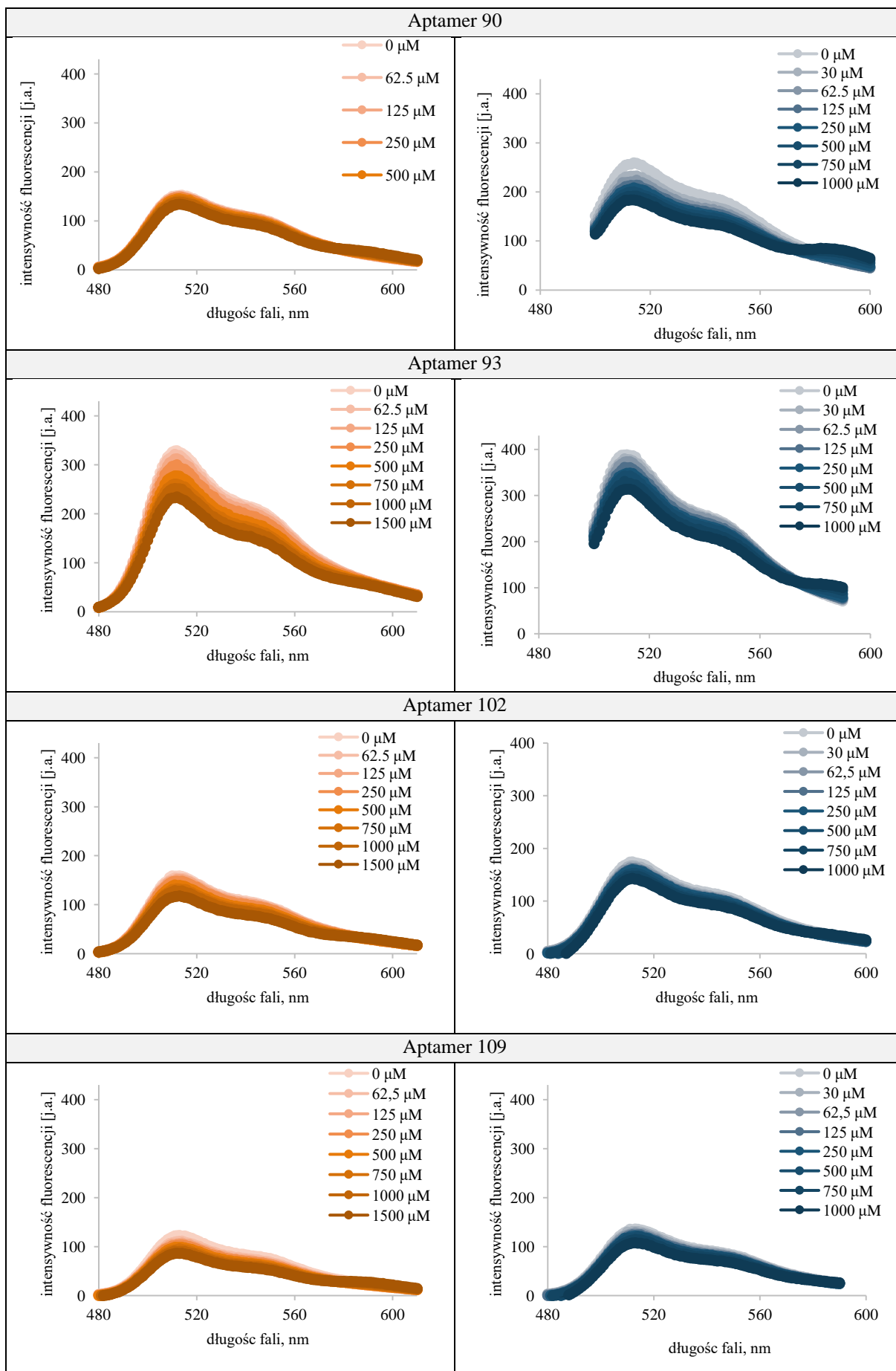
Tabela 23. Zmiany widma emisji fluorescencji sondy YOYO-1 w trakcie miareczkowania aptamerów RNA liposomami LUV_{DOPC} i LUV_{RAFT}

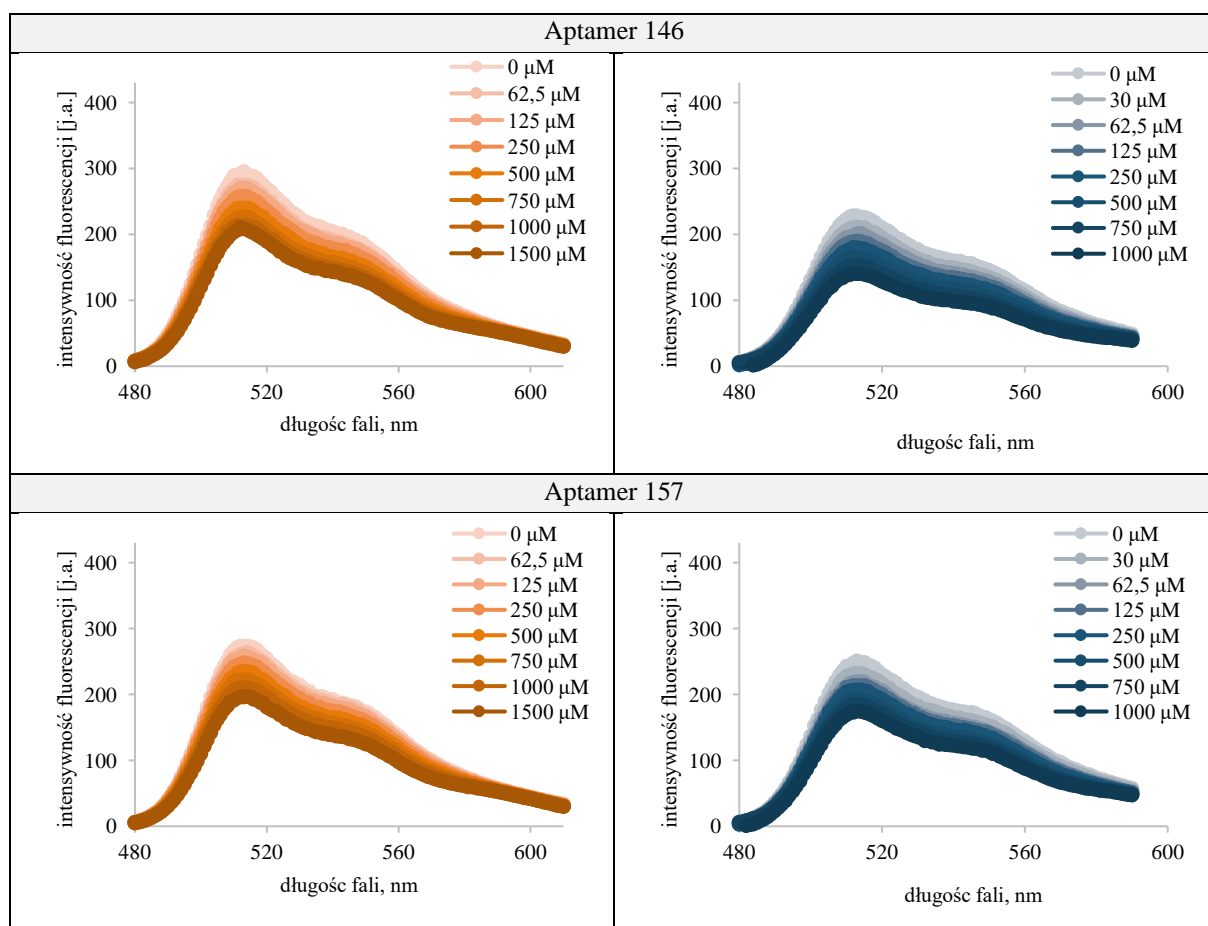
Dla kolejnych aptamerów wykresy po lewej stronie tabeli przedstawiają zmiany widma YOYO-1 przy miareczkowaniu liposomami LUV_{DOPC} (stężenie lipidu DOPC 0 μM –1500 μM), zaś wykresy po prawej przy miareczkowaniu LUV_{RAFT} (stężenie lipidów trawnych 0 μM – 1000 μM).







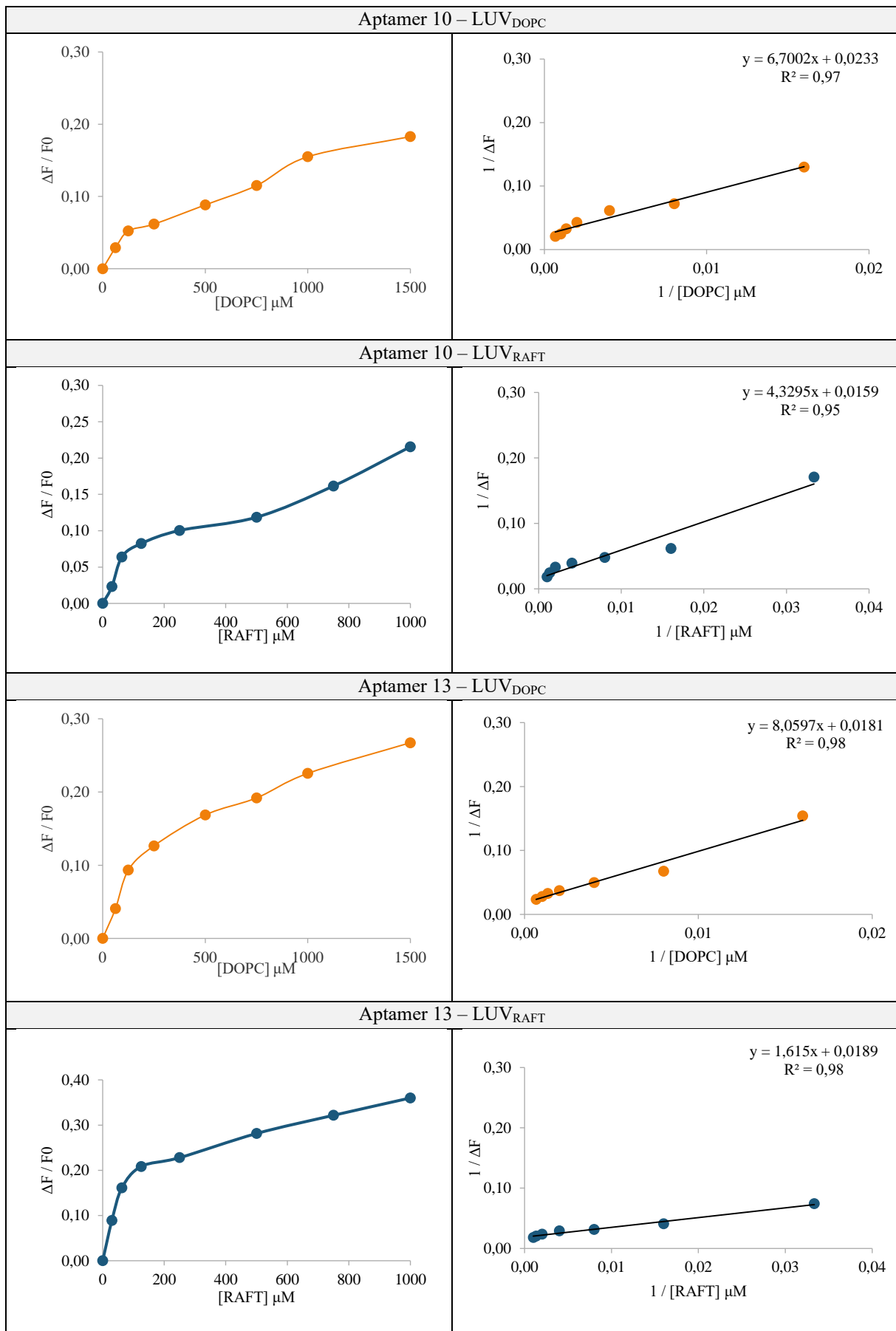


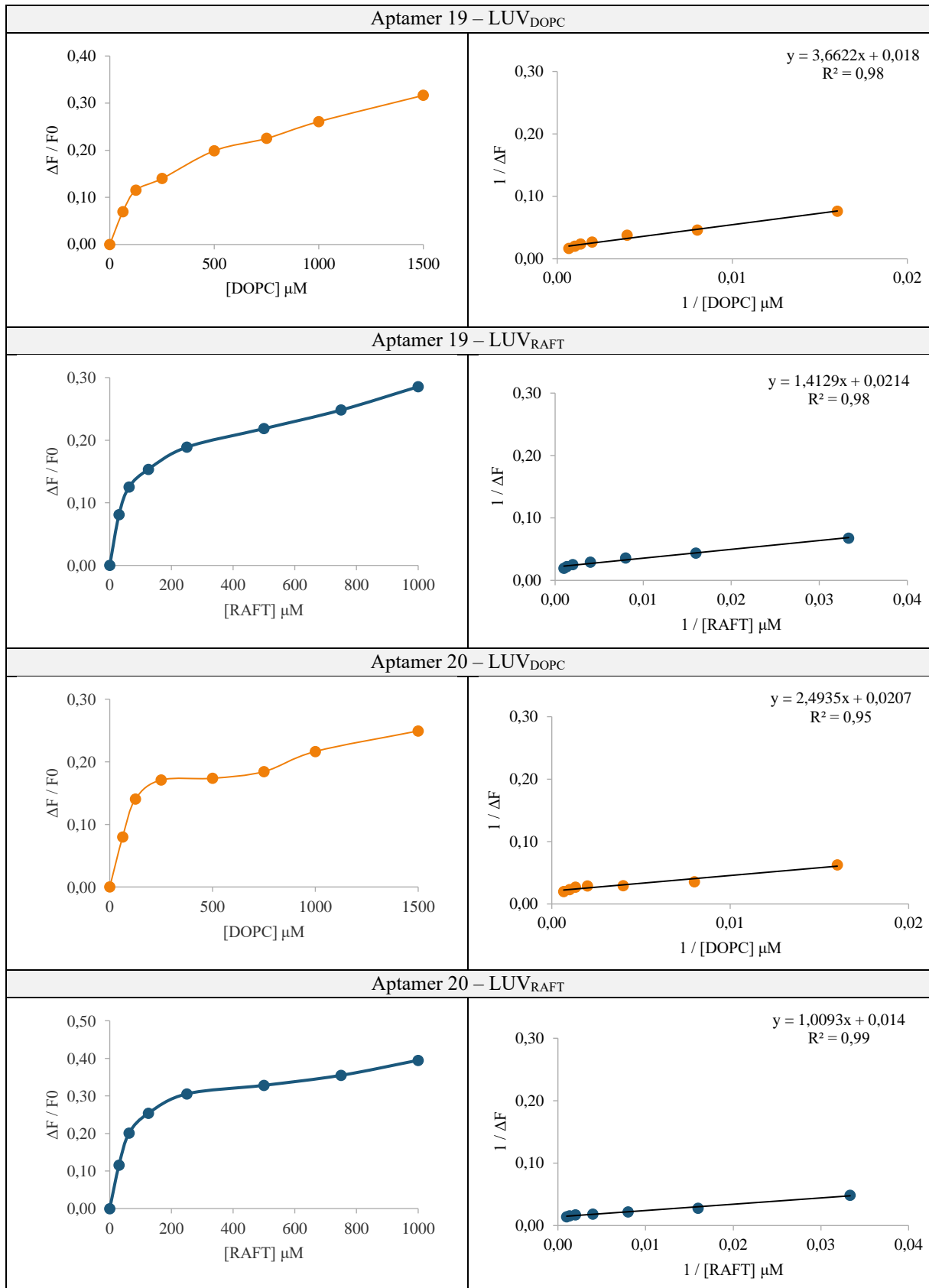


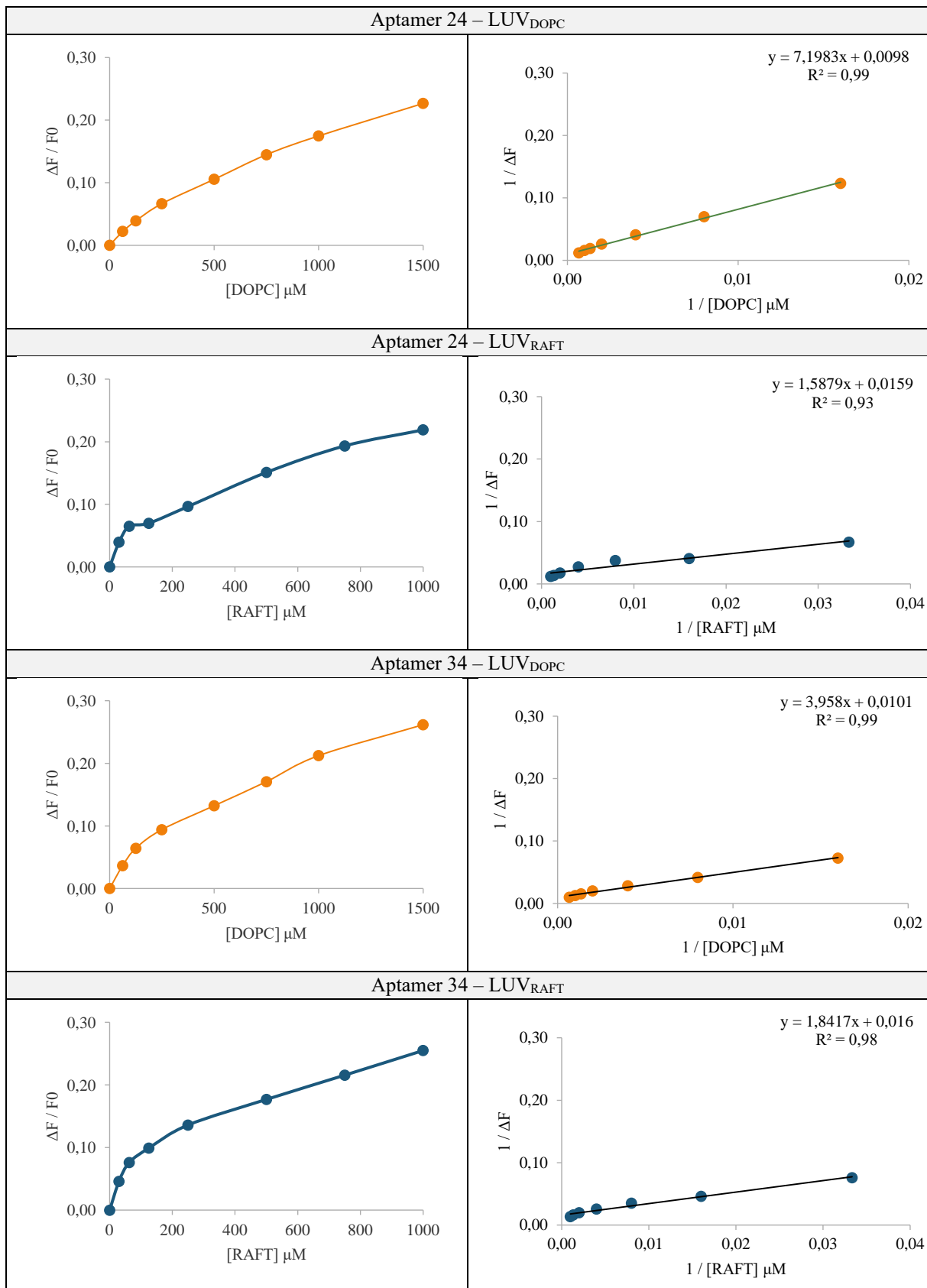
W trakcie miareczkowania liposomami obserwowano spadek fluorescencji sondy YOYO-1. Wskazuje to na zachodzenie transferu energii od związanej z RNA sondy YOYO-1 (donora), do związanej z błoną liposomów sondy LissRh-PE (akceptor) w trakcie oddziaływania RNA z błoną lipidową.

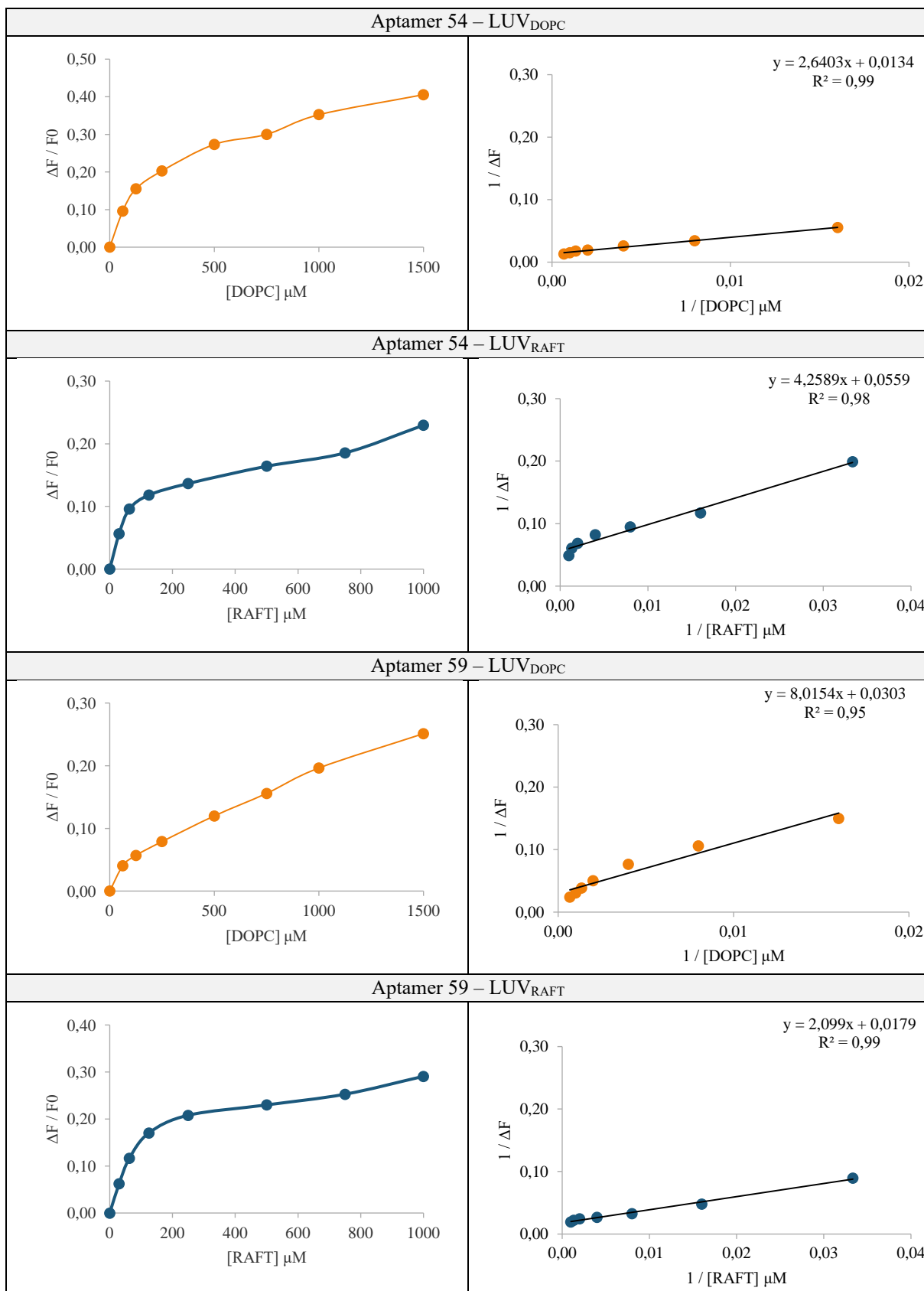
Tabela 24. Zmiany emisji fluorescencji sondy YOYO-1 oraz odwrotności zmian fluorescencji YOYO-1 w trakcie miareczkowania aptamerów RNA liposomami.

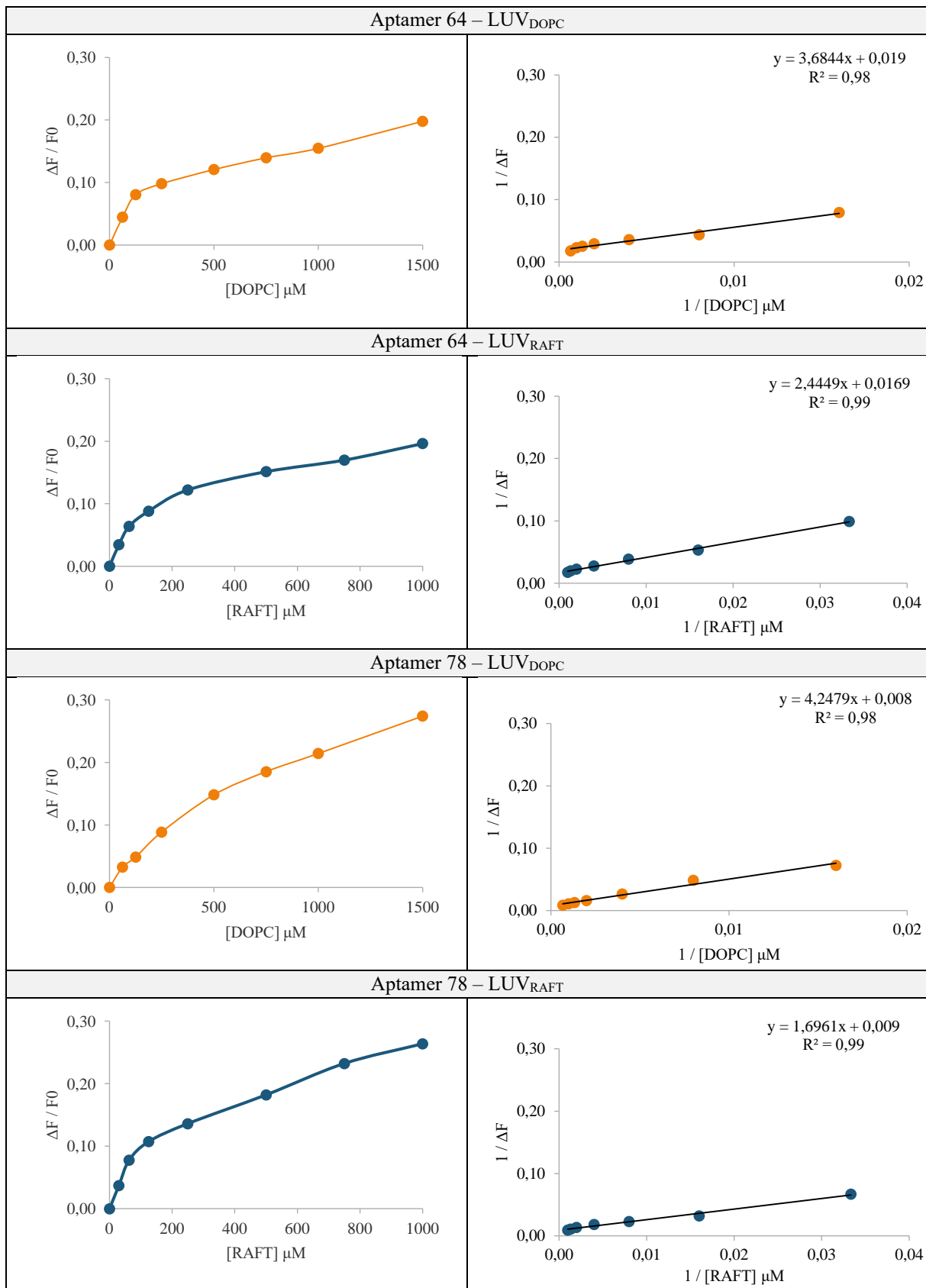
Dla kolejnych aptamerów po lewej stronie tabeli przedstawione zostały wykresy zmiany fluorescencji sondy YOYO-1 podczas miareczkowania aptamerów liposomami LUV_{DOPC} lub LUV_{RAFT}, po prawej stronie przedstawione zostały wykresy odwrotności zmiany fluorescencji YOYO-1 podczas miareczkowania danym typem liposomów wraz z równaniami regresji liniowej. Użyte na wykresie skróty oznaczają: F₀ – to maksymalna fluorescencja YOYO-1 uzyskana przed rozpoczęciem miareczkowania liposomami, ΔF – to różnica między fluorescencją F₀, a wartościami fluorescencji kolejnych punktów pomiarowych (w trakcie miareczkowania liposomami). Podane na osi X wartości odnoszą się do stężenia lipidów wchodzących w skład liposomów, czyli stężenia DOPC, w przypadku LUV_{DOPC} (stężenie oznaczone na wykresach jako [DOPC]) lub stężenia DOPC, SM i Chl w przypadku LUV_{RAFT} (na wykresach oznaczone jako [RAFT]).

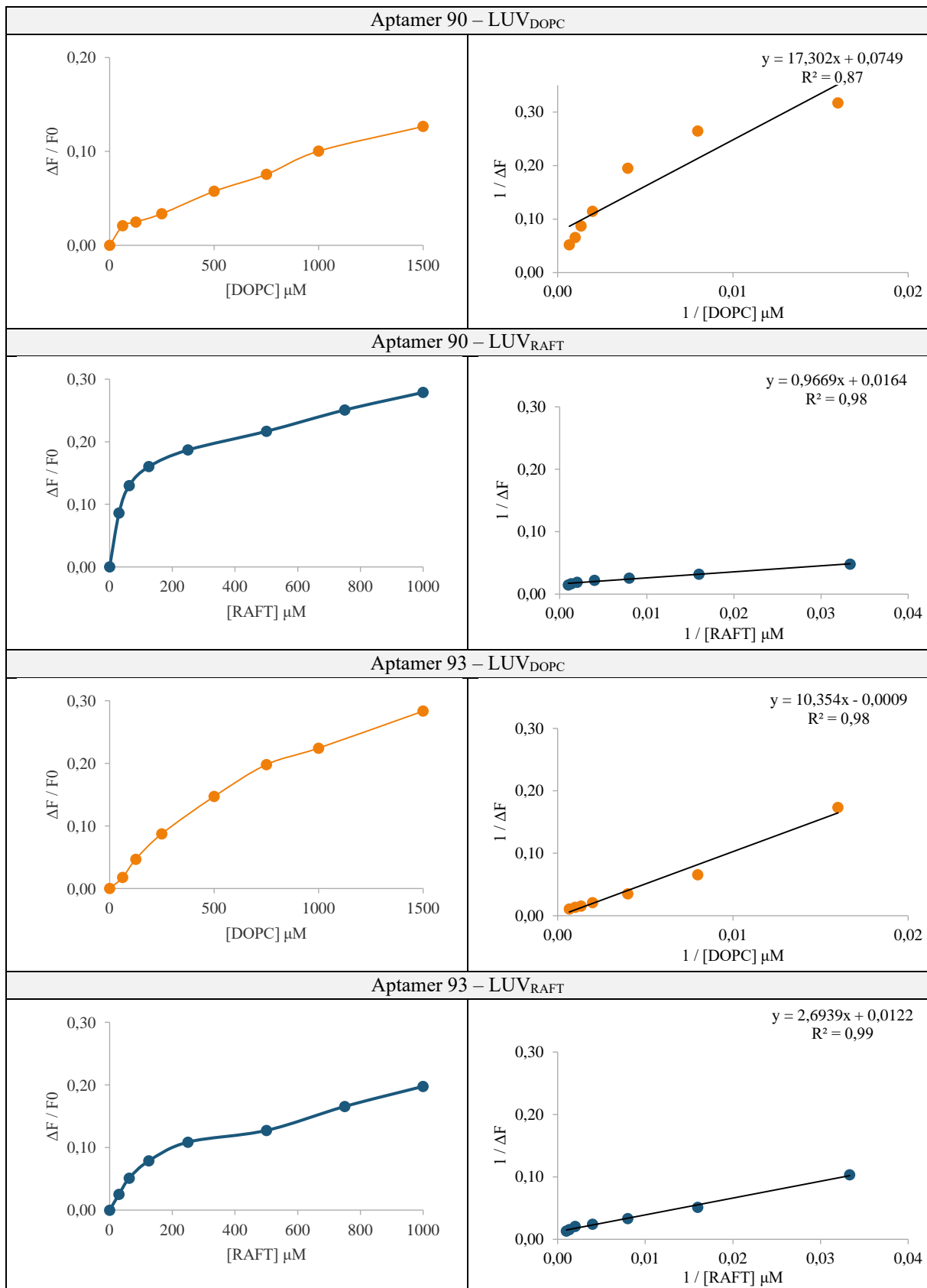


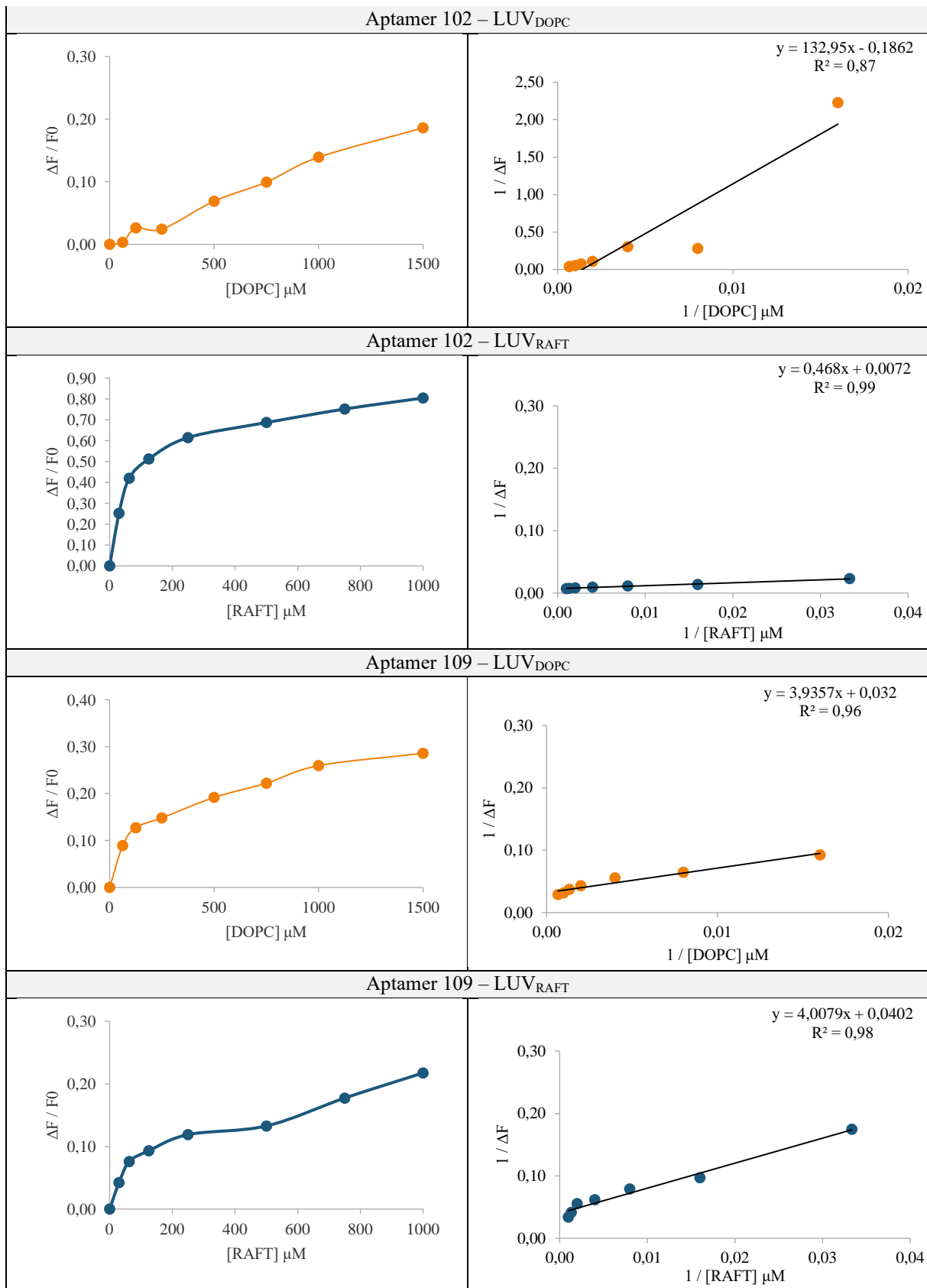


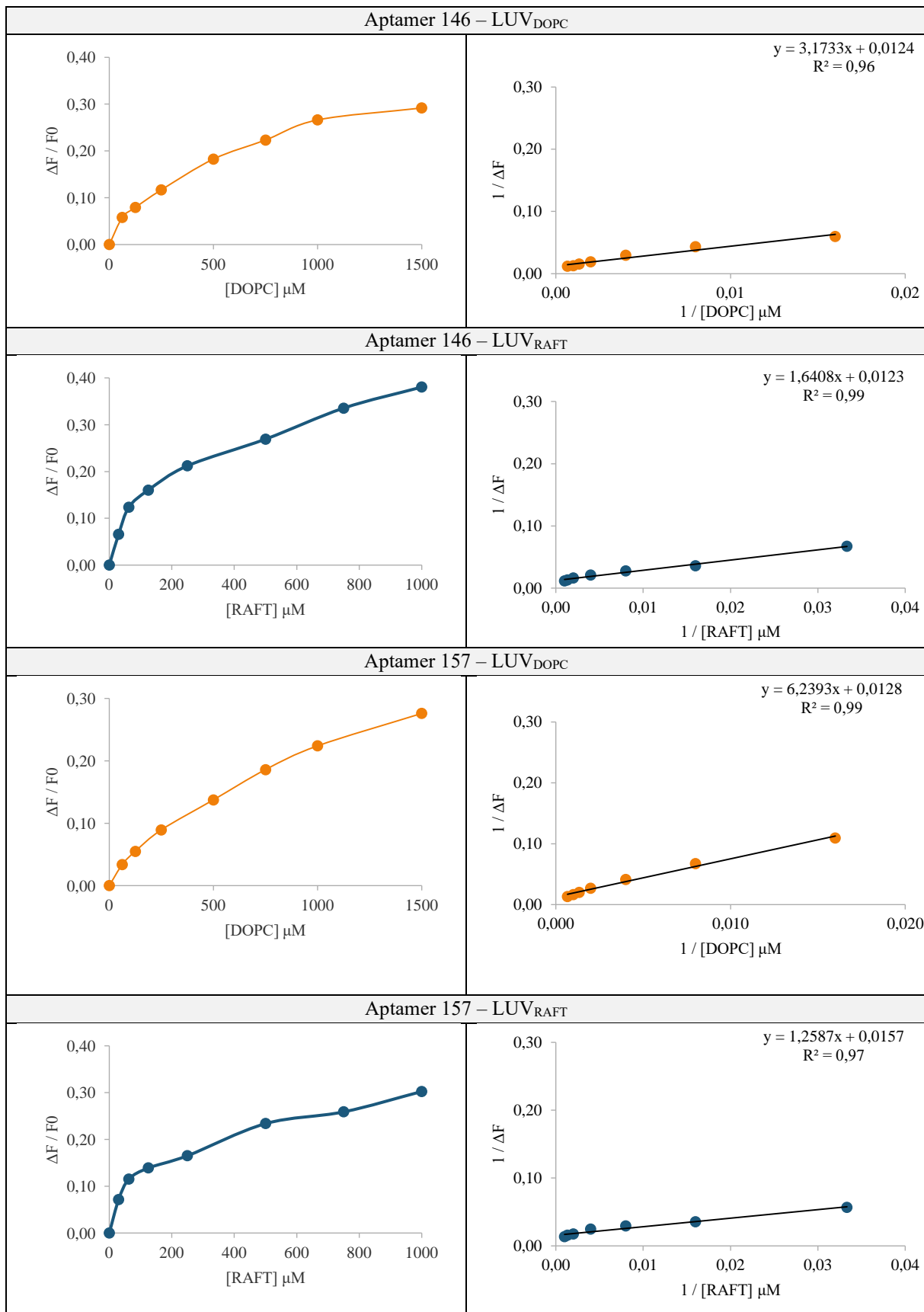








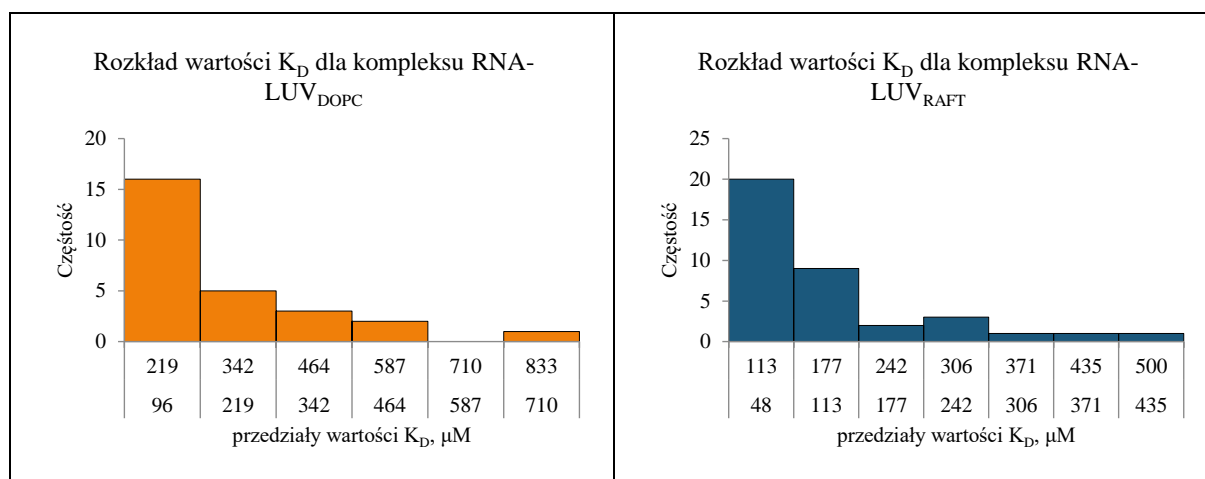




Stosunek $\Delta F/F_0$ zasadniczo wzrastał podczas miareczkowania aptamerów RNA liposomami, wykazując stopniowe wysycanie aptameru RNA cząsteczkami lipidów. Na podstawie uzyskanego równania regresji liniowej obliczana była wartość K_D dla każdego pomiaru. Z kolei na podstawie uzyskanych wartości K_D dla poszczególnych powtórzeń doświadczenia, obliczana była średnia K_D dla danego aptameru.

Dla niektórych pomiarów, szczególnie w przypadku oddziaływań aptamerów RNA z LUV_{DOPC} , stosunek $\Delta F/F_0$ w trakcie miareczkowania był nieregularny, dla takich pomiarów nie została obliczona stała dysocjacji. Mogło to wynikać z bardzo słabego poziomu oddziaływania lub braku oddziaływania aptameru z błoną liposomów.

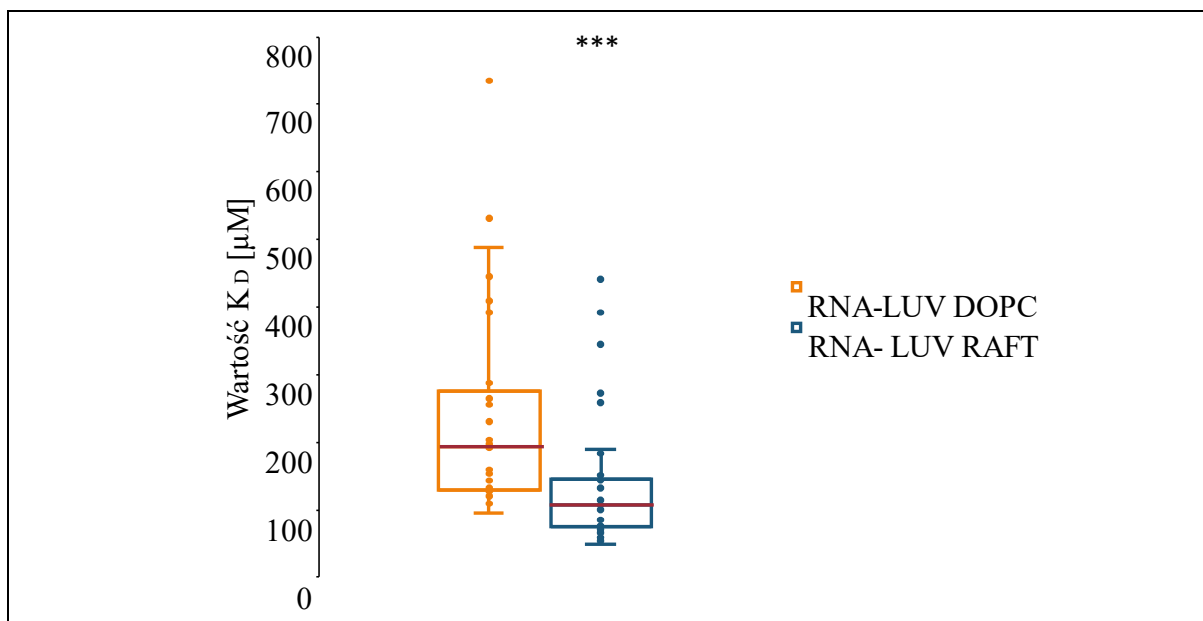
Ostatecznie wyznaczono w sumie K_D dla 27 pomiarów oddziaływań aptamerów RNA z błonami liposomów DOPC oraz 37 wartości K_D dla oddziaływań aptamerów z błonami liposomami tratwowymi. Na wykresach poniżej zostały przedstawione histogramy rozkładu wartości wyznaczonych K_D dla obydwu typów błon.



Rysunek 22. Histogramy rozkładu wartości K_D dla kompleksów RNA z liposomami

Przedstawione histogramy rozkładu wartości wyznaczonych K_D odnoszą się do oddziaływania aptamerów RNA z dwoma typami błon: po lewej dla kompleksu RNA- LUV_{DOPC} ($n=27$), po prawej dla kompleksu RNA- LUV_{RAFT} ($n=37$).

Na poniższym wykresie pudełkowym (Rysunek 23.) zestawione zostały rozkłady wszystkich wartości K_D uzyskanych dla kompleksów aptamerów RNA z błonami LUV_{DOPC} (RNA-DOPC) oraz z RNA błonami LUV_{RAFT} (RNA-Tratwy). Porównanie medialnych wartości K_D dla wiązania aptamerów z błonami LUV_{DOPC} wynosi $194 \mu M$ (po lewej) oraz $107 \mu M$ w przypadku błon LUV_{RAFT} (po prawej). Wskazuje to na silniejsze oddziaływanie aptamerów RNA z błonami tratwowymi w porównaniu z błonami nie-tratwowymi. Istotność różnicy między powinowactwem RNA do tych dwóch typów błon pęcherzyków lipidowych została potwierdzona testem U Manna-Whitneya ($U=215$, $p < 0,001$).

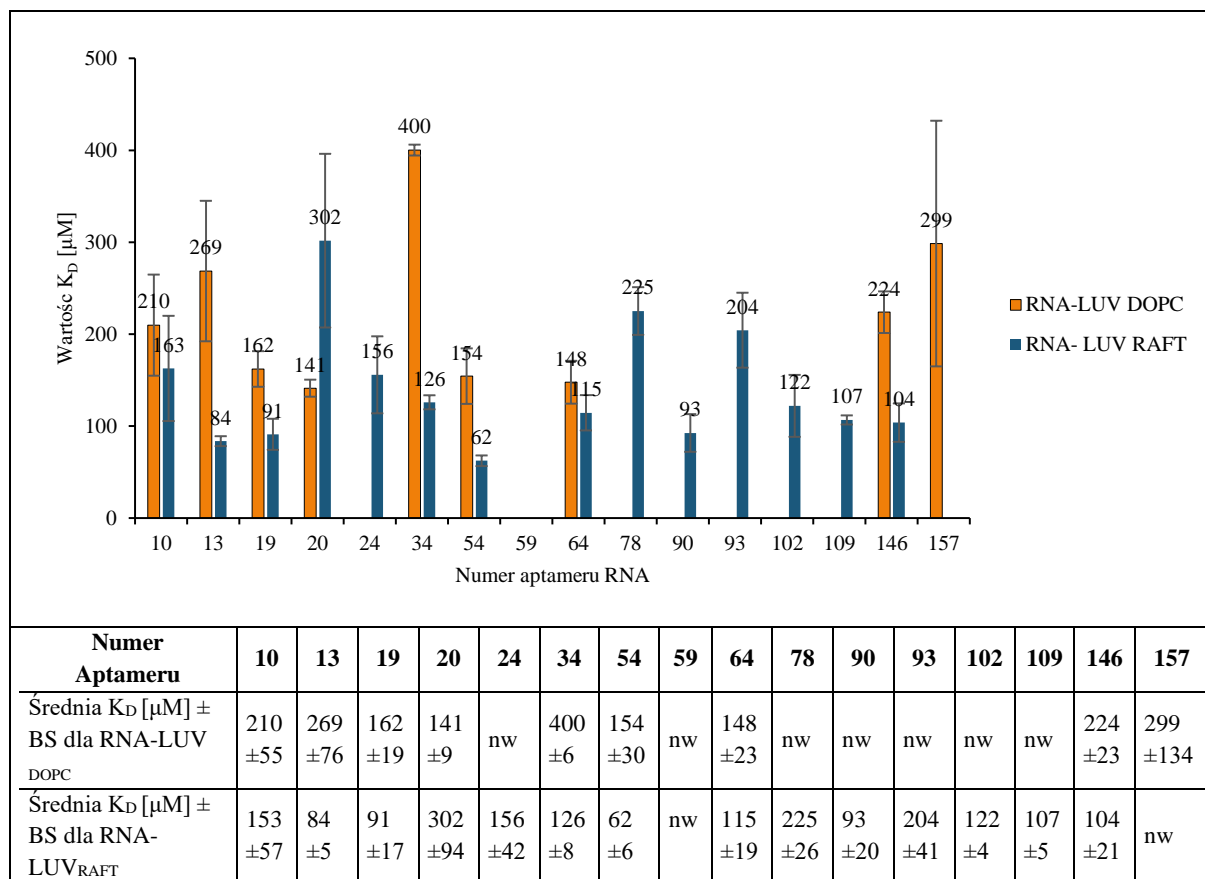


Rysunek 23. Rozkład wartości K_D dla kompleksów RNA z liposomami

Ramka rozkładu obrazuje zakres międzykwartylowy pomiarów K_D . Medialne wartości K_D dla obydwu typów liposomów zostały zaznaczone czerwoną linią. „Wąsy” na wykresie ograniczają zakres wartości K_D i oznaczają minimalną i maksymalną wartości K_D dla podanych dwóch typów oddziaływania RNA z liposomami. Kółka na górze wykresu pudełkowego to wartości odstające. Liczba danych $n_{\text{DOPC}} = 27$, $n_{\text{RAFT}} = 37$. Symbol „***” oznacza wartość prawdopodobieństwa, $p < 0,001$, dla testu U Manna-Whitneya różnic w medianach.

Na Rysunku 24. zestawione zostały średnie wartości K_D dla poszczególnych aptamerów przy oddziaływaniu z LUV_{DOPC} oraz LUV_{RAFT} . Dla pomiarów oddziaływania aptamerów RNA z LUV_{DOPC} , dla 7 aptamerów (numery 24, 59, 78, 90, 93, 102, 109) nie było możliwe wyznaczenie K_D w kilku powtórzeniach, stąd nie podano na wykresie średniej. Uzyskane pojedyncze wartości K_D dla tych aptamerów były wysokie (123-734 μM) co sugeruje bardzo słabe oddziaływanie RNA z błonami pęcherzyków. Dla aptamerów 10, 34, 54, 146 i 147 możliwe było wyznaczenie K_D w dwóch powtórzeniach (średnia wartość podana na wykresie). Dla pozostałych aptamerów (numery: 13, 19, 20 i 64) podano średnie wartości K_D uzyskane przynajmniej w trzech powtórzeniach.

Dla pomiarów oddziaływania aptamerów z LUV_{RAFT} nie było możliwe wyznaczenie średniej K_D dla dwóch aptamerów o numerach 59 i 157. Uzyskano dla nich jedynie pojedyncze K_D równe odpowiednio 117 i 80 μM . Dla aptamerów o numerach: 34, 78, 109 i 146 podane na wykresie wartości średniej pochodzą z dwóch pomiarów, dla których możliwe było wyznaczenie stałej. Dla pozostałych 10 aptamerów podane średnie wartości K_D uzyskano przynajmniej w trzech powtórzeniach.



Rysunek 24. Zestawienie średnich K_D dla kompleksów aptamerów z liposomami LUV_{DOPC} i LUV_{RAFT}.

Wykres przedstawia wartości średniej K_D wraz z słupkiem błędów standardowych dla pomiarów 16 aptamerów. Wartości K_D i błędów standardowych podane są w tabeli pod wykresem. Oznaczenie „nw” w tabeli oznacza, że dla tego aptameru nie wyznaczono średniej wartości K_D .

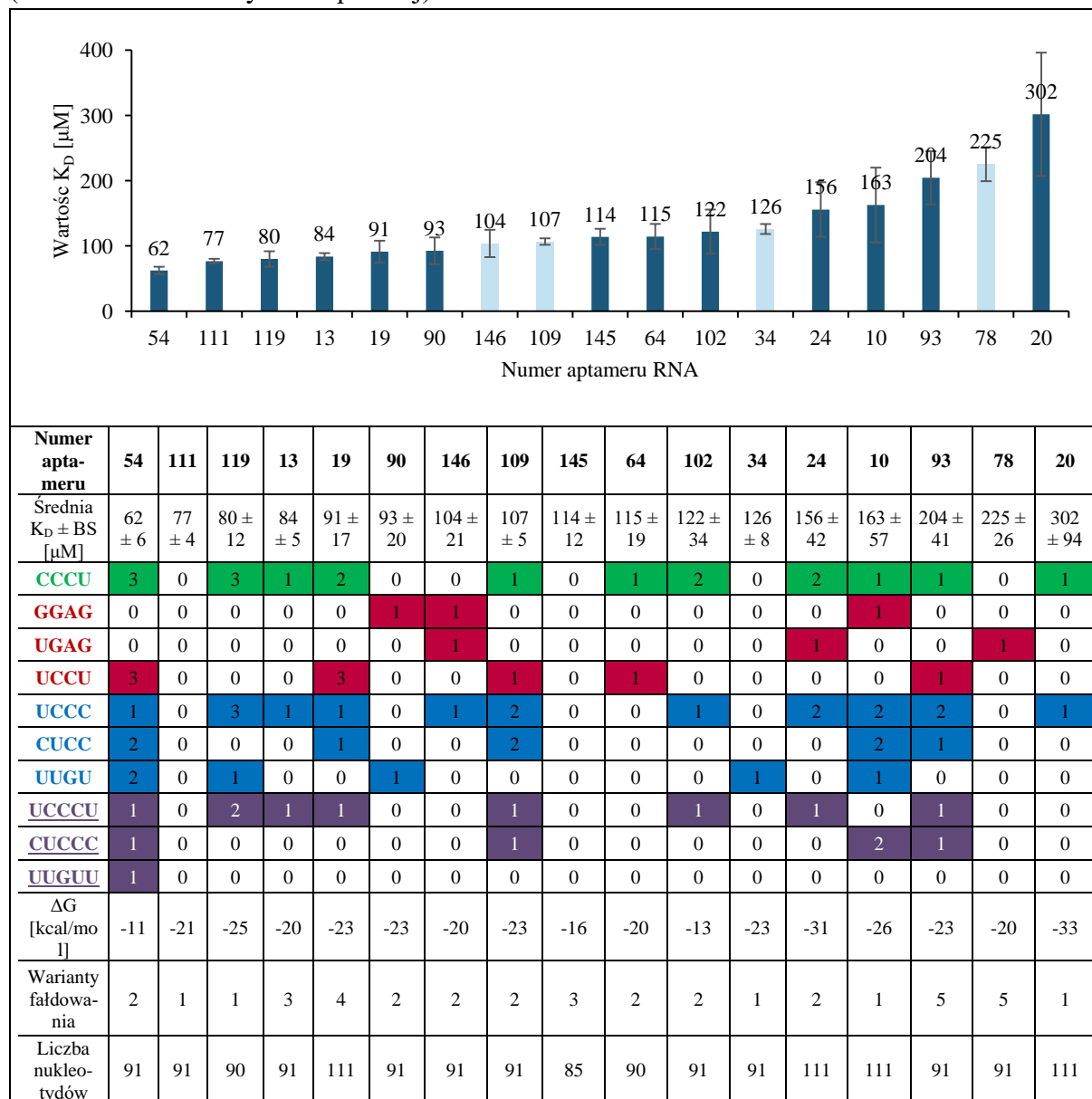
Zasadniczo otrzymane wartości stałej K_D były średnio prawie dwukrotnie niższe dla oddziaływań aptamerów z LUV_{RAFT} w porównaniu z LUV_{DOPC}. Największą różnicę (około 3-krotnie niższe K_D dla oddziaływania RNA-LUV_{RAFT} w porównaniu z RNA-LUV_{DOPC}) można było odnotować dla aptamerów o numerach 13, 34 i 54. Dla pozostałych aptamerów (numery 10, 19, 64 i 146) wartości K_D oddziaływania RNA-LUV_{RAFT} były około dwukrotnie niższe w porównaniu z wartościami K_D dla kompleksów RNA-LUV_{DOPC}. Wyjątek od tego trendu stanowił aptamer numer 20, dla którego wartość K_D dla kompleksu RNA-LUV_{RAFT} była około 2-krotnie wyższa w porównaniu z wartością K_D kompleksu RNA-LUV_{DOPC}.

4.4. ODDZIAŁYWANIE APTAMERÓW RNA Z LIPOSOMAMI TRATWOWYMI

Aby określić znaczenie sekwencyjnych i strukturalnych motywów RNA na poziom powinowactwa RNA-błona, porównano wartości K_D uzyskane dla oddziaływania aptamerów o zróżnicowanym składzie motywów RNA z liposomami LUV_{RAFT}. Oprócz badanych wcześniej 16 aptamerów dobrano dodatkowo dwa aptamery bez motywów RNA: aptamer 111 i 145 oraz

aptamer 119 zawierający motywy trawowe i dwa motywy 5-nukleotydydowe i wykonano dla nich pomiary fluorescencyjne i wyznaczono wartości K_D w kilku powtórzeniach.

Dla 13 aptamerów uzyskano wartości K_D przynajmniej w trzech powtórzeniach, średnie wartości K_D dla tych aptamerów przedstawione są na rysunku poniżej jako ciemno niebieskie słupki. Dla aptamerów o numerach: 34, 78, 109 i 146 uzyskano wartości K_D z dwóch pomiarów (na wykresie poniżej średnie K_D dla tych aptamerów oznaczone są jasno niebieskimi słupkami). Jak wspomniano wcześniej, z przeprowadzonych pomiarów oddziaływania aptamerów z LUV_{RAFT} nie było możliwe wyznaczanie średniej K_D dla dwóch aptamerów o numerach 59 i 157. Dla tych RNA uzyskano jedynie pojedyncze wartości K_D równe odpowiednio 117 i 80 μ M (nie zaznaczone na rysunku poniżej).



Rysunek 25. Zestawienie średnich K_D dla kompleksów 17 aptamerów z błonami LUV_{RAFT}.

Wartości K_D są średnią z przynajmniej z 3 niezależnych eksperymentów (ciemno niebieskie słupki) lub dwóch eksperymentów (jasno niebieskie słupki) \pm błąd standardowy (BS). Pod wykresem w tabeli zaznaczono, które motywy i w jakiej liczbie występują w poszczególnych aptamerach, podana została energia swobodna uzyskana dla pierwszego wariantu strukturalnego, liczba zaproponowanych wariantów strukturalnych oraz całkowita liczba nukleotydów.

Najniższe średnie wartości K_D dla oddziaływania z LUV_{RAFT} , uzyskano dla aptamerów 54 i 111 odpowiednio $62 \mu\text{M}$ i $77 \mu\text{M}$. Aptamer numer 54, o najwyższym powinowactwie do tratw, charakteryzował się największą liczbą motywów sekwencyjnych spośród analizowanych oligonukleotydów. Zawierał w sumie 14 motywów RNA: trzy motywy egzosomalno-tratwowe CCCU, z których dwa znajdowały się w pętlach, zaś jeden na styku trzonu i pętli (3S/1L); trzy motywy egzosomalne UCCU, zlokalizowane całkowicie w pętlach; pięć motywów tratwowych, w tym dwa motyw CUCC zlokalizowane na styku pętli i trzonu (3L/1S; 1L/3S), dwa motywy UUGU, z których jeden znajdował się na styku pętli i trzonu (2L/1S/1L) (lub całkowicie w pętli w przypadku alternatywnego fałdowania) oraz drugi całkowicie w trzonie, a także motyw UCCC w trzonie. Aptamer ten zawierał również trzy motywy 5-nukleotydowe: jako jedyny spośród analizowanych aptamerów posiadał sekwencję UUGUU na styku pętli i trzonu (2L/1S/2L) (lub całkowicie w pętli w alternatywnej strukturze); motyw CUCCC, na styku pętli i trzonu (1L/4S) oraz motyw UCCCU na styku trzonu i pętli (4S/1L). Kilka motywów zachodziło na siebie: motywy UCCU i UUGU oraz UCCU i CUCC, a także motywy CUCC, UCCC i CCCU, które zachodząc na siebie tworzyły motyw CUCCC.

Drugim z kolei aptamerem wykazującym najsilniejsze powinowactwo do błon tratwowych ($K_D = 77 \mu\text{M}$) był RNA 111. Aptamer ten nie posiadał analizowanych motywów egzosomalnych czy tratwowych, za to w jego przewidzianej strukturze drugorzędowej występował wyraźny motyw spinki do włosów (nukleotydy 26-40) z niedużą 5-nukleotydową pętlą oraz trzonem obejmującym 5 par zasad.

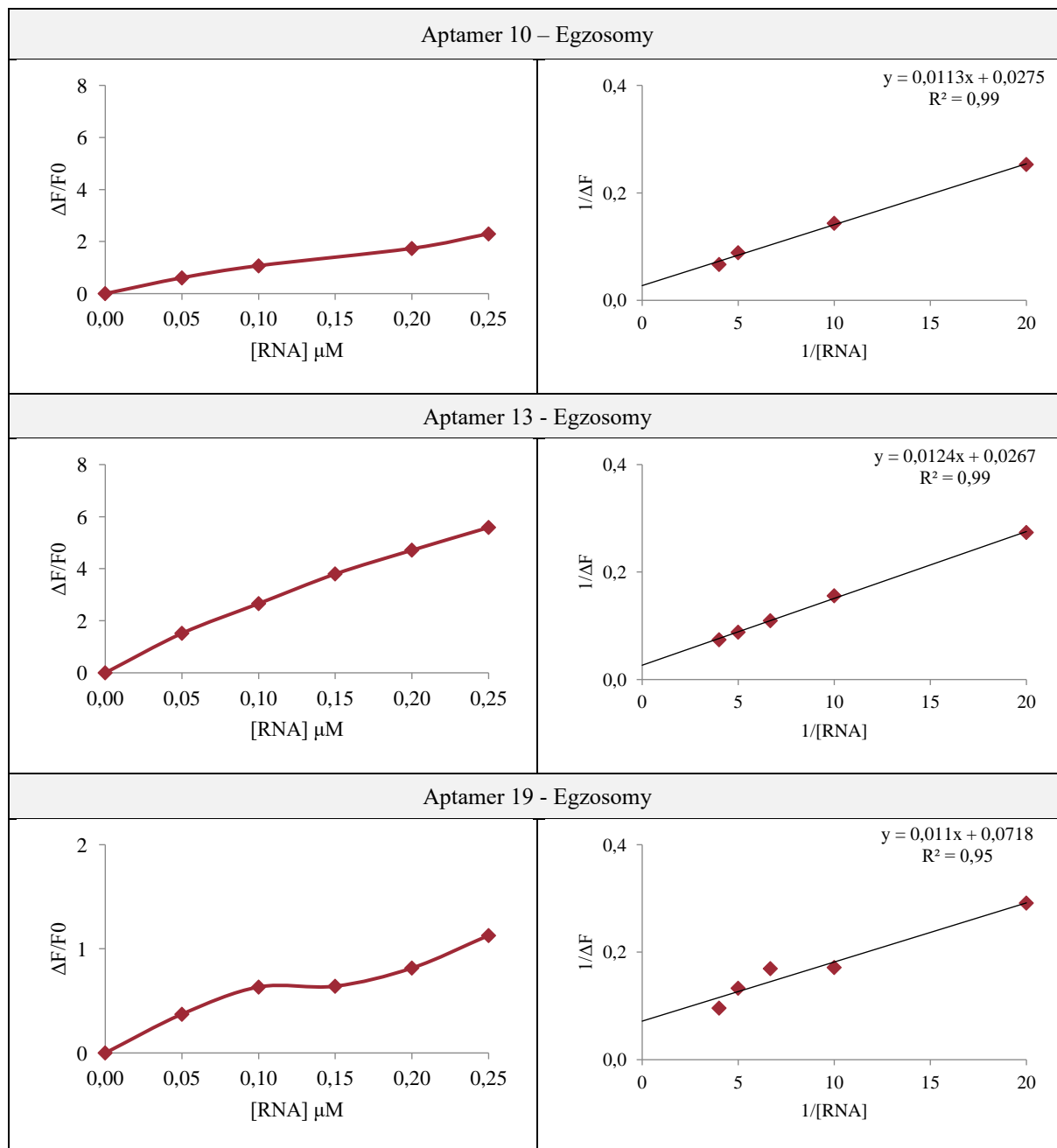
Cztery kolejne aptamery o numerach: 119, 13, 19 i 90 również charakteryzowały się zwiększonym powinowactwem do tratw, wartości średnich K_D przyjmowały dla tych aptamerów wartości poniżej $100 \mu\text{M}$. Dla ośmiu aptamerów o numerach: 146, 109, 104, 64, 102, 34, 24 i 10 średnie wartości K_D przyjmowały wartości od 114 do $163 \mu\text{M}$. Aptamerami o najslabszym powinowactwie do tratw okazały się RNA o numerach: 93, 78 i 20, ich wartości K_D dla oddziaływania z tratwami wynosiły odpowiednio 204 , 225 i $302 \mu\text{M}$.

4.5. ODDZIAŁYWANIE APTAMERÓW RNA Z EGZOSOMAMI

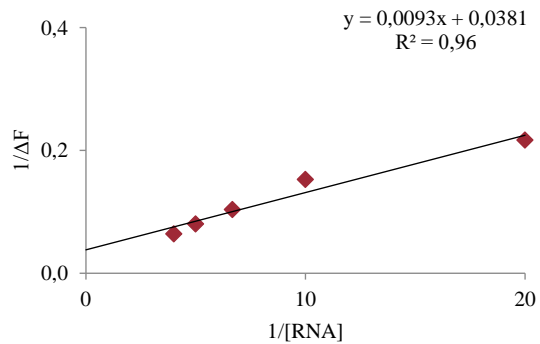
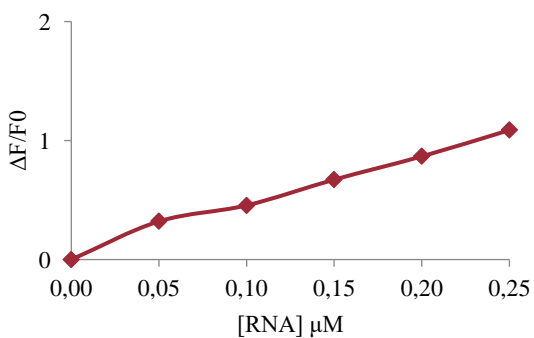
Kolejnym etapem badań była próba określenia aktywności oddziaływania aptamerów RNA z tratwami w układach biologicznych z wykorzystaniem egzosomów izolowanych z surowicy bydłowej. Procedura pomiarów została opisana w paragrafie 3.2.9. Podobnie jak w przypadku badania oddziaływań aptamerów z liposomami, również tutaj, wykonywano pomiary w oparciu o zjawisko FRET. Mierzony był spadek fluorescencji w kanale donora (sondy CTB-555 i fDiI związane z egzosomami), przy wzrastającym stężeniu akceptora (sonda SYTO 61 związana z RNA). Stała dysocjacji K_D obliczana była dla kompleksu RNA-błona egzosomów. W Tabeli 25. przedstawiono zmiany fluorescencji sond związanych z egzosomami podczas miareczkowania aptamerami RNA.

Tabela 25. Zmiany emisji fluorescencji sond egzosomalych CTB555 i fDiI oraz odwrotności zmian fluorescencji sond w trakcie miareczkowania egzosomów aptamerami RNA.

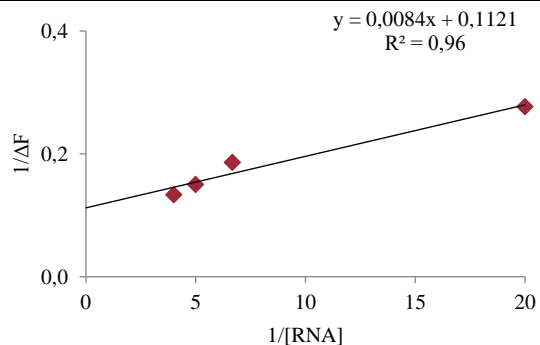
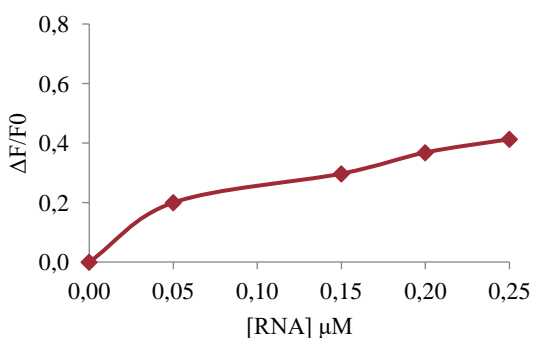
Po lewej stronie tabeli umieszczone są wykresy zmiany fluorescencji sond, zaś po prawej, odwrotności zmiany fluorescencji tych sond. F_0 – to maksymalna fluorescencja CTB-555 i fDiI uzyskana przed rozpoczęciem miareczkowania akceptorem. ΔF – to różnica między fluorescencją F_0 , a wartościami fluorescencji kolejnych punktów pomiarowych (w trakcie miareczkowania RNA).



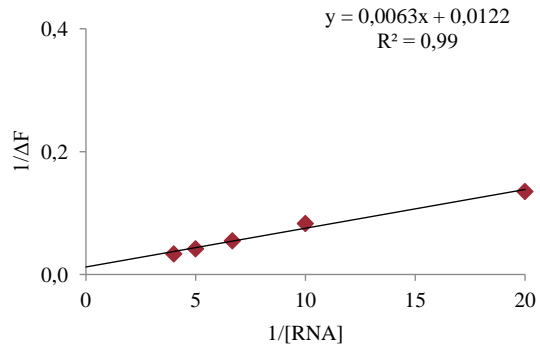
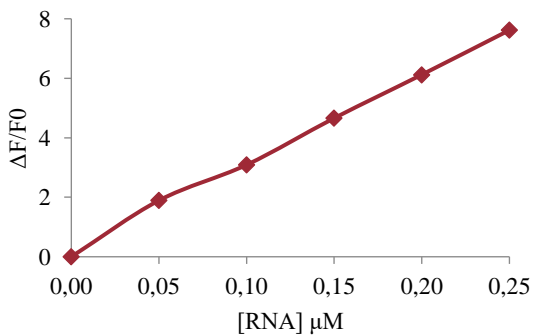
Aptamer 24 - Egzosomy



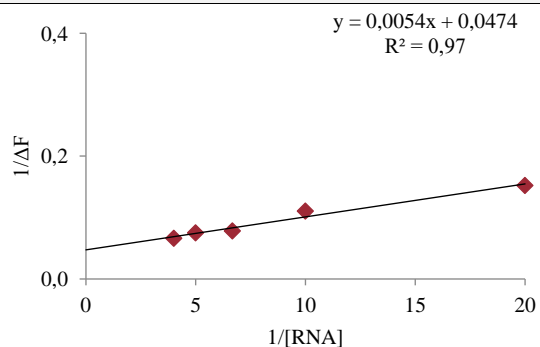
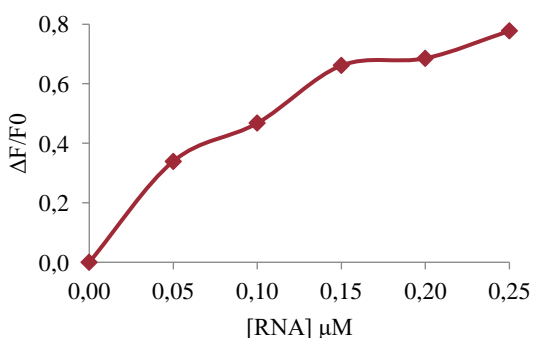
Aptamer 54 - Egzosomy

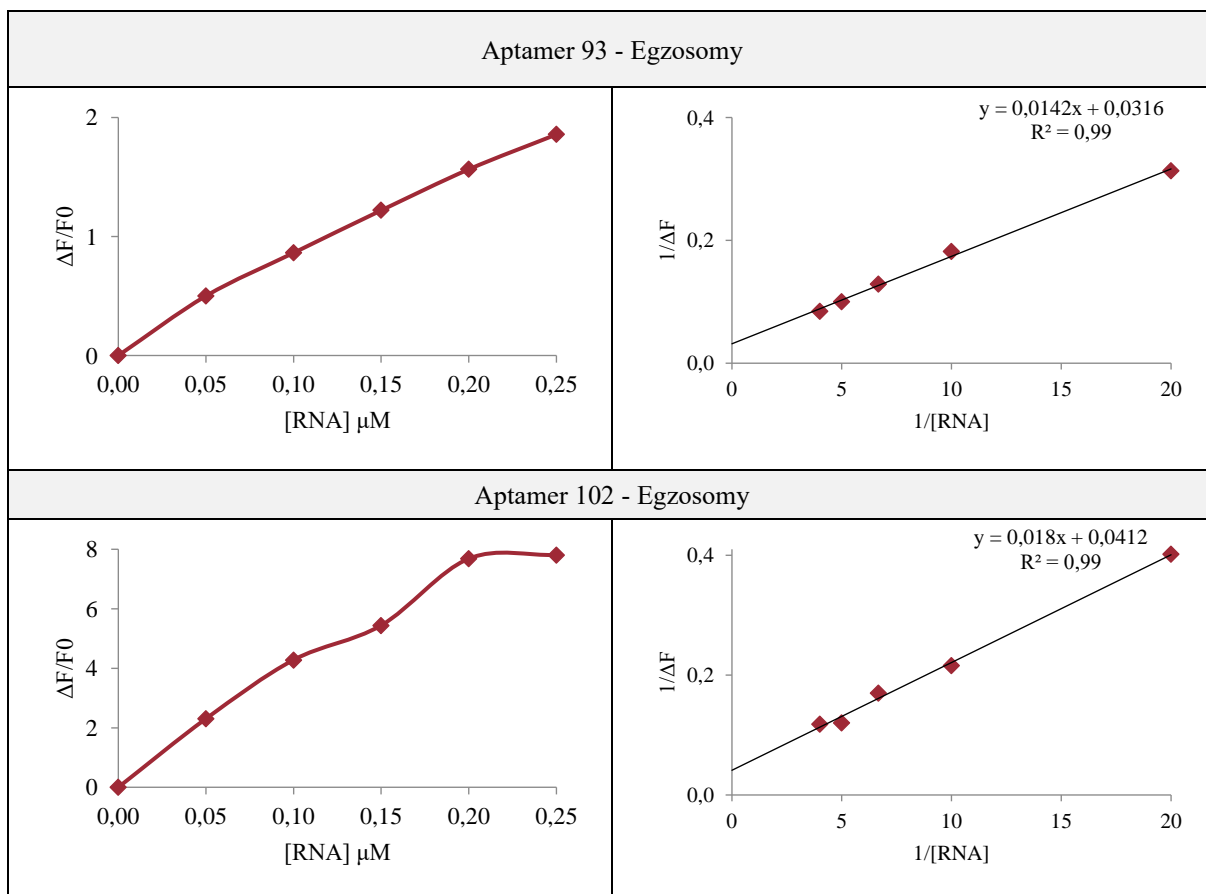


Aptamer 78 - Egzosomy

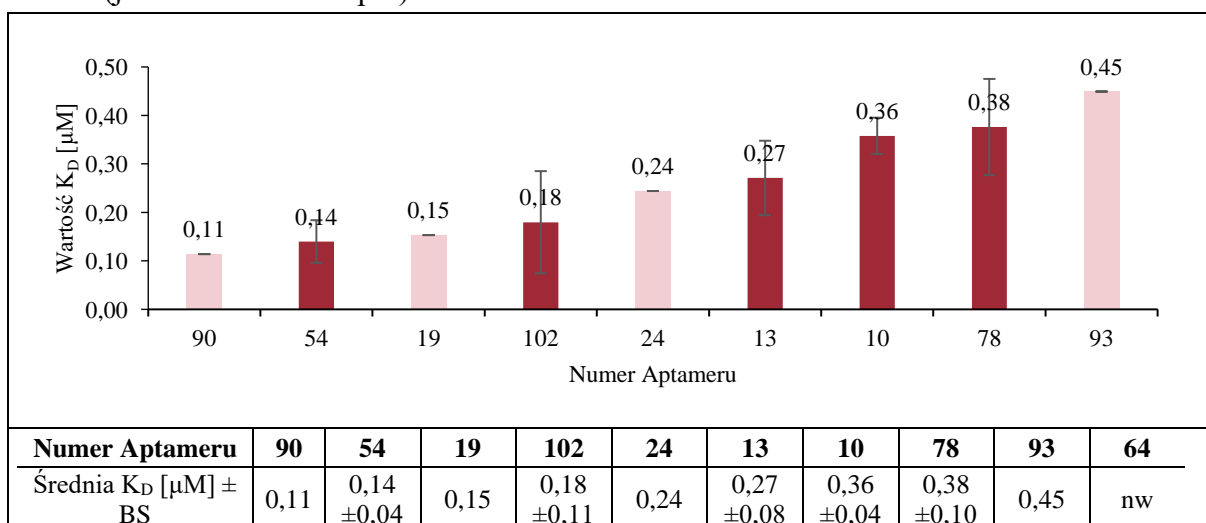


Aptamer 90 - Egzosomy





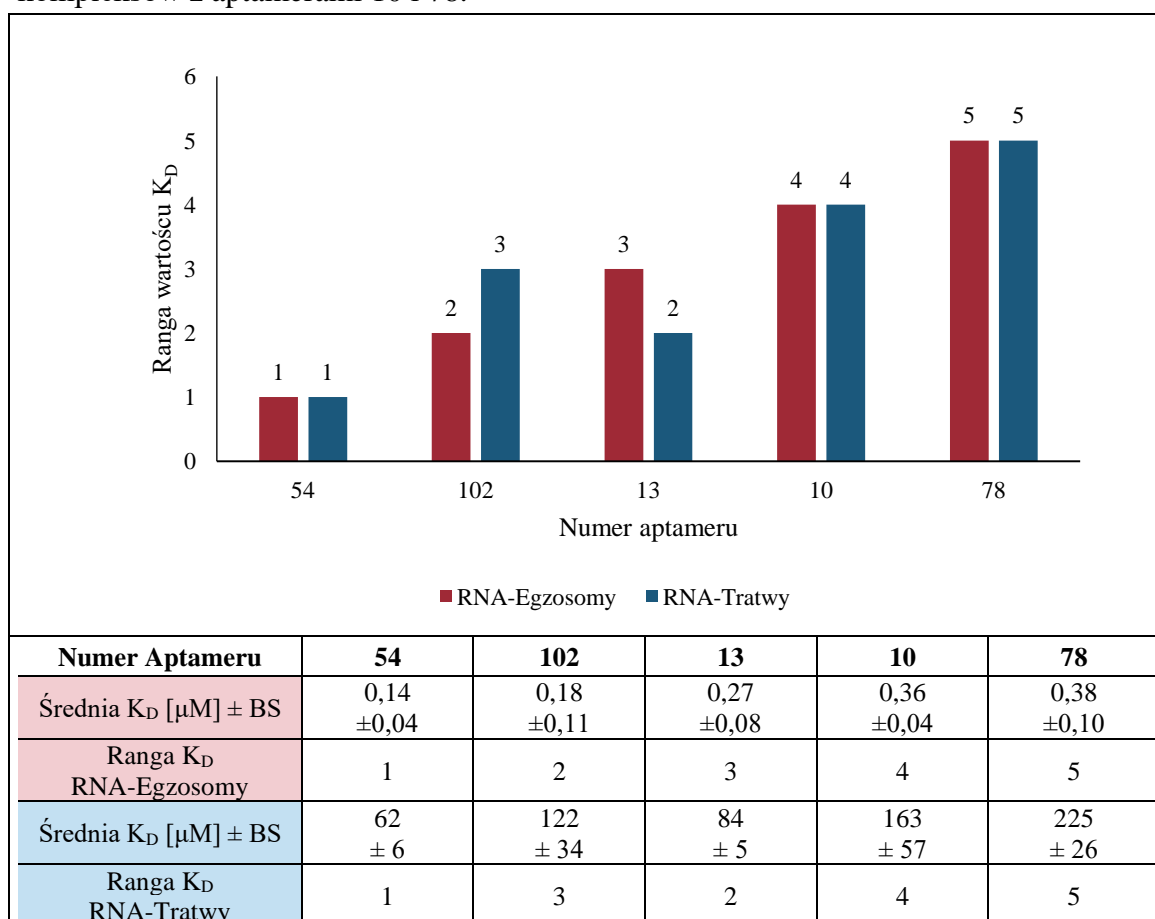
Badania oddziaływania RNA z błoną egzozomów prowadzone były dla 10 aptamerów, jednak tylko dla połowy z nich udało się uzyskać wartości K_D w kilku powtórzeniach i wyliczyć średnią. Dla trzech aptamerów o numerach: 13, 54 i 102 uzyskano wartości K_D dla trzech powtórzeniach, a dla dwóch kolejnych (numery 10 i 78) uzyskano K_D dla dwóch powtórzeń eksperymentu. Dla czterech aptamerów o numerach: 19, 24, 90 i 93 uzyskano pojedyncze wartości K_D , zaś dla aptameru 64 nie udało się wyznaczyć K_D . Na rysunku poniżej zestawiono średnie wartości K_D uzyskane dla 5 aptamerów, dla których możliwe było wyznaczenie K_D w kilku powtórzeniach (ciemno czerwone słupki) oraz pojedyncze wartości K_D dla pozostałych 4 aptamerów (jasno czerwone słupki).



Rysunek 26. Zestawienie średnich K_D dla kompleksów 10 aptamerów RNA z błonami egzozomów

Najmniejszą wartość K_D uzyskano dla aptameru numer 90 ($K_D = 0,11 \mu\text{M}$) jednak ze względu na to, że jest to wynik tylko dla jednego pomiaru, istnieje duża niepewność co do tego pomiaru. Spośród aptamerów z wyznaczoną średnią K_D , aptamerem, który wykazywał najsilniejsze powinowactwo do błon egzosomów okazał się RNA 54 (średnia $K_D = 0,14 \pm 0,04 \mu\text{M}$). Podobną do tego aptameru wartość K_D uzyskano dla aptameru 19 (pojedynczy pomiar $K_D = 0,15 \mu\text{M}$) oraz aptameru 102 (średnia $K_D = 0,18 \pm 0,11 \mu\text{M}$). Dwa kolejne aptamery z wyższymi wartościami K_D to RNA o numerach 24 i 13, o wartościach K_D odpowiednio $0,24 \mu\text{M}$ (wartość z pojedynczego pomiaru) i $0,27 \pm 0,08 \mu\text{M}$ (średnia z 3 pomiarów). Trzy aptamery, których K_D sugeruje najsłabsze powinowactwo do błony egzosomów to RNA o numerach: 10 (średnie $K_D = 0,36 \pm 0,04$), RNA 78 (średnie $K_D = 0,38 \pm 0,10 \mu\text{M}$) oraz RNA 93 (K_D dla pojedynczego pomiaru $K_D = 0,45 \mu\text{M}$).

Jeśli zestawić według średniej wartości K_D aptamery, dla których badano oddziaływanie zarówno względem liposomów jak i egzosomów, to różnice w powinowactwie aptamerów RNA do błon egzosomów wydają się przypominać różnice w powinowactwie tych samych aptamerów do błon tratwowych (wykres poniżej). W obu eksperymentach najsilniejsze powinowactwo RNA-błona uzyskano dla kompleksów z aptamerem 54, zaś słabe powinowactwo dla kompleksów z aptamerami 10 i 78.



Rysunek 27. Zestawienie rang średnich K_D dla kompleksów aptamerów z błonami egzosomów i LUV_{RAFT}

4.6. CHARAKTERYSTYKA MUTANTÓW RNA WYKORZYSTANYCH W BADANIACH

Alby sprawdzić czy obecność konkretnych motywów RNA ma wpływ na wartość powinowactwa RNA-błona, przeprowadzono badania oddziaływania z błonami mutantów aptamerów o zmodyfikowanej liczbie motywów RNA, a następnie porównano otrzymane wartości stałej dysocjacji z wartościami otrzymanymi dla oryginalnych aptamerów. Przygotowane dwie grupy mutantów obejmowały:

- (1) Mutanty, w których wyjściowy motyw lub motywy były zaburzane poprzez substytucję nukleotydową lub delecję – grupy mutantów aptamerów o numerach: 13, 90 i 102
- (2) Mutanty, do których wstawiane były nukleotydy, tak aby utworzyły dodatkowy motyw RNA, nie obecny w oryginalnym aptamerze – grupy mutantów o numerach: 10, 111 i 145

W sekcji 3.2.4 opisane już zostało w jaki sposób mutanty zostały zaprojektowane i przygotowane do badań.

4.6.1. Karty charakterystyki mutantów aptamerów

Podobnie jak w przypadku aptamerów, przygotowano karty charakterystyki mutantów, gdzie podana została struktura 2-rzędowa o najniższej energii swobodnej zaproponowana przez program Mfold, z zaznaczonymi motywami sekwencyjnymi oraz wprowadzonymi modyfikacjami. Oznaczenia i skróty wykorzystane w kartach charakterystyki mutantów są analogiczne do oznaczeń podanych wcześniej przy kartach charakterystyki aptamerów (sekcja 4.2.3). W poniższych tabelach pod składem nukleotydowym, podany został rodzaj modyfikacji. Nukleotydy wstawione (insercje) lub zmienione (substytucje) zostały oznaczone na żółto w podanych sekwencjach mutantów oraz przewidzianych fałdowaniach. Miejsca delecji nukleotydów w sekwencji mutantów zostały oznaczone symbolem \downarrow na żółtym tle oraz żółtą linią między nukleotydami w wizualizacjach struktury 2-rzędowej.

Mutant 10A

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAGUGAAA**GGAG****CCU**ACUUUCUCUUCGUGUGUGGCCUCGUCUU
CUU**CUCCC**GU**UUGU****CUCCC**CUUUCGCU**CAUACGCCGAUCACAUGACCA**

Liczba nukleotydów: 111

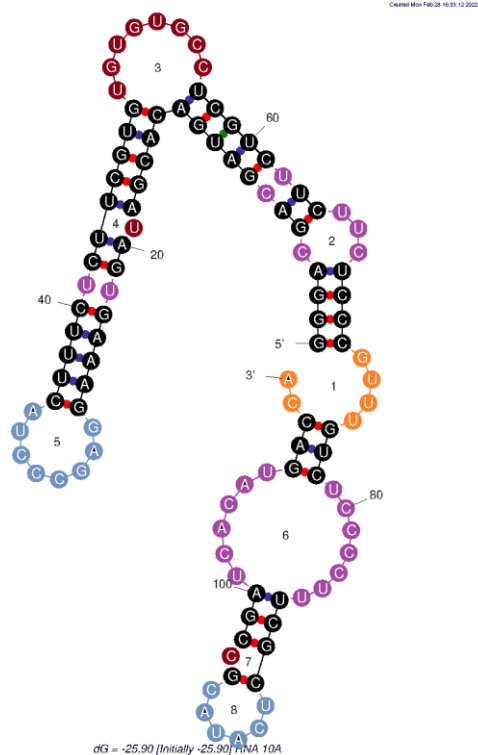
Skład nukleotydowy: 19 A, 35 C, 24 G, 33 U

Modyfikacje: Substytucja 2 nukleotydów (nt.) U31 na C i G33 na C. Powstaje dodatkowy motyw **CCCU**.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -25.90$ kcal/mol

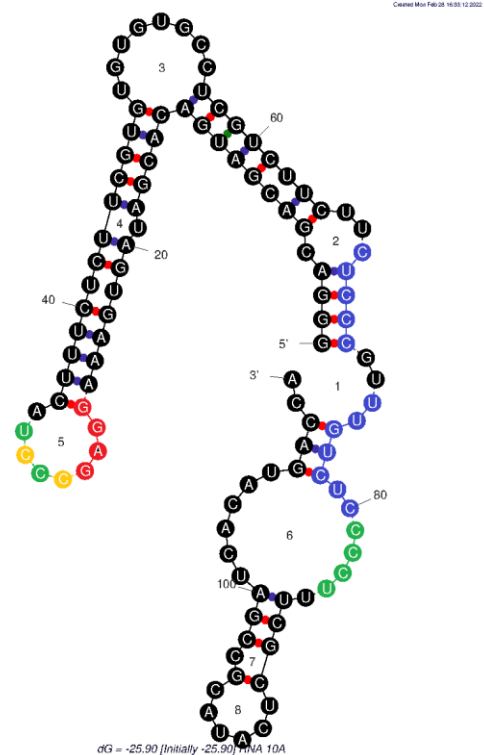
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 54% 9
- Wybrzuszenie 10% 3
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 21% 4
- Pętla spinki 13% 2
- Pętla końcowa 5% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 3,5

MOTYWY SEKWENCYJNE



- CCCU** x2 (4L; 4L)
- GGAG** (1S/3L)
- UCCC** x2 (4S; 4L)
- CUCC** x2 (1L/3S; 1S/3L)
- UUGU** (2L/2S)
- CUCCC** x 2 (1L/4S; 1S/4L)

Motywy CUCC i UCCC zachodzą na siebie i tworzą motyw CUCCC; CUCC, UCCC i CCCU zachodzą na siebie i tworzą motyw CUCCC

Mutant 10B

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAGUGAAA**GGAG****CCCU**UACUUUCUCUUCGUGUGUGGCCUCGUCUU
CUU**CUCCC**GU**UUGU****CUCCC**UUUCGC**CCCU**CAUACGCCGAUCACAUGACCA

Liczba nukleotydów: 114

Skład nukleotydowy: 19 A, 38 C, 24 G, 33 U

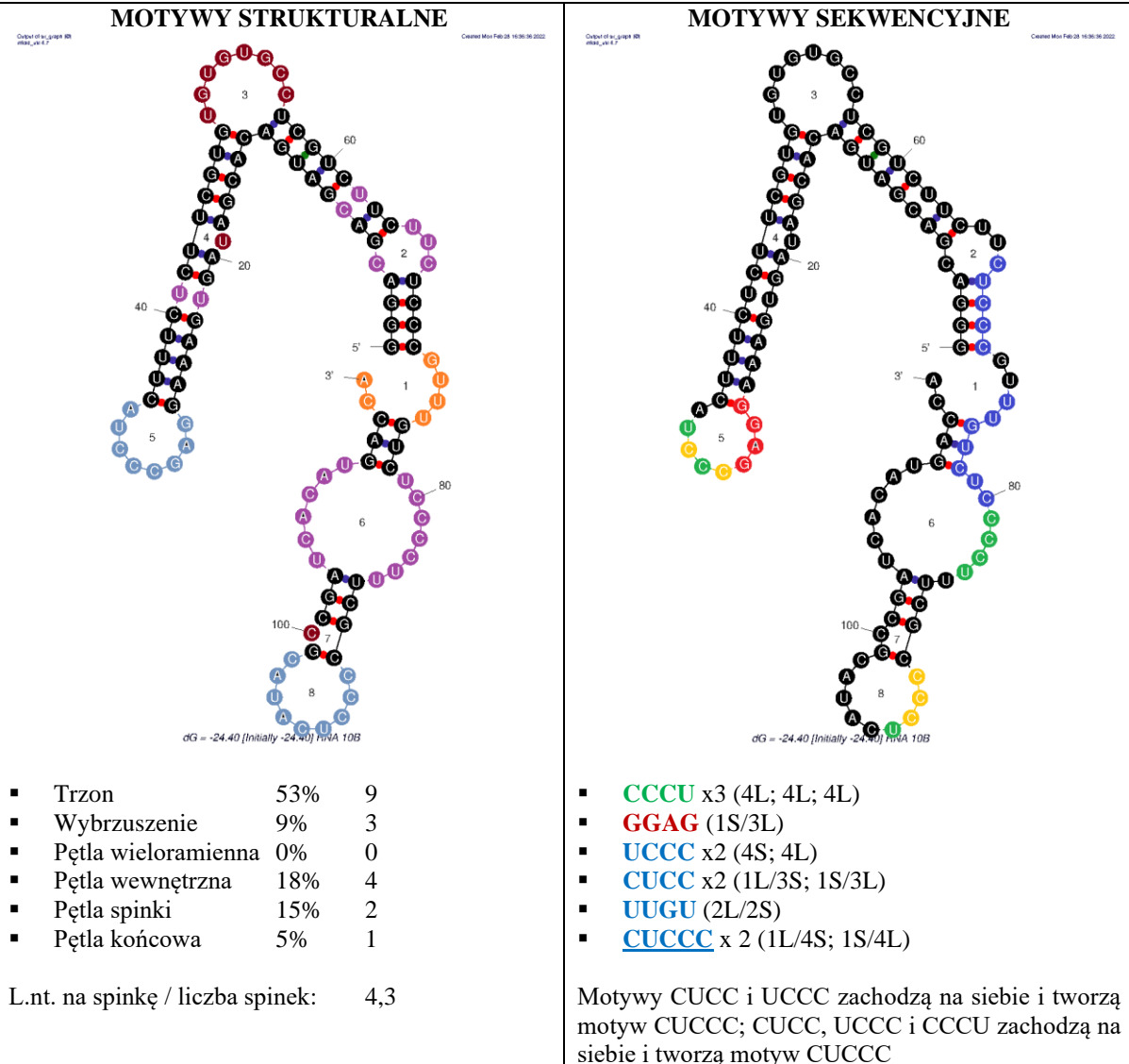
Modyfikacje: Substytucja 2 nt. U31 na C i G33 na C.

Powstaje dodatkowy motyw **CCCU**.

Insercja 3 nt. CCC między C89 i U90. Powstaje dodatkowy motyw **CCCU**.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -24.40$ kcal/mol
- Struktura 2 : $\Delta G = -23.20$ kcal/mol



Mutant 10C

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAGUGAAA**GGAGU**CCCUACUUUCUCUUCGUGUGUGUGCCUCGUCU
UCUUCUCCCGUUUGUCUCCCCUUUCGCUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

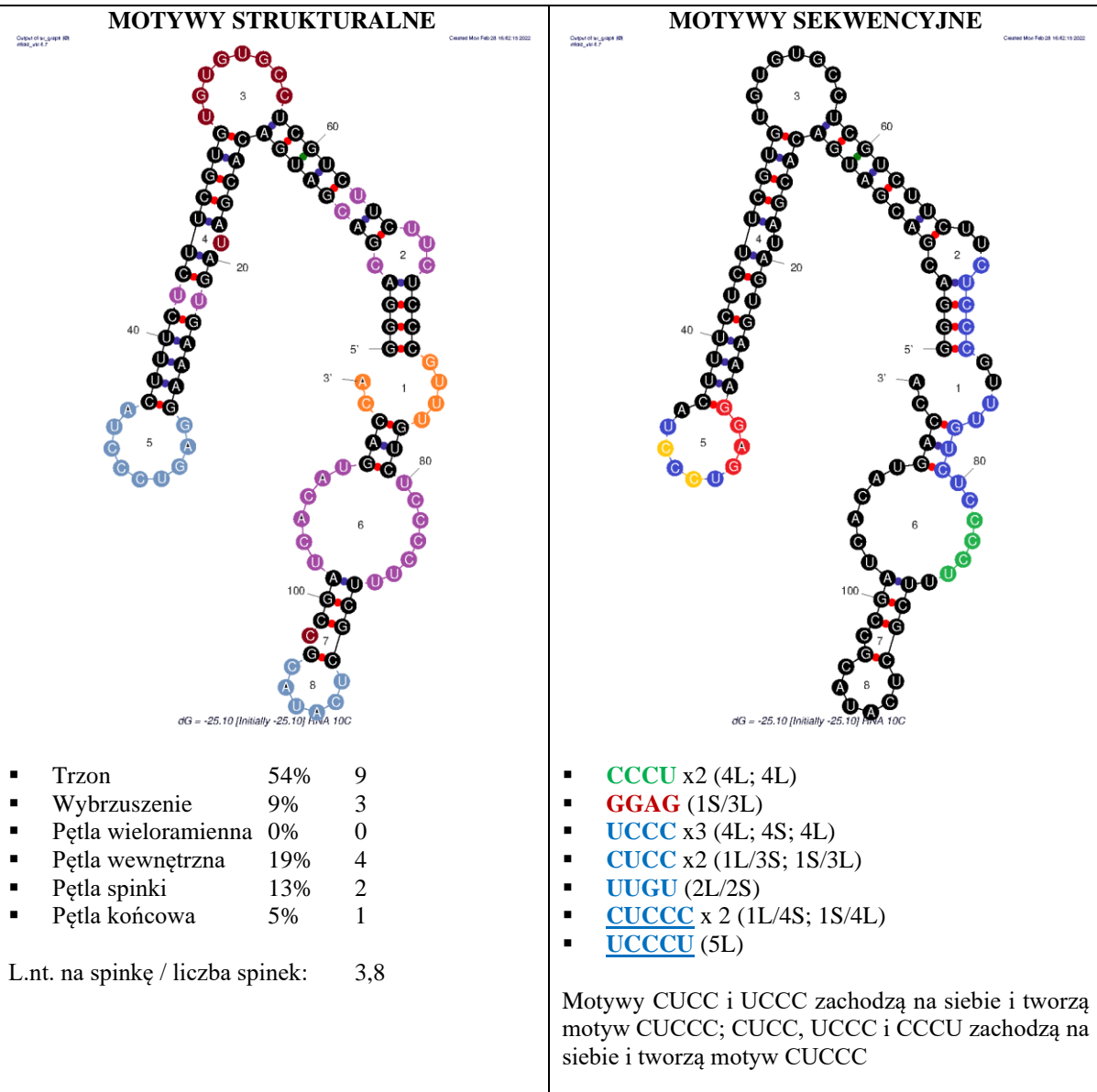
Liczba nukleotydów: 112

Skład nukleotydowy: 19 A, 35 C, 24 G, 34 U

Modyfikacje: Insercja 1 nt. C między U31 a C32, substytucja 1 nt. G33 na C. Powstają dodatkowe motywy **UCCC** i **CCCU**, które zachodzą na siebie i tworzą motyw **UCCCU**.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -25.10$ kcal/mol



Mutant 10D

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAGUGAAA**GGAG****CUCC****CC**ACUUCUCUUCGUGUGUGUGCCUCGUCU
UCUU**CUCCC****GUUGUCUCCC****CU**UUCGCU**CAUACGCCGAUCACAUGACCA**

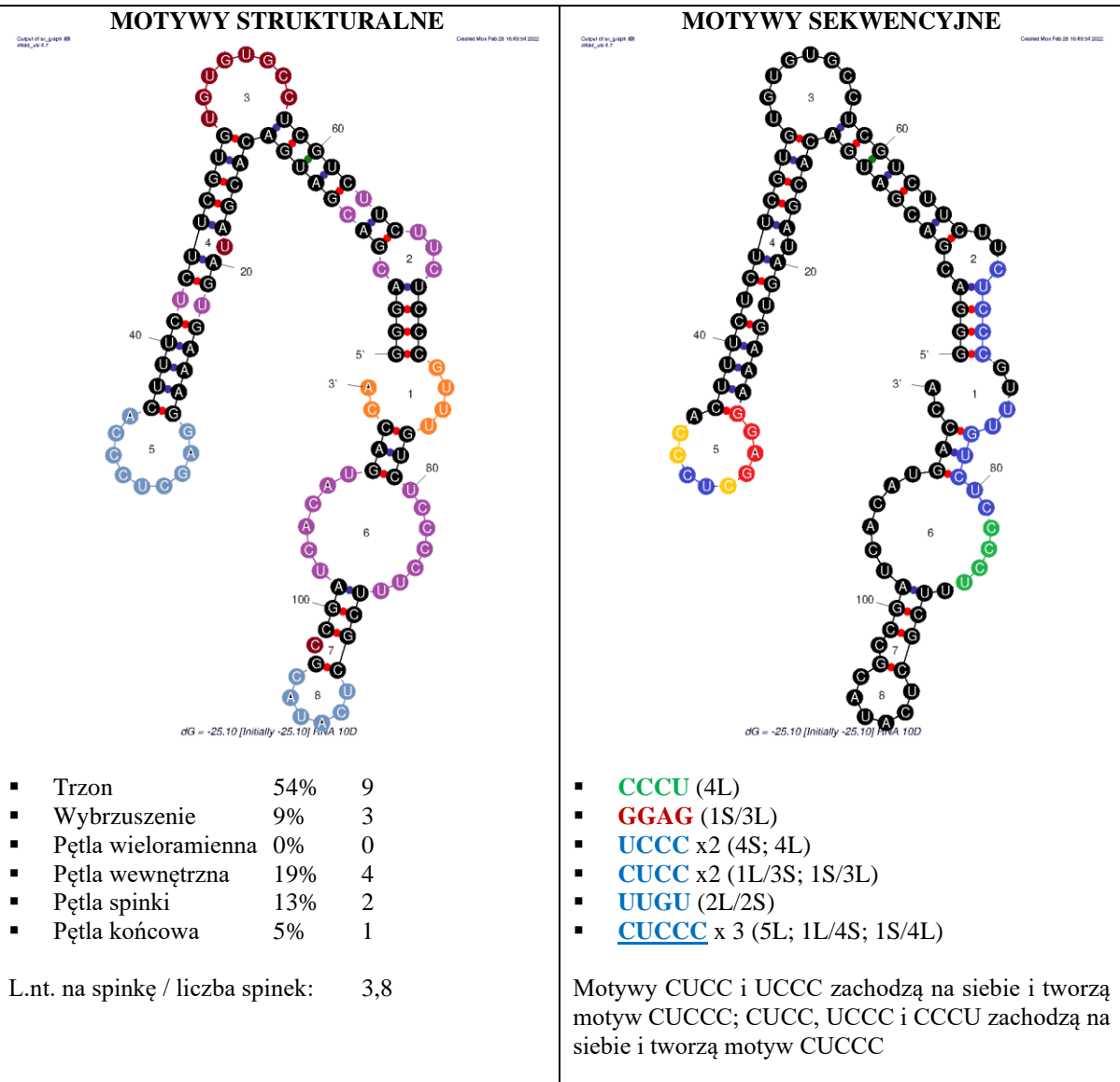
Liczba nukleotydów: 112

Skład nukleotydowy: 19 A, 36 C, 24 G, 33 U

Modyfikacje: Insercja 1 nt. C między G30 i U31, substytucja dwóch nukleotydów G33-U34 na CC. Powstają dodatkowe motywy **CUCC**, **UCCC**, które zachodzą na siebie i tworzą motyw **CUCCC**.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -25.10$ kcal/mol



Mutant 13A

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGUAAAGUGCUUCUAUGGGUUGCAGUAAGUUCGUGUCUGGACCUUUA
CCUUCGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

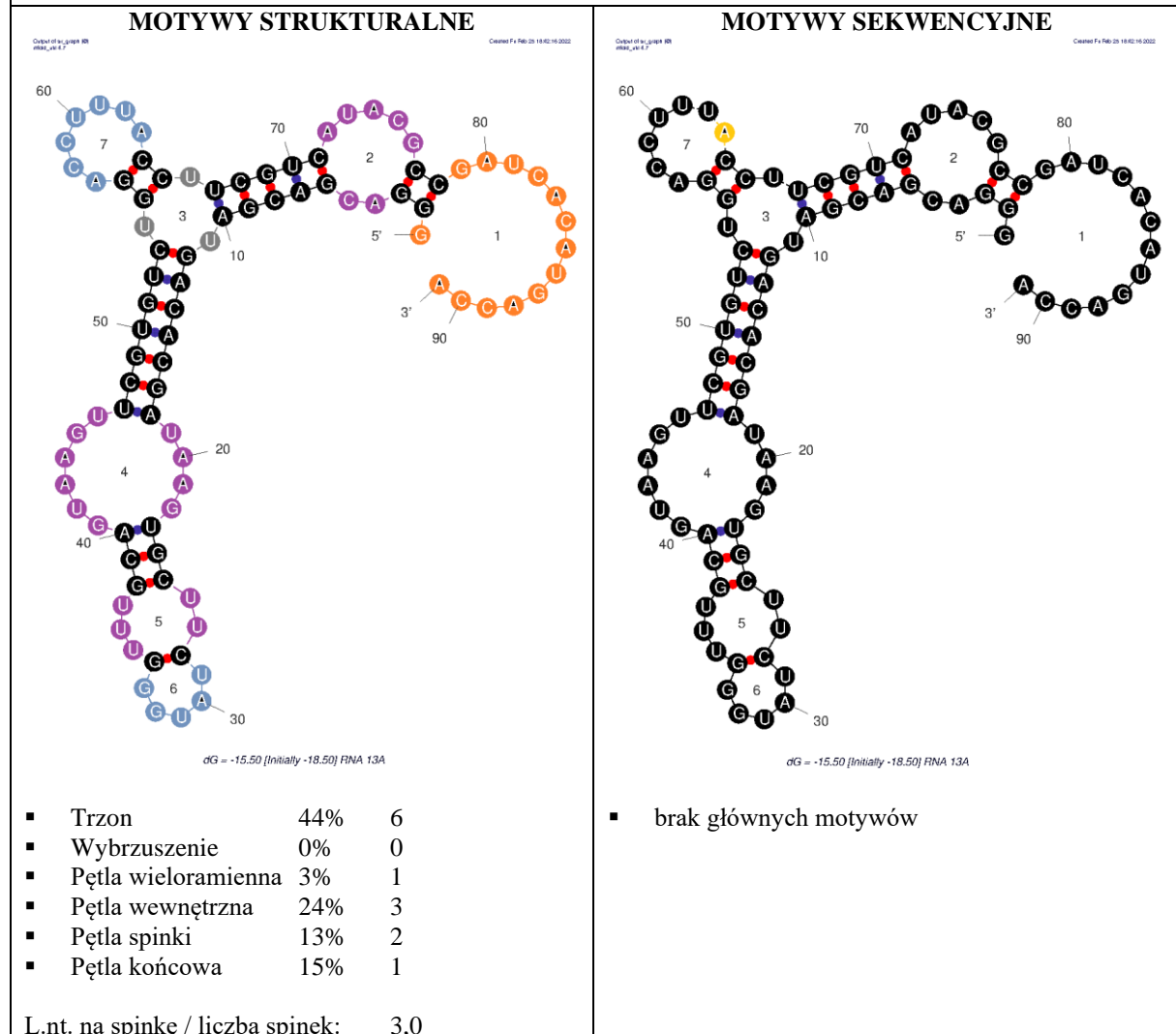
Liczba nukleotydów: 91

Skład nukleotydowy: 21 A, 22 C, 23 G, 25 U

Modyfikacje: Substytucja 1 nt. z motywu UCCCU, C63 na A. Zaburzenie wszystkich oryginalnych motywów.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -18.50$ kcal/mol,
- Struktura 2 : $\Delta G = -18.50$ kcal/mol,
- Struktura 3 : $\Delta G = -18.20$ kcal/mol,



Mutant 13B

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGUAAAGUGCUUCUAUGGGUUGCAGUAAGUUCGUGUCUGGACCUU^U
CCUUCGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

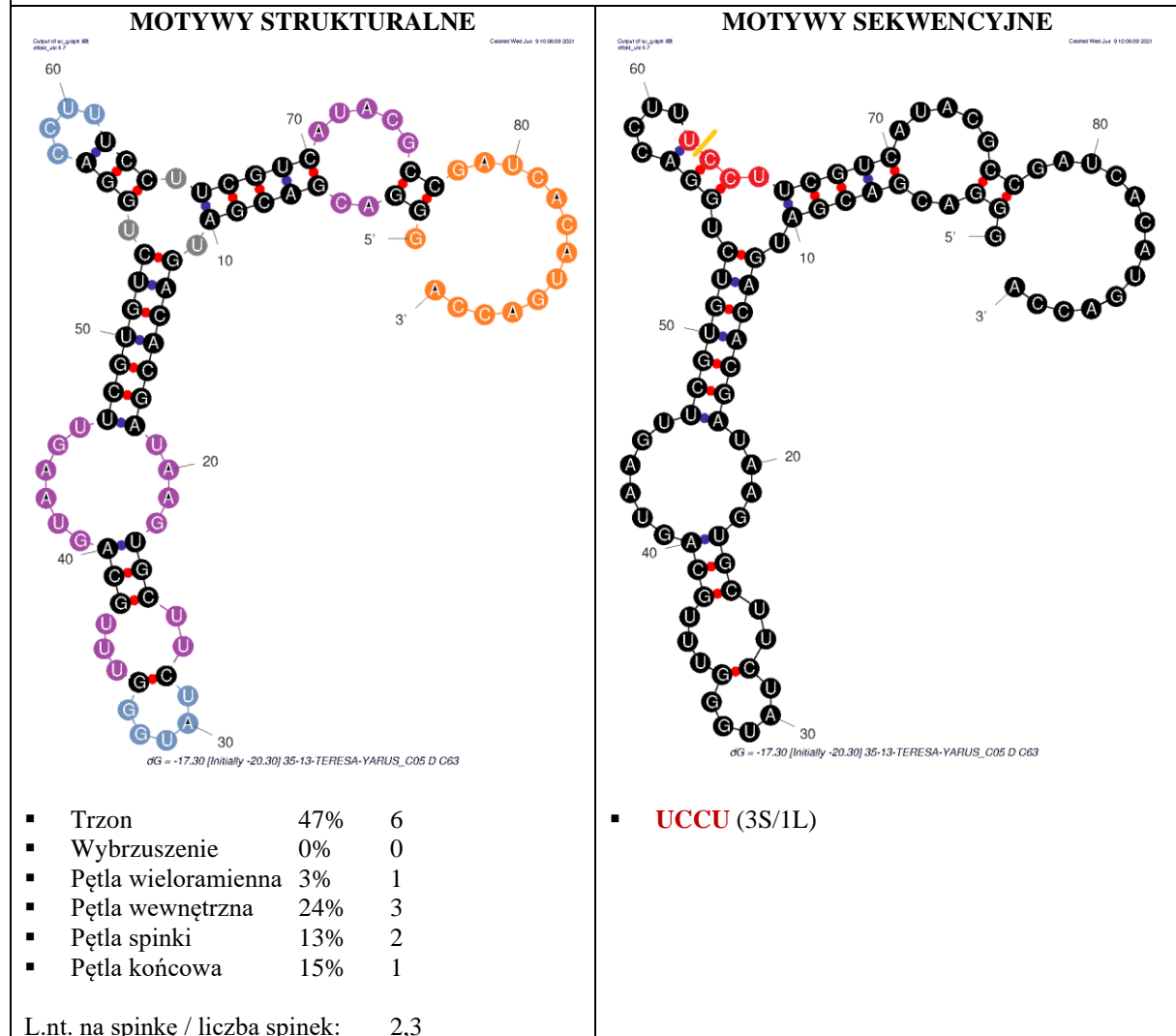
Liczba nukleotydów: 90

Skład nukleotydowy: 20 A, 22 C, 23 G, 25 U

Modyfikacje: Delecja 1 nt. C63 z motywu UCCCU.
 Zaburzenie oryginalnych motywów. Powstaje dodatkowy motyw UCCU.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -20.30$ kcal/mol,
- Struktura 2 : $\Delta G = -20.30$ kcal/mol,
- Struktura 3 : $\Delta G = -20.00$ kcal/mol,



Mutant 90A

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGUAAAACGAUUAGUG**GGAG**UUUACCUUCUCAU**A**UGUCGGGUCACUUCG
GCAAGUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

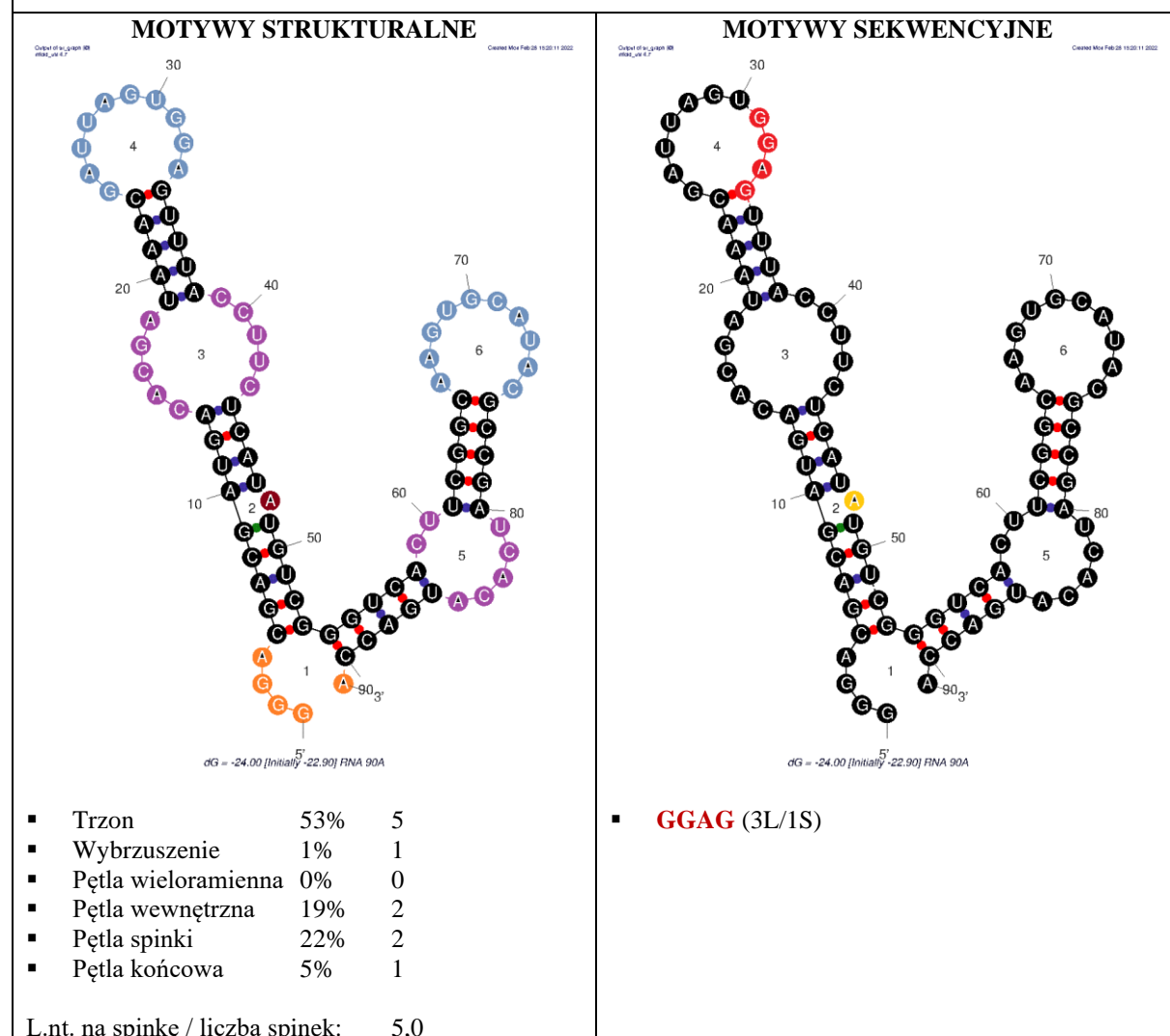
Liczba nukleotydów: 91

Skład nukleotydowy: 25 A, 22 C, 23 G, 21 U

Modyfikacje: Substytucja Int. z motywu **UUGU**,
 U48 na A. Zaburzenie oryginalnego motywu UUGU.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -22.90$ kcal/mol



- GGAG** (3L/1S)

Mutant 90B

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGUAAAACGAUUAGU**GGAG**UUUACCUUCUCAU**U**GUCGGGUCACUUCG
GCAAGUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

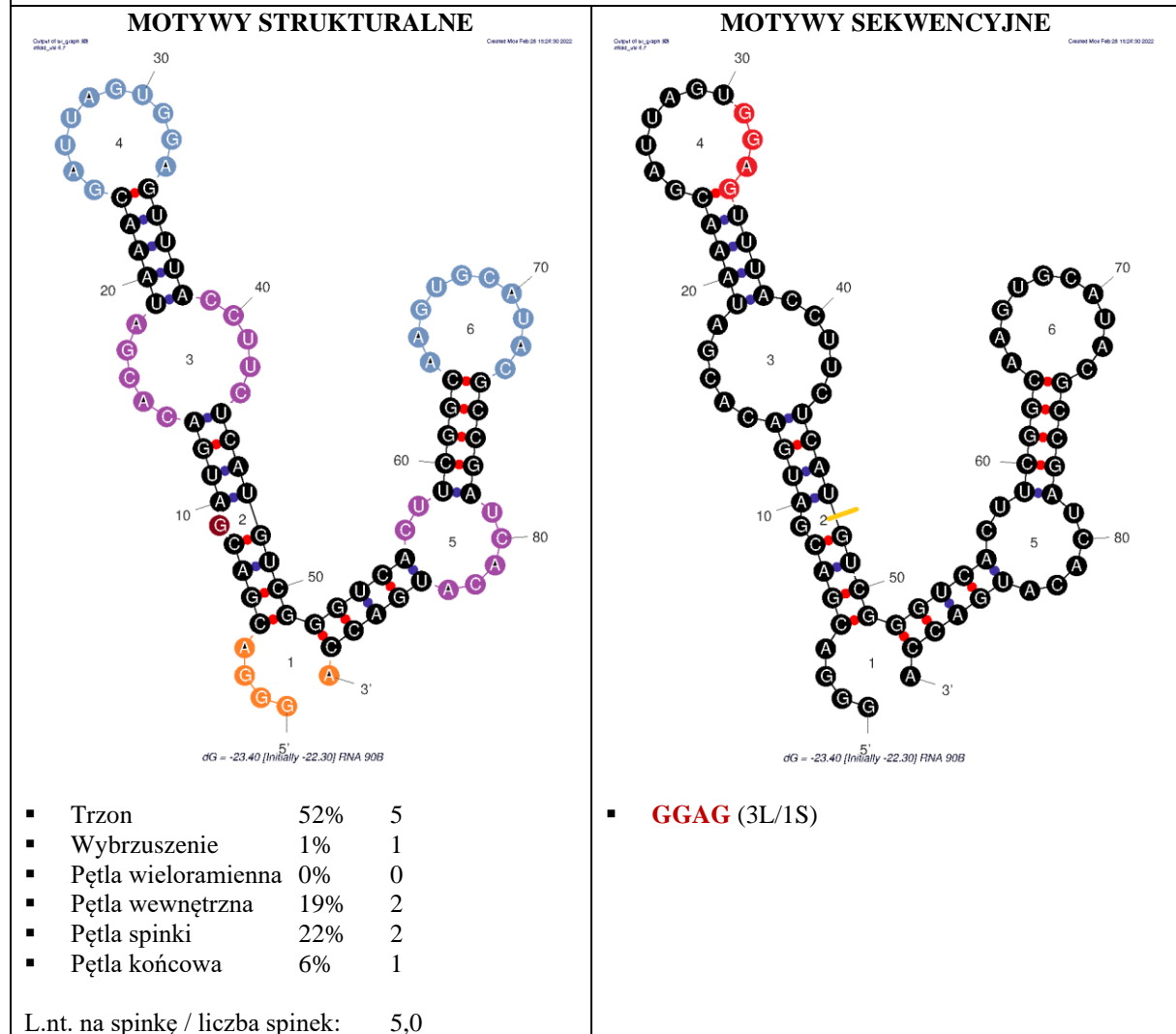
Liczba nukleotydów: 89

Skład nukleotydowy: 24 A, 22 C, 23 G, 20 U

Modyfikacje: Delecja 2 nt. U48-U49 z motywu **UUGU**. Zaburzenie oryginalnego motywu **UUGU**.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -22.30$ kcal/mol



Mutant 90C

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGUAAAACGAUUAGUG⁺GUUUACCUUCUCAUUUGUCGGGUCACUUCGG
CAAGUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

Liczba nukleotydów: 89

Skład nukleotydowy: 23 A, 22 C, 22 G, 22 U

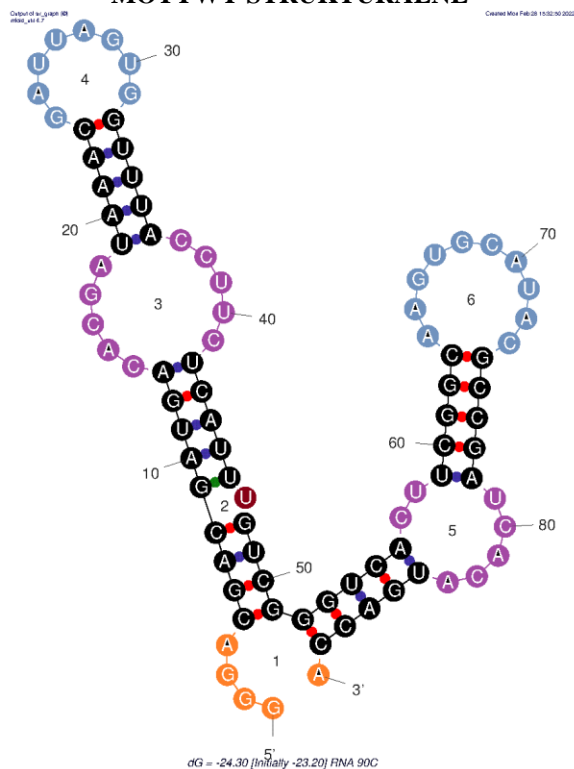
Modyfikacje: Delecja 2 nt. G32-A33 z motywu **GGAG**. Zaburzenie oryginalnego motywu GGAG.

Warianty strukturalne:

Struktura 1 : $\Delta G = -23.20$ kcal/mol

Struktura 2 : $\Delta G = -22.20$ kcal/mol,

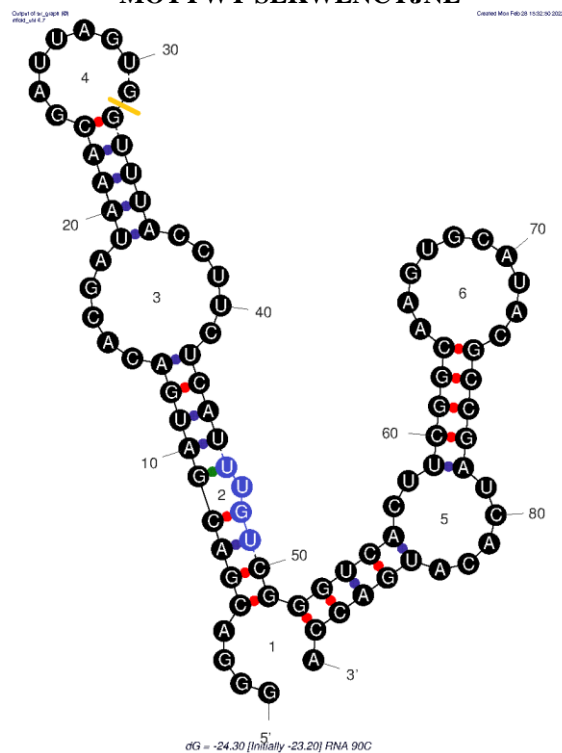
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 54% 5
- Wybrzuszenie 1% 1
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 19% 2
- Pętla spinki 20% 2
- Pętla końcowa 6% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 4,5

MOTYWY SEKWENCYJNE



- **UUGU** (1S/1L/2S)

Mutant 102A

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGUAACCAAUACCAUGGAUUGGU**A**CCUUUAUCCAGCUUCUUA**A**CCU
ACCUGUUCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

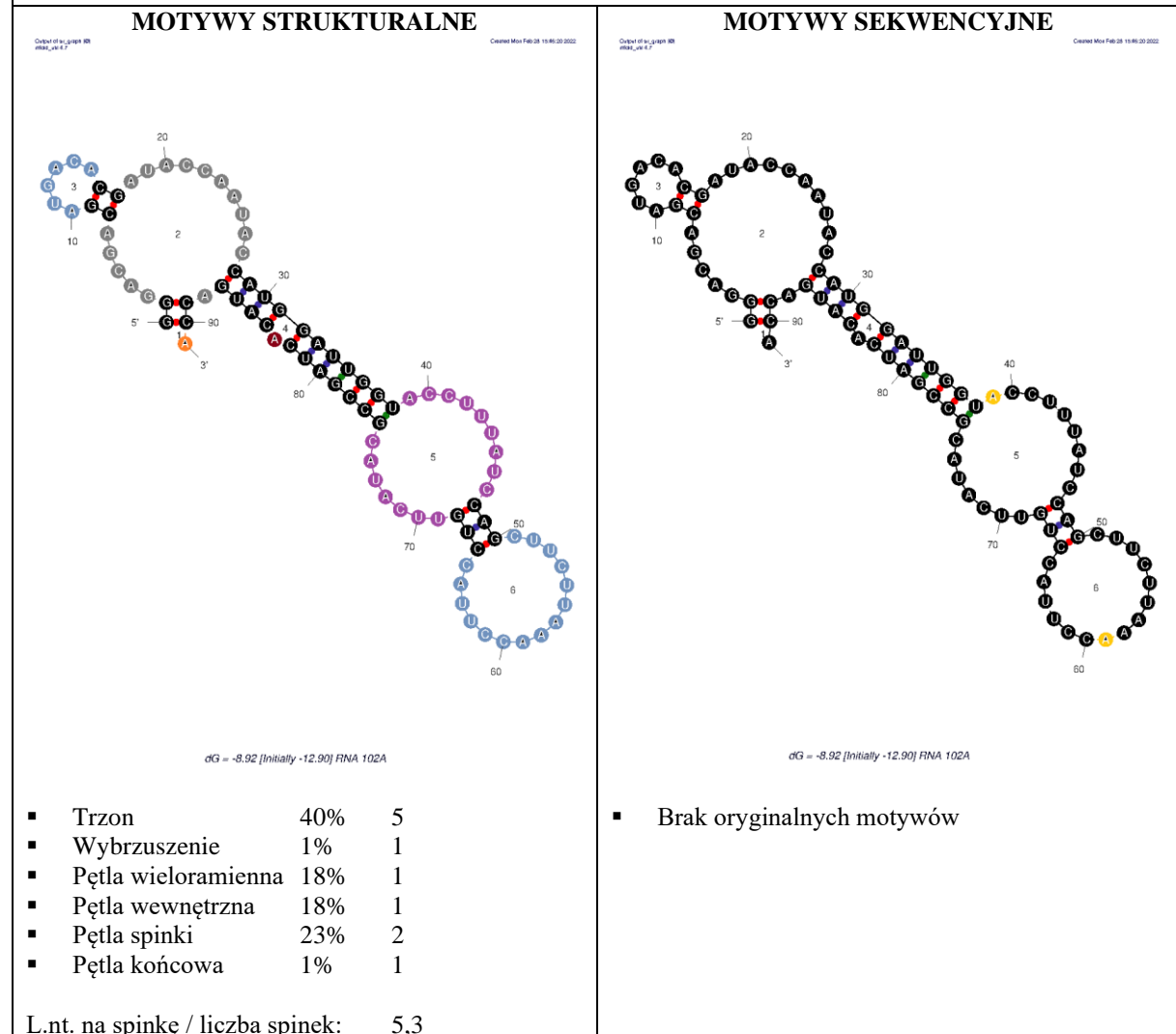
Liczba nukleotydów: 91

Skład nukleotydowy: 26 A, 26 C, 16 G, 23 U

Modyfikacje: Substytucja 1 nt. z motywu **UCCCU**, C39 na A. Substytucja 1 nt. z motywu **CCCU**, C59 na A. Zaburzenie wszystkich oryginalnych motywów.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -12.90$ kcal/mol
- Struktura 2 : $\Delta G = -12.40$ kcal/mol



Mutant 102B

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUACCAAUACCAUGGAUUGGU **UAAAA** UUAUCCAGCUUCUUA **AAAAU**
ACCUGUUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

Liczba nukleotydów: 91

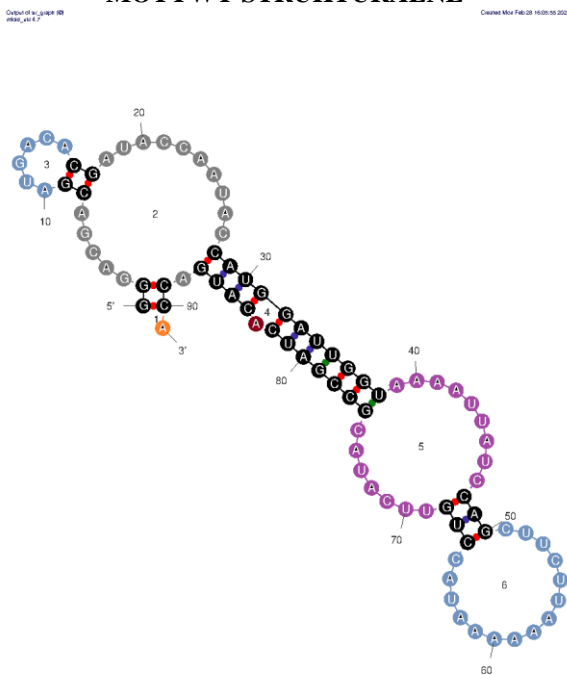
Skład nukleotydowy: 32 A, 22 C, 16 G, 21 U

Modyfikacje: Substytucja 4 nt. z motywu **UCCCU**, C39-U42 na AAAA. Substytucja 4 nt. z motywu **CCCU** (C59-U62) na AAAA. Zaburzenie wszystkich oryginalnych motywów.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -12.90$ kcal/mol
- Struktura 2 : $\Delta G = -12.40$ kcal/mol

MOTYWY STRUKTURALNE

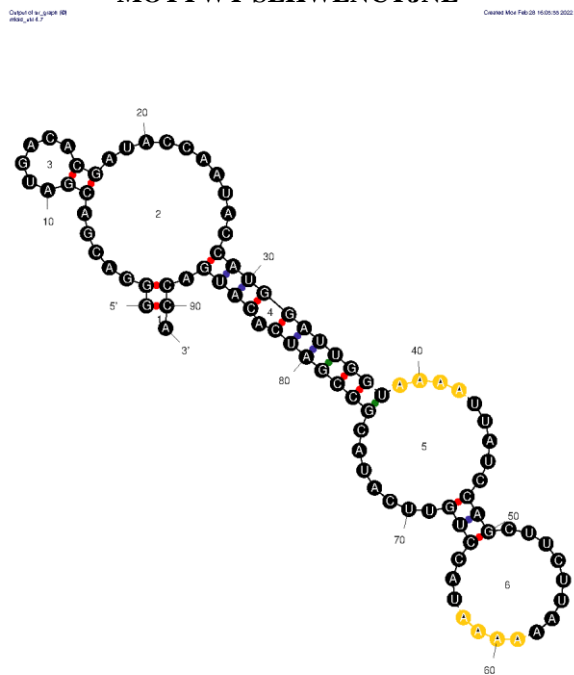


$\Delta G = -8.92$ [Initially -12.90] RNA 102B

- Trzon 40% 5
- Wybrzuszenie 1% 1
- Pętla wieloramienna 18% 1
- Pętla wewnętrzna 18% 1
- Pętla spinki 23% 2
- Pętla końcowa 1% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 5,3

MOTYWY SEKWENCYJNE



$\Delta G = -8.92$ [Initially -12.90] RNA 102B

- Brak oryginalnych motywów

Mutant 102C

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUACCAAUACCAUGGAUUGGU⁺CCUUUAUCCAGCUUCUAA⁺CCUU
ACCUGUUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

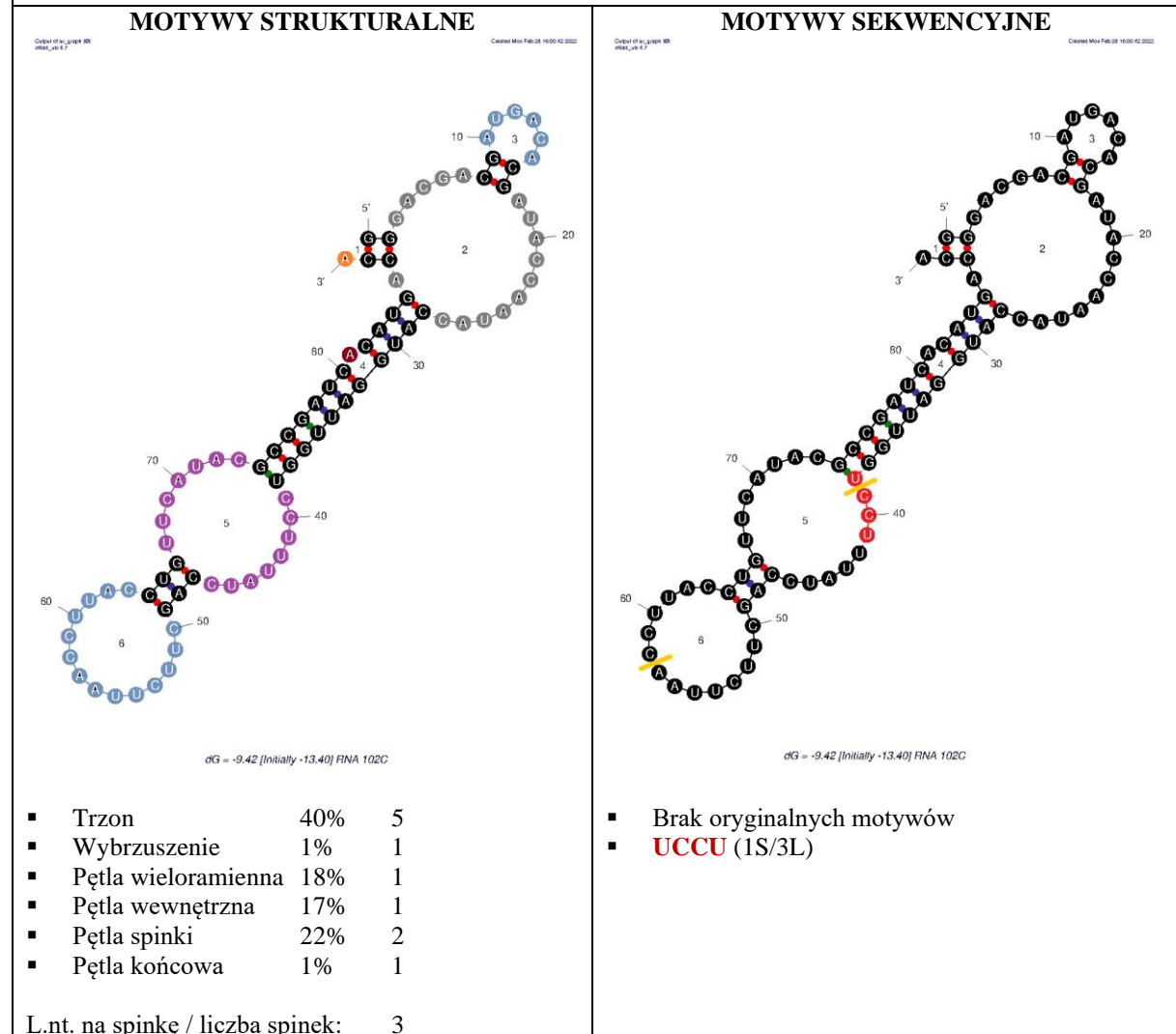
Liczba nukleotydów: 89

Skład nukleotydowy: 24 A, 26 C, 16 G, 23 U

Modyfikacje: Delecja 1 nt. C39 z motywu UCCCU.
Delecja 1 nt. C59 z motywu CCCU. Zaburzenie moty-
wów, powstaje dodatkowy motyw UCCU.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -13.40$ kcal/mol
- Struktura 2 : $\Delta G = -12.90$ kcal/mol



Mutant 102D

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUACCAAUACCAUGGAUUGGU⁺⁺CUUUAUCCAGCUUCUUA⁺⁺CUUA
CCUGUUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

Liczba nukleotydów: 87

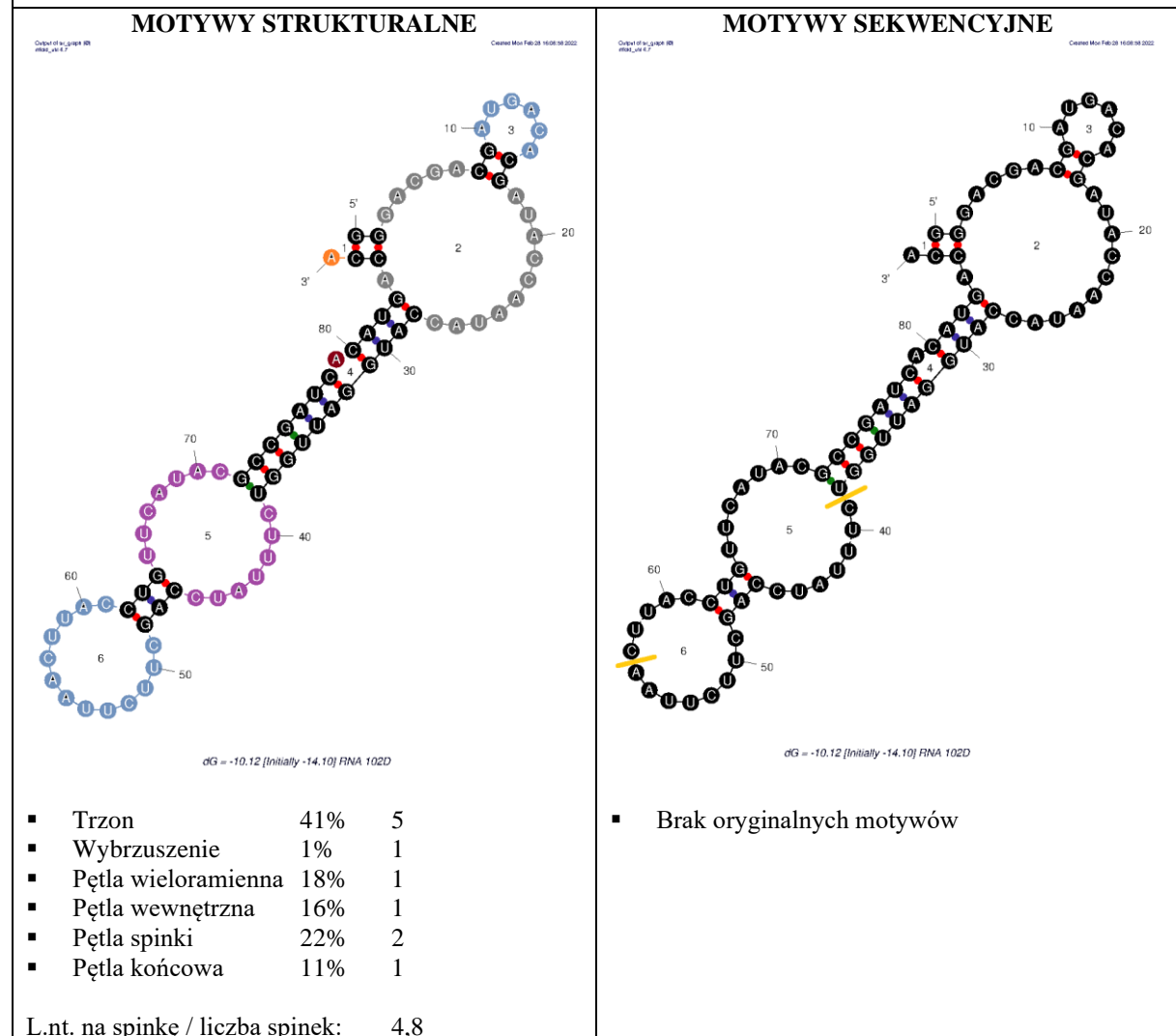
Skład nukleotydowy: 24 A, 24 C, 16 G, 23 U

Modyfikacje: Delecja 2 nt. C39-C40 z motywu UCCCU. Delecja 2 nt. C59-C60 z motywu CCCU.

Zaburzenie wszystkich oryginalnych motywów.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -14.10$ kcal/mol
- Struktura 2 : $\Delta G = -13.60$ kcal/mol,



Mutant 111A

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUACUAUCAGAAUAA **CCC**UGUGUUCUUUGGUUCUGUGCACACGCUG
UUUCAGGGCUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

Liczba nukleotydów: 94

Skład nukleotydowy: 23 A, 25 C, 22 G, 24 U

Modyfikacje: Insercja 3 nt. CCC między A32 a U33.

Powstaje motyw **CCCU**.

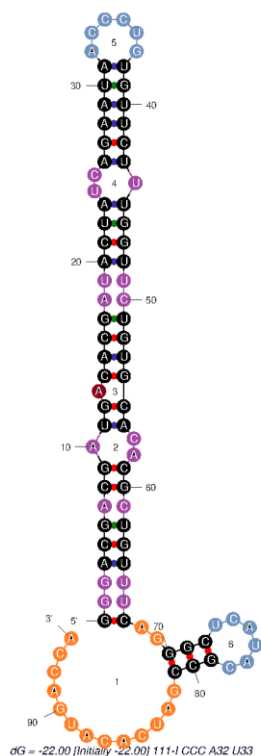
Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -22.00$ kcal/mol,

MOTYWY STRUKTURALNE

Output of mfold 3.9.0
 #seqs: 111.1

Created Mon Oct 24 09:55:17 2022



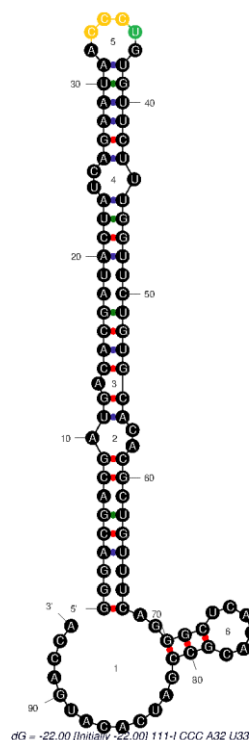
- Trzon 53% 8
- Wybrzuszenie 1% 1
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 17% 5
- Pętla spinki 13% 2
- Pętla końcowa 16% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 3,0

MOTYWY SEKWENCYJNE

Output of mfold 3.9.0
 #seqs: 111.1

Created Mon Oct 24 09:55:17 2022



- CCCU (4L)**

Mutant 111B

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUACUAUCAGAAUAA **CCCU** **UGU** GUUCUUUGGUUCUGUGCACACGCU
GUUUCAGGGGCUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

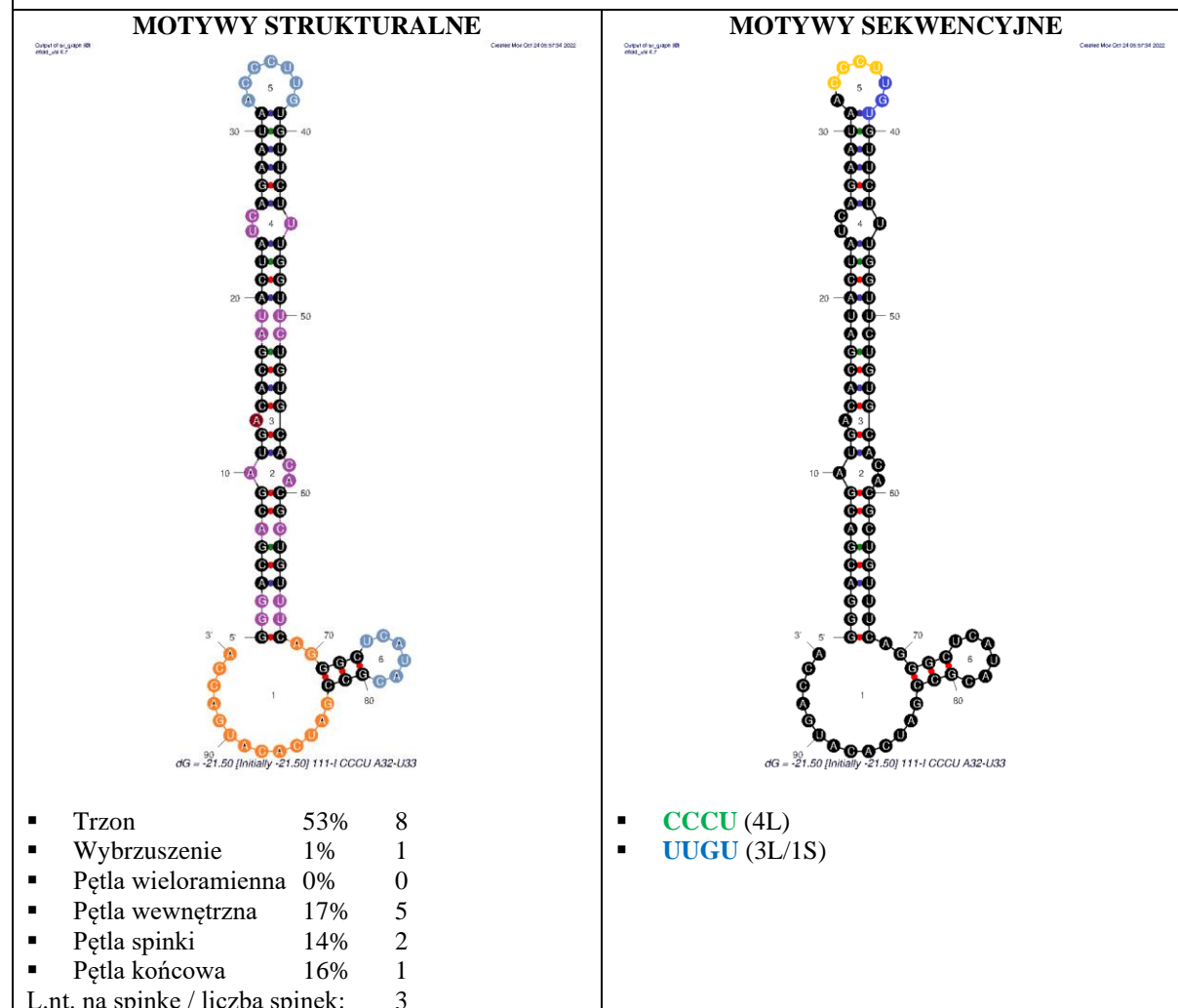
Liczba nukleotydów: 95

Skład nukleotydowy: 23 A, 25 C, 22 G, 25 U

Modyfikacje: Insercja 4 nt. CCCU między A32 a U33. Powstają motywy **CCCU** i **UUGU**, które zachodzą na siebie.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -21.50$ kcal/mol,



Mutant 111C

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUACUAUCAGAAUAAU**UCCC**GUGUUCUUUGGUUCUGUGCACACGCUG
UUUCAGGGCUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

Liczba nukleotydów: 94

Skład nukleotydowy: 23 A, 25 C, 22 G, 24 U

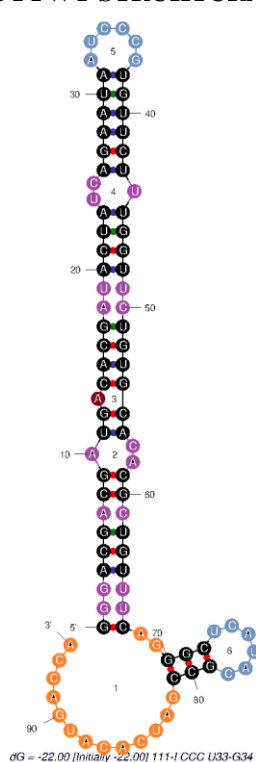
Modyfikacje: Insercja 3 nt. CCC między U33 a G34.

Powstaje motyw **UCCC**.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -22.00$ kcal/mol

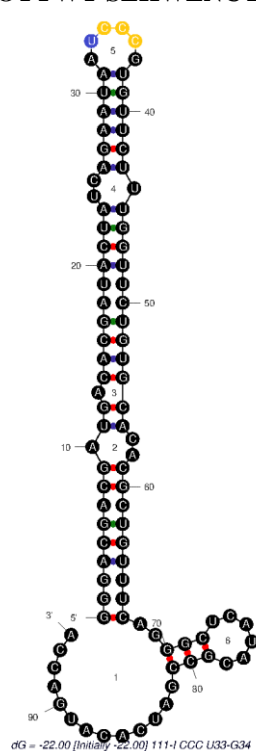
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 53% 8
- Wybrzuszenie 1% 1
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 17% 5
- Pętla spinki 13% 2
- Pętla końcowa 16% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 3,0

MOTYWY SEKWENCYJNE



- UCCC (4L)**

Mutant 111D

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUACUAUCAGAAUAAU**UCCC**GUGUUCUUUGGUUCUGUGCACACGCU
GUUUCAGGGCUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

Liczba nukleotydów: 95

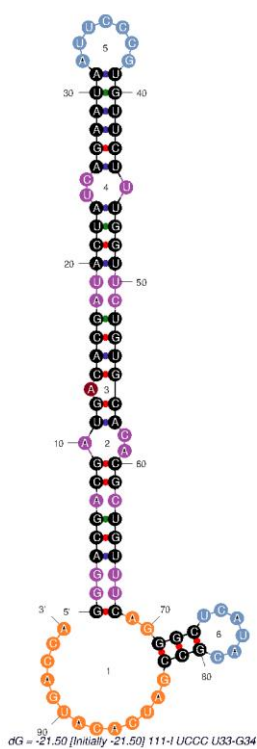
Skład nukleotydowy: 23 A, 25 C, 22 G, 25 U

Modyfikacje: Insercja 4 nt. UCCC między U33 a G34. Powstaje motyw **UCCC**.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -21.50$ kcal/mol,

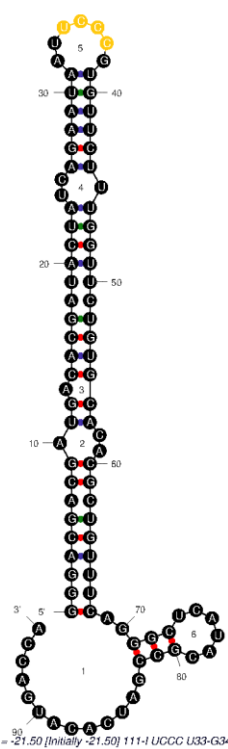
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 53% 8
- Wybrzuszenie 1% 1
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 17% 5
- Pętla spinki 14% 2
- Pętla końcowa 16% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 3,3

MOTYWY SEKWENCYJNE



- UCCC (4L)**

Mutant 111E

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUACUAUCAGAAUAAUG**CUCCU**GUUCUUUGGUUCUGUGCACACGCU
GUUUCAGGGGCUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

Liczba nukleotydów: 95

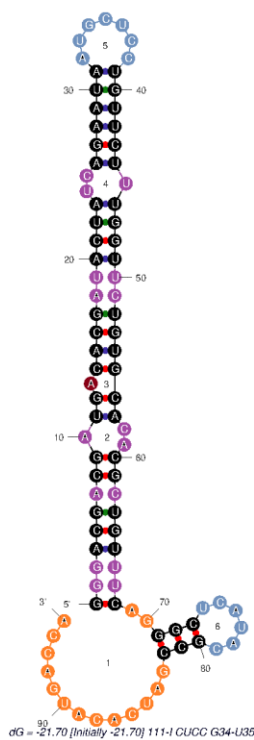
Skład nukleotydowy: 23 A, 25 C, 22 G, 25 U

Modyfikacje: Insercja 4 nt. CUCC między G34 a U35. Powstają motywy **CUCC** oraz **UCCU**, które zachodzą na siebie.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -21.70$ kcal/mol,

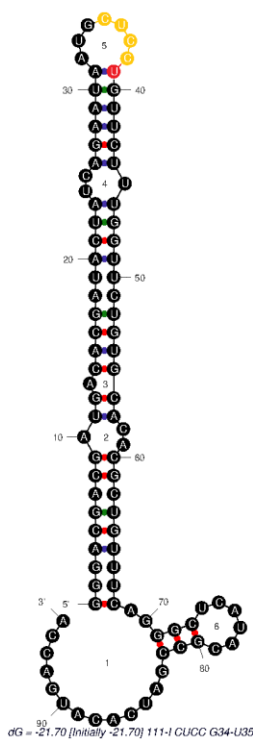
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 53% 8
- Wybrzuszenie 1% 1
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 17% 5
- Pętla spinki 14% 2
- Pętla końcowa 16% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 3,3

MOTYWY SEKWENCYJNE



- CUCC** (4L)
- UCCU** (3L/1S)

Mutant 111F

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUACUAUCAGAAUAA**UUGU****UUGU**GUUCUUUGGUUCUGUGCACACGCU
GUUUCAGGGGCUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

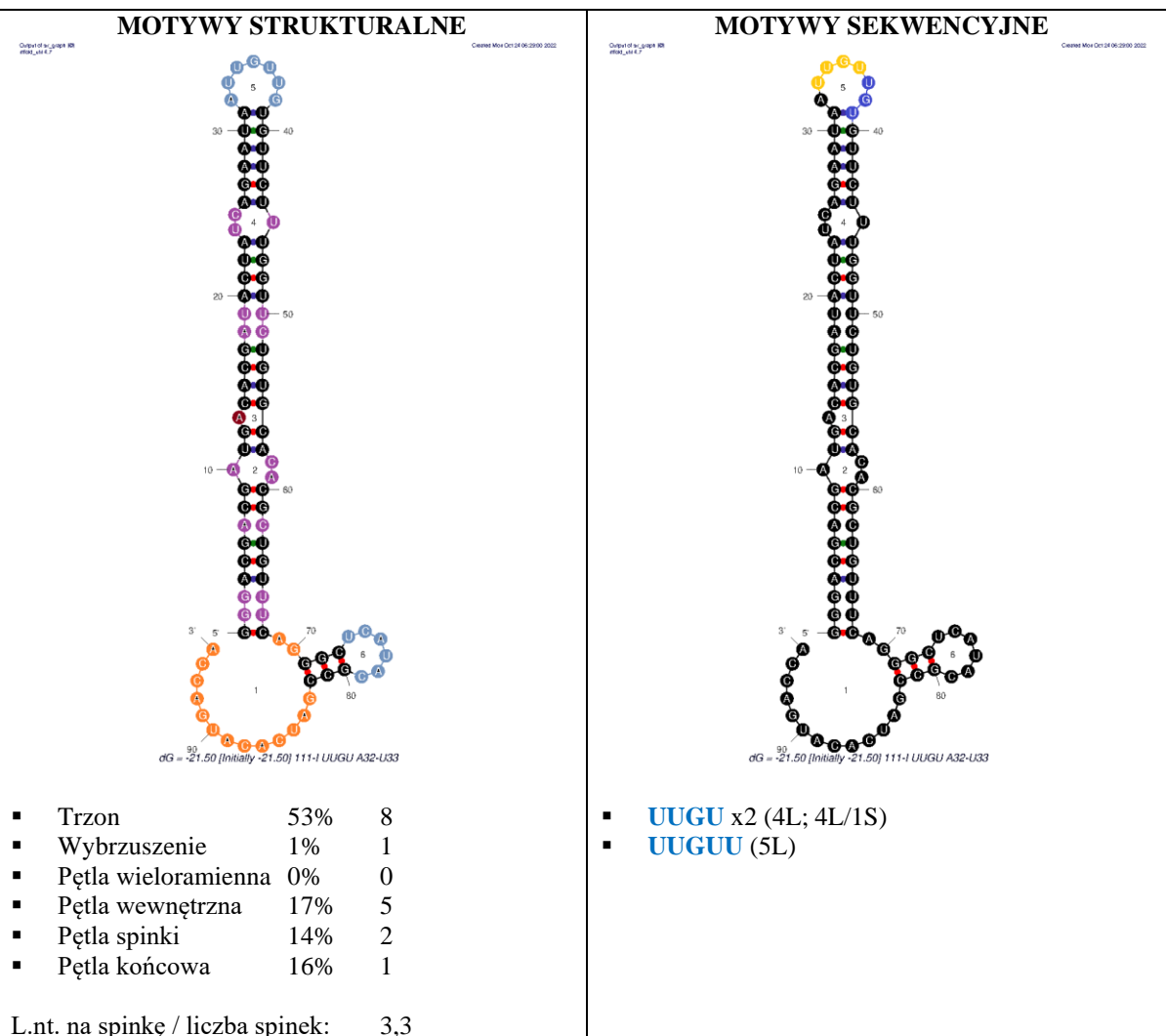
Liczba nukleotydów: 95

Skład nukleotydowy: 23 A, 22 C, 23 G, 27 U

Modyfikacje: Insercja 4 nt. UUGU między A32 a U33. Powstają dwa motywy **UUGU**, i motyw **UUGUU**, które zachodzą na siebie.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -21.50$ kcal/mol,



Mutant 111G

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUACUAUCAGAAUAAU**GGAG**UGUUCUUUGGUUCUGUGCACACGCUG
UUUCAGGGCUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

Liczba nukleotydów: 94

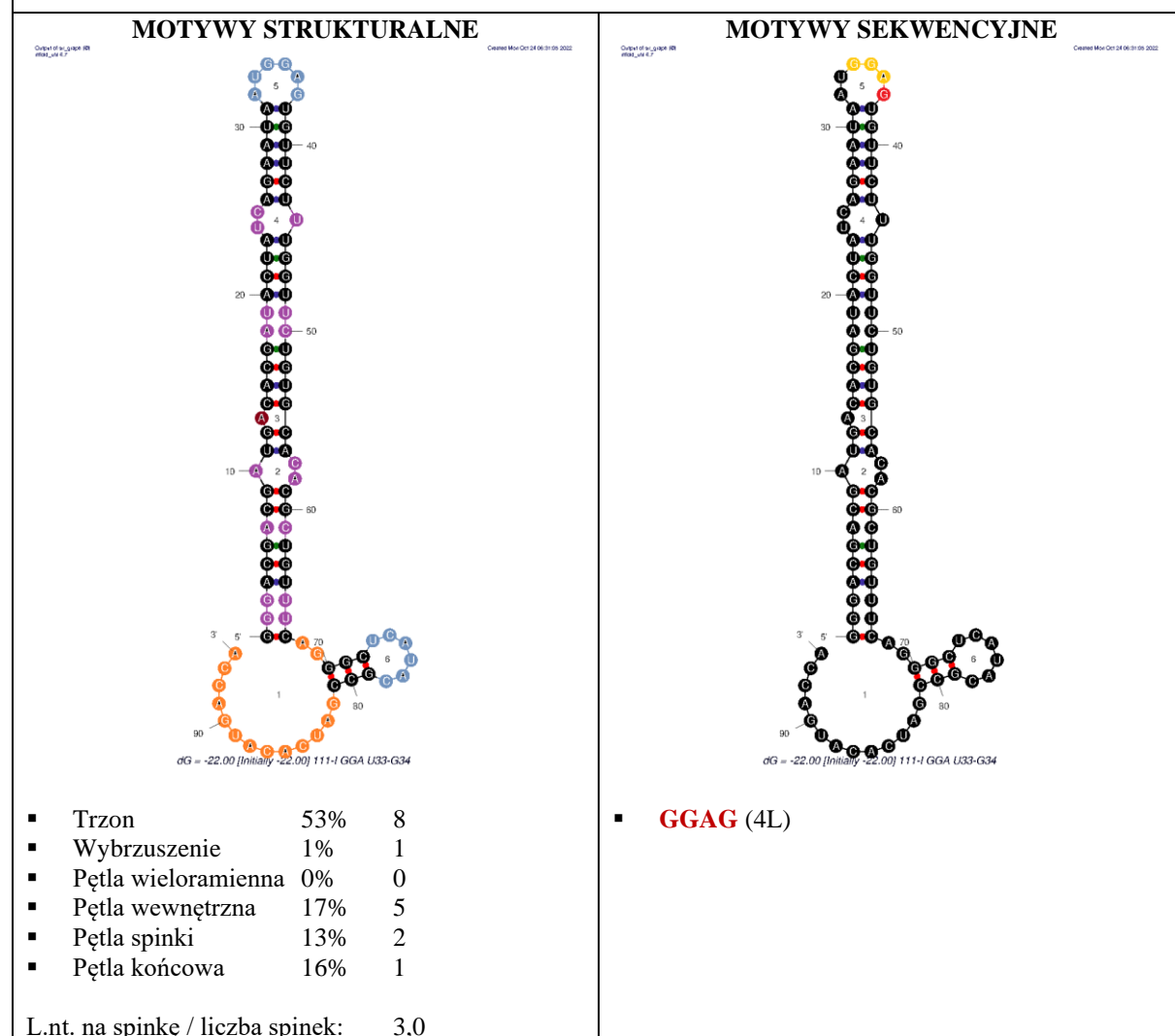
Skład nukleotydowy: 24 A, 22 C, 24 G, 24 U

Modyfikacje: Insercja 3 nt. GGA między U33-G34.

Powstaje motyw **GGAG**.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -22.00$ kcal/mol,



Mutant 145A

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAGACAUUAUUAU**CCCU**GGGUGCUGUCGACGUGUUUAUUAUCGCC
UUUUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

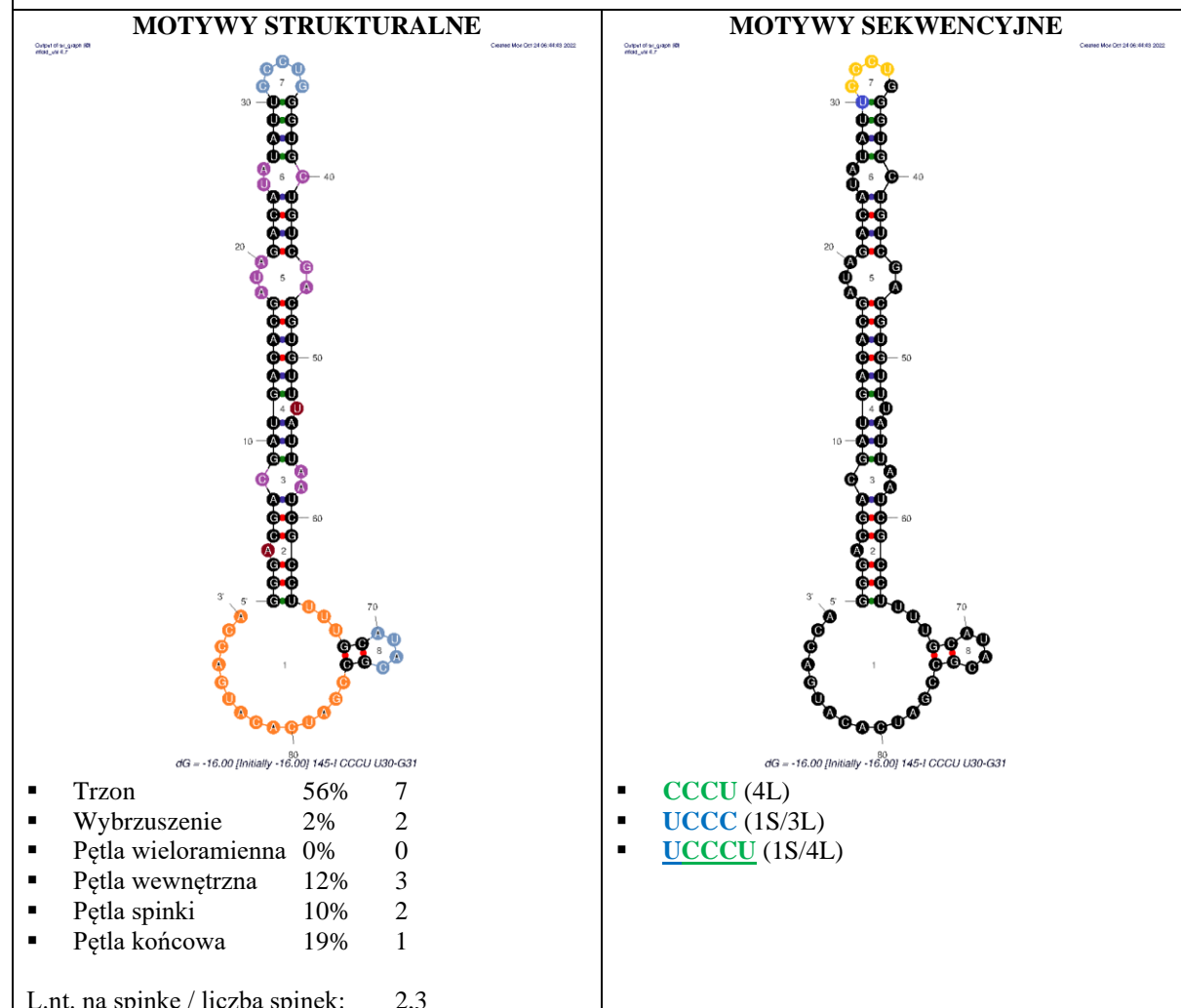
Liczba nukleotydów: 89

Skład nukleotydowy: 22 A, 22 C, 21 G, 24 U

Modyfikacje: Insercja 4 nt. CCCU między U30 a G31. Powstaje motyw **UCCC** i **CCCU**, które zachodzą na siebie i tworzą motyw **UCCCU**.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -16.00$ kcal/mol,
- Struktura 2 : $\Delta G = -15.40$ kcal/mol,
- Struktura 3 : $\Delta G = -15.00$ kcal/mol,



Mutant 145B

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAGACAUUAUUU**UCCC**GGGUGCUGUCGACGUGUUUAUUAUCGCC
UUUUGCAUACGCCGAUCAUGACCA

Liczba nukleotydów: 89

Skład nukleotydowy: 22 A, 22 C, 21 G, 24 U

Modyfikacje: Insercja 4nt. UCCC między U30 a G31.

Powstaje motyw **UCCC**.

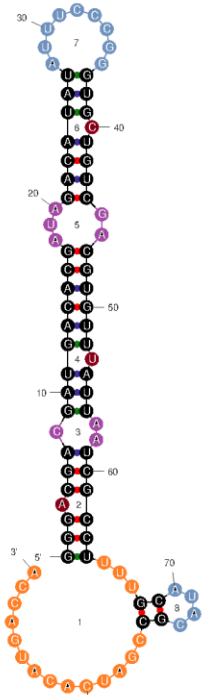
Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -15.20$ kcal/mol,
- Struktura 2 : $\Delta G = -14.90$ kcal/mol,
- Struktura 3 : $\Delta G = -14.60$ kcal/mol,
- Struktura 4 : $\Delta G = -14.20$ kcal/mol,

MOTYWY STRUKTURALNE

Output of: juppi-88
#seq_1414.7

Casey-Mir Oct 24 05:31:06 2022



$\Delta G = -15.20$ [Initially -15.20] 145-1 UCCC U30-G31

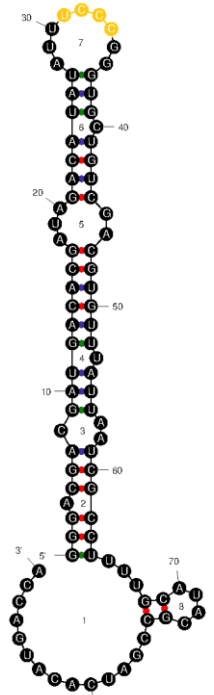
- Trzon 54% 7
- Wybrzuszenie 3% 3
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 9% 2
- Pętla spinki 15% 2
- Pętla końcowa 19% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 3,3

MOTYWY SEKWENCYJNE

Output of: juppi-88
#seq_1414.7

Casey-Mir Oct 24 05:31:06 2022



$\Delta G = -15.20$ [Initially -15.20] 145-1 UCCC U30-G31

- **UCCC (4L)**

Mutant 145C

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAGACAUUAUAUU**CUCC**GGGUGCUGUCGACGUGUUUAUUAUCGCC
UUUUGCAUACGCCGAUCAUGACCA

Liczba nukleotydów: 89

Skład nukleotydowy: 22 A, 22 C, 21 G, 24 U

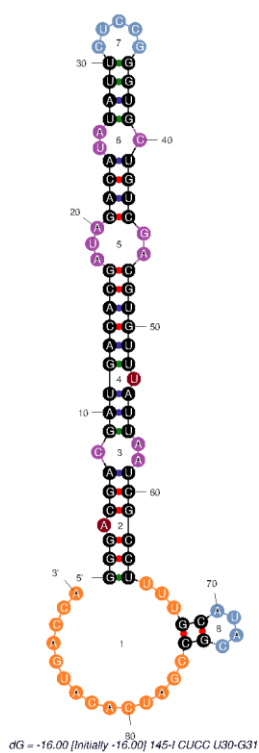
Modyfikacje: Insercja 4nt. CUCC między U30 a G31.

Powstaje motyw **CUCC**.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -16.00$ kcal/mol,
- Struktura 2 : $\Delta G = -15.40$ kcal/mol,
- Struktura 3 : $\Delta G = -15.00$ kcal/mol

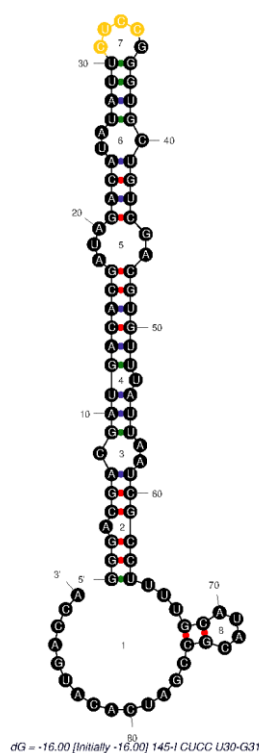
MOTYWY STRUKTURALNE



- Trzon 56% 7
- Wybrzuszenie 2% 2
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 12% 3
- Pętla spinki 10% 2
- Pętla końcowa 19% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 2,3

MOTYWY SEKWENCYJNE



- **CUCC (4L)**

Mutant 145D

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAGACAUUAU**UUGU**UGGGUGCUGUCGACGUGUUUAUUAACGCC
UUUUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

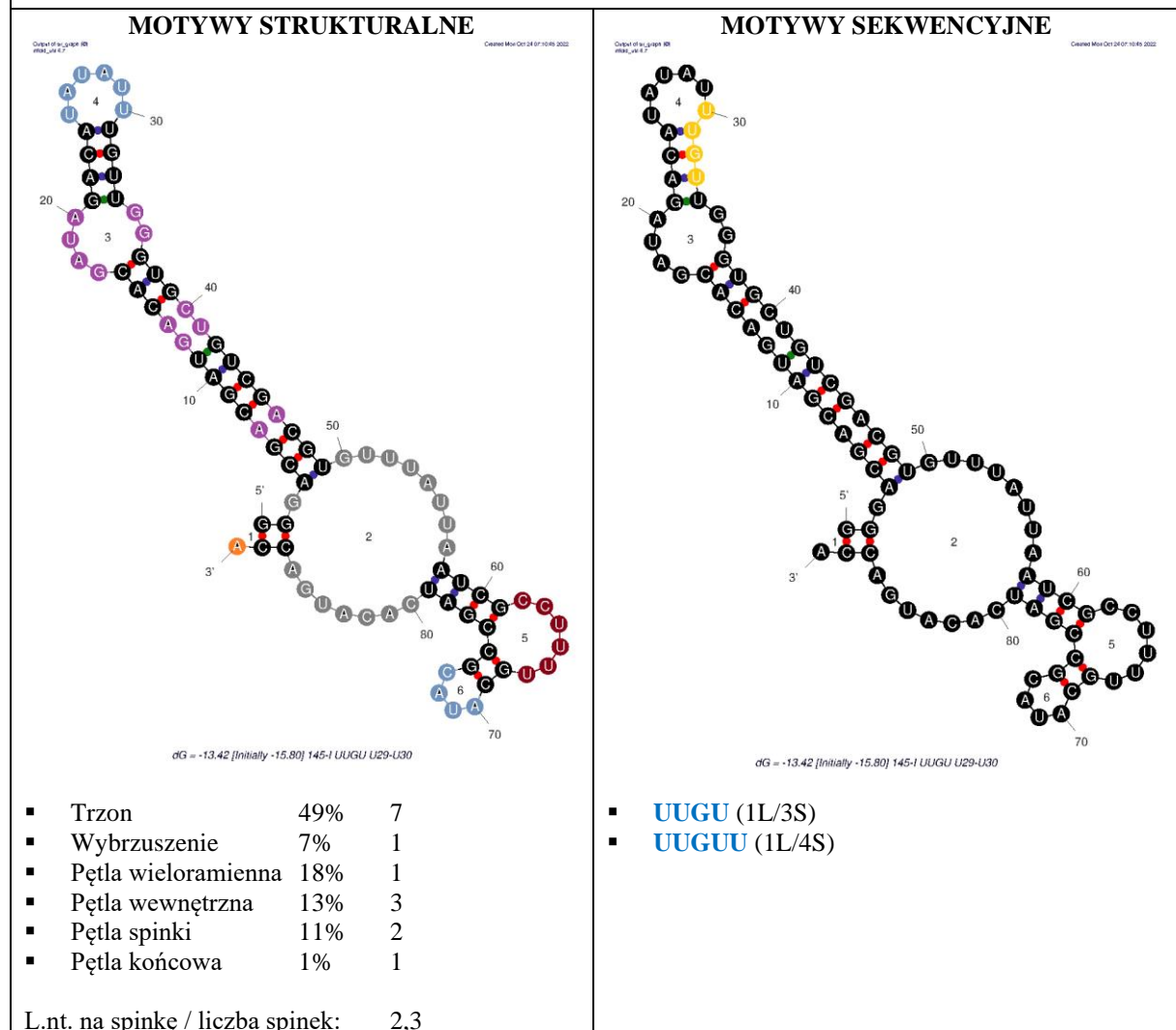
Liczba nukleotydów: 89

Skład nukleotydowy: 22 A, 19 C, 22 G, 26 U

Modyfikacje: Insercja 4 nt. UUGU między U29 a U30. Powstaje motywy **UUGU** i **UUGUU**. Motywy zachodzą na siebie.

Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -15.80$ kcal/mol,
- Struktura 2 : $\Delta G = -15.20$ kcal/mol,
- Struktura 3 : $\Delta G = -15.20$ kcal/mol,
- Struktura 4 : $\Delta G = -15.10$ kcal/mol
- Struktura 5 : $\Delta G = -14.90$ kcal/mol
- Struktura 6 : $\Delta G = -14.80$ kcal/mol



Mutant 145E

Sekwencja (5' → 3') :

GGGACGACGAUGACACGAUAGACAUUAU**GGAG**UUGGGUGCUGUCGACGUGUUUAUUAACGC
CUUUUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

Liczba nukleotydów: 89

Skład nukleotydowy: 23 A, 19 C, 24 G, 23 U

Modyfikacje: Insercja 4 nt. GGAG między A28-U29.

Powstaje motyw **GGAG**.

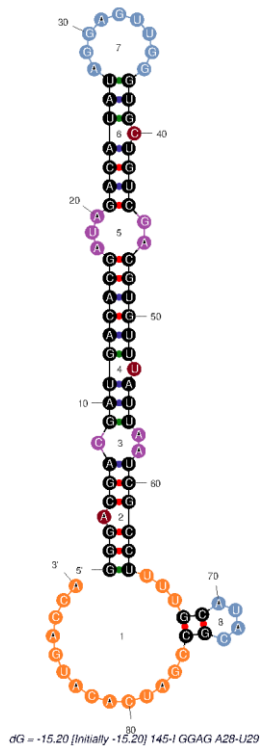
Warianty strukturalne:

- Struktura 1 : $\Delta G = -15.20$ kcal/mol,
- Struktura 2 : $\Delta G = -14.60$ kcal/mol,
- Struktura 3 : $\Delta G = -14.20$ kcal/mol

MOTYWY STRUKTURALNE

Output of m_rna4k 88
mRNA_v4.1.7

Created Mon Oct 24 07:58:41 2022



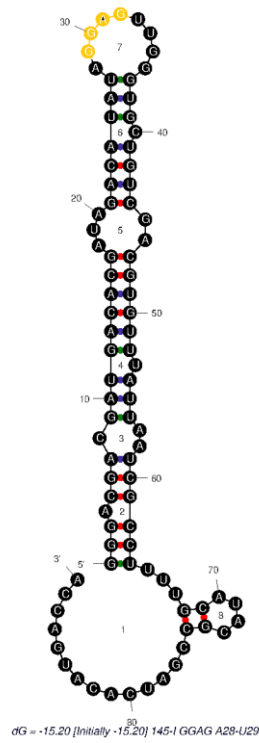
- Trzon 54% 7
- Wybrzuszenie 3% 3
- Pętla wieloramienna 0% 0
- Pętla wewnętrzna 9% 2
- Pętla spinki 15% 2
- Pętla końcowa 19% 1

L.nt. na spinkę / liczba spinek: 3,3

MOTYWY SEKWENCYJNE

Output of m_rna4k 88
mRNA_v4.1.7

Created Mon Oct 24 07:58:41 2022



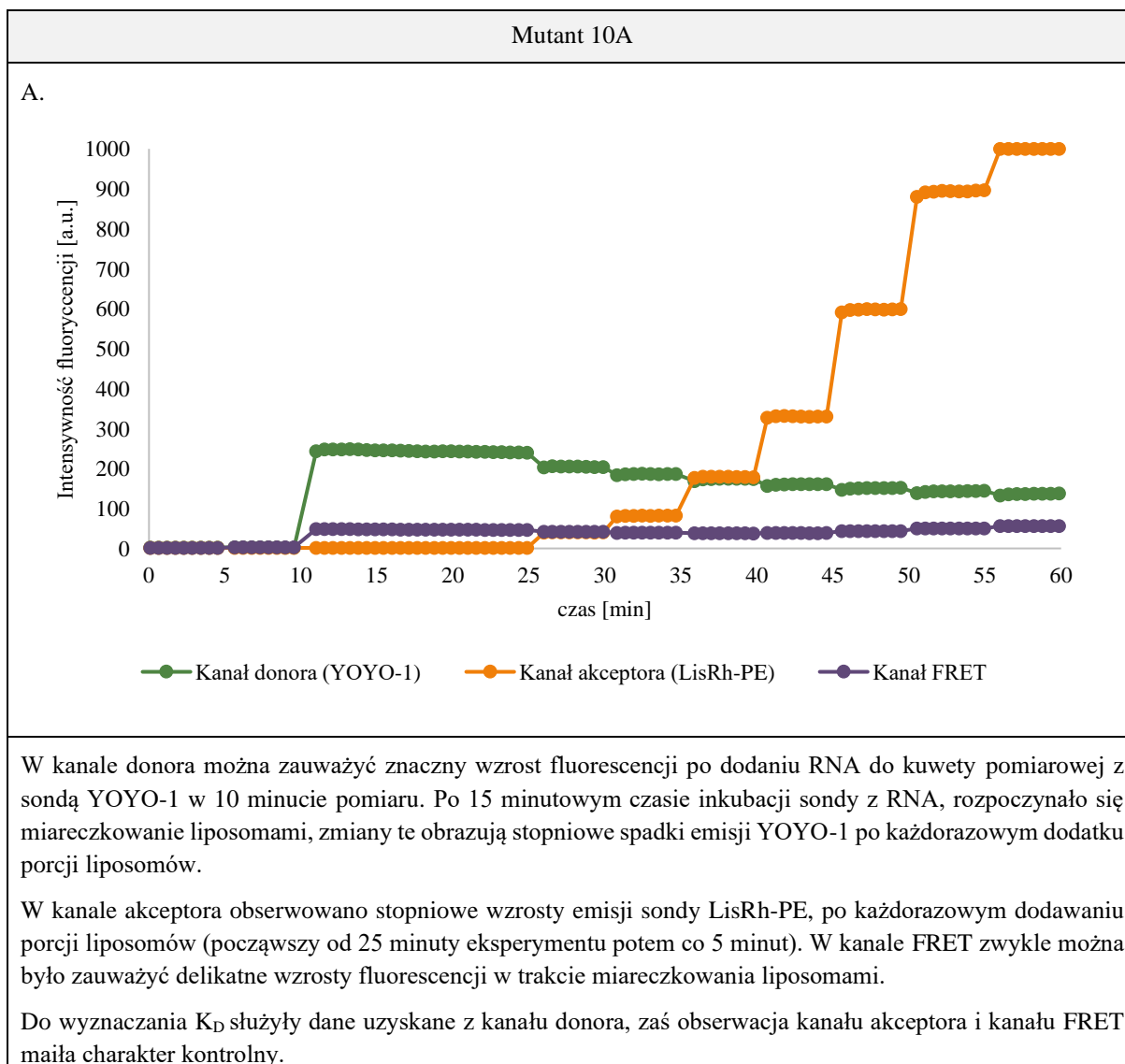
- **GGAG** (4L)

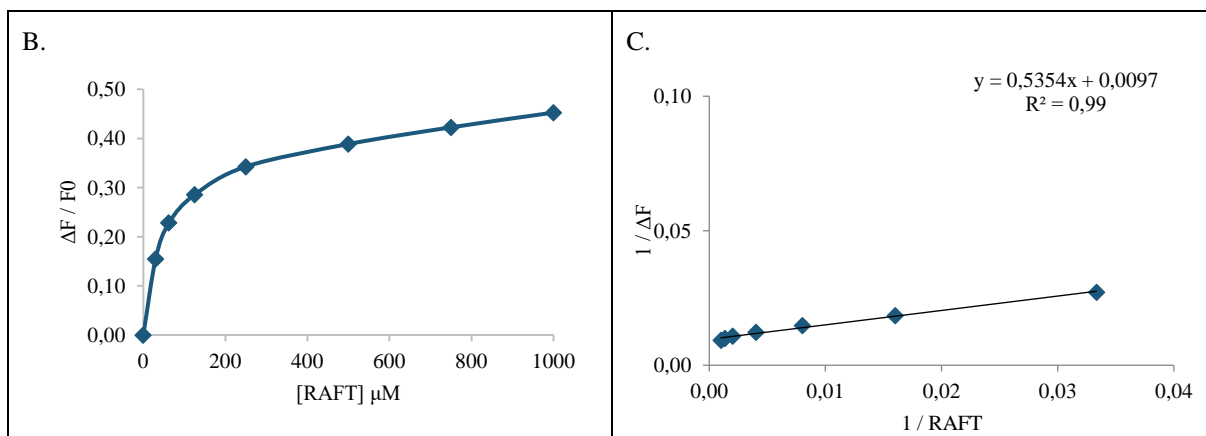
4.7. ODDZIAŁYWANIE MUTANTÓW APTAMERÓW Z LIPOSOMAMI TRATWOWYMI

Pomiary fluorescencyjne oddziaływania mutantów aptamerów z LUV_{RAFT}, prowadzone były w programie Kinetics. Przykładowe wykresy zmian fluorescencji sond zobrazowane są w tabeli poniżej. Podobnie jak w przypadku aptamerów RNA sporządzono wykresy zmiany fluorescencji sondy YOYO-1 w czasie miareczkowania liposomami oraz wykresy odwrotności zmiany fluorescencji YOYO-1 podczas miareczkowania.

Tabela 26. Wyniki pomiarów oddziaływania mutantów RNA z błonami tratwowymi na przykładzie mutantu 10A.

- A. Wykres kinetyczny zmian fluorescencji w trakcie miareczkowania mutantu liposomami LUV_{RAFT}. Wykres obrazuje zmiany fluorescencji w czasie, mierzony w trzech kanałach. Na zielono oznaczony jest kanał donora – sondy YOYO-1 związanej z RNA, na pomarańczowo kanał akceptora – sonda LisRH-PE związana z liposomami oraz na fioletowo kanał FRET.
- B. Wykres zmiany fluorescencji sondy YOYO-1 w trakcie miareczkowania
- C. Wykres odwrotności zmiany fluorescencji sondy YOYO-1 z równaniem regresji



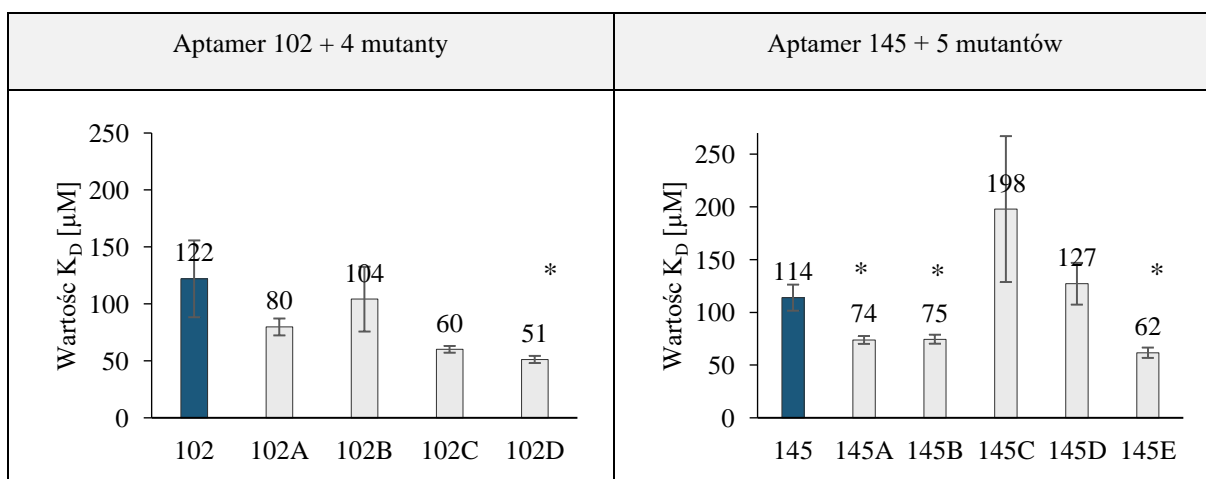
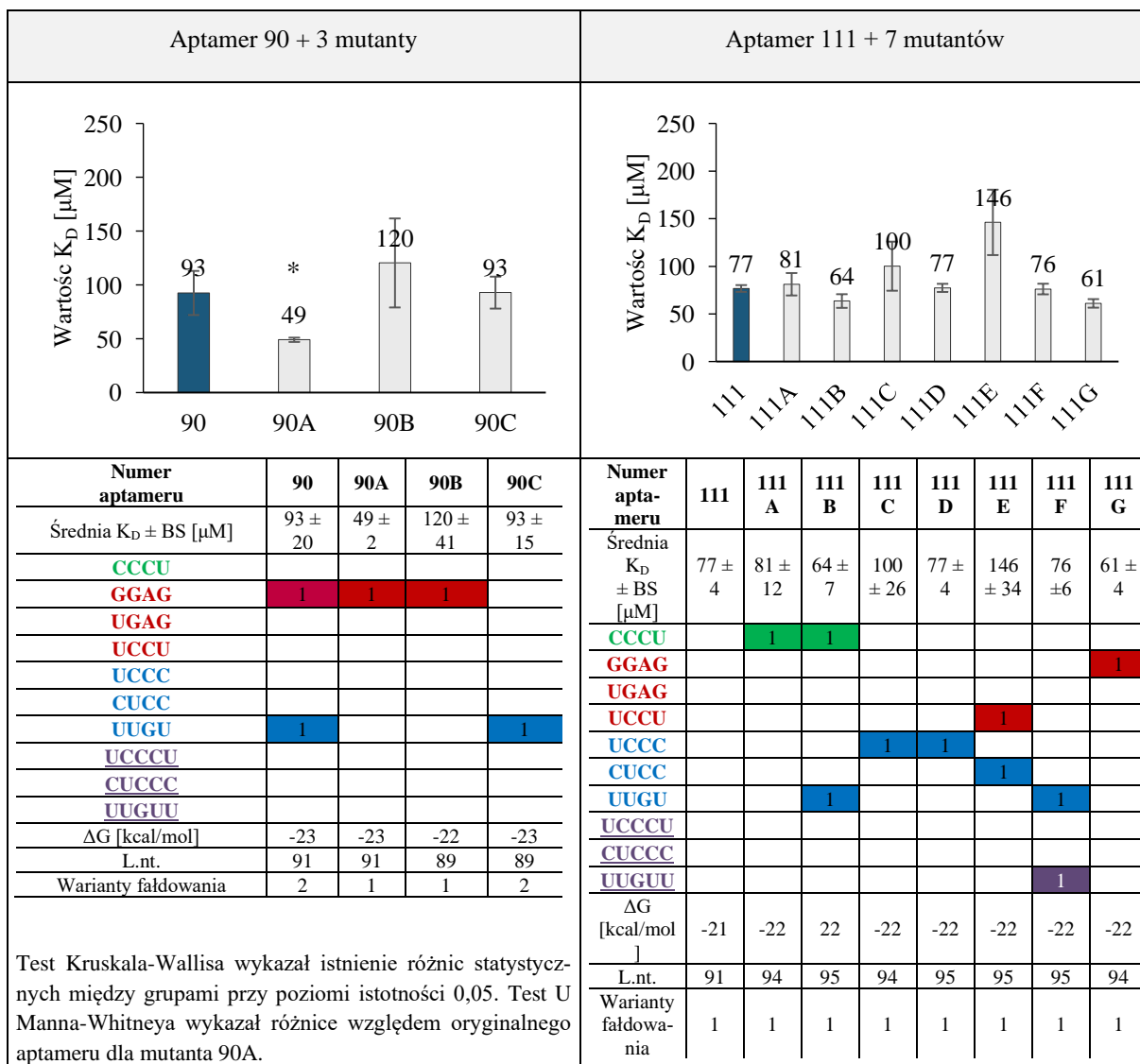


Tak jak w przypadku eksperymentów z oryginalnymi aptamerami RNA, na podstawie równania regresji z każdego eksperymentu obliczana była stała dysocjacji K_D . Średnie wartości K_D dla oddziaływania każdego mutanta z LUV_{RAFT} obliczane były z czterech powtórzeń eksperymentu. Wartości średnich K_D oryginalnych aptamerów oraz wszystkich ich mutantów zestawione są w tabeli poniżej.

Tabela 27. Zestawienie średnich K_D dla kompleksów aptamerów i ich mutantów z błonami LUV_{RAFT} .

Poniżej wykresów została podana wartość średniej K_D z błędem standardowym (BS), profil motywów sekwencyjnych dla każdego RNA, wartość ΔG [kcal/mol] uzyskana dla pierwszego przewidzianego fałdowania, liczba nukleotydów oraz liczba wariantów fałdowania.

Aptamer 13 + 2 mutanty				Aptamer 10 + 4 mutanty					
<p>Wartość K_D [μM]</p>				<p>Wartość K_D [μM]</p>					
<p>Numer aptameru</p>				<p>Numer aptameru</p>					
<p>Średnia K_D \pm BS [μM]</p>				<p>Średnia K_D \pm BS [μM]</p>					
<p>CCC<u>U</u></p>				<p>CCC<u>U</u></p>					
<p>GGAG</p>				<p>GGAG</p>					
<p>UGAG</p>				<p>UGAG</p>					
<p>UCC<u>U</u></p>				<p>UCC<u>U</u></p>					
<p>UCC<u>C</u></p>				<p>UCC<u>C</u></p>					
<p>CUCC</p>				<p>CUCC</p>					
<p>UUG<u>U</u></p>				<p>UUG<u>U</u></p>					
<p>UCC<u>U</u></p>				<p>UCC<u>U</u></p>					
<p>CUCC</p>				<p>CUCC</p>					
<p>UUG<u>U</u></p>				<p>UUG<u>U</u></p>					
<p>ΔG [kcal/mol]</p>				<p>ΔG [kcal/mol]</p>					
<p>L.nt.</p>				<p>L.nt.</p>					
<p>Warianty fałdowania</p>				<p>Warianty fałdowania</p>					



Numer aptameru	102	102A	102B	102C	102D	Numer aptameru	145	145A	145B	145C	145D	145E
Średnia $K_D \pm BS$ [μM]	122 \pm 34	80 \pm 7	104 \pm 28	60 \pm 3	51 \pm 3	Średnia $K_D \pm BS$ [μM]	114 \pm 12	74 \pm 4	75 \pm 4	198 \pm 69	127 \pm 20	62 \pm 5
CCCU	2					CCCU		1				
GGAG						GGAG						1
UGAG						UGAG						
UCCU				1		UCCU						
UCCC	1					UCCC		1	1			
CUCU						CUCU				1		
UUGU						UUGU					1	
UCCCU	1					UCCCU		1				
CUCCC						CUCCC						
UUGUU						UUGUU					1	
ΔG [kcal/mol]	-13	-13	-13	-13	-14	ΔG [kcal/mol]	-16	-16	-15	-16	-16	-15
L.nt.	91	91	91	89	87	L.nt.	85	89	89	89	89	89
Warianty faldowania	2	2	2	2	2	Warianty faldowania	3	3	4	3	6	3
Test Kruskala-Wallisa wykazał istnienie różnic statystycznych między grupami przy poziomi istotności 0,05. Test U Manna-Whitneya wykazał różnice względem oryginalnego aptameru dla mutantu 102D.						Test Kruskala-Wallisa wykazał istnienie różnic statystycznych między grupami przy poziomi istotności 0,05. Test U Manna-Whitneya wykazał różnice względem oryginalnego aptameru dla mutantów 145A, 145B i 145E.						

W przypadku mutantów aptameru 13 ($K_D = 84 \pm 5 \mu M$) wprowadzone mutacje, polegające na zaburzeniu wszystkich oryginalnych motywów RNA, nie wpłynęły znacząco na zmianę średniej K_D w porównaniu z oryginalnym aptamerem. Wartości stałej dysocjacji mutantów wynosiły: dla mutantu 13A (z substytucją jednonukleotydomą zaburzającą oryginalne motywy) $K_D = 71 \pm 8 \mu M$ oraz dla mutantu 13B (delecja jednonukleotydoma skutkująca zaburzeniem oryginalnych motywów ale powstaniem motywu UCCU) $K_D = 88 \pm 18 \mu M$.

Co do modyfikacji aptameru 90 ($K_D = 93 \pm 20 \mu M$) to dla jednego z mutantów – RNA 90A stwierdzono prawie dwukrotny spadek średniej fluorescencji ($K_D = 49 \pm 2 \mu M$) w porównaniu z aptamerem bez modyfikacji. Mutant 90A miał zaburzony motyw trawowy UUGU poprzez substytucję. Co ciekawe dla mutantu 90B z zaburzonym tym samym motywem poprzez delecję nukleotydów, zanotowano wzrost średniej ($K_D = 120 \pm 41 \mu M$). Dla ostatniego z mutantu o numerze 90C, z zaburzonym motywem egzozomowym GGAG, uzyskano średnią K_D porównywalną z oryginalnym aptamerem.

Wszystkie mutanty aptameru 102 ($K_D = 122 \pm 34 \mu M$) zasadniczo wykazywały niższą wartość średniej K_D w porównaniu z oryginalnym aptamerem, Największe różnice w wartości K_D otrzymano dla mutantów o numerach: 102C ($K_D = 60 \pm 3 \mu M$) i 102D ($K_D = 51 \pm 3 \mu M$). Obydwa te mutanty miały zaburzone wszystkie oryginalne motywy przez delecję, przy czym w przypadku mutantu 102C delecja nukleotydów wpłynęła na utworzenie dodatkowego motywu UCCU.

Jeśli chodzi o aptamery ze wstawionym dodatkowym motywem, to w przypadku aptameru numer 10 ($K_D = 163 \pm 57 \mu M$) wszystkie jego mutanty charakteryzowały się obniżoną wartością K_D w stosunku do RNA bez mutacji. Najsilniejsze powinowactwo do błon zaobserwowano dla mutantu 10A z dodatkowym motywem CCCU ($K_D = 58 \pm 2 \mu M$), wartość K_D była prawie trzykrotnie niższa w porównaniu z oryginalnym aptamerem. Co ciekawe dla RNA 10B, gdzie wstawione były dwa dodatkowe motywy CCCU, powinowactwo okazało się słabsze niż w pierwszym mutancie ($K_D = 92 \pm 10 \mu M$), mimo wszystko wartość K_D była nadal prawie

dwukrotnie niższa względem RNA bez modyfikacji. Dla pozostałych dwóch modyfikacji RNA, mutant 10C (z zachodzącymi na siebie motywami UCCC i CCCU) i mutant 10D (dodatkowy motyw CUCCC), wartości średniej K_D wynosiły odpowiednio $119 \pm 8 \mu\text{M}$ i $140 \pm 34 \mu\text{M}$, co również wskazuje na silniejsze powinowactwo tych aptamerów do błon tratwowych w porównaniu z wyjściowym aptamerem.

Dla aptameru numer 111 ($K_D = 77 \pm 4 \mu\text{M}$) badano oddziaływanie z LUV_{RAFT} dla 7 mutantów z dodatkowymi motywami egzosomalnymi i tratwowymi. Wartości średniej K_D pięciu aptamerów były na podobnym poziomie co wyjściowy aptamer i wynosiły: dla mutant 111A (z motywem CCCU) $K_D = 81 \pm 12 \mu\text{M}$, dla mutant 111B (z zachodzącymi motywami CCCU i UUGU) $K_D = 64 \pm 7 \mu\text{M}$, dla mutant 111D (z motywem UCCC) $K_D = 77 \pm 4 \mu\text{M}$, dla mutant 111F (z dwoma zachodzącymi na siebie motywami UUGU) $K_D = 76 \pm 6 \mu\text{M}$ oraz dla mutant 111G (z motywem GGAG) $K_D = 61 \pm 4 \mu\text{M}$. Nieco niższe powinowactwo do błony w porównaniu z wyjściowym aptamerem odnotowano dla dwóch zmodyfikowanych RNA: mutant 111C (z motywem UCCC) $K_D = 100 \pm 26 \mu\text{M}$ i dla mutant 111E (z zachodzącymi na siebie motywami CUCC) $K_D = 146 \pm 34 \mu\text{M}$.

W przypadku RNA 145 ($K_D = 114 \pm 12 \mu\text{M}$) dwa zmodyfikowane RNA wykazywały wyższe wartości średniej K_D w porównaniu z aptamerem wyjściowym: mutant 145C (z motywem CUCC) $K_D = 198 \pm 69 \mu\text{M}$ oraz mutant 145 D (z motywem UUGU) $K_D = 127 \pm 20 \mu\text{M}$. Trzy pozostałe modyfikacje wykazywały natomiast silniejsze powinowactwo do błony niż oryginalny RNA: mutant 145A (z zachodzącymi motywami UCCC i CCCU) $K_D = 74 \pm 4 \mu\text{M}$, mutant 145B (z motywem UCCC) o bardzo podobnej średniej K_D równej $75 \pm 4 \mu\text{M}$ oraz mutant 145E (z motywem GGAG) o największym powinowactwie do LUV_{RAFT} , $K_D = 62 \pm 5 \mu\text{M}$.

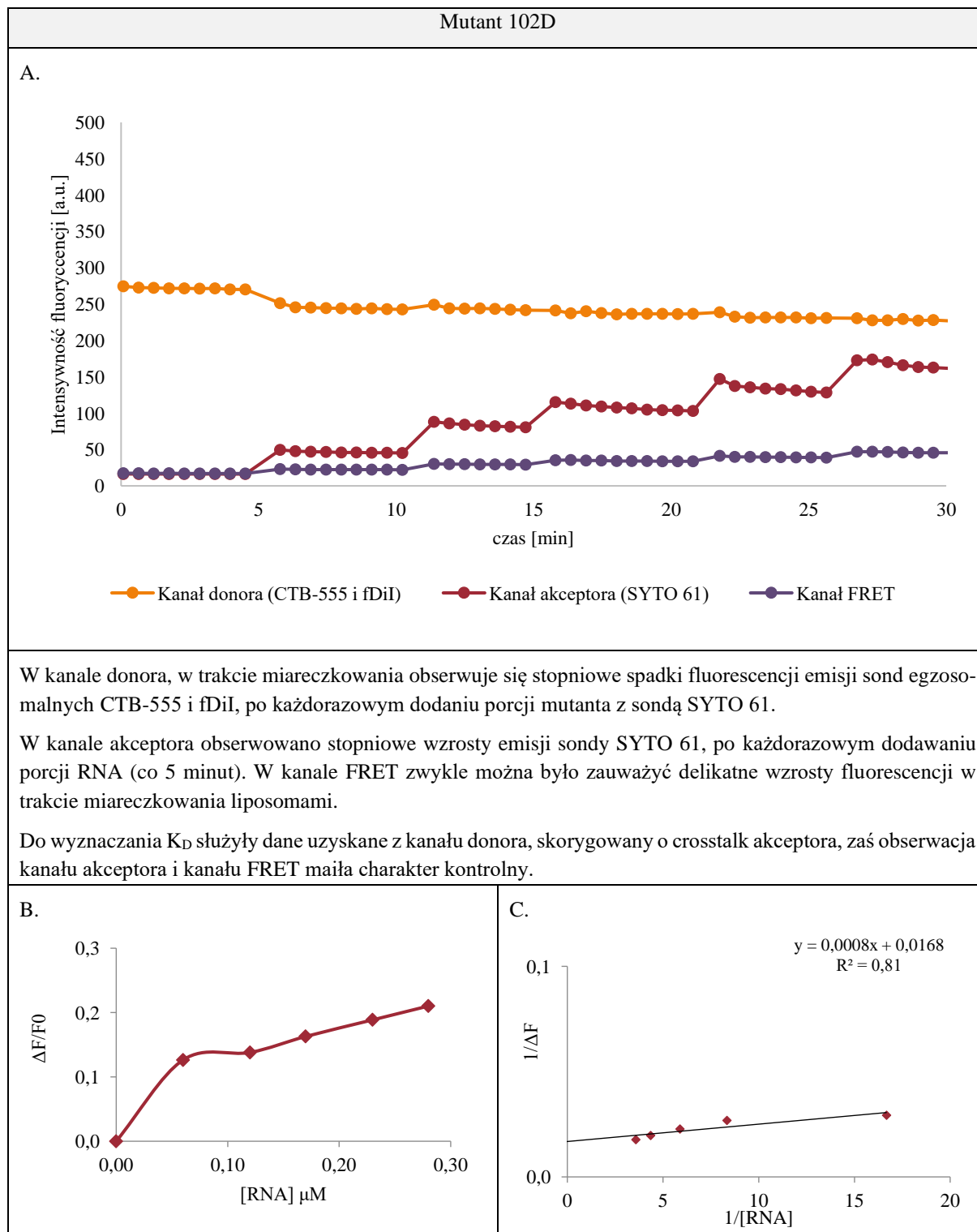
4.8. ODDZIAŁYWANIE MUTANTÓW APTAMERÓW Z EGZOSOMAMI

Podobnie jak w przypadku badań oddziaływania aptamerów RNA z błonami egzosomów przeprowadzono eksperymenty mające na celu zbadanie poziomu oddziaływania mutantów RNA z tymi biologicznymi pęcherzykami. Badania prowadzono dla czterech mutantów: 13A, 13B, 90A, oraz 102D. Mutanty 90A oraz 102 D były tymi mutantami, które wykazywały największą różnicę w wartości K_D w porównaniu z oryginalnym aptamerem w doświadczeniach z błonami liposomów. Dla kontrastu mutanty 13A i 13B wykazywały wartości K_D zbliżone do wyjściowego aptameru. Celem tej części eksperymentalnej była próba określenia czy oddziaływanie tych aptamerów z błonami egzosomów będzie wykazywać podobne tendencje.

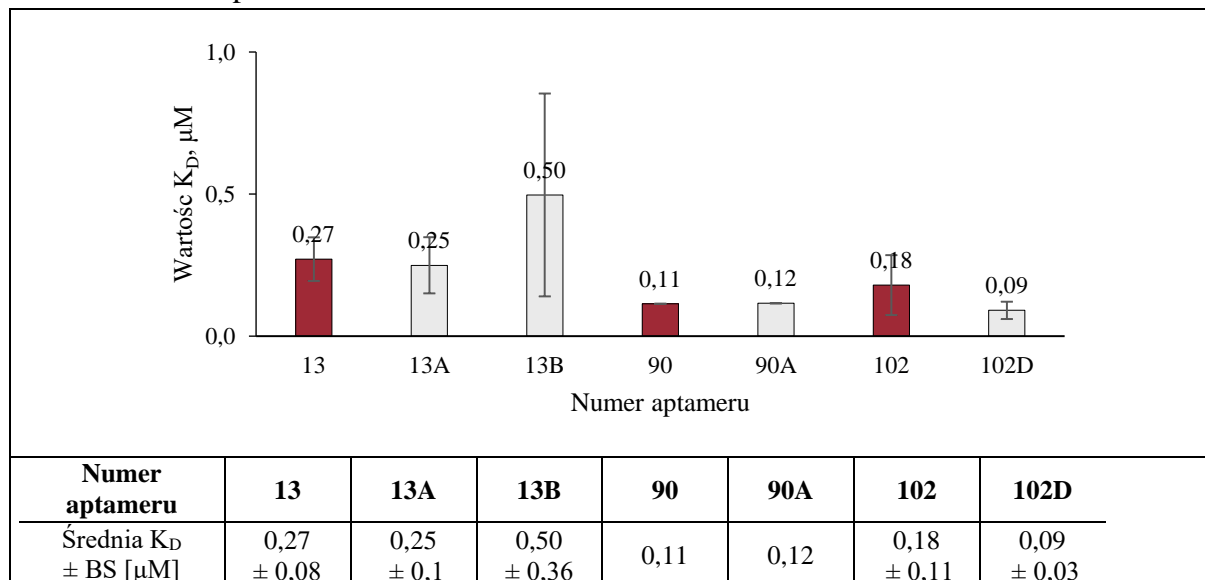
Badania prowadzone były w programie Kinetics. Przykładowe wykresy zmian fluorescencji sond zobrazowane są poniżej w Tabeli 28 dla mutant 102D. Sporządzono wykresy zmiany fluorescencji sond egzosomalnych CTB-555 i fDiI w czasie miareczkowania RNA oraz wykresy odwrotności zmiany fluorescencji tych sond.

Tabela 28. Wyniki pomiarów oddziaływania mutantów RNA z błonami egzosomów na przykładzie mutantu 102D.

- A. Wykres kinetyczny zmian fluorescencji w trakcie miareczkowania egzosomów mutantem RNA. Wykres obrazuje zmiany fluorescencji w czasie w trzech badanych kanałach. Na pomarańczowo oznaczony jest kanał donora – sondy CTB-555 i fDiI związane z błoną egzosomów, na czerwono kanał akceptora – sonda SYTO 61 związana z RNA oraz na fioletowo kanał FRET.
- B. Wykres zmiany fluorescencji sond CTB-555 i fDiI w trakcie miareczkowania mutantem.
- C. Wykres odwrotności zmiany fluorescencji sond CTB-555 i fDiI z równaniem regresji



Na podstawie równania regresji z każdego eksperymentu obliczana była stała K_D . Dla mutantu 13B udało się uzyskać wartości K_D dla trzech powtórzeń eksperymentu, zaś dla mutantów 13A i 102D po dwie wartości K_D , na ich podstawie obliczone były średnie. Dla mutantu 90A wyliczenie K_D było możliwe tylko z jednego powtórzenia eksperymentu. W tabeli poniżej zestawione są średnie wartości K_D oryginalnych aptamerów 13 i 102 wraz z ich mutantami oraz wartości K_D dla aptameru 90 i mutantu 90A.



Rysunek 28. Zestawienie średnich K_D dla kompleksów aptamerów i ich mutantów z błonami egzozomowymi.

Słupki oznaczone czerwonym kolorem odnoszą się do oryginalnych aptamerów RNA, szare do mutantów.

Biorąc pod uwagę RNA 13 ($K_D = 0,27 \pm 0,08 \mu\text{M}$), uzyskana średnia wartość K_D dla jego mutantu 13A (z zaburzonymi motywami przez substytucję), była bardzo podobna do wyjściowego aptameru i wynosiła $K_D = 0,25 \pm 0,1 \mu\text{M}$. Dla drugiego badanego mutantu 13B (delecja prowadząca do zaburzenia oryginalnych motywów, z powstaniem motywu UCCU) wartość średniej K_D była znacznie wyższa ($K_D = 0,50 \pm 0,36 \mu\text{M}$), występował tu jednak duży rozrzut wartości K_D w przeprowadzonych powtórzeniach. W przypadku porównania mutantu 13A i oryginalnego aptameru numer 13, wynik doświadczenia z egzozomami przypomina wynik eksperymentu z błonami liposomów, gdzie również wprowadzone mutacje, nie wpłynęły znacząco na zmianę średniej K_D w porównaniu z oryginalnym aptamerem.

Uzyskana dla mutantu 90A wartość K_D równa $0,12 \mu\text{M}$ jest bardzo zbliżona do wartości otrzymanej dla oryginalnego aptameru 90 ($K_D = 0,11 \mu\text{M}$). Z kolei w porównaniu z oryginalnym aptamerem o numerze 102 ($K_D = 0,18 \pm 0,11 \mu\text{M}$), wartość średniej dysocjacji mutantu 102D była dwukrotnie niższa ($K_D = 0,09 \pm 0,03 \mu\text{M}$).

Ze względu na duży rozrzut przy powtórzeniach pomiarów, trudno wyciągnąć rzetelne wnioski na temat oddziaływania aptamerów RNA z błonami egzozomalnymi. Przeprowadzony test Kruskala-Wallisa nie wykazał różnic statystycznie istotnych między wartościami K_D dla poszczególnych grup (aptamerów i ich mutantów) przy poziomie istotności $\alpha=0,05$. Mimo wszystko tendencje zmian wartości K_D w eksperymentach z egzozomami wydają się w pewnym stopniu przypominać zmiany w doświadczeniach z błonami modelowymi.

5. DYSKUSJA

Dyskusję wyników podzielono na trzy części. W sekcji 5.1. omówiono znaczenie tratw lipidowych w wiązaniu aptamerów RNA z błonami. Następnie w sekcji 5.2. podzielonej na trzy części podjęto próbę określenia roli w interakcjach RNA-błona dla: motywów sekwencyjnych (5.2.1), motywów strukturalnych (sekcja 5.2.2.) oraz innych czynników (sekcja 5.2.3.). Ostatnia sekcja 5.3. zawiera podsumowanie badań i wnioski.

5.1. ZNACZENIE TRATW LIPIDOWYCH W ODDZIAŁYWANIU APTAMERÓW RNA Z BŁONAMI

Przeprowadzone badania oddziaływania aptamerów RNA z dwoma typami błon liposomowych wskazują na różnice w poziomie oddziaływania RNA z błoną w zależności od fazy (składu) błony lipidowej w temperaturze 21°C. Medialne wartości dla rozkładów wartości K_D kompleksów RNA-LUV_{DOPC} i RNA-LUV_{RAFT} były prawie dwukrotnie niższe dla oddziaływań aptamerów z błonami tratwowymi, co sugeruje, że obecność tych domen sprzyja powinowactwu RNA-błona.

Porównując średnie wartości K_D dla oddziaływania poszczególnych aptamerów RNA z błoną tratwową i nie-tratwową, przeważająca większość aptamerów wykazywała zwiększone powinowactwo (K_D średnio dwukrotnie niższa) do błon tratwowych w porównaniu z błonami DOPC. Wyjątkiem był jedynie aptamer 20, dla którego wartość K_D kompleksu RNA-tratwy była około 2-krotnie wyższa w porównaniu z wartością K_D kompleksu RNA-DOPC, co wskazuje na silniejsze powinowactwo tego RNA do błony nie-tratwowej.

Silniejsze powinowactwo RNA do błony uporządkowanej w porównaniu z powinowactwem do błony nie uporządkowanej, uzyskano w badaniach interakcji mRNA VegT z pęcherzykami lipidowymi [Janas i in., 2021]. W tych badaniach RNA VegT212 (sygnalizacyjne RNA w oocytach *Xenopus*, które lokalizuje się na biegunie wegetatywnym podczas oogenezy) wiązało się silniej z błonami zawierającymi domeny uporządkowane (liposomy składające się z cholesterolu, sfingomieliny i DOPC) w porównaniu z błoną nieuporządkowaną (liposomy DOPC), wartość K_D była w przybliżeniu 27 razy niższa dla oddziaływania RNA z liposomami tratwowymi.

Badania przeprowadzone przez [Czerniak i in., 2021] wskazały, że podczas gdy większość randomizowanych sekwencji RNA w mieszaninie oligonukleotydów może wiązać się z błonami w fazie żelowej ($L\beta$ – faza maksymalnie uporządkowana), istnieje raczej niewielka ilość RNA o powinowactwie do fazy płynnej błony ($L\alpha$ – faza ciekło-nieuporządkowana). Choć w badaniach tych nie była analizowana faza L_o – ciekło-uporządkowana (będąca modelem błony tratwowej), przeprowadzone analizy sugerują, że powinowactwo randomizowanych RNA do błony wzrasta w miarę wzrastającego uporządkowania błony, a stan błony może regulować interakcje RNA-błona. Można przypuszczać, że oddziaływanie RNA z błoną tratwową, będzie wykazywać powinowactwo pośrednie między błonami w fazie żelowej i płynnej.

Jeśli chodzi o znaczenie domen tratwowych w procesie ładowania RNA, proponuje się mechanizm, w którym obecność regionów tratwy w błonie MVB może umożliwić bezpośrednie oddziaływanie RNA z tym regionem podobnym do tratwy [Janas i in., 2015]. Jednocześnie

badania, wskazują na rolę również innych czynników regulujące procesie sortowania RNA do egzosomów, takich jak: zegar dobowy [Yeung i in., 2022], białka wiążące RNA [Statello i in., 2018] czy właściwości wewnętrzne RNA [Garcia-Martin i in., 2022]. Tak więc obecność domen tratwowych w błonie i występowanie oddziaływań RNA-tratwy wydaje się być jednym z kilku czynników mających znaczenie w tym złożonym procesie. Wyniki tej pracy również potwierdzają potencjalną regulacyjną rolę tratw lipidowych i mogą sugerować udział tych uporządkowanych domen w procesie ładowania RNA do egzosomów.

5.2. ZNACZENIE MOTYWÓW SEKWENCYJNYCH I STRUKTURALNYCH W ODDZIAŁYWANIU APTAMERÓW RNA Z BŁONAMI

W tym rozdziale przedyskutowano znaczenie motywów sekwencyjnych RNA: egzosomalowych, tratwowych i 5-nukleotydomowych oraz motywów struktury drugorzędowej w oddziaływaniu RNA-błona. Sprawdzany był wpływ na kształtowanie się wartości K_D trzech grup czynników: (1) motywów sekwencyjnych, (2) motywów strukturalnych oraz (3) dodatkowych czynników.

5.2.1. Znaczenie motywów sekwencyjnych RNA

W związku z doniesieniami literaturowymi, że obecność określonych motywów nukleotydomowych w sekwencji RNA może regulować oddziaływanie RNA z błoną ciałek wielopęcherzykowych w procesie ładowania RNA do egzosomów, podjęto się analizy wpływu obecności i lokalizacji motywów RNA egzosomalowych (GGAG, UGAG, CCCU, UCCU), motywów tratwowych (CCCU, UCCC, CUCC, UUGU) oraz dodatkowo motywów 5-nukleotydomowych (UCCCU, CUCCC i UUGUU) na poziom oddziaływania RNA-błona pęcherzyków. Przeanalizowano interakcje między poszczególnymi aptamerami RNA zawierającymi różne składy motywów RNA z błonami tratwowymi i porównano wartości stałej dysocjacji dla interakcji RNA-błona.

Motyw egzosomalowo-tratwowy CCCU

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów z oddziaływaniem aptamerów RNA z tratwami (sekcja 4.4) sugerują, że obecność motywów CCCU może sprzyjać oddziaływaniu RNA z błonami tratwowymi. Aptamery 54 i 119, które zawierały najwięcej wystąpień tego motywu (po 3 motywy CCCU w sekwencji RNA) charakteryzowały się wyższym poziomem powinowactwa do błon tratwowych, w porównaniu z aptamerami z dwoma motywami CCCU (aptamery 19, 102 i 24) lub jednym (aptamery 13, 64, 10, 93 i 20) wystąpieniem tego motywu. Z drugiej strony fakt, że dwa aptamery bez tego motywu (RNA 111 i 90) również wykazywały silne powinowactwo do tratw, może sugerować, że obecność tego motywu nie jest konieczna dla zwiększonego poziomu oddziaływania RNA-błona i mogą istnieć inne czynniki promujące interakcje RNA-błona.

W eksperymentach z mutantami aptamerów (Sekcja 4.7) dodatkowy motyw CCCU znalazł się w sumie w 6 mutantach. W Tabeli 29. zestawiono procentowe zmiany średniej wartości

K_D mutantów względem oryginalnego aptameru^{*}. W pięciu przypadkach (10A, 10B 10C, 111B i 145A) mutanty z dodatkowym motywem CCCU wykazywały zwiększone powinowactwo do tratw, w porównaniu z oryginalnym aptamerem. Największą różnicę w powinowactwie wykazał mutant 10A (substytucja 2-nukleotydoma), wartość stałej dysocjacji zmniejszyła się o ponad połowę (K_D -65 %) względem wyjściowego aptameru. Co ciekawe mutant 10B z wstawionymi dwoma motywami CCCU (substytucja 2-nt., insercja 3-nt.) wykazał mniejszy procent zmiany niż 10A (K_D mniejsza o 43% względem oryginalnego aptameru). W jednym przypadku (mutant 111A) z wstawionym motywem CCCU (insercja 3-nt.), zmodyfikowany RNA wykazał nieznacznie słabsze powinowactwo (K_D + 6%).

W sześciu mutantach sekwencja motywu CCCU była zaburzana. Tabela 30. zawiera zestawienie procentowej zmiany średniej wartości K_D mutantów względem oryginalnego aptameru przy zaburzaniu motywów). Mutant 13A, gdzie zaburzone były wszystkie oryginalne motywy (tym motywu CCCU), przez substytucję 1-nukleotydomą, wykazywał zwiększone powinowactwo (K_D -13%) względem bazowego RNA. W przypadku mutantu 13B z zaburzeniem tych samych motywów przez jednonukleotydomą delecję, powinowactwo nieznacznie się zmniejszyło (K_D +5%). Wszystkie mutanty aptameru 102, gdzie zaburzone były wszystkie oryginalne motywy (w tym sekwencja CCCU), wykazywały większe powinowactwo niż oryginalny aptamer. Procent zmiany był większy w przypadku mutantów z delecją (102C, K_D -51%; mutant 102D, K_D -58%), w porównaniu do zmiany K_D mutantów z substytucją nukleotydomą (mutant 102A, K_D -35%, mutant 102B, K_D -15%).

Mimo że, motyw CCCU zaproponowany został jako motyw RNA oddziałujący z białkiem hnRNPA2B1 [Villarroya-Beltri i in., 2013], przeprowadzone badania mogą sugerować, że motyw ten odgrywa również rolę w bezpośrednim oddziaływaniu RNA-błona, chociaż na podstawie uzyskanych wyników nie można jednoznacznie określić na ile obecność motywu CCCU sprzyja zwiększeniu powinowactwa RNA-błona. Pomiar mutantów, gdzie motyw ten był wprowadzany wydają się potwierdzać, że obecność tego motywu sprzyja interakcji RNA-błona, jednak wyniki eksperymentów z mutantami gdzie motyw ten był zaburzany są niejednoznaczne. Trudność w określeniu czy zaburzenie motywu CCCU wywołuje zmiany K_D może się wiązać z tym, że modyfikacje tego motywu w mutantach powodowały również zaburzenie sekwencji innych motywów takich jak UCCC czy UCCCU, które zachodziły na siebie np. w mutantach aptamerów 13 i 102.

Motywy egzosomalowe

Spśród badanych aptamerów siedem z nich posiadało przynajmniej jeden z motywów egzosomalowych. Aptamer 54, o najsilniejszym powinowactwie do tratw, posiadał aż trzy motywy UCCU. Podobnie aptamer 19, który również zawierał trzy motywy UCCU i dość dobrze oddziaływał z tratwami. Z drugiej strony aptamery bez motywów egzosomalowych również charakteryzowały się dobrym wiązaniem do tratw.

^{*} Procentowa zmiana wartości K_D wyliczana była jako stosunek różnicy średniej K_D mutantu i średniej K_D aptameru do średniej K_D aptameru. Znak „+” oznacza wzrost, a „-” spadek wartości K_D mutantu o dany procent, względem oryginalnego aptameru.

Mutanty ze wstawionym dodatkowym motywem GGAG (111G i 145E) wykazywały zwiększone powinowactwo (% zmiany K_D odpowiednio -20% i -46%) (Tabela 29.), z kolei powinowactwo mutantu 90C (z zaburzonym motywem GGAG), nie różniło się względem oryginalnego aptameru 90 (Tabela 30.).

Mutant 13B, w którym pojawił się motyw UCCU przy zaburzaniu wszystkich oryginalnych motywów wykazywał słabsze powinowactwo niż nie zmodyfikowany RNA. Z kolei mutant 102C, w którym również motyw UCCU wystąpił przy zaburzaniu oryginalnych motywów wykazywał zwiększone powinowactwo ($K_D = -53\%$). Aptamer 111E, do którego wstawiono motyw UCCU wykazywał znacznie słabsze powinowactwo ($K_D = +91\%$) w porównaniu z oryginalnym aptamerem, co jednak może być wynikiem zwiększenia pętli przy wprowadzaniu tego motywu (możliwe znaczenie wielkości pętli podano w sekcji 5.2.2).

Na podstawie uzyskanych wyników nie można jednoznacznie stwierdzić, że obecność motywów egzosomalych wyraźnie wpływa na zwiększenie powinowactwa RNA do błon. Nie wykluczone, że wzbogacenie sekwencji o motyw UCCU lub GGAG, może promować oddziaływanie z błoną, jednak nie jest to zależność wyraźna. Być może aktywność motywów egzosomalych jest wyraźniejsza w oddziaływaniu z RNA z białkami wiążącymi RNA, które w warunkach fizjologicznych pośredniczą w wiązaniu RNA z błonami [Lee i in., 2019; Fabbiano i in., 2020].

Motywy tratwowe

Motywy tratwowe występowały dość licznie w badanych aptamerach, 10 spośród 13 analizowanych aptamerów posiadało przynajmniej jeden z motywów tratwowych. Motyw UCCC, był dodatkowym motywem, który znalazł się w 6 mutantach (10C, 10D, 111C, 111D, 145A i 145B). W przypadku wszystkich mutantów aptamerów 10 i 145 mutanty z tym motywem wykazywały większe powinowactwo niż oryginalny RNA bez modyfikacji (Tabela 29). Natomiast dwa mutanty aptameru 111 (również zawierające ten motyw) przeciwnie, wykazywały niższe powinowactwo do błon tratwowych w porównaniu z bazowym aptamerem. Jeśli chodzi o mutanty gdzie motyw ten był zaburzany (Tabela 30.), to są to te same mutanty co w przypadku zaburzania motywu CCCU, tak więc i zmiany K_D zostały już opisane wyżej.

Dodatkowy motyw tratwowy CUCC znalazł się w trzech mutantach: 10D, 111E i 145C (Tabela 29). W przypadku mutantu 10D, gdzie oprócz tego motywu dodatkowo znalazły się motywy UCCC i CUCCC zachodzące na sekwencję CUCC, powinowactwo mutantu do tratw zwiększyło się ($K_D -14\%$) w porównaniu z oryginalnym aptamerem. W przypadku dwóch kolejnych aptamerów, gdzie motyw CUCC był wstawiany przez 4-nukleotydową insercję, powinowactwo RNA-błona dla mutantów było znacząco słabsze w porównaniu z oryginalnymi aptamerami (mutant 145C, $K_D + 74\%$ i mutant 111, $K_D + 91\%$), co może sugerować, że wprowadzenie motywu CUCC do sekwencji RNA nie wpływa na zwiększenie powinowactwa RNA-błona tratwowa.

Dodatkowy motyw UUGU posiadały trzy zmodyfikowane oligonukleotydy: mutant 111B, 111F i 145D (Tabela 29.). W przypadku mutantu 111B gdzie przy wprowadzaniu motywu CCCU (insercja 4-nukleotydowa) został jednocześnie dodany motyw UUGU powinowactwo zwiększyło się ($K_D -17\%$). Dwa kolejne mutanty (111F i 145D) posiadały ten sam rodzaj modyfikacji (insercja 4 nukleotydowa), gdzie przy wprowadzaniu dodatkowego motywu UUGU tworzył się motyw 5-nukleotydowy UCCCU, jednak zmiany K_D były różne w

porównaniu z oryginalnymi aptamerami – dla mutantu 111F powinowactwo nieznacznie wzrosło (K_D -1%), zaś dla mutantu 145D powinowactwo zmalało (K_D +12%). Zaburzony motyw UUGU wystąpił w dwóch mutantach aptameru 90 (Tabela 30.). Mutant 90A (z substytucją 1-nt.), wykazywał zwiększone powinowactwo do tratw (K_D - 47%), zaś mutant 90B, z delecją dwóch nukleotydów, zmniejszone powinowactwo (K_D +30%) względem wyjściowego RNA 90. Wydaje się, że zmiany K_D mutantów związane z wprowadzaniem lub zaburzaniem tego motywu są niejednoznaczne.

Podsumowując, nie znaleziono bezpośredniej zależności między obecnością i liczbą motywów tratwowych, a kształtowaniem wartości K_D dla kompleksów RNA-błona. Motywy z tej grupy występowały zarówno w aptamerach o wysokim jak i niskim powinowactwie do błon. Warto jednak zauważyć, że mutanty ze wstawionym motywem UCCC, w większości charakteryzowały się silniejszym powinowactwem do LUV_{RAFT} niż oryginalne aptamery. Z kolei, w przypadku motywu UUGU, występował on w trzech z czterech aptamerów o największym powinowactwie do tratw, w tym w najlepiej wiążącym się RNA 54, który jako jedyny aptamer posiadał dwa motywy UUGU. Potencjalnie aktywność motywów tratwowych, podobnie jak motywów egzosomalnych, może być powiązana z interakcją tych motywów z białkami RBP i w ten sposób oddziaływać z błoną.

Motywy 5-nukleotydomowe

Również w przypadku analizowanych motywów 5-nukleotydomowych, motywy te występowały zarówno w aptamerach o słabszym jak i silniejszym powinowactwie RNA-błona, a ich brak (np. RNA 111) nie był jednoznaczny z występowaniem wysokich wartości K_D . Analizując tą grupę motywów można by zwrócić uwagę na motyw UUGUU, który występował jedynie w najlepiej wiążącym się aptamerze 54, chociaż nie sposób udowodnić, że to właśnie obecność tego motywu wpływała na silne powinowactwo tego aptameru do błon tratwowych.

Motyw UCCCU znalazł się w sekwencji mutantu 145A wraz z motywami UCCC i CCCU (wszystkie motywy zachodziły na siebie) w wyniku insercji 4-nukleotydomów. Jak to już wspomniano przy omawianiu powyższych motywów 4-nukleotydomowych, mutant z tymi dodatkowymi motywami wykazał zwiększone powinowactwo do tratw (K_D -37%). Mutanty gdzie motyw ten był zaburzany również podane zostały powyżej, przy omawianiu zaburzania motywu CCCU.

Motyw CUCCC został wprowadzony do mutantu 10D wraz z zachodzącymi na niego motywami CUCC i UCCC poprzez jednonukleotydomową insercję oraz substytucję 2-nukleotydomów (Tabela 29.). Mutant ten wykazywał zwiększone powinowactwo względem błon w porównaniu z oryginalnym aptamerem (K_D -14%), jednak to RNA było jedynym przypadkiem z modyfikacją motywu CUCCC, tak więc trudno wnioskować o znaczeniu tego motywu w regulacji powinowactwa RNA-błona.

Jako że, motyw UUGUU zachodził na motyw UUGU w obydwu przypadkach występowania tego motywu, mutanty z tym motywem (111F i 145D) zostały podane powyżej przy odmawianiu motywu tratwowego UUGU. W przypadku tego 5-nukleotydomowego motywu można by jeszcze zauważyć, że aptamer 54, o najlepszym powinowactwie do błon, jako jedyny posiadał sekwencję UUGUU, jednak znów nie sposób udowodnić, że to właśnie ten motyw promował interakcje RNA-błona.

Biorąc pod uwagę, że mutanty zarówno z wprowadzonymi, jak i zaburzonymi motywami 5-nukleotydowymi wykazywały w większości przypadków zwiększone powinowactwo do błon nie można określić wpływu obecności motywów 5-nukleotydowych na regulację powinowactwa RNA-błona.

Tabela 29. Zestawienie procentowej zmiany średniej wartości K_D mutantów względem oryginalnego aptameru dla mutantów ze wstawionymi dodatkowymi motywami.

Motyw wstawiany	Numer mutantu	% zmiany K_D^*	Typ modyfikacji
CCCU 6 mutantów	10A	-64%	Substytucja 2 nukleotydów: U31 na C i G33 na C.
	10B	-43%	Substytucja 2 nt. U31 na C i G33 na C. Insercja 3 nt. CCC między C89 i U90.
	10C	-27%	Insercja 1 nt. C między U31 a C32. Substytucja 1 nt G33 na C.
	111A	+ 6%	Insercja 3 nt. CCC między A32 a U33
	111B	-17%	Insercja 4 nt. CCCU między A32 a U33.
	145A	-35%	Insercja 4 nt. CCCU między U30 a G31
GGAG 2 mutanty	111G	-20%	Insercja GGA między U33-G34.
	145E	-46%	Insercja 4 nt. GGAG między A28-U29
UCCU 3 mutanty	13B	+5%	Delecja 1 nt. C63
	102C	-51%	Delecja 2 nt. C39 i C59
	111E	+91%	Insercja 4 nt. CUCC między G34 a U35.
UCCC 6 mutantów	10C	-27%	Insercja 1 nt. C między U31 a C32. Substytucja 1 nt. G33 na C.
	10D	-14%	Insercja 1 nt. C między G30 i U31. Substytucja 2 nt. G33-U34 na CC.
	111C	+31%	Insercja 3 nt. CCC między U33 a G34.
	111D	+1%	Insercja 4 nt. UCCC między U33 a G34.
	145A	-35%	Insercja 4 nt. CCCU między U30 a G31
	145B	-35%	Insercja 4nt. UCCC między U30 a G31.
CUCC 3 mutanty	10D	-14%	Insercja 1 nt. C między G30 i U31. Substytucja 2 nt. G33-U34 na CC.
	111E	+91%	Insercja 4 nt. CUCC między G34 a U35.
	145C	+74%	Insercja 4nt. CUCC między U30 a G31.
UUGU 3 mutanty	111B	-17%	Insercja 4 nt. CCCU między A32 a U33.
	111F	-1%	Insercja 4 nt. UUGU między A32 a U33.
	145D	+12%	Insercja 4 nt. UUGU między U29 a U30.
UCCCU 1 mutant	145A	-35%	Insercja 4 nt. CCCU między U30 a G31
CUCCC 1 mutant	10D	-14%	Insercja 1 nt. C między G30 i U31. Substytucja 2 nt. G33-U34 na CC.
UUGUU 2 mutanty	111F	-1%	Insercja 4 nt. UUGU między A32 a U33.
	145D	+12%	Insercja 4 nt. UUGU między U29 a U30.

* Procentowa zmiana średniej wartości K_D wyznaczana była następująco:

$$\% \text{ zmiany } K_D = \frac{\text{wartość } \text{sr.} K_D \text{ mutantu} - \text{wartość } \text{sr.} K_D \text{ oryginalnego aptameru}}{\text{wartość } \text{sr.} K_D \text{ oryg. aptameru}}$$

Znak „+” oznacza wzrost, a „-” spadek wartości K_D mutantu o dany procent, względem oryginalnego aptameru.

Tabela 30. Zestawienie procentowej zmiany średniej wartości K_D mutantów względem oryginalnego aptameru przy zaburzaniu danych motywów w mutantach.

Motyw zaburzany	Numer mutantu	% zmiany K_D	Typ modyfikacji
CCCU 6 mutantów	13A	-15%	Substytucja 1 nt. C63 na A
	13B	+ 5%	Delecja 1 nt. C63
	102A	-35%	Substytucja 2 nt. C39 na A i C59 na A
	102B	-15%	Substytucja 8 nt. C39-U42 na AAAA i C59-U62 na AAAA.
	102C	-51%	Delecja 2 nt. C39 i C59
	102D	-58%	Delecja 4 nt. C39-C40 i C59-C60
GGAG 1 mutant	90C	0%	Delecja 2 nt. G32-A33
UCCC 6 mutantów (jak dla CCCU)	13A	-15%	Substytucja 1 nt. C63 na A
	13B	+ 5%	Delecja 1 nt. C63
	102A	-35%	Substytucja 2 nt. C39 na A i C59 na A
	102B	-15%	Substytucja 8 nt. C39-U42 na AAAA i C59-U62 na AAAA.
	102C	-51%	Delecja 2 nt. C39 i C59
	102D	-58%	Delecja 4 nt. C39-C40 i C59-C60
UUGU 2 mutanty	90A	-47%	Substytucja 1 nt. U48 na A
	90B	+30%	Delecja 2 nt. U48-U49
UCCCU 6 mutantów	13A	-15%	Substytucja 1 nt. C63 na A
	13B	+ 5%	Delecja 1 nt. C63
	102A	-35%	Substytucja 2 nt. C39 na A i C59 na A
	102B	-15%	Substytucja 8 nt. C39-U42 na AAAA i C59-U62 na AAAA.
	102C	-51%	Delecja 2 nt. C39 i C59
	102D	-58%	Delecja 4 nt. C39-C40 i C59-C60

Podsumowując, przeprowadzone badania nie dają jednoznacznej odpowiedzi czy sama obecność pewnych motywów RNA wpływa na powinowactwo RNA-błona. Wyniki sugerują, że obecność takich sekwencji jak motyw egzosomalno-tratwowy CCCU, motyw egzosomalny GGAG czy motyw tratwowy UCCC, może sprzyjać powinowactwu RNA-błona, jednak nie można jednoznacznie wykluczyć, że inne motywy RNA takich właściwości nie posiadają. Prawdopodobnie występowanie motywów RNA w sekwencji aptamerów nie jest jedynym czynnikiem, który determinuje powinowactwo RNA do błony ale może zależeć od lokalizacji motywu w cząsteczce RNA. W przypadku niektórych motywów silniejsze wzmocnienie oddziaływania RNA-błona może występować przy w interakcjach RNA z błonami za pośrednictwem białek wiążących RNA. Doniesiono, że sekwencje CCCU i GGAG mają powinowactwo do RBP (hnRNPA2B1) i białka prionowego (PrP) [Villarroya-Beltri i in., 2013; Iida i in., 2019]. Niemniej jednak otrzymane wyniki sugerują, że motywy te mogą odgrywać rolę w bezpośrednim oddziaływaniu RNA z błoną. Możliwe też, że istnieją również inne motywy RNA, które nie były analizowane w tej pracy, a sprzyjają powinowactwu RNA-błona. Niedawno zaproponowany został motyw UGUG, jako sekwencja, która licznie występuje w miRNA izolowanym z egzosomów/pęcherzyków wewnątrzkomórkowych [Garcia-Martin i in., 2022]. Motyw ten dwukrotnie występował w aptamerze 111, o silnym powinowactwie do błon, co może sugerować, znacznie tego motywu przy oddziaływaniu RNA-błona.

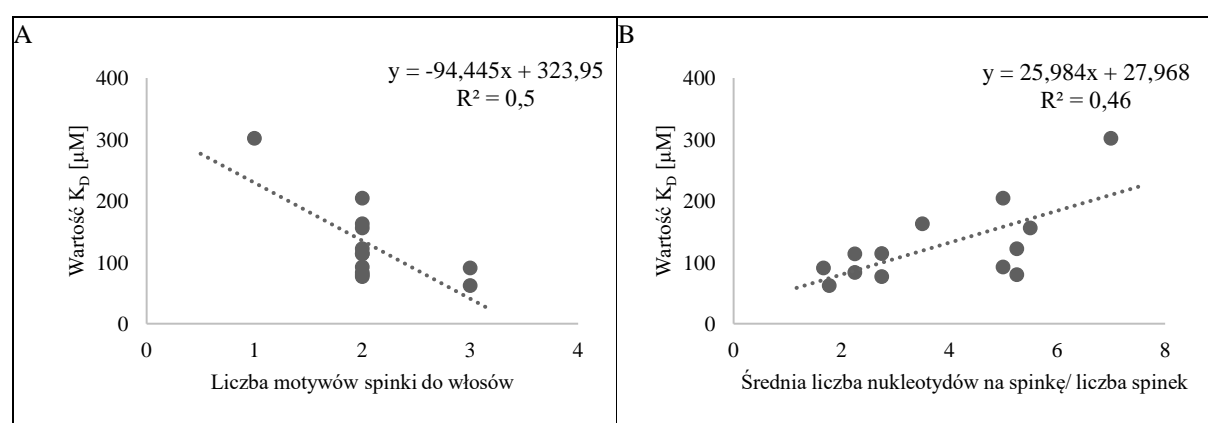
5.2.2. Znaczenie motywów strukturalnych

Próbując określić znaczenie motywów struktury drugorzędowej badanych aptamerów RNA na poziom oddziaływania RNA-błona, przeprowadzone zostały analizy zależności wartości średniej K_D , otrzymanej kompleksów RNA z LUV_{RAFT} od: (1) procentu nukleotydów w poszczególnych motywach strukturalnych, (2) liczby poszczególnych motywów strukturalnych oraz (3) liczby nukleotydów na spinkę i średniej liczby nukleotydów. Analizy korelacji nie dostarczyły satysfakcjonującego wyjaśnienia zmienności wartości K_D biorąc pod uwagę obecność motywów strukturalnych. Można jednak dostrzec kilka potencjalnych związków między zmiennością K_D , a obecnością motywów strukturalnych w przewidzianych fałdowaniach.

Struktura spinki do włosów

Wykresy na Rysunku 29. obrazują zależności średniej wartości K_D od: (A) liczby motywów typu spinki do włosów występujących w poszczególnych aptamerach (B) stosunku średniej liczby nukleotydów na spinkę do liczby spinek, który świadczy o wielkości spinki. Dla pierwszej zależności można zaobserwować ujemną korelację ze współczynnikiem korelacji $r = -0,71$, co wskazuje, że im więcej motywów typu spinka tym mniejsza wartość K_D . Z kolei biorąc pod uwagę wyznaczony dla każdego aptameru stosunek średniej liczby nukleotydów na spinkę przez liczbę spinek, obserwuje się dodatnią korelację (współczynnik korelacji $r = 0,68$), co sugeruje, że wraz ze wzrostem liczby nukleotydów w spinkach rośnie wartość K_D . Powyższe obserwacje mogą sugerować, że obecność motywu spinki do włosów z niewielką liczbą nukleotydów w pętli, może wpływać na zwiększenie powinowactwa RNA do tratw.

Konkretnym przykładem potencjalnego znaczenia motywu spinki może być aptamer 111. Oprócz RNA 54, był on drugim z kolei aptamerem wykazującym najsilniejsze powinowactwo do błon tratwowych ($K_D = 77 \mu\text{M}$). Aptamer ten nie posiadał analizowanych motywów egzosomalowych czy tratwowych, za to w jego przewidzianej strukturze drugorzędowej występował wyraźny motyw spinki do włosów (nukleotydy 26-40) z niedużą 5-nukleotydową pętlą oraz trzonem długości pięciu par zasad. Być może taki układ struktury spinki (nieduża spinka na stabilnym trzonie) wpływa na zwiększenie powinowactwa RNA-błona.



Rysunek 29. Krzywe zależności zmienności K_D od wybranych elementów strukturalnych.

A. Krzywa zależności zmienności K_D od liczby motywów typu spinka do. Krzywa wskazuje na istnienie negatywnej korelacji między wartościami K_D a liczbą motywów spinki (współczynnik korelacji $r = -0,71$). B. Krzywa zależności zmienności K_D od stosunku liczby nukleotydów na spinkę do liczby spinek (współczynnik korelacji $r = 0,68$).

Jednoniciowy odcinek końcowy

Aptamer numer 20 mimo posiadania motywu egzozomowo-tratwowego CCCU wykazywał najsłabsze powinowactwo do tratw ($K_D = 302 \pm 94 \mu\text{M}$). Może to mieć związek z lokalizacją tego motywu w jednoniciowym odcinku przy końcu 3' (nukleotydy 83-86). Aptamer ten jako jedyny spośród analizowanych aptamerów posiadał tak długi (37-nukleotydowy) odcinek jednoniciowy przy końcu 3'. Możliwe, że właśnie obecność takiego długiego „ogona” nie sprzyja wiązaniu z błoną tratwową i ogranicza aktywność motywów RNA w zwiększaniu powinowactwa RNA do błony tratwowej. Co ciekawe aptamer ten jako jedyny wykazywał silniejsze powinowactwo do błon LUV_{DOPC} ($K_D = 141 \pm 9 \mu\text{M}$), co może sugerować, że obecność jednonukleotydowego „ogona” przy końcu 3' nie ogranicza w takim samym stopniu oddziaływania aptameru z błoną nie uporządkowaną i może mieć specyficzny wpływ w zależności od fazy błony.

Zależność wiązania RNA-błony tratwowe od struktury RNA stwierdzono w badaniach [Janas i in., 2006]. Chociaż nie zidentyfikowano wtedy konkretnych motywów oddziałujących z błoną, wykazano istnienie 20-krotnej zmiany w procencie wiązania RNA-błona tratwowa, w zależności od zmian w strukturze drugorzędowej RNA. Co ciekawe w tych samych badaniach nie stwierdzono wpływu modyfikacji struktury RNA na poziom wiązania z liposomami DMPC (1,2-dimyristoleoyl-sn-glycero-3-fosfocholina) będącymi na granicy fazy żelowej-pomarszczonej i ciekłej. Z kolei w badaniach oddziaływania RNA z błonami w fazie żelowej [Czerniak i in., 2021] zasugerowano, że wiązanie RNA do błon jest zależne m.in. od obecności struktur dwuniciowych.

W badaniach, w których poszukiwano motywów sekwencyjnych, mogących regulować pakowanie RNA do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych [Batagov i in., 2011; Bolukbasi i in. 2012], zaproponowane przez badaczy motywy były obecne jako część regionów pętli w przewidzianych strukturach drugorzędowych, wskazuje to na potencjalne znaczenie tego motywu strukturalnego przy wprowadzaniu RNA do pęcherzyków. Również w badaniach [Janas i in., 2021], gdzie określano powinowactwo do tratw aptamerów RNA zawierających fragmenty elementów lokalizacyjnych mRNA, największe powinowactwo uzyskano dla RNA zawierających elementy lokalizacyjne w pętli struktury spinki do włosów. Taka lokalizacja motywów prawdopodobnie umożliwia interakcję motywu z cząsteczkami lipidów, zwiększając w ten sposób powinowactwo aptameru RNA do błony lipidowej.

Trudność z jednoznacznym określeniem wpływu motywów strukturalnych na poziom oddziaływania RNA-błona, może wiązać się z ograniczeniami metody używanej do przewidywania struktury RNA. Przewidywana przez program Mfold struktura 2-rzędowa RNA, jest prognozą sekwencji o najniższej energii swobodnej, obliczanej na podstawie algorytmu opartego głównie o parowanie zasad Watson'a-Crick'a. Algorytm ten nie uwzględnia niekanonicznego parowania nukleotydów, które wpływa na kształtowanie struktur RNA wyższego rzędu. Z tego względu rzeczywiste fałdowanie RNA, czy warianty struktury przestrzennej mogą się różnić od tych zaproponowanych przez program [Vicens i in., 2022]. Przykładem mogą być oddziaływania warstwowe między parami zasad (ang. stacking), które umożliwiają układanie w stopy sparowanych nukleotydów, co prowadzi np. do przyjmowania przez cząsteczkę RNA struktury helisy w kształcie litery A. W dalszych badaniach warto by uwzględnić również struktury wyższego rzędu wynikające z parowania niekanonicznego.

5.2.3. Znaczenie innych czynników

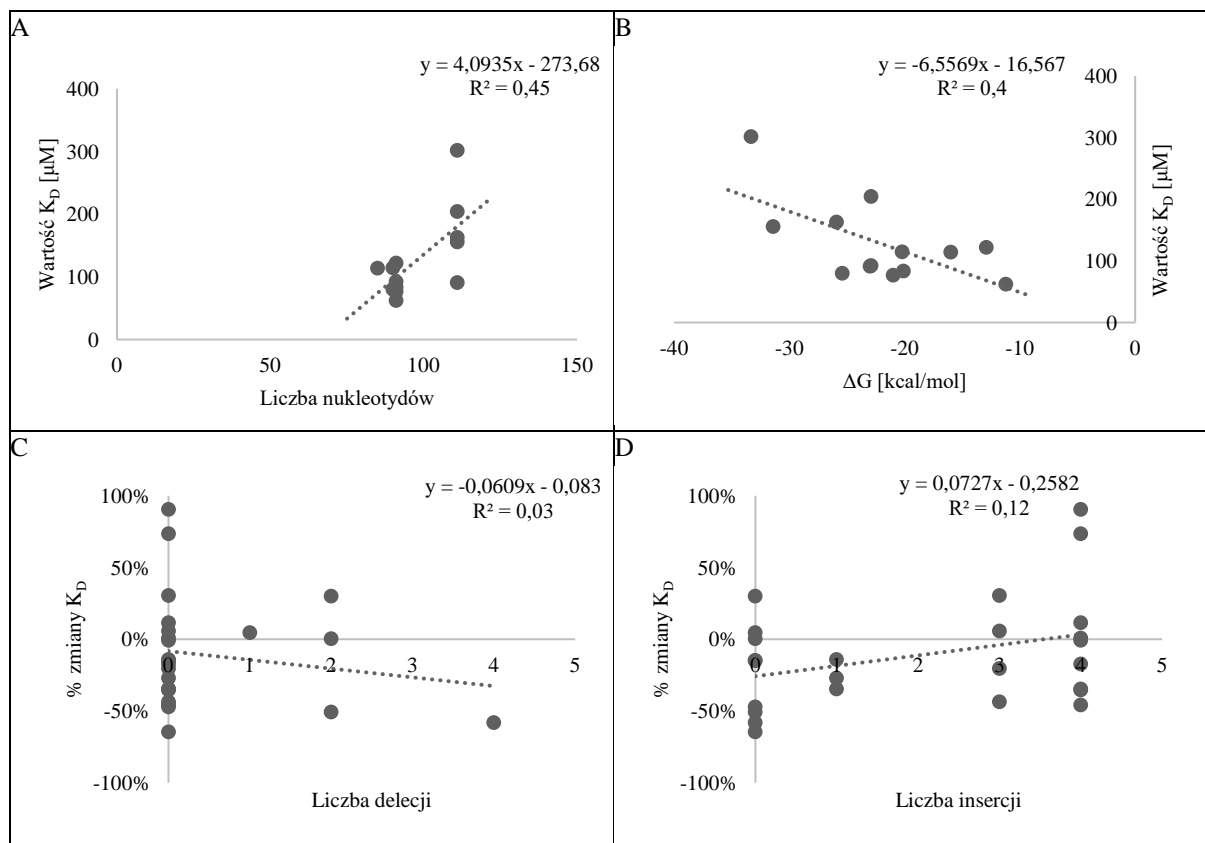
W ostatniej części opracowania sprawdzono, czy czynniki inne niż obecność motywów sekwencyjnych i strukturalnych mogą wyjaśnić zmienność wartości K_D aptamerów RNA. Analizy przeprowadzono dla: (1) długości łańcucha RNA, (2) składu nukleotydowego badanych aptamerów, (3) energii swobodnej fałdowania poszczególnych aptamerów oraz (4) liczby wariantów strukturalnych zaproponowanych przez program do fałdowania.

Długość łańcucha RNA

Mimo, że badane aptamery miały zbliżoną długość (od 85 do 111 nt.), można zauważyć delikatną tendencję zestawiając wartości K_D uzyskane dla poszczególnych aptamerów z ich liczbą nukleotydów (Rysunek 30. A). Zasadniczo krótsze aptamery (91 nt.) wykazywały silniejsze powinowactwo do tratw w porównaniu z dłuższymi aptamerami (111 nt.). We wspomnianych wcześniej badaniach [Czerniak i in., 2021], przy porównywaniu poziomu oddziaływania 19- i 40-nukleotydowych RNA z błoną lipidową w fazie żelowej zaobserwowano, że zwiększenie długości RNA prowadziło również do zwiększonego wiązania z błoną. Badacze zaproponowali wtedy, że wraz z długością cząsteczki zwiększa się zawartość nukleotydów G, które sprzyjają zwiększeniu powinowactwa RNA-błona. Wyniki niniejszej pracy wydają się wskazywać na przeciwną tendencję, co do znaczenia długości RNA. Może to wynikać z faktu, że w badaniach będących przedmiotem tej pracy wykorzystywano znacząco dłuższe aptamery (do 111 nt.), niż RNA we wspomnianych badaniach [Czerniak i in., 2021] (do 40 nt.), jak również różnic wynikających z fazy błony, względem której prowadzono badania.

Skład nukleotydowy

Modele korelacji nie wykazały znaczących zależności między zmianami wartości K_D , a składem nukleotydowym badanych aptamerów, co może wynikać z tego, że badane aptamery nie różniły się znacząco składem nukleotydowym. Procentowana zawartość poszczególnych nukleotydów w badanych aptamerach wynosiła: A 17% – 26%, C 22% – 38%, G 15% – 25% i U 24% – 31%. We wspomnianych już badaniach [Czerniak i in., 2021] wskazywano na wzbogacenie RNA w guaninę, jako czynnik promujący oddziaływanie RNA z błoną. W innych badaniach [Garcia-Martin i in., 2022] zaobserwowano, że miRNA izolowane z pęcherzyków wydzielanych z komórek linii hodowlanych, były wzbogacone w nukleotydy CG w ok. 62%, w odróżnieniu do RNA komórkowego, o niższej zawartości procentowej CG. Dla porównania, jeśli chodzi o wpływ składu nukleotydowego na oddziaływanie RNA z błoną, za pośrednictwem białek błonowych, to w niedawno opublikowanych badaniach [Sarmah i in., 2023], w których analizowano czynniki wpływające na kierowanie mRNA do białek błonowych w bakterii, stwierdzono, że zawartość uracylu jest ważnym wyznacznikiem lokalizacji mRNA zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. mRNA bogaty w U wykazywał zwiększone wiązanie z receptorami w błonie pęcherzyków bakterii *E. coli*. Z kolei zwiększenie zawartości cytozyny lub adeniny zmniejszało wiązanie mRNA z błoną, natomiast zwiększenie zawartości guaniny nie wpływało na interakcję mRNA-błona.



Rysunek 30. Krzywe zależności zmienności K_D od wybranych czynników

A. Zależność zmienności średniej K_D kompleksów aptamer-błona od liczby nukleotydów (współczynnik korelacji $r = 0,67$). B. Zależność zmienności średniej K_D kompleksów aptamer-błona od wartości energii swobodnej fałdowania RNA (współczynnik korelacji $r = -0,63$). C. Zależność zmienności % zmiany K_D od liczby delecji (współczynnik korelacji $r = -0,2$). D. Zależność zmienności % zmiany K_D od liczby insercji (współczynnik korelacji $r = 0,35$).

Energia swobodna

Biorąc pod uwagę energię swobodną (ΔG [kcal/mol]) przewidzianą dla najbardziej prawdopodobnego fałdowania, zaobserwowano pewną delikatną zależność (Rysunek 30. B). Wydaje się, że im większa energia swobodna fałdowania (bliżej wartości zero), tym mniejsza wartość stałej K_D . Można przypuszczać, że uporządkowanie struktury 2-rzędowej RNA ma znaczenie w oddziaływaniu z błonami tratwowymi, a aptamery o większej energii swobodnej mają większe powinowactwo do błon tratwowych. W badaniach [Garcia-Martin i in., 2022] zaobserwowano z kolei, że RNA, które oddziaływały z błoną pęcherzyków zewnątrzkomórkowych charakteryzowały się niższą energią swobodną (ΔG ok. -3 [kcal/mol]), niż RNA magazynowane w komórkach (ΔG ok. -2 [kcal/mol]).

Rodzaj modyfikacji

Porównując ze sobą zależności między % zmiany wartości K_D mutantów, a rodzajem modyfikacji, które wpływały na długości RNA, można zauważyć pewną tendencję zmian, chociaż korelacja jest bardzo słaba (Rysunek 30. C i D). Mutanty z delecjami nukleotydowymi przejawiały nieznaczny spadek wartości stałej dysocjacji, zaś mutanty z insercjami wzrost K_D w odniesieniu do bazowego RNA. Wprowadzone mutacje dotyczyły nukleotydów w obrębie pętli spinki do włosów, dlatego też determinowana przez sposób mutacji zmiana wielkości pętli

może być tym czynnikiem, który bierze udział w regulowaniu powinowactwa RNA-błona. Porównując ze sobą konkretne aptamery można zaobserwować, że mutant 10A ze wstawionym motywem CCCU poprzez substytucję (wielkość pętli nie zmieniła się) wykazywał zwiększone powinowactwo do tratw, zaś mutant 111A ze wstawionym przez insercję (powiększenie pętli) tym samym motywem, wykazywał słabsze powinowactwo niż oryginalny aptamer (Tabela 29.). Również mutanty aptameru 111, do których wprowadzano dodatkowe motywy przez insercję wykazywały znaczne spadki powinowactwa względem tratw: mutant 111E ($K_D = +91\%$), mutant 111C ($K_D = +31\%$). Obserwacje te wydają się korespondować ze wcześniejszymi spostrzeżeniami dotyczącymi długości łańcucha RNA i wielkości motyw spinki do włosów, gdzie dla RNA o krótszych sekwencjach i mniejszych motywach spinki, uzyskiwano zwiększone powinowactwo do błon.

Wspominanie wyżej doniesienia literaturowe sugerują, że oddziaływanie RNA z błonami lipidowymi może być zależne od czynników takich jak: sekwencja nukleotydów RNA, struktura drugorzędowej czy długości RNA. Również analizy opisane w tej pracy wskazują, że poziom powinowactwa danego RNA do błony lipidowej może być regulowany zarówno czynnikami sekwencyjnymi (motywy RNA), strukturalnymi (motyw spinki do włosów) czy też innymi właściwościami, jak np. długość łańcucha RNA. Oprócz wyżej wymienionych czynników badacze zwracają uwagę również na znaczenie oddziaływań elektrostatycznych i interakcji hydrofobowych w oddziaływaniach RNA-lipidy. W pracy [Michanek i in., 2012] zasugerowano, że wiązanie RNA z monowarstwami fosfolipidów, napędzane jest interakcjami między hydrofobowymi zasadami jednoniciowego RNA, a łańcuchami węglowodorowymi fosfolipidów. Tego typu oddziaływania nie były przedmiotem tej pracy jednak, z pewnością stanowią kolejną grupę czynników wpływających na kształtowanie poziomu powinowactwa RNA-błona. W przyszłości warto by poszerzyć przeprowadzone w tej pracy badania uwzględniając również te typy interakcji.

5.3. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Celem niniejszej pracy było lepsze poznanie mechanizmu oddziaływania RNA z błonami pęcherzyków lipidowych oraz weryfikacja postawionych hipotez badawczych. W odniesieniu do postawionych zadań badawczych, przeprowadzone badania można podsumować następująco:

- 1) Identyfikacja motywów strukturalnych oraz sekwencyjnych oraz ich lokalizacji w badanych aptamerach RNA.

Zarówno w analizowanej bazie sekwencji aptamerów RNA jak i bazie przygotowanych mutantów zostały zidentyfikowane następujące motywy RNA: CCCU, GGAG, UGAG i UCCU (motywy egzosomalowe), CCCU, UCCC, CUCC i UUGU (motywy tratwowe), UCCCU, CUCCC i UUGUU (motywy 5-nukleotydoe). W przewidzianych za pomocą programu Mfold fałdowaniach cząsteczek aptamerów RNA oraz mutantów, zostały zidentyfikowane motywy struktury drugorzędowej: podwójna helisa, wybrzuszenia, pętle wewnętrzne, pętle wieloramiennie, pętle typu spinki do włosów oraz odcinki jednoniciowe przy końcach cząsteczki. Na podstawie wyników przeszukiwań motywów oraz przewidzianych struktur drugorzędowych sporządzono karty charakterystyki analizowanych aptamerów RNA oraz mutantów.

- 2) Pomiar stałej dysocjacji (K_D) dla oddziaływania aptamerów RNA z błonami modelowymi oraz z błonami egzosomów.

Przeprowadzone zostały badania poziomu oddziaływania aptamerów RNA z błonami modelowymi (liposomy DOPC i tratwowe) oraz błonami egzosomów, jak również mutantów oryginalnych aptamerów z liposomami tratwowymi i egzosomami. Na podstawie przeprowadzonych pomiarów uzyskano wartości stałej dysocjacji dla większości badanych RNA. Dla niektórych aptamerów nie było możliwe wyznaczenie wartości K_D , co mogło być związane z tak słabym poziomem oddziaływania danego RNA z błoną, że dokładne wyznaczenie K_D wykraczało poza zakres używanego układu pomiarowego. Najsilniejszym powinowactwem do tratw charakteryzowały się aptamery 54 i 111, a aptamer 54 również najsilniejszym powinowactwem do błon egzosomów.

Badania z wykorzystaniem błon egzosomów okazały się szczególnie trudne, m.in. ze względu na złożoną procedurę ich izolacji, co wiązało się z ograniczoną pulą egzosomów, którą można było wykorzystać do badań. Wyniki poziomu oddziaływania aptamerów RNA i mutantów z egzosomami charakteryzowały się dużym rozrzutem, a w przypadku niektórych aptamerów uzyskano wartości K_D jedynie dla pojedynczych powtórzeń. W przyszłości warto by powtórzyć tą część badań z wykorzystaniem większej puli egzosomów. Niemniej jednak uzyskane różnice w poziomach powinowactwa danych RNA z błonami egzosomów przypominały różnice uzyskane dla tych samych RNA w oddziaływaniach z liposomami tratwowymi.

- 3) Weryfikacja znaczenia tratw w procesie oddziaływania RNA z błonami.

Przeprowadzone pomiary wskazują, że aptamery RNA mają zdolność do bezpośredniego oddziaływania z regionem tratw lipidowych błony pęcherzyków, a stan błony może regulować powinowactwo RNA-błona. Porównanie wartości K_D dla oddziaływania aptamerów RNA w kompleksach z błoną nieuporządkowaną i błoną uporządkowaną dostarczyło znaczących różnic w poziomie powinowactwa RNA-błona w zależności od fazy błony. Wartości K_D

były średnio prawie dwukrotnie niższe dla oddziaływań aptamerów z LUV_{RAFT} w porównaniu z LUV_{DOPC}. Wyjątek stanowił aptamer 20, który wykazywał silniejsze powinowactwo do błon nieuporządkowanych. Generalna tendencja wskazuje, że domeny tratwowe sprzyjają interakcji badanych aptamerów RNA z cząsteczkami lipidów i mogą stanowić potencjalne miejsce wiązania cząsteczek RNA.

- 4) Przeprowadzenie analizy dotyczącej istnienia korelacji między powinowactwem badanych aptamerów RNA do błon lipidowych, a występowaniem motywów strukturalnych i sekwencyjnych w cząsteczkach RNA.

Dla uzyskanych w badaniach wartości K_D oddziaływania RNA-błona tratwowa, przeprowadzone zostały analizy zależności między zmiennością K_D , a występowaniem czynników takich jak: motywy sekwencyjne (ze zwróceniem uwagi na ich lokalizację w cząsteczce), motywy strukturalne występujące w przewidzianym fałdowaniu, a także innych czynników takich jak długości łańcucha RNA, skład nukleotydowy oraz energia swobodna fałdowania. Podsumowując rezultaty można zauważyć że:

- Motywy sekwencyjne CCCU, GGAG, UCCC mogą promować oddziaływanie RNA-błona. Mutanty ze wstawionym motywami zasadniczo wykazywały wzrost powinowactwa. Co do innych motywów sekwencyjnych nie było możliwe określenie korelacji między zmiennością K_D a występowaniem tych motywów. Trudności w ustaleniu wpływu zaburzenia czy wstawienia konkretnego motywu, wiązała się z tym, że mutacje obejmowały niekiedy kilka motywów jednocześnie. Stąd w przyszłych badaniach, można by przygotować panel mutantów gdzie zmiany dotyczyłyby wyłącznie pojedynczych motywów.
- Największy wzrost powinowactwa zaobserwowano przy wprowadzeniu do RNA motywu CCCU przez substytucję 2-nukleotydów oraz przy delecje 4-nukleotydów (podczas zaburzania oryginalnych motywów), co wiązało się ze zmniejszeniem pętli spinki. Przypadki te mogą sugerować, że powinowactwo RNA-błona tratwowa może być regulowana zarówno obecnością motywów sekwencyjnych (takich jak sekwencja CCCU) jak i motywów strukturalnych (małe pętle struktury drugorzędowej).
- Wydaje się ponadto, że skrócenie pętli (delecja) i wprowadzenie motywu przez substytucję zwiększa powinowactwo, zaś powiększenie pętli (insercja), nawet przy wprowadzeniu motywu, nie zwiększa powinowactwa RNA-błona. Te obserwacje uzyskane dla mutantów, wydają się korespondować z analizami długości aptamerów, gdzie zasadniczo krótsze aptamery wykazywały silniejsze powinowactwo do błon tratwowych.
- Na znaczenie motywu spinki do włosów (mała spinka na stabilnym trzonie) w regulacji powinowactwa RNA-błona, może wskazywać również korelacja między wartością K_D , a liczbą spinek oraz korelacja między K_D , a obliczonym parametrem świadczącym o występowaniu małych spinek.
- Obecność jednoniciowego odcinka przy końcu cząsteczki oligonukleotydu, może z kolei osłabiać oddziaływanie aptameru RNA z tratwami błonowymi.

Odnosząc się do postawionych hipotez badawczych, na podstawie przeprowadzonych badań można sformułować następujące wnioski:

I. RNA ma zdolność do bezpośrednio oddziaływania z regionem tratw lipidowych.

Przeprowadzone badania wskazują na potwierdzenie hipotezy o możliwości bezpośredniego oddziaływania RNA z regionem tratw lipidowych. Co więcej, obecność domen tratwowych sprzyja zwiększonemu powinowactwu badanych aptamerów RNA do błony w porównaniu z błoną nieuporządkowaną.

II. Oddziaływanie aptamerów RNA z błoną regulowane jest przez sekwencje nukleotydowe (motywy RNA), których wpływ na poziom oddziaływania RNA-błona zależy od lokalizacji cząsteczki.

Niektóre motywy np. CCCU, GGAG czy UCCC wydają się promować oddziaływania RNA z błoną, jednak na podstawie przeprowadzonych badań nie można stwierdzić, że sama ich obecność (lub brak) w łańcuchu RNA w bezpośredni sposób reguluje powinowactwo RNA-błona. Wpływ motywów sekwencyjnych RNA wydaje się raczej być powiązany z występowaniem motywów strukturalnych (np. motyw spinki do włosów), które mogą umożliwić „uaktywnienie” danych sekwencji promujących oddziaływanie RNA z błoną.

III. Obecność motywów struktury drugorzędowej może regulować poziom powinowactwa RNA-błona.

Występowanie pewnych motywów struktury drugorzędowej takich jak motyw spinki do włosów (mała spinka na stabilnym trzonie) może sprzyjać oddziaływaniu RNA z błoną, z kolei obecność długiego jednoniciowego odcinka przy końcu cząsteczki aptameru nie sprzyja oddziaływaniom RNA-błona.

Prawdopodobnie na zmienność powinowactwa RNA do błony wpływa w różnym stopniu wiele czynników, spośród analizowanych, a przypuszczalnie i innych. Innymi słowy o wiązaniu RNA do błon pęcherzyków może decydować układ elementów strukturalnych, sekwencyjnych, jak i stan błony lipidowej. W przyszłości warto by znaleźć bardziej złożony model, który lepiej mógłby wyjaśnić zależności pomiędzy tymi elementami i stopień w jakim wpływają na powinowactwo RNA-błona.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Ahadi, A., Brennan, S., Kennedy, P. J., Hutvagner, G., Tran, N. (2016). Long non-coding RNAs harboring miRNA seed regions are enriched in prostate cancer exosomes. *Scientific reports*, 6(1), 1-14.
- 2) Algar, W. R., Hildebrandt, N., Vogel, S. S., Medintz, I. L. (2019). FRET as a biomolecular research tool—understanding its potential while avoiding pitfalls. *Nature methods*, 16(9), 815-829.
- 3) Anand, S., Samuel, M., Kumar, S., Mathivanan, S. (2019). Ticket to a bubble ride: Cargo sorting into exosomes and extracellular vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1867(12), 140203.
- 4) Bagnat, M., Keränen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Simons, K. (2000). Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 3254-3259.
- 5) Batagov, A. O., Kuznetsov, V. A., Kurochkin, I. V. (2011, December). Identification of nucleotide patterns enriched in secreted RNAs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nanovesicles. In *BMC genomics* (Vol. 12, pp. 1-14). BioMed Central.
- 6) Bolukbasi, M. F., Mizrak, A., Ozdener, G. B., Madlener, S., Ströbel, T., Erkan, E. P., ... Saydam, O. (2012). miR-1289 and “Zipcode”-like sequence enrich mRNAs in microvesicles. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 1, e10.
- 7) Börtlein, C., Schumacher, F., Kleuser, B., Dölken, L., Avota, E. (2019). Role of neutral sphingomyelinase-2 (NSM 2) in the control of T cell plasma membrane lipid composition and cholesterol homeostasis. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 226.
- 8) Brown, D.A., Rose, J.K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68, 533–544.
- 9) Brown, T. (2009). *Genomy*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
- 10) Contreras, F.X., Ernst, A.M., Haberkant, P., Bjorkholm, P., Lindahl, E., Gonen, B., Tischer, C., Elofsson, A., von Heijne, G., Thiele, C., i in. (2012). Molecular recognition of a single sphingolipid species by a protein’s transmembrane domain. *Nature*, 481, 525–529.
- 11) Coumans, F.A.W., Brisson, A.R., Buzas, E.I., Dignat-George, F., Drees, E.E.E., El-Andaloussi, S., Emanuelli, C., Gasecka, A., Hendrix, A., Hill, A. F., i in. (2017). Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circ. Res.*, 120 (10), 1632–1648.
- 12) Czerniak, T., Saenz, J. P. (2022). Lipid membranes modulate the activity of RNA through sequence-dependent interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(4), e2119235119.
- 13) Darband, S. G., Mirza-Aghazadeh-Attari, M., Kaviani, M., Mihanfar, A., Sadighparvar, S., Yousefi, B., Majidinia, M. (2018). Exosomes: natural nanoparticles as bio shuttles for RNAi delivery. *Journal of Controlled Release*, 289, 158-170.
- 14) de Gassart, A., Géminard, C., Février, B., Raposo, G., Vidal, M. (2003). Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood*, 102(13), 4336-4344.
- 15) Deatherage, B. L., Cookson, B. T. (2012). Membrane Vesicle Release in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: a Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life. *Infection and Immunity*, 80 (6), 1948–1957.

- 16) Dietrich, C., Bagatolli, L. A., Volovyk, Z. N., Thompson, N. L., Levi, M., Jacobson, K., Gratton, E. (2001). Lipid Rafts Reconstituted in Model Membranes. *Biophysical Journal*, 80, 1417–1428
- 17) Eggeling, C., Ringemann, C., Medda, R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Polyakova, S., Belov, V.N., Hein, B., von Middendorff, C., Schönle, A., Hell, S.W. (2009). Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature*, 457, 1159-1163
- 18) Fabbiano, F., Corsi, J., Gurrieri, E., Trevisan, C., Notarangelo, M., D'Agostino, V. G. (2020). RNA packaging into extracellular vesicles: An orchestra of RNA-binding proteins?. *Journal of extracellular vesicles*, 10(2), e12043.
- 19) Fan, Y., Chen, Z., Zhang, M. (2022). Role of exosomes in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of central nervous system diseases. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 291.
- 20) Fecchi, K., Anticoli, S., Peruzzu, D., Iessi, E., Gagliardi, M. C., Matarrese, P., Ruggieri, A. (2020). Coronavirus interplay with lipid rafts and autophagy unveils promising therapeutic targets. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1821.
- 21) Flores, J. K., Ataide, S. F. (2018). Structural Changes of RNA in Complex with Proteins in the SRP. *Frontiers in molecular biosciences*, 5, 7.
- 22) Friedrichson, T., Kurzchalia, T.V. (1998). Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature*, 394, 802–805.
- 23) Garcia-Martin, R., Wang, G., Brandão, B. B., Zanotto, T. M., Shah, S., Kumar Patel, S., ... Kahn, C. R. (2022). MicroRNA sequence codes for small extracellular vesicle release and cellular retention. *Nature*, 601(7893), 446-451.
- 24) Guduric-Fuchs, J., O'Connor, A., Camp, B., O'Neill, C. L., Medina, R. J., Simpson, D. A. (2012). Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC genomics*, 13, 1-14.
- 25) György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., ... Buzás, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and molecular life sciences*, 68(16), 2667-2688.
- 26) Ha, D., Yang, N., Nadithe, V. (2016). Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(4), 287-296.
- 27) Hao, M., Mukherjee, S., Maxfield, F.R. (2001). Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes. *PNAS*, 98 (23), 13072–13077
- 28) Haraszti, R. A., Didiot, M. C., Sapp, E., Leszyk, J., Shaffer, S. A., Rockwell, H. E., ... Khvorova, A. (2016). High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *Journal of extracellular vesicles*, 5(1), 32570.
- 29) Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., Simons, K. (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.*, 141, 929–942
- 30) Heberle, F.A., Petruzielo, R.S., Pan, J., Drazba, P., Kučerka, N., Standaert, R.F., Feigenson, G.W., Katsaras, J. (2013). Bilayer thickness mismatch controls domain size in model membranes. *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 6853–6859
- 31) Hirano, K., Kinoshita, M., Matsumori, N. (2022). Impact of sphingomyelin acyl chain heterogeneity upon properties of raft-like membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1864(12), 184036.

- 32) Hoshina S, Sekizuka T, Kataoka M, Hasegawa H, Hamada H, Kuroda M, i in. (2016) Profile of Exosomal and Intracellular microRNA in Gamma-Herpesvirus-Infected Lymphoma Cell Lines. *PLoS ONE* 11(9): e0162574. doi:10.1371/journal.pone.0162574
- 33) Hu, W., Liu, C., Bi, Z. Y., Zhou, Q., Zhang, H., Li, L. L., Zhang, J., Zhu, W., Song, Y. Y., Zhang, F., Yang, H. M., Bi, Y. Y., He, Q. Q., Tan, G. J., Sun, C. C., Li, D. J. (2020). Comprehensive landscape of extracellular vesicle-derived RNAs in cancer initiation, progression, metastasis and cancer immunology. *Molecular cancer*, 19(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01199-1>
- 34) Hullin-Matsudaa, F., Kobayashia, T. (2007). Monitoring the distribution and dynamics of signalling microdomains in living cells with lipid-specific probes. *Cell. Mol. Life Sci.*, 64, 2492–2504
- 35) Iida, M., Mashima, T., Yamaoki, Y., So, M., Nagata, T., Katahira, M. (2019). The anti-prion RNA aptamer R12 disrupts the Alzheimer's disease-related complex between prion and amyloid β . *The FEBS journal*, 286(12), 2355-2365.
- 36) Janas, A. M., Sapoń, K., Janas, T., Stowell, M. H., Janas, T. (2016). Exosomes and other extracellular vesicles in neural cells and neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858(6), 1139-1151.
- 37) Janas, T., Yarus, M. (2003). Visualization of membrane RNAs. *Rna*, 9(11), 1353-1361.
- 38) Janas, T., Janas, M.M., Sapoń, K. (2015) Mechanisms of RNA loading into exosomes. *FEBS Lett* 589, 1391-1398.
- 39) Janas, T., Janas, P., Sapoń, K., Janas, T. (2020). Binding of RNA aptamers to membrane lipid rafts: Implications for exosomal miRNAs transfer from cancer to immune cells. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8503.
- 40) Janas, T., Janas, T., Yarus, M. (2006). Specific RNA binding to ordered phospholipid bilayers. *Nucleic acids research*, 34(7), 2128-2136.
- 41) Janas, T., Sapoń, K., Janas, T., Yarus, M. (2021). Specific binding of VegT mRNA localization signal to membranes in *Xenopus* oocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1868(4), 118952.
- 42) Johnson, I.; Spence, M. (2011). Probes for the Nucleus. *Molecular Probe Handbook, A Guide to Fluorescent Properties and Labeling Technologies*, 11.
- 43) Kaiser, H. J., Lingwood, D., Levental, I., Sampaio, J. I., Kalvodova, L., Rajendran, L., Simons, K. (2009) Order of lipid phases in model and plasma membranes. *PNAS*, 106 (39), 16645–16650
- 44) Kamat, N. P., Tobé, S., Hill, I. T., Szostak, J. W. (2015). Electrostatic localization of RNA to protocell membranes by cationic hydrophobic peptides. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(40), 11735-11739.
- 45) Katzmann, D. J., Odorizzi, G., Emr, S. D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nature reviews Molecular cell biology*, 3(12), 893-905.
- 46) Kiessling, V., Wan, C., Tamm, L.K. (2009). Domain coupling in asymmetric lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1788, 64–71
- 47) Koppers-Lalic, D., Hackenberg, M., Bijnsdorp, I. V., van Eijndhoven, M. A., Sadek, P., Sie, D., ... Pegtel, D. M. (2014). Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell reports*, 8(6), 1649-1658.

- 48) Kosaka, N., Iguchi, H., Hagiwara, K., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Ochiya, T. (2013). Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), 10849-10859.
- 49) Lakowicz, J. R. (Ed.). (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Boston, MA: springer US.
- 50) Lee, H., Li, C., Zhang, Y., Zhang, D., Otterbein, L. E., Jin, Y. (2019). Caveolin-1 selectively regulates microRNA sorting into microvesicles after noxious stimuli. *Journal of Experimental Medicine*, 216(9), 2202-2220.
- 51) Li, X., Zhu, W., Fan, M., Zhang, J., Peng, Y., Huang, F., ... Lu, S. (2021). Dependence of SARS-CoV-2 infection on cholesterol-rich lipid raft and endosomal acidification. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 1933-1943.
- 52) Lichtenberg, D., Goni, F.M, Heerklotz, H. (2005). Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem. Sci.*, 30, 430–436
- 53) Lichtman, J. W., Conchello, J. A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature methods*, 2(12), 910-919.
- 54) Lin, A., Hu, Q., Li, C., Xing, Z., Ma, G., Wang, C., ... Yang, L. (2017). The LINK-A lncRNA interacts with PtdIns (3, 4, 5) P3 to hyperactivate AKT and confer resistance to AKT inhibitors. *Nature cell biology*, 19(3), 238-251.
- 55) Lin, C. N., Tsai, Y. C., Hsu, C. C., Liang, Y. L., Wu, Y. Y., Kang, C. Y., ... Hsu, K. F. (2021). An aptamer interacting with heat shock protein 70 shows therapeutic effects and prognostic ability in serous ovarian cancer. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 23, 757-768.
- 56) Liu, H., Huang, Y., Huang, M., Huang, Z., Wang, Q., Qing, L., ... Jia, B. (2022). Current Status, Opportunities, and Challenges of Exosomes in Oral Cancer Diagnosis and Treatment. *International Journal of Nanomedicine*, 2679-2705.
- 57) Liu, Y., Li, D., Liu, Z., Zhou, Y., Chu, D., Li, X., ... Zhang, C. Y. (2015). Targeted exosome-mediated delivery of opioid receptor Mu siRNA for the treatment of morphine relapse. *Scientific reports*, 5(1), 1-10.
- 58) London, E., Brown, D.A. (2000). Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim. Biophys. Acta.*, 1508, 182–195.
- 59) Los, D. A., Zinchenko, V. V. (2009). Regulatory role of membrane fluidity in gene expression. In *Lipids in Photosynthesis* (pp. 329-348). Springer, Dordrecht.
- 60) Lozano, M. M., Hovis, J. S., Moss, F. R. III, Boxer, S. G. (2016). Dynamic reorganization and correlation among lipid raft components. *J. Am. Chem. Soc.*, 138, 9996–10001
- 61) Maas, S. L. N., Breakefield, X. O., Weaver, A. M. (2017). Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends in Cell Biology*, 27 (3), 172-188
- 62) Michanek, A., Yanez, M., Wacklin, H., Hughes, A., Nylander, T., Sparr, E. (2012). RNA and DNA association to zwitterionic and charged monolayers at the air–liquid interface. *Langmuir*, 28(25), 9621-9633.
- 63) Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, JP, Hartmann, MA., Bonneu, M., Simon-Plas, F., Lessire, R., Bessoule, JJ. (2004) Lipid rafts in higher plant cells—purification and characterization of triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem.*, 279, 36277–36286

- 64) Owen, D. M., Williamson, D. M., Magenau, A., Gaus, K. (2012). Sub-resolution lipid domains exist in the plasma membrane and regulate protein diffusion and distribution. *Nat. Commun.*, 3, 1256,
- 65) Pigati, L., Yaddanapudi, S. C., Iyengar, R., Kim, D. J., Hearn, S. A., Danforth, D., ... Duelli, D. M. (2010). Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PloS one*, 5(10), e13515.
- 66) Pike, L. J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal of Lipid Research*, 44, 655-667
- 67) Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.*, 47, 1597–1598.
- 68) Pollet, H., Conrard, L., Cloos, A. S., Tyteca, D. (2018). Plasma membrane lipid domains as platforms for vesicle biogenesis and shedding?. *Biomolecules*, 8(3), 94.
- 69) Rajagopal, C., Harikumar, K.B. (2018). The Origin and Functions of Exosomes in Cancer. *Frontiers in Oncology*. B, 66, 1-13.
- 70) Sakai-Kato, K., Yoshida, K., Takechi-Haraya, Y., Izutsu, K. I. (2020). Physicochemical characterization of liposomes that mimic the lipid composition of exosomes for effective intracellular trafficking. *Langmuir*, 36(42), 12735-12744.
- 71) Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 72) Santangelo, L., Giurato, G., Cicchini, C., Montaldo, C., Mancone, C., Tarallo, R., ... Tripodi, M. (2016). The RNA-binding protein SYNCRIP is a component of the hepatocyte exosomal machinery controlling microRNA sorting. *Cell reports*, 17(3), 799-808.
- 73) Sapoń, K., Gawrońska, I., Janas, T., Sikorski, A. F., Janas, T. (2020). Exosome-associated polysialic acid modulates membrane potentials, membrane thermotropic properties, and raft-dependent interactions between vesicles. *FEBS letters*, 594(11), 1685-1697.
- 74) Sapoń, K., Janas, T., Sikorski, A. F., Janas, T. (2019). Polysialic acid chains exhibit enhanced affinity for ordered regions of membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1861(1), 245-255.
- 75) Sapoń, K., Mańka, R., Janas, T., Janas, T. (2023). The role of lipid rafts in vesicle formation. *J Cell Sci*; 136 (9): jcs260887.
- 76) Sarmah, P., Shang, W., Origi, A., Licheva, M., Kraft, C., Ulbrich, M., ... Koch, H. G. (2023). mRNA targeting eliminates the need for the signal recognition particle during membrane protein insertion in bacteria. *Cell Reports*, 42(3).
- 77) Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A., Simons, K. (2003). Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 100, 5795–5800
- 78) Schutz, G.J., Kada, G., Pastushenko, V.P., Schindler, H. (2000). Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J.*, 19, 892–901.
- 79) Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature reviews Molecular cell biology*, 18(6), 361-374.
- 80) Shurtleff, M. J., Temoche-Diaz, M. M., Karfilis, K. V., Ri, S., Schekman, R. (2016). Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *elife*, 5, e19276.
- 81) Simons, K., Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 569–572

- 82) Simons, K., Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1, 31-39
- 83) Singer, S. J., Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175, 720–731.
- 84) Skryabin, G. O., Komelkov, A. V., Savelyeva, E. E., Tchevkina, E. M. (2020). Lipid rafts in exosome biogenesis. *Biochemistry (Moscow)*, 85(2), 177-191.
- 85) Sobo, K., Chevallier, J., Parton, R.G., Gruenberg, J., van der Goot, F.G. (2007). Diversity of raft-like domains in late endosomes. *PLoS ONE*, 2 (4), e391.
- 86) Sorice, M., Misasi, R., Riitano, G., Manganeli, V., Martellucci, S., Longo, A., ... Mattei, V. (2021). Targeting lipid rafts as a strategy against coronavirus. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 618296.
- 87) Statello, L., Maugeri, M., Garre, E., Nawaz, M., Wahlgren, J., Papadimitriou, A., ... Valadi, H. (2018). Identification of RNA-binding proteins in exosomes capable of interacting with different types of RNA: RBP-facilitated transport of RNAs into exosomes. *PloS one*, 13(4), e0195969.
- 88) Sviridov, D., Miller, Y. I., Ballout, R. A., Remaley, A. T., Bukrinsky, M. (2020). Targeting Lipid Rafts—A Potential Therapy for COVID-19. *Frontiers in immunology*, 11.
- 89) Tan, S. S., Yin, Y., Lee, T., Lai, R. C., Yeo, R. W. Y., Zhang, B., ... Lim, S. K. (2013). Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane. *Journal of extracellular vesicles*, 2(1), 22614.
- 90) Tanaka, K., Okuda, T., Kasahara, Y., Obika, S. (2021). Base-modified aptamers obtained by cell-internalization SELEX facilitate cellular uptake of an antisense oligonucleotide. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 23, 440-449.
- 91) Tárnok, A. (2008). SYTO dyes and histoproteins—Myriad of applications. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 73(6), 477-479.
- 92) Taylor, K., Sobczak, K. (2020). Intrinsic regulatory role of RNA structural arrangement in alternative splicing control. *International journal of molecular sciences*, 21(14), 5161.
- 93) Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., ... Jovanovic-Taliman, T. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular vesicles*, 7(1), 1535750.
- 94) Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., ... Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319(5867), 1244-1247.
- 95) Triantafilou, M., Miyake, K., Golenbock, D. T., Triantafilou, K. (2002). Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *Journal of cell science*, 115(12), 2603-2611.
- 96) Turchinovich, A., Tonevitsky, A. G., Burwinkel, B. (2016). Extracellular miRNA: a collision of two paradigms. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(10), 883-892.
- 97) Varma, R., Mayor, S. (1998). GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*, 394, 798–801.
- 98) Veatch, S.L., Keller, S.L. (2003). Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophys. J.*, 85, 3074–3083

- 99) Vicens, Q., Kieft, J. S. (2022). Thoughts on how to think (and talk) about RNA structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(17), e2112677119.
- 100) Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Madrid, F., Mittelbrunn, M. (2014, October). Sorting it out: regulation of exosome loading. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 28, pp. 3-13). Academic Press.
- 101) Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., ... Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature communications*, 4(1), 2980..
- 102) Wang, J., Singh, A., Ozer, A., Zipfel, W. R. (2020). Fluorophore-labelled RNA aptamers to common protein tags as super-resolution imaging reagents. *bioRxiv*.
- 103) Wei, H., Chen, Q., Lin, L., Sha, C., Li, T., Liu, Y., ... Zhu, X. (2021). Regulation of exosome production and cargo sorting. *International Journal of Biological Sciences*, 17(1), 163.
- 104) Wesółowska, A., Piwocka, K. (2017). Egzosomalne mikroRNA jako element komunikacji międzykomórkowej w nowotworach. *Postępy Biochemii*, 63(2), 110-118.
- 105) Wiederschain, G. Y. (2011). *The Molecular Probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies*.
- 106) Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.*, 13, 269-88
- 107) Xu, R., Greening, D. W., Zhu, H. J., Takahashi, N., Simpson, R. J. (2016). Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *The Journal of clinical investigation*, 126(4), 1152-1162.
- 108) Yeung, C. Y. C., Dondelinger, F., Schoof, E. M., Georg, B., Lu, Y., Zheng, Z., ... Kjaer, M. (2022). Circadian regulation of protein cargo in extracellular vesicles. *Science Advances*, 8(14), eabc9061.
- 109) Yu, J., Fischman, D. A., Steck, T. L. (1973). Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J. Supramol. Struct.*, 1, 233–248.
- 110) Zhang H, Wang Y, Bai M, i in. (2018) Exosomes serve as nanoparticles to suppress tumor growth and angiogenesis in gastric cancer by delivering hepatocyte growth factor siRNA. *Cancer Sci.*, 109, 629–641
- 111) Zuccato, E., Blott, E. J., Holt, O., Sigismund, S., Shaw, M., Bossi, G., Griffiths, G. M. (2007). Sorting of Fas ligand to secretory lysosomes is regulated by mono-ubiquitylation and phosphorylation. *Journal of cell science*, 120(1), 191-199.
- 112) Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research*, 31(13), 3406-3415.

SPIS RYSUNKÓW

Rysunek 1. Struktura głównych lipidów błonowych.....	- 11 -
Rysunek 2. Schemat błony plazmatycznej z obszarem tratw lipidowych.....	- 13 -
Rysunek 3. Przykład interakcji lipid – lipid w tworzeniu domen tratwowych.....	- 14 -
Rysunek 4. Fazy bony lipidowej.....	- 16 -
Rysunek 5. Klasy zewnątrzkomórkowych pęcherzyków błonowych.....	- 17 -
Rysunek 6. Schemat budowy egzosomu.....	- 18 -
Rysunek 7. Formowanie, wydzielanie i pobieranie egzosomów.....	- 19 -
Rysunek 8. Mechanizm pączkowania regionu tratwowego do wnętrza MVB.....	- 20 -
Rysunek 9. Możliwe interakcje egzosomów z komórkami docelowymi.....	- 22 -
Rysunek 10. Budowa RNA.....	- 24 -
Rysunek 11. Schemat głównych motywów struktury drugorzędowej RNA.....	- 25 -
Rysunek 12. Diagram Jabłońskiego z rezonansowym przeniesieniem energii Förstera (FRET).....	- 28 -
Rysunek 13. Przykładowe miejsca wstawiania motywów RNA do pętli.....	- 50 -
Rysunek 14. Profie elucji egzosomów.....	- 54 -
Rysunek 15. Wykres zmian pozornej fluorescencji liposomów.....	- 55 -
Rysunek 16. Porównanie zmian fluorescencji sond RNA w trakcie miareczkowania liposomami.....	- 57 -
Rysunek 17. Układy sond używanych w badaniach.....	- 58 -
Rysunek 18. Częstość występowania motywów RNA w bazie aptamerów.....	- 70 -
Rysunek 19. Struktura 2-rzędowa aptameru 102 z zaznaczonymi motywami strukturalnymi.....	- 73 -
Rysunek 20. Struktura 2-rzędowa aptameru 102 z zaznaczonymi motywami sekwencyjnymi.....	- 74 -
Rysunek 21. Lokalizacja motywu CCCU w aptamerach RNA.....	- 75 -
Rysunek 22. Histogramy rozkładu wartości K_D dla kompleksów RNA z liposomami.....	- 108 -
Rysunek 23. Rozkład wartości K_D dla kompleksów RNA z liposomami.....	- 109 -
Rysunek 24. Zestawienie średnich K_D dla kompleksów aptamerów z liposomami LUV _{DOPC} i LUV _{RAFT}	- 110 -
Rysunek 25. Zestawienie średnich K_D dla kompleksów 17 aptamerów z błonami LUV _{RAFT}	- 111 -
Rysunek 26. Zestawienie średnich K_D dla kompleksów 10 aptamerów RNA z błonami egzosomów.....	- 115 -
Rysunek 27. Zestawienie rang średnich K_D dla kompleksów aptamerów z błonami egzosomów i LUV _{RAFT}	- 116 -
Rysunek 28. Zestawienie średnich K_D dla kompleksów aptamerów i ich mutantów z błonami egzosomowymi.....	- 149 -
Rysunek 29. Krzywe zależności zmienności K_D od wybranych elementów strukturalnych.....	- 157 -
Rysunek 30. Krzywe zależności zmienności K_D od wybranych czynników.....	- 160 -

SPIS TABEL

Tabela 1. Rola egzosomów w zależności od przenoszonego ładunku.	23 -
Tabela 2. Przykłady motywów RNA oznaczonych w egzosomalych RNA.....	26 -
Tabela 3. Markery elektroforetyczne używane w badaniach	32 -
Tabela 4. Sekwencje RNA badanych aptamerów i ich formy przechowywania.....	33 -
Tabela 5. Sekwencje RNA i DNA badanych mutantów	35 -
Tabela 6. Sekwencje starterów	38 -
Tabela 7. Lipidy używane w badaniach	39 -
Tabela 8. Sondy fluorescencyjne używane w badaniach.	40 -
Tabela 9. Wyszukiwane motywy RNA	43 -
Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR.....	45 -
Tabela 11. Parametry reakcji PCR	45 -
Tabela 12. Skład mieszaniny do reakcji transkrypcji.....	46 -
Tabela 13. Stężenia aptamerów RNA po transkrypcji	49 -
Tabela 14. Stężenia mutantów RNA po transkrypcji	51 -
Tabela 15. Długości fal wzbudzenia i emisji używanych sond fluorescencyjnych.....	56 -
Tabela 16. Parametry pomiarów dla badań oddziaływania RNA-liposomy.	60 -
Tabela 17. Schemat pomiarów oddziaływania RNA z liposomami.....	61 -
Tabela 18. Parametry pomiarów dla badań oddziaływania RNA-egzosomy	63 -
Tabela 19. Schemat pomiarów oddziaływania RNA z egzosomami.....	64 -
Tabela 20. Profil motywów sekwencyjnych RNA w bazie aptamerów.	66 -
Tabela 21. Frekwencja występowania motywów RNA w bazie aptamerów	71 -
Tabela 22. Porównanie występowania motywów RNA w oryginalnej bazie 148 aptamerów RNA oraz w puli 19 badanych aptamerów.....	72 -
Tabela 23. Zmiany widma emisji fluorescencji sondy YOYO-1 w trakcie miareczkowania aptamerów RNA liposomami LUV _{DOPC} i LUV _{RAFT}	95 -
Tabela 24. Zmiany emisji fluorescencji sondy YOYO-1 oraz odwrotności zmian fluorescencji YOYO-1 w trakcie miareczkowania aptamerów RNA liposomami.	99 -
Tabela 25. Zmiany emisji fluorescencji sond egzosomalych CTB555 i fDiI oraz odwrotności zmian fluorescencji sond w trakcie miareczkowania egzosomów aptamerami RNA.....	113 -
Tabela 26. Wyniki pomiarów oddziaływania mutantów RNA z błonami tratwowymi na przykładzie mutantu 10A.	143 -
Tabela 27. Zestawienie średnich K_D dla kompleksów aptamerów i ich mutantów z błonami LUV _{RAFT} . -	144 -
Tabela 28. Wyniki pomiarów oddziaływania mutantów RNA z błonami egzosomów na przykładzie mutantu 102D.	148 -

Tabela 29. Zestawienie procentowej zmiany średniej wartości K_D mutantów względem oryginalnego aptameru dla mutantów ze wstawionymi dodatkowymi motywami.- 155 -

Tabela 30. Zestawienie procentowej zmiany średniej wartości K_D mutantów względem oryginalnego aptameru przy zaburzaniu danych motywów w mutantach.....- 156 -

ZAŁĄCZNIKI

Załącznik 1. Lista wszystkich oryginalnych sekwencji RNA

Poniższe sekwencje aptamerów RNA podane zostały w kierunku 5' do 3'. Sekwencje stałe przy końcach 5' i 3' zostały zapisane kursywą i podkreślone. Motywy RNA zostały oznaczone odpowiednimi kolorami: motyw CCCU – zielony; inne motywy egzosomalne (GGAG, UGAG i UCCU) – czerwony; motywy trawowe (UCCC, CUCC, UUGU) – niebieski; motywy 5-nukleotydowe są dodatkowo podkreślone.

1

GGGACGACGAUGACACGAUACGAUCAGCCACAGUGUUCUGCUAUCGUCUAUCUUAUGCCCCGUAGCCAAGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

3

GGGACGACGAUGACACGAUAUGCGCUGGCGGCCGUAUUGUUCUUCUCCCCUCUUGCACCCCCGUACACCAUACGCCGAUCACAUGACCA

4

GGGACGACGAUGACACGAUAUCGCUCCGCUGAUCCCGCCGUACGCAGUGUAUCGUUCUACUUGGAUAGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

5

GGGACGACGAUGACACGAUAUGUUUGACCGAGUACGCGUGACUAAGUUCUACUGACCCGUUCCUUGAGCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

6

GGGACGACGAUGACACGAUACUGAUUUUCGACCGGCAUUUCUGGCCUGUGUAUUGUUCUAUCCCCUGUUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

7

GGGACGACGAUGACACGAUAGAUGUUCGCCUCCUUGUGUCGUGUUCUGUGAAUUCGGCUUACCGGAUCGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

8

GGGACGACGAUGACACGAUAACUAGCUAAACCGUCAUGUUCGGCCUGCUUUUUUGACUCAACUUGCCCCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

9

GGGACGACGAUGACACGAUAUCGGCUCGCUCUGGUCGACAACCCCGUCUUGGCCUUCUCUCCAAUAUGCUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

10

GGGACGACGAUGACACGAUAGUGAAAAGGAGUCGUACUUCUCUUCGUGUGUGGCCUCGUCUUCUUCUCCGUUUGUCUCCUUCGCUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

11

GGGACGACGAUGACACGAUAUAUCCUCGGCUGUUUAGUGUCACUCGCCCUGUCUGAAUGCCGUCGAGAUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

13

GGGACGACGAUGACACGAUAAGUGCUUCUAUGGGUUUGCAGUAAGUUCGUGUCUGGACCUUCCCUUCGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

14

GGGACGACGAUGACACGAUAUCAUGUAUUUGGCUCUUCGCUAUGCAUAGUAGUUACU**UCCC**AGACCAGACCAUACGCCGAUCACAUGACCA

15

GGGACGACGAUGACACGAUACGAUACGUAAUUCGCACAUAACCUGUCUUA**UCCU**GUUCUCGGUUGUUGGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

17

GGGACGACGAUGACACGAUACCGUGGCACUC**UUGU**GUCUGUUGUG**CCCU****UUGU**AGUUGUUCGUCAUGUUUCCGCCGUCA**CUCCC**GUCGUUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

19

GGGACGACGAUGACACGAUACCG**CCCU**UGCUCGUUUCGGA**UCCCU****CCAU****UCCU**UGCUGAAGUCG**UCCU**AUCGCUCAUCCA**UCCU**CAUGUUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

20

GGGACGACGAUGACACGAUAGCCCGUAAUGUGGGUUGGUUCUCUACGUUCAACGCUCGUUCUACUCGUA**UCCC**ACAAUCUAA**CCCU**GCCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

21

GGGACGACGAUGACACGAUAUACGCGGUGUGCUGUUUCGCG**UCCU**AUCGACGUGCUUCGUU**UCCCU**CUUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

22

GGGACGACGAUGACACGAUACUGUAGGACGUGUCUCUUCACCGUACUCACAAGAGC**GGAG**UGGUACAUACAUACGCCGAUCACAUGACCA

23

GGGACGACGAUGACACGAUAUCUGGCGCGCACGCAAACUUUCUUUCUCUUGCUCUCGACCACGC**UGAG**GACAUACGCCGAUCACAUGACCA

24

GGGACGACGAUGACACGAUACGCACUUACUAUGGCCCGUGUGGUUUGCGAACCU**UCCCU****UCCCU**GUGUCAUGA**UGAG**AUCGGUCUUCUGGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

25

GGGACGACGAUGACACGAUAUUGGCUAUAUAUGCG**UCCUCCU**UCUAGCCAUUUAUCGUA**UCCU**UCGAGUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

27

GGGACGACGAUGACACGAUAGAUUAGCUGCGA**UGAG**CUGCUUCGGACUCUGUGGUUAUUUGCCGGUGAUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

29

GGGACGACGAUGACACGAUAUUCGGUCUUUUCGCU**UUGU**AUGAUAGUC**UUGU**GAUGAAGUUGC**UCCCU**UCAUACGCCGAUCACAUGACCA

30

GGGACGACGAUGACACGAUAGUGGUUCGAC**UUGUU**CUCUCU**UCCC**GAUCGUCUAAUCCGGGGAUCAUAUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

31

GGGACGACGAUGACACGAUAUUGAAUAGGAUAGUAUCGUGACUCAUCUACUACUAGUACAACGCACUCUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA
32

GGGACGACGAUGACACGAUAUCUGUCCACUGACU**UCCU**UUGUUCAUGCUC**UCCCU**CACUAGAAAUGUCCGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

33

GGGACGACGAUGACACGAUAAGGUCUAUCGCAGUCUUUCU**UCCCU**UCAAGUCACUCUUCUAGUCCAUGGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

34

GGGACGACGAUGACACGAUAAG**UUGU**GUUGACCUAGCGUAUUAACUGGUCCGUCUUUGAUAGCGUUGCGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

35

GGGACGACGAUGACACGAUACGG**CUCCC**CACGUCAUAGCCGUCUUUUGGGUGUUGACCUUCUUAUAGCUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

36

GGGACGACGAUGACACGAUAUCGUGCGCUUCUUCUCUCUACCUUAUCGACU**CUCCU**AUACCCACUCACG**UCCU**GUGACU**UCCC**ACACUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

37

GGGACGACGAUGACACGAUAGCUCGUUGGACUCUAGACGCCCGUUAUCCGCCAUUCACU**UCCC**GCGACAUACGCCGAUCACAUGACCA

38

GGGACGACGAUGACACGAUA**UUGU**GGGUUGGCGCACACCAUUCUUGCUCAUUUUCAUCUCUGGAAGUGCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

39

GGGACGACGAUGACACGAUAAGUGCUUCAUGUAUUCUGGGCGCUAUGCUCUAUCGUGUGCUUGCU**CUCCU**GC GCGAU**UCCCUCCUCCC**GUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

40

GGGACGACGAUGACACGAUAUGGGCGCAU**UGAG**CAGUAACCUGCAAUCGACUACGCUA**UCCC**GGGACUGGCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

41

GGGACGACGAUGACACGAUAACGCGCCACCA**UCCU**CGCUUUGGUUUCGUCUUAACCUCUGAAGGU**UCCCU**GCAUACGCCGAUCACAUGACCA

42

GGGACGACGAUGACACGAUAGGGCCGUGCUCAUCCAACGUCGCCGAACGGGCUCGAUUGACCCCAUGCCGCCGAAACGCUA**UCCU**CGACUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

43

GGGACGACGAUGACACGAUAGAUUCCAGAAUCUGCAUGC**UUGU**AUAACAGUU**UCCCU**AA**CUCCC**GAGCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

44

GGGACGACGAUGACACGAUAGCCUCUGUAUAUGCACUCUAUGGUCUGAAUCUUAAGCUAGCCA**CCCU**GGGCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

45

GGGACGACGAUGACACGAUACGAU**CUCCU**UGGACA**UCCU**GUUUGACUGUUACA**AAU**UCCCUAAACUCUAGCCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

46

GGGACGACGAUGACACGAUACUGACGAGAGCUAGCCUUU**UUGU**CACCGAACUUGCUUCUC**GGAGGU**UCCCUUGAUCUGAUUU**CUCCCCU**CAUACGCCGAUCACAUGACCA

47

GGGACGACGAUGACACGAUAUGCCGGACACGCGAUUACGUCGU**UUGUU**CACUUUGCCAUCUAAGGACUAGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

48

GGGACGACGAUGACACGAUAC**UUGU**CAUGACCCCGUGU**UUGUU**AU**CUCC**GCUCUUUUAUCUCAUAGU**UUGUU**CUUACGACUCGCUCUCUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

49

GGGACGACGAUGACACGAUAUCGCUGCGUUAU**CUCCU**UGCC**GGAG**GCUCUU**UCCCGU**UCGUCUUAUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

50

GGGACGACGAUGACACGAUAGCAACCGGUA**UUGU**AUC**UGAG**GCGA**UUGU**CCGUGGGUUGCGUUCUACUCGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

51

GGGACGACGAUGACACGAUAC**UUGU**GAUCUGUCAUUAAGGAUUUGGCCUUAUGAAUAGUGUG**CCCU**AACCAUACGCCGAUCACAUGACCA

52

GGGACGACGAUGACACGAUACG**UGAG**GUUUGCAUCGUCGCAGCU**UUGU**CUUUUACGUUACGUUCUGGUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

53

GGGACGACGAUGACACGAUAUUGCGGCUAUCGUUCCGUCUU**UCCCGU**ACGUGGUUCUAUACCCCCAGGACUCA**UCCU**CUCCCCUGUUUCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

54

GGGACGACGAUGACACGAUAC**CCCU**UCGC**CCCU****UCCU**UUGUUACACUA**UCCUCCAUUGUA**CUCCCU**UCCU**GCAUACGCCGAUCACAUGACCA

55

GGGACGACGAUGACACGAUAGUAAA**CUCC**GACUGUAAGAUUUGCGCGAAUUGGGUUGCCGGACACUACAUACGCCGAUCACAUGACCA

56

GGGACGACGAUGACACGAUAAGGUGCGGCUU**GGAG**CGCAUGUCCAGAGCA**UCCU**UCGCCUAUAGG**CCCU**GCAUACGCCGAUCACAUGACCA

59

GGGACGACGAUGACACGAUAGCGCUAU**UCCCCU**CUGGCGUUCGUCUCAACGUCUGGCCAAGACCCGAUAUACAUACGCCGAUCACAUGACCA

60

GGGACGACGAUGACACGAUAUCGGAUUUCUCGCCUU**UCCU**UAUGCUCUCUGUAAUACGCCA**CUCCU**GAACAUACGCCGAUCACAUGACCA

61

GGGACGACGAUGACACGAUAUAGGUAUGGUUUGUUCCUCCUACCUAGCUCUAUGAUGUGGCCUAUUCGUCGUAGCACGCUGUGGCUUCAUACGCCGAUCACAUGACCA
62

GGGACGACGAUGACACGAUAGCGUGUCGUGAUUCAUUCUUGUUUCCCCCUCGUGUCGUAUCGAGGUGCGUAUCGAUCGCUUACGCCCCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

64

GGGACGACGAUGACACGAUAUGUAGGAUGACGGUCCACCUAUUAUUCGUGCCCUAUUUCUUCCUUGCGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

66

GGGACGACGAUGACACGAUACUCUCCUGAUCUCAGACUAUGCGGUGAGCGCGAUCGUCCAAAGCCUGCGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

67

GGGACGACGAUGACACGAUAUCAGUUUUUGCGCGACCCCUGGCUCUCUGGCCUUUUGUUCGACUUUGCGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

68

GGGACGACGAUGACACGAUACCUCUCGACUGAAAUAUCUGUAGCUCCGGCACGUUCUGUCUCCUCUGGCCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

69

GGGACGACGAUGACACGAUAGCCAUCGGCGUAUACCGGGCAUUUCUGGCACACACUUAGAGUCAGUGCGUGCCUUGGGACACCCACUG CAUACGCCGAUCACAUGACCA

70

GGGACGACGAUGACACGAUAGGGACAUCUGUUCUGCAAUCAAGGAAAUCUGCUCUCACAGUUCUGGGUCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

71

GGGACGACGAUGACACGAUACGACCCGAUAGCUGCCCCGAUGUGUUUAUGUCCCUGCGACCCUGCCGACCAUACGCCGAUCACAUGACCA

73

GGGACGACGAUGACACGAUAUCUCAGGGCUAUCUGUGCUCUCGUGGUAAGUACACAGCAACGAAUUGAUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

74

GGGACGACGAUGACACGAUACUCUGGUAUUCUGAUGGUCCGGCCCCUUGCCUGUGUUCUGUCUGGACGAUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

75

GGGACGACGAUGACACGAUAAGUCGCCUCCUGGCCAAACGCUAUGUUGUACCUUUGAUGCUCAGUUGCGCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

76

GGGACGACGAUGACACGAUACCUGUCUGGUGUUUCGGUCUAAUACGUGGCUGGAUUAGUUAACCCGAGAUGCCGAAUCCUUGGUAUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

77

GGGACGACGAUGACACGAUAUGCAAGGUCUAGACUCAGUCAUGGAUCUAAUCUGACUUCAGCGCAAACGCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

78

GGGACGACGAUGACACGAUAUUGCUCUAGUGAUCCACUUGCGUCUAUUGAGCGGCCUUUGCCACGGGUCACAUACGCCGAUCACAUGACCA

79

GGGACGACGAUGACACGAUACGUGCUACGUGUCUCAGCACGUAUCCUGUCAAGUAUCAUGAUCCGUGCCCUAGCGUCCUCUGACAUCACCAUACGCCGAUCACAUGACCA

82

GGGACGACGAUGACACGAUAUCGAUGCCGCCUCUUCUCGUGUUCACUUUCGUGCCGACGCAAGCAACACUUCUCUUUCGGCCUUGGUCUCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

83

GGGACGACGAUGACACGAUAAGUAAUAGAGAUUUACUUUCCGUUUUAUUAGGGACAAGCGUCUUCGGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

84a

GGGACGACGAUGACACGAUACAGCAACCUCCUGAUACCACUAUUUGGCAGUAGUGGUUUCAGGCCUUUCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

84b

GGGACGACGAUGACACGAUAACCGUGGGCGGGAU AUGUUAUCUUUGGUUCUAAAGGUUAUCCUUGUGGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

86

GGGACGACGAUGACACGAUAACAUGGUGGUGGUCACUCCUACCUCCCGUCUCGGAAUCGCCUCCUAUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

87

GGGACGACGAUGACACGAUAUGUUGAGCUUGCGCGACCUCACAUAACCUUGUCAAAAACAGUCUUCGUGGGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

88

GGGACGACGAUGACACGAUACGUCUGGUCAGUUCGU AUCACUGUUCGCCUAUCCGCCGUUCUCUGACUGUUGUUUGGUUAGCGAGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

89

GGGACGACGAUGACACGAUACGCCUCACUGUAGUUGGUCGCCCCGGCUAGGUCCGAUUGAUCCUUGUCUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

90

GGGACGACGAUGACACGAUAACGAUUAGUGGAGUUUACCUUCUCAUUUGUCGGGUCACUUCGGCAAGUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

92

GGGACGACGAUGACACGAUAGCACGCUAUUAUCCCCGGUAGAUGAGUUAUGCUCACUCGUUCUAAAACGCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

93

GGGACGACGAUGACACGAUAUCCGUCAAGGCGCGUUGCAAAUCCCGAGGUCUGUAUUUUCUUCGUUAGUCCUGCACAUUCCCCUCGAACCAUACGCCGAUCACAUGACCA

94

GGGACGACGAUGACACGAUAGCUAGGCUAACAUUGUCUCAUGGCCGAGCGUAUGGAUCUACGGACUUAUACGCCGAUCACAUGACCA

96

GGGACGACGAUGACACGAUACCGUUGGCACGCUCGCAGUUGUAGUGCACGUUCAUAUUAGGGUAGCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

97

GGGACGACGAUGACACGAUAUGCGGAUAGUGGGUACUAGACGCUUACCGUGAACUCCUACCCACUGACCAUACGCCGAUCACAUGACCA

98

GGGACGACGAUGACACGAUAGUAACUGAAUUGACCGGCACUAACCGCUUCCUACGACUCUAUUAUUGCUGAUUUUUUGGCUAACCGGCACCAUACGCCGAUCACAUGACCA

99a

GGGACGACGAUGACACGAUAUCAGUUUAUCGCCCCCUAAUGCUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

99b

GGGACGACGAUGACACGAUAUCAGUUUAUCGCCCCCUAAUGCUCCAGACAUCGUGAGGAUCAUACUACAUACGCCGAUCACAUGACCA

100

GGGACGACGAUGACACGAUAUCUGCCUCGCUCACCCUGCUCAUGCCCAUAUCCUGUGCUCGACCUACCUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

102

GGGACGACGAUGACACGAUACCAAUACCAUGGAUUGGUCCCUUUAUCCAGCUUCUAACCCUUACCUGUUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

103

GGGACGACGAUGACACGAUAGUUCGGCGUGCCAUUAUGUCCAUUGUAUGGUCGAUAUGGCCUUGCACCUCCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

104

GGGACGACGAUGACACGAUAGUGGUGCUGGCCUCAAGGUAUGUCAGGCGCUAUGUCUUCGUACCCUAUUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

106

GGGACGACGAUGACACGAUUCCUAACAUUGGCAGCGUUUAGGUUCAUCGGUUCAUAGCCUUCCCUUAGCUUCGUCGCUCACACGUUUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

107

GGGACGACGAUGACACGAUAUCAGAUUCUCGCCUUCAGGCACGUUGGUAUAGGAAGCUUCCAUCUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

108

GGGACGACGAUGACACGAUACGAUCCGGAUUUUGUCCACCGCCUCUCUCUUCUUAUCUGGGGUCUAGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

109

GGGACGACGAUGACACGAUAACGCGACAGGGUCUGACAGGCGUCUCCUUCCCUUUUGCAUAAUCUCCCGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

110

GGGACGACGAUGACACGAUAGCGAGUUGCGUAUUGCUUGCUCUUGUUCUCAUUGCCCGUCGCGCUUGGUUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

111

GGGACGACGAUGACACGAUACUAUCAGAAUAAUGUGUUCUUUGGUUCUGUGCACACGCUGUUUCAGGGCUCAUACGCCGAUCACAUGACCA
112

GGGACGACGAUGACACGAUAUCGUGUUGUGAAUUGCUUUUAGGCCUCGCAGCGUAAACGGCUUACCCUGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

113

GGGACGACGAUGACACGAUACCUUUGGCUCGGUAUUGAGUCCUUAGCCUUCUCCAUGGUUUUUUCCCUUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

114

GGGACGACGAUGACACGAUAUGCUUUUGCCUGUCAUGCCUACUGCACUUCGAUCAAUUGCCUUCCCUCGUACAUACGCCGAUCACAUGACCA

115

GGGACGACGAUGACACGAUACUCCUUGUUCUGUGUACUGGUUGACUUUCGUCGGUGUCUGCGUCCGAGGGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

116

GGGACGACGAUGACACGAUAUGCCAGACGGCGCACUCUCCAGCUAUUGACGUUGAUCAUUCGCCACGCAUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

117

GGGACGACGAUGACACGAUAUCUACGGCUUUUGUUUCAUCGUUGCGUUCUCUGUCGACACUGAGUGCCUACAUACGCCGAUCACAUGACCA

118

GGGACGACGAUGACACGAUAUUUGCCGGCCUCUGAUUAAGCUAUCCACUCACUAUACAACGCAAAUUCGCGUUGUCUGUUUUGUUCCGUUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

119

GGGACGACGAUGACACGAUAUUUUCCCUCAUGUAUUCGUAUUGGCCGUUGUCCCUGCUCAUCCCCUGGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

120

GGGACGACGAUGACACGAUAAUCCGAUGUCCGGGAUCUCGAUUACUCUGUCAUCUCGGCAGUCCGCUGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

121

GGGACGACGAUGACACGAUAAGUAUUCGCAUGUGUGUGAUCAGGUCAUUAUGUUUGUCCUGUGGAUGUAACCAUACGCCGAUCACAUGACCA

122

GGGACGACGAUGACACGAUAGGCUGUGGCUUCCGUCCUCAGGGGAUUUGUCUCGUGUUGCUUGACUAGGUUGGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

123

GGGACGACGAUGACACGAUAAAAUGCAAUUCGUAGUGGUCGAGAUGAAUCGUUUGUCAAGUUACCCUCCGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

124

GGGACGACGAUGACACGAUAACCGGAAAUAGUGUGCAUCCUCCUCUACGUUCAUCGAUCUUCCUUGCGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

125

GGGACGACGAUGACACGAUAUCUGGGUCUGUCUACUCGAUCACGUGCGCGUGGAAGUAGGUGUAUAUCAGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

126

GGGACGACGAUGACACGAUACCCAGGAAUUGUGUUUUGACUAGCGCCCGUUCUCAUGUUGUGUGGGUGUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

127

GGGACGACGAUGACACGAUACUAUGCACUCGAUGCCGU AUGCGAACUGCUC AACUGUUUAUUCGCAU CAUACGCCGAUCACAUGACCA

128

GGGACGACGAUGACACGAUAAUUCU UCCC GGCACCUACUCGUCUACAUCUUGCCAUCGGGCC CCCU UGGACA UACGCCGAUCACAUGACCA

129

GGGACGACGAUGACACGAUAAGAGUUGCAAUUGACUUAUCCGGUCGCUUUUGAACUACUUGAUCCU UUGGAUUAUGCCUA UCCCCU GU CAUACGCCGAUCACAUGACCA

131

GGGACGACGAUGACACGAUAGCUCAGUUGGGUAGUAUUGUAUUGGCUGUAUCCU ACCGCGUCCAGAAUGACA UACGCCGAUCACAUGACCA

132

GGGACGACGAUGACACGAUACUUCUAAUAGGGUGCAUGUUAUUGU GCUCAUACCUCAAUAC CCCU GCU CAUACGCCGAUCACAUGACCA

133

GGGACGACGAUGACACGAUAUCGUAAACUACGUUGGACUGCAUUCGAAUAUGUCUAUAUGCGCCUACU CAUACGCCGAUCACAUGACCA

134

GGGACGACGAUGACACGAUAACUGAGCUUGUCUUGUAUUCGUUUGCUUUGAG CGGCCGAUUCUAAGAG CAUACGCCGAUCACAUGACCA

135

GGGACGACGAUGACACGAUACAGAUUGGGCCAUCUGUCAUAGUGAUUCUUCU UCCC AGGUAUCCACUCUA CAUACGCCGAUCACAUGACCA

136

GGGACGACGAUGACACGAUAGCAAUCAUUGCGUCUCUUGCUGUUGCUUAUGUGUUCGCCGUUAAGG CAUACGCCGAUCACAUGACCA

137

GGGACGACGAUGACACGAUAUGUUCUGUGGAUGGUCAUAUUGUAUCGU UCCU GAUCUGUG CUCC GUACUGCCAACUGUCCU ACGCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

138

GGGACGACGAUGACACGAUAGUUCUGGAUCUCUAGCCUU UCCCCU CUGAAUCCUCCU UUCGCAACGCG CAUACGCCGAUCACAUGACCA

139

GGGACGACGAUGACACGAUAGCUCCGGUACUAGAAUAGUGUUCUUGUGCUUGU UCUCUACCUCGACUCA CAUACGCCGAUCACAUGACCA

140

GGGACGACGAUGACACGAUAUCGUUUUAUCUCCUCCUUUGAUCUUCUCCCCAAUUUGCUACUGAUCCAGCCCGUUGGCUGUCCCAGCUUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

141

GGGACGACGAUGACACGAUAUCUGCGCGUCUGACGUAUCAAGAAGUAUGGACCCUGAGUAUUUAUCUGCACAUACGCCGAUCACAUGACCA

142

GGGACGACGAUGACACGAUAUUUUGCGAACGAGCUUCAUGCCCUUUUGAAGACUGCCUGUGUUUCCUCCUCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

143

GGGACGACGAUGACACGAUAGGCCUCUGCUAAGACCACUGCGUUGCAACACAUCUCCUGAUCCACCUCCAACAUACGCCGAUCACAUGACCA

144

GGGACGACGAUGACACGAUAUAUCCGGGCGUACGAUUCGCAUGAGAGUUCCCUGUAAUUUACGGCCUGGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

145

GGGACGACGAUGACACGAUAGACAUAUAUUGGGUGCUGUCGACGUGUUUAUUAUUCGCCUUUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

146

GGGACGACGAUGACACGAUAUGUGAGGAGUCGCGGUUUCUUCUGGUUUUGGUCCAUUGGCCGAGUCAACAUACGCCGAUCACAUGACCA

148

GGGACGACGAUGACACGAUAGCAAAGUGUAUGCGGAUCUUUGCUCGCAGUCAUUCAUCAUCUCCUUAUCUGGUUGUUUCGUCCUACUGUCUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

149

GGGACGACGAUGACACGAUAUCGCUCAUCACUCUCCUACUCGUCUGUAUUCUGUCCUUGACCCCGAUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

151

GGGACGACGAUGACACGAUAUCUGUCUUCUUCGCUCUGACGCGAUUUUCCGUGCGAUUUGCGUCUUUGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

152

GGGACGACGAUGACACGAUAUCACCUCAUCGCCACGAAGAAUUGCGCCGAUCUCGGAUGGCUAUGGUUCGCAACGUGCGUUAACAGAAGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

153

GGGACGACGAUGACACGAUAAGUAGCCUGUGUCUUUUAGCCUUAGUACUACUCAACUUGUUCUCUUGCCUUUGUUAUCUUUCCUCCUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

154

GGGACGACGAUGACACGAUAUGGUUUAGCAUCGUGGCUACUAAACCGUCGCAUCCAUCUGCCUUCGCGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

155

GGGACGACGAUGACACGAUAUUUCAUGUGCUUUUGGGCGCCUUGAGACAAAUUGGUCCUUCUUGACUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

156

GGGACGACGAUGACACGAUAUGCCCACAUUGACGACCCUCCAGACCCGUGAUGGCACCCGUGGAUACCUCGACCAUACGCCGAUCACAUGACCA

157

GGGACGACGAUGACACGAUAUGUACCAUGGCAUAUCAGCUCACAUUCUUCCUGCGCCUCCUCCUGCUCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

158

GGGACGACGAUGACACGAUAGCUAUUCGGAUACGCAUCGUGUCCACCGCCGAGUCAUCGGUCGGCGCGCGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

159

GGGACGACGAUGACACGAUAGCUGCUAGUUGAACAGUCUUAAGCUUGAUCCUUUCCAAUCAACCUCCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

160

GGGACGACGAUGACACGAUAGGCGAGUGCUUUUCCUCGUCCACUGCGUUUUGUCAAAGGUUCACUGAGUCCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

161

GGGACGACGAUGACACGAUACAGAGCUUCGGUCAUCAUCGCGCUGGGUCCAUAAGGCCGAUAUACAGAGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

162

GGGACGACGAUGACACGAUAUCUCGGCUUAUCGCGUUAACCGUUGUGAGUAUAGCUCCUCAAACCGUCUUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

163

GGGACGACGAUGACACGAUAGCAUUUUAAAGCGUGAAUUCUUUCGCGUUUUCGUCGGGCUAUUCCUGCCUCCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

164

GGGACGACGAUGACACGAUAUCAGCCUACCGUAUUUUGUCUAGUGUUCAUACUAAUACGACUCCAGAACGGUCAUGAUCACGGGUCUUGUCAUACGCCGAUCACAUGACCA

165

GGGACGACGAUGACACGAUAUAGACUCGUCGAUUGGCCAUCGAUGGUCACUGCUCGGAGAUUGUUAGGGCCCAUACGCCGAUCACAUGACCA

166

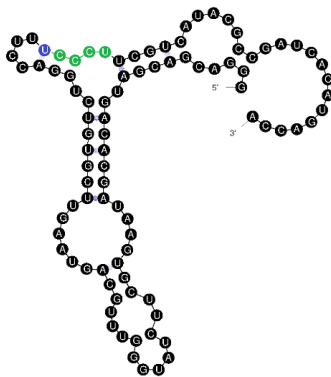
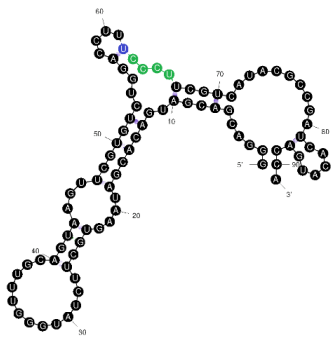
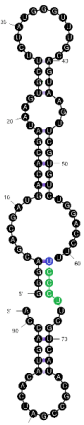
GGGACGACGAUGACACGAUAUAAACCAUAGGCACCUCGUUUGGAUGGAUACACGUUUCAGCCCCUGAUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

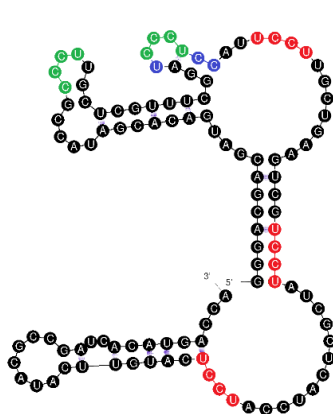
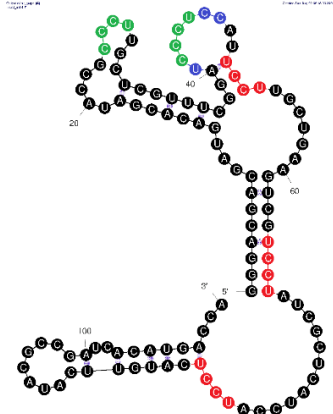
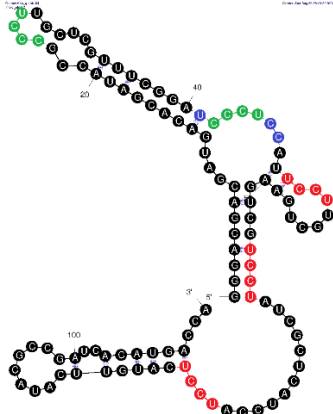
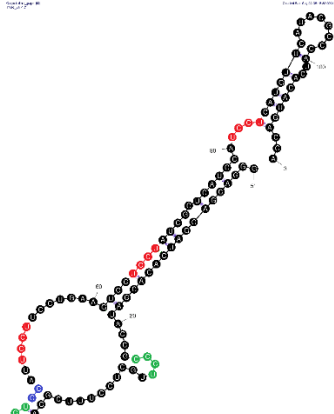
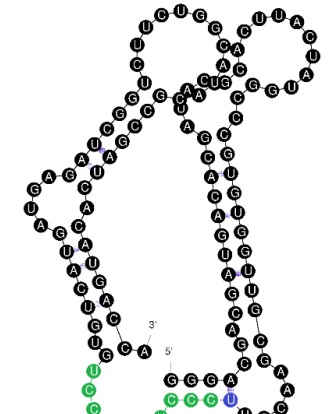
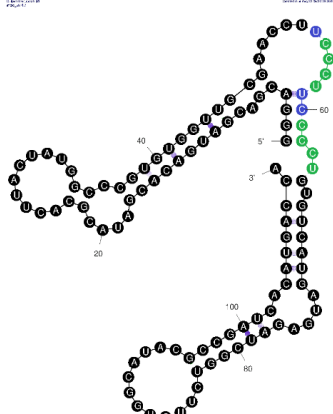
167

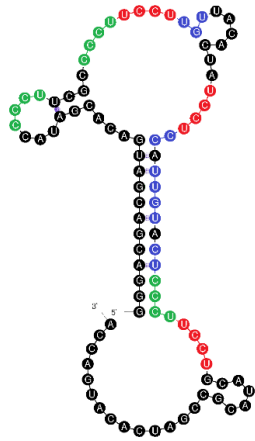

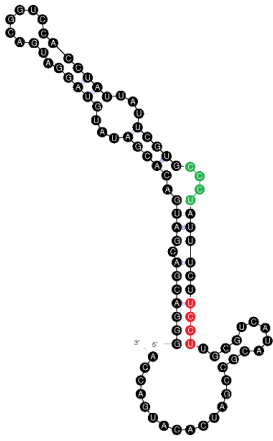
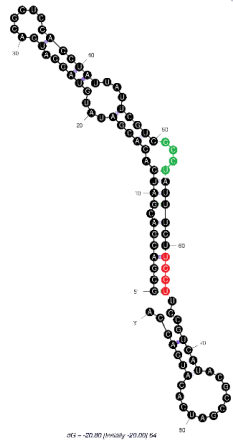
GGGACGACGAUGACACGAUAAUCGCAGUUCAGUUCUCAUCGCCUUGGUCCUUAGUACUCCGCCUGCUGCAUACGCCGAUCACAUGACCA

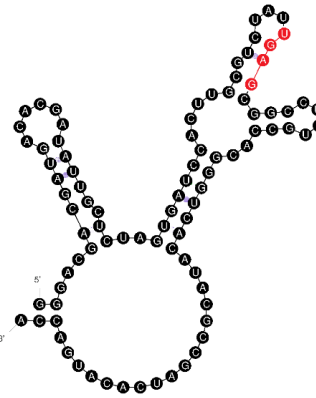
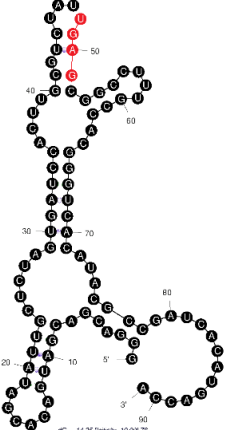
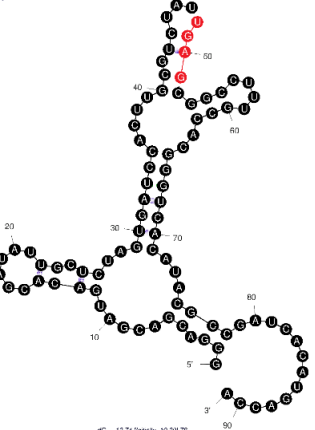
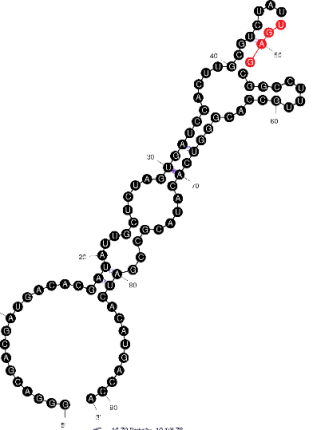
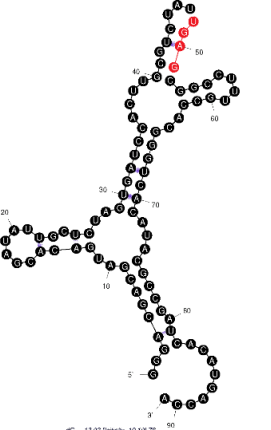
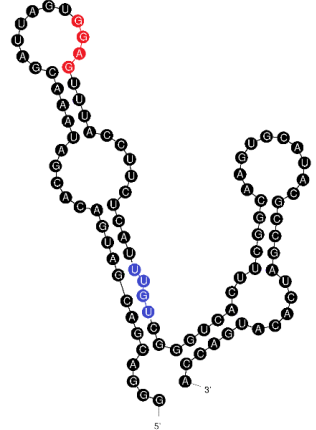
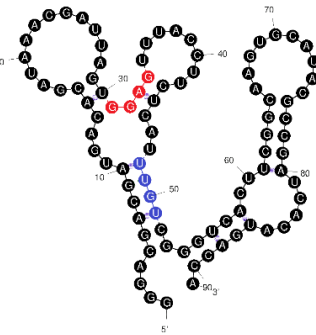
Załącznik 2. Tabela wariantów fałdowania badanych RNA

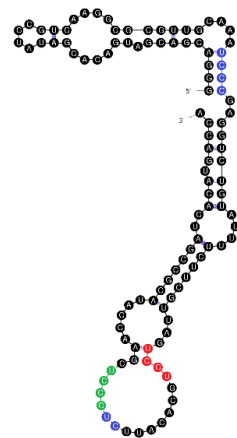
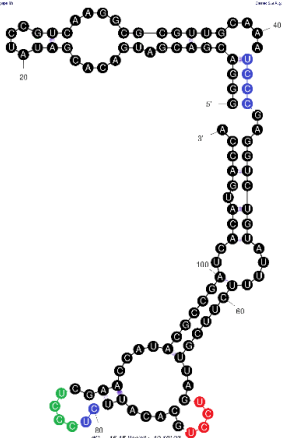
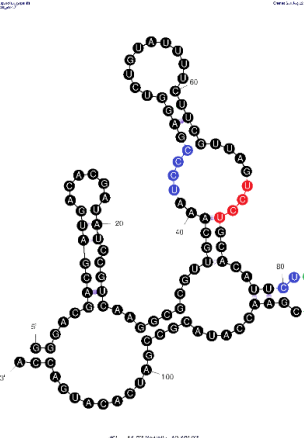
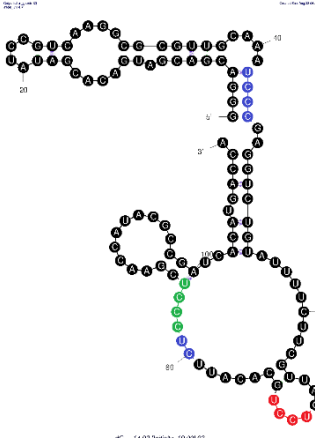
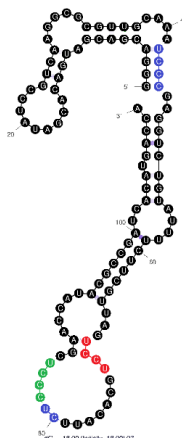
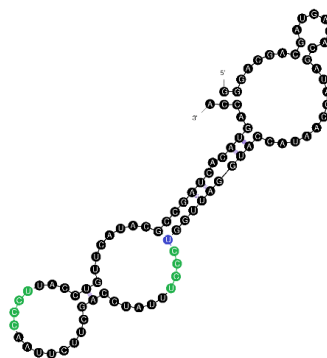

Lokalizacja motywów RNA w zaproponowanych alternatywnych strukturach aptamerów wygenerowanych przez program Mfold. W tabeli nie pominięto aptamery, dla których uzyskano tylko jedną strukturę, te przedstawiono wcześniej w kartach charakterystyki. Dla aptamerów z przynajmniej dwoma zaproponowanymi fałdowaniami, dla porównania podano wszystkie fałdowania. Motyw egzosomalowo-tratwowy CCCU jest zaznaczony na zielono, pozostałe motywy egzosomalowe (GGAG, UGAG i UCCU) są zaznaczone na czerwono, zaś motywy tratwowe (UCCC, CUCC, UUGU) na niebiesko. Energia swobodna każdego wariantu strukturalnego jest podana poniżej struktury RNA.

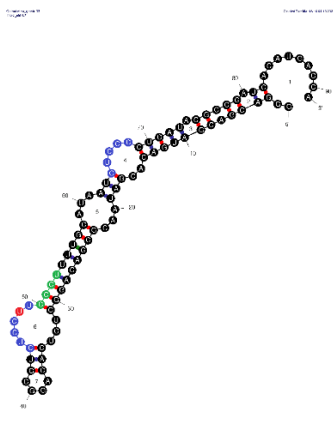
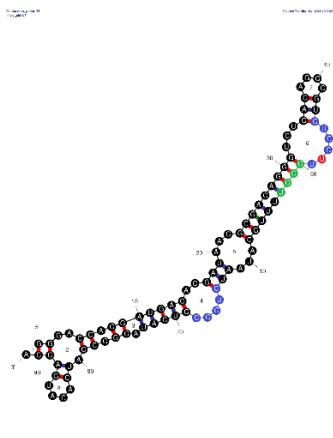
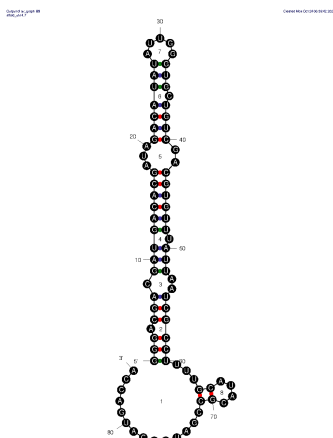
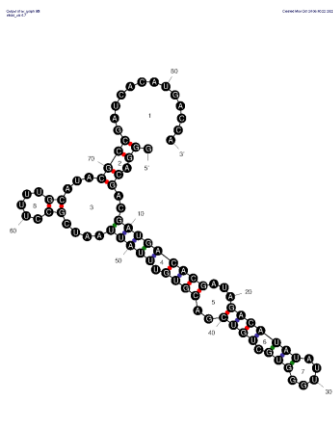
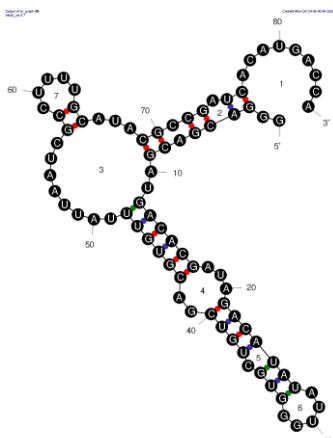
Numer RNA	Lokalizacja motywów w strukturze 2-rzędowej o najniższej energii swobodnej	Lokalizacja motywów RNA w alternatywnych strukturach			
13	 <p data-bbox="286 1066 622 1090">Struktura 1 : $\Delta G = -20.10$ kcal/mol,</p>	 <p data-bbox="640 1066 976 1090">Struktura 2 : $\Delta G = -19.80$ kcal/mol,</p>	 <p data-bbox="994 1066 1330 1090">Struktura 3 : $\Delta G = -19.60$ kcal/mol,</p>		

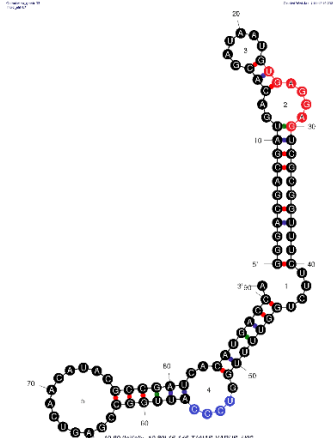
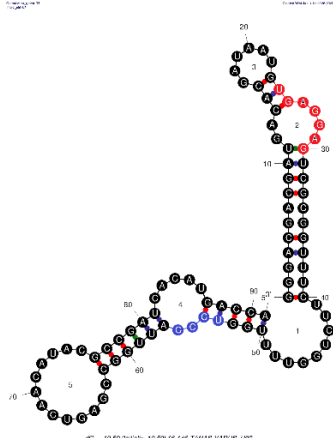
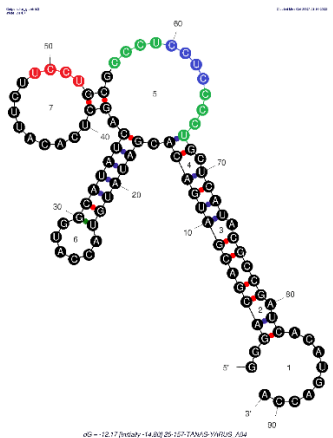
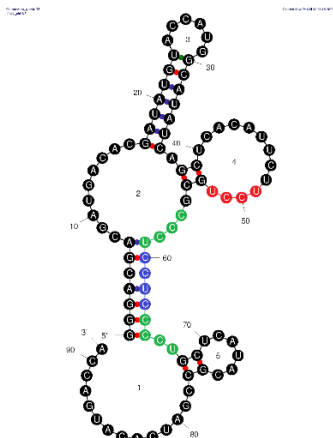
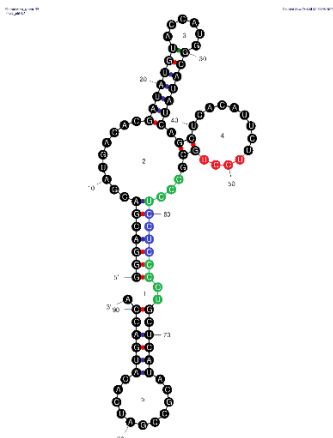
19	 <p>Struktura 1 : $\Delta G = -23.00$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 2 : $\Delta G = -22.50$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 3 : $\Delta G = -22.50$ kcal/mol</p>	 <p>Struktura 4 : $\Delta G = -22.40$ kcal/mol,</p>	
24	 <p>Struktura 1 : $\Delta G = -31.40$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 2 : $\Delta G = -30.10$ kcal/mol,</p>			

54	 <p>Struktura 1 : $\Delta G = -11.20$ kcal/mol</p>	 <p>Struktura 2 : $\Delta G = -10.80$ kcal/mol,</p>			
64	 <p>Struktura 1 : $\Delta G = -20.20$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 2 : $\Delta G = -20.00$ kcal/mol,</p>			

78	 <p>Struktura 1 : $\Delta G = -20.00$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 2 : $\Delta G = -19.90$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 3 : $\Delta G = -19.20$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 4 : $\Delta G = -19.10$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 5 : $\Delta G = -19.10$ kcal/mol,</p>
90	 <p>Struktura 1 : $\Delta G = -22.90$ kcal/mol</p>	 <p>Struktura 2 : $\Delta G = -22.10$ kcal/mol</p>			

93	 <p>Struktura 1 : $\Delta G = -19.20$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 2 : $\Delta G = -19.10$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 3 : $\Delta G = -19.10$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 4 : $\Delta G = -19.00$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 5 : $\Delta G = -18.90$ kcal/mol,</p>
102	 <p>Struktura 1 : $\Delta G = -12.90$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 2 : $\Delta G = -12.40$ kcal/mol,</p>			

109	 <p>Struktura 1 : $\Delta G = -22.80$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 2 : $\Delta G = -21.70$ kcal/mol,</p>			
145	 <p>Struktura 1 : $\Delta G = -16.00$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 2 : $\Delta G = -15.40$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 3 : $\Delta G = -15.00$ kcal/mol</p>		

146	 <p>Struktura 1 : $\Delta G = -19.80$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 2 : $\Delta G = -19.50$ kcal/mol</p>			
157	 <p>Struktura 1 : $\Delta G = -14.80$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 2 : $\Delta G = -14.80$ kcal/mol,</p>	 <p>Struktura 3 : $\Delta G = -14.50$ kcal/mol</p>		