

STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU POLSKIM

Tytuł: Badanie oddziaływania aptamerów RNA z błonami pęcherzyków lipidowych

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, jak: motywy egzosomowe (CCCU, GGAG, UGAG i UCCU) lub 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 nietratwową oraz izolowane z surowicy bydłowej 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), wybrzuszenia, 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 poziomego 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 tą 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.