

INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK W POZNANIU

Marta Soszyńska-Jóźwiak

**STRUKTURA DRUGORZĘDOWA SEGMENTU 5 RNA(+)
WIRUSA GRYPY ORAZ JEJ KONSERWATYWNE
MOTYWY STRUKTURALNE**

Praca doktorska została wykonana
w Zespole Genomiki Strukturalnej RNA
Zakładu Biochemii RNA

Promotor:
Dr hab. Elżbieta Kierzek
profesor IChB PAN

POZNAŃ 2016

*Pani Profesor Elżbiecie Kierzek
dziękuję za opiekę promotorską,
wrozumiałość, cenne rady oraz okazaną pomoc*

*Wszystkim współpracownikom
z Zespołu Genomiki Strukturalnej RNA
oraz Zakładu Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych
dziękuję za wszelką pomoc*

*Pracę dedykuje moim Rodzicom
w podziękowaniu za wsparcie
oraz pomoc w realizacji planów życiowych*

SPIS TREŚCI

| | |
|---|----|
| SPIS TREŚCI..... | 3 |
| CEL PRACY..... | 7 |
| STRESZCZENIE..... | 8 |
| ABSTRACT..... | 16 |
| WSTĘP LITERATUROWY..... | 21 |
| 1. Wprowadzenie | 21 |
| 2. Budowa wirusa grypy | 22 |
| 3. Cykl replikacyjny wirusa grypy..... | 24 |
| 4. Konserwatywne motywy strukturalne wybranych wirusów RNA | 26 |
| 4.1. Element IRES..... | 27 |
| 4.2. Motywy strukturalne 3' UTR HCV | 31 |
| 4.3. Motywy strukturalne 5' UTR i 3' UTR wirusa Denga..... | 32 |
| 4.4. Element RRE wirusa HIV | 34 |
| 4.5. Rybozym HDV | 35 |
| 4.6. Domeny TLS..... | 36 |
| 5. Konserwatywne motywy strukturalne wirusa grypy | 37 |
| 5.1. Struktura „panhandle”..... | 38 |
| 5.2. Motywy strukturalne zaangażowane w alternatywne składanie mRNA wirusa grypy | 39 |
| 5.3. Model struktury drugorzędowej vRNA segment 8 szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)..... | 43 |
| 5.4. Bioinformatyczne analizy genomu wirusa grypy | 44 |
| 5.5. Praktyczne wykorzystanie konserwatywnych motywów strukturalnych | 44 |
| WYNIKI I DYSKUSJA..... | 46 |
| 1. Identyfikacja konserwatywnych motywów strukturalnych w segmencie 5 RNA(+). | 46 |
| 2. Konserwatywny motyw strukturalny RNA wirusa grypy: M121..... | 46 |
| 2.1. Przewidywanie struktury drugorzędowej M121 | 46 |
| 2.2. Mapowanie struktury drugorzędowej M121 | 49 |
| 2.3. Hybrydyzacja M121 do macierzy izoenergetycznych | 56 |
| 2.4. Motyw M121 w segmencie 5 RNA(+) szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)..... | 59 |

SPIS TREŚCI

| | |
|---|-----|
| 2.5. Inhibicja namnażania wirusa grypy w liniach komórkowych przez antysensowe oligonukleotydy nacelowane na M121 | 60 |
| 2.6. Określenie cytotoksyczności użytych oligomerów antysensowych | 66 |
| 3. Konserwatywny motyw strukturalny RNA wirusa grypy: M198..... | 66 |
| 3.1. Mapowanie struktury drugorzędowej M198..... | 66 |
| 3.2. Hybrydyzacja M198 do macierzy izoenergetycznych | 75 |
| 3.3. Motyw M198 w segmencie 5 RNA(+) szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) 77 | |
| 3.4. Inhibicja namnażania wirusa grypy w liniach komórkowych przez antysensowe oligonukleotydy nacelowane na M198 | 77 |
| 3.4. Określenie cytotoksyczności użytych oligonukleotydów antysensowych..... | 80 |
| 4. Segment 5 RNA(+) wirusa grypy typu A | 80 |
| 4.1. Mapowanie struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5 | 81 |
| 4.1.1. Model struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5 | 82 |
| 4.1.2. Porównanie modelu struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5 uzyskanego na podstawie danych z 23°C oraz 37°C..... | 89 |
| 4.1.3. Model struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5 z preferowanym fałdowaniem lokalnym | 92 |
| 4.2. Hydroliza RNA RNazą H w obecności oligomerów DNA..... | 93 |
| 4.3. Hybrydyzacja cRNA segmentu 5 do macierzy izoenergetycznych | 95 |
| 4.4. Strukturalno-sekwencyjna analiza bioinformatyczna | 104 |
| 5. Podsumowanie badań struktury drugorzędowej RNA(+) segmentu 5 | 114 |
| 6. Struktura drugorzędowa rejonu kodującego segmentu 5 RNA(+) | 114 |
| 6.1. Mapowanie struktury drugorzędowej rejonu kodującego segmentu 5 RNA(+) szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) | 115 |
| 6.2. Porównanie rejonu kodującego segmentu 5 RNA(+) oraz cRNA segmentu 5 modelowego szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)..... | 121 |
| 7. Inhibicja namnażania wirusa grypy w liniach komórkowych przez antysensowe oligonukleotydy nacelowane na segment 5 RNA(+) | 121 |
| 8. Określenie cytotoksyczności użytych oligonukleotydów antysensowych | 129 |
| PODSUMOWANIE..... | 130 |
| MATERIAŁY I METODY | 132 |
| 1. Materiały..... | 132 |
| 1.1. Oligonukleotydy..... | 132 |
| 1.2. Plazmidy..... | 151 |

SPIS TREŚCI

| | |
|--|-----|
| 1.3. Linie komórkowe | 151 |
| 1.4. Wirus grypy typu A..... | 151 |
| 1.5. Kompetentne komórki bakteryjne..... | 151 |
| 1.6. Enzymy | 151 |
| 1.7. Izotop promieniotwórczy | 152 |
| 1.8. Barwniki..... | 152 |
| 1.9. Komercyjnie dostępne zestawy do biologii molekularnej | 152 |
| 1.10. Odczynniki, roztwory, bufony, pożywki | 152 |
| 1.11. Odczynniki do hodowli komórkowej..... | 155 |
| 1.12. Wzorce mas kwasów nukleinowych | 157 |
| 2. Metody | 157 |
| 2.1. Synteza oligonukleotydów | 157 |
| 2.2. Znakowanie oligonukleotydów barwnikami fluorescencyjnymi | 157 |
| 2.3. Spektroskopia mas | 158 |
| 2.4. Strącanie kwasów nukleinowych | 158 |
| 2.5. Rozdział kwasów nukleinowych w żelach agarozowych | 158 |
| 2.6. Rozdział kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych..... | 158 |
| 2.7. Oczyszczanie DNA i RNA..... | 159 |
| 2.8. Otrzymanie matrycy do transkrypcji in vitro M121 | 159 |
| 2.9. Otrzymanie matrycy do transkrypcji in vitro M198, cRNA segmentu 5 oraz kodującego regionu segmentu 5 RNA(+) o sekwencji szczepu A/Vietnam/1203/2004(H5N1) | 159 |
| 2.10. Otrzymanie matrycy do transkrypcji in vitro segmentu 7 vRNA(-) o sekwencji szczepu A/California/04/2009 (H1N1)..... | 160 |
| 2.11. Izolacja totalnego RNA metodą Chomczyńskiego-Sacchi | 160 |
| 2.12. Transformacja kompetentnych komórek bakteryjnych DH5 α | 160 |
| 2.13. Oczyszczanie plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej | 161 |
| 2.14. Transkrypcja in vitro | 161 |
| 2.15. Znakowanie 5' końca RNA radioaktywnym izotopem ³² P..... | 161 |
| 2.16. Fałdowanie RNA..... | 162 |
| 2.17. Mapowanie enzymatyczne | 162 |
| 2.18. Hydroliza RNA indukowana obecnością jonów ołowiu..... | 163 |
| 2.19. Mapowanie chemiczne..... | 163 |

SPIS TREŚCI

| | |
|---|------------|
| 2.20. Selektywna hydroliza RNA z udziałem rybonukleazy H w obecności oligomeru DNA..... | 163 |
| 2.21. Reakcja odwrotnej transkrypcji | 164 |
| 2.22. Drabinki do analizy modyfikacji RNA | 164 |
| 2.23. Elektroforeza kapilarna | 164 |
| 2.24. Analiza wyników uzyskanych poprzez rozdział cząsteczek z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej | 165 |
| 2.25. Macierze izoenergetyczne | 165 |
| 2.26. Hodowla linii komórkowej MDCK oraz MDCK-HA | 166 |
| 2.27. Infekcja komórek MDCK, MDCK-HA wirusem grypy | 166 |
| 2.28. Namnażanie wirusa grypy typu A (A/California/04/2009 oraz jednocyklicznego wirusa grypy A/California/04_NYICE_E3/2009) | 167 |
| 2.29. Test łyśinkowy | 167 |
| 2.30. Określenie wydajności transfekcji | 168 |
| 2.31. Określenie potencjału hamowania namnażania wirusa grypy przez oligonukleotydy antysensowe metodą immunofluorescencyjną | 168 |
| 2.32. Określenie potencjału hamowania namnażania wirusa grypy przez oligonukleotydy antysensowe z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym | 170 |
| 2.33. Określenie cytotoksyczności oligonukleotydów antysensownych | 171 |
| 2.34. Identyfikacja konserwatywnych motywów strukturalnych | 171 |
| 2.35. Określenie stopnia konserwatywności modeli struktury drugorzędowej w typie A wirusa grypy..... | 172 |
| 2.36. Przewidywanie struktur drugorzędowych badanych cząsteczek | 172 |
| 2.37. Określenie prawdopodobieństwa występowania par zasad oraz rejonów jednoniciowych modeli struktur drugorzędowych badanych cząsteczek | 173 |
| BIBLIOGRAFIA | 174 |

CEL PRACY

Wirus grypy posiada materiał genetyczny w postaci 8 segmentów RNA (vRNA). W trakcie cyklu replikacyjnego dochodzi do syntezy komplementarnych RNA (cRNA), które stanowią matrycę do powstania genomowych RNA. Z kolei cząsteczki vRNA stanowią matryce do syntezy mRNA. Choć główne elementy cyklu replikacyjnego wirusa grypy są dobrze opisane w literaturze, to jednak wiedza na temat struktury drugorzędowej wirusowych RNA jest znikoma. Jednocześnie sugeruje ona, że struktura drugorzędowa RNA wirusa jest istotna dla prawidłowego przebiegu cyklu replikacyjnego i wydajnego namnożenia się wirusa.

W pracy doktorskiej skupiono się na badaniach struktury drugorzędowej segmentu 5 RNA(+) wirusa grypy, szczególnie pod kątem identyfikacji w nim konserwatywnych motywów strukturalnych.

Głównym celem niniejszej pracy była:

1. Identyfikacja konserwatywnych motywów strukturalnych występujących w segmencie 5 RNA(+) oraz określenie i potwierdzenie ich struktury drugorzędowej z użyciem metod bioinformatycznych oraz mapowania RNA.
2. Określenie struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5 wirusa grypy z wykorzystaniem technik mapowania struktury RNA.
3. Określenie struktury drugorzędowej rejonu kodującego segmentu 5 RNA(+) wirusa grypy z wykorzystaniem technik mapowania struktury RNA.
4. Określenie zachowawczości struktur konserwatywnych motywów strukturalnych, cRNA segmentu 5 oraz rejonu kodującego segmentu 5 RNA(+).
5. Określenie rejonów dostępnych dla wiązania modyfikowanych oligonukleotydów z wykorzystaniem mikromacierzy izoenergetycznych.
6. Zaprojektowanie antysensowych oligonukleotydów na podstawie modeli struktur drugorzędowych badanych RNA oraz wyników hybrydyzacji do macierzy izoenergetycznych.
7. Badanie właściwości inhibitorowych antysensowych oligonukleotydów w linii komórkowej MDCK zainfekowanej wirusem grypy.

STRESZCZENIE

STRESZCZENIE

Wirus grypy jest obiektem zainteresowania wielu grup badawczych na całym świecie. Przyczyną tego jest fakt, że coroczne epidemie grypy sezonowej przysparzają wiele ofiar śmiertelnych, a powikłana pogrypowe są równie groźne i mogą powodować trwałe uszczerbek na zdrowiu. Ponadto, wirus posiada tendencje do wywoływania pandemii.

Co więcej, obecnie istniejące leki przeciw wirusowi grypy nie są w pełni skuteczne. Nie istnieje też uniwersalna szczepionka i każda sezonowa grypa wymaga nowej szczepionki. Dlatego też, ważny jest rozwój szerokiej gamy preparatów mogących być wykorzystywanych, jako biofarmaceutyki. Większość stosowanych obecnie terapeutyków oddziałuje z wirusowymi białkami. Pojawiają się jednak szczepy wirusa grypy odporne na te leki. W tej sytuacji alternatywną wydaje się być terapia nacelowana na wirusowe RNA.

Rodzina *Orthomyxoviridae*, do której należy wirus grypy typu A, gromadzi wirusy posiadające otoczkę i materiał genetyczny w postaci jednoniciowego, antysensownego, podzielonego na segmenty RNA.

W klasyfikacji wirusa grypy wyróżnia się 3 główne typy: A, B oraz C. Typ A jest odpowiedzialny za sezonowe epidemie oraz okazjonalne pandemie. Pozostałe typy wirusa grypy stanowią mniejsze zagrożenie dla człowieka. Typ A można podzielić na kilka podtypów, które klasyfikowane są w zależności od odmiany powierzchniowych glikoprotein: hemaglutyniny i neuraminidazy. Znanych jest 18 typów hemaglutyniny i 9 rodzajów neuraminidazy.

Hemaglutynina oraz neuraminidaza wraz z białkiem M2 umieszczone są w otoczce wirusa, a kapsyd tworzy białko M1. Wewnątrz wirionu znajduje się vRNA w kompleksie z nukleoproteiną (NP) oraz trzema podjednostkami wirusowej polimerazy (PB1, PB2, PA). Kompleks ten określa się, jako vRNP. W cyklu replikacyjnym wirusa ważne są także białka NS1, NS2 (NEP) oraz PB1-F2. W ostatnich latach zidentyfikowano kolejne białka wirusowe, a mianowicie: PB2-S2, N40, PA-X, PA-N155 oraz PA-N182.

Genom wirusa A grypy złożony jest z 8 segmentów RNA (vRNA), które zawierają od 890 do 2341 nukleotydów i kodują wszystkie niezbędne białka do przeprowadzenia cyklu replikacyjnego wirusa.

STRESZCZENIE

Cykl replikacyjny wirusa grypy składa się z następujących etapów: adsorpcji i penetracji wirusa do komórek gospodarza, importu vRNP do jądra gospodarza, replikacji i transkrypcji vRNP, eksportu potomnych vRNP z jądra komórkowego oraz składania i uwalniania potomnych wirionów.

RNA pełni istotną rolę w wielu procesach namnażania wirusów typu RNA – praktycznie na każdym etapie cyklu. Ważną rolę w funkcjonowaniu RNA odgrywa jego struktura. Często motywy struktury drugorzędowej wielu wirusów są konserwatywne i jest to związane z pełnioną przez nie funkcją. W wirusach zidentyfikowano konserwatywne motywy strukturalne RNA, takie jak: element IRES u wirusów z rodziny *Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Discistroviridae*, a także motywy strukturalne znajdujące się na 5' i 3' UTR wirusa zapalenia wątroby typu C, wirusa Denga. Innymi jest element RRE wirusa HIV, rybozym HDV czy element TLS wirusów roślinnych.

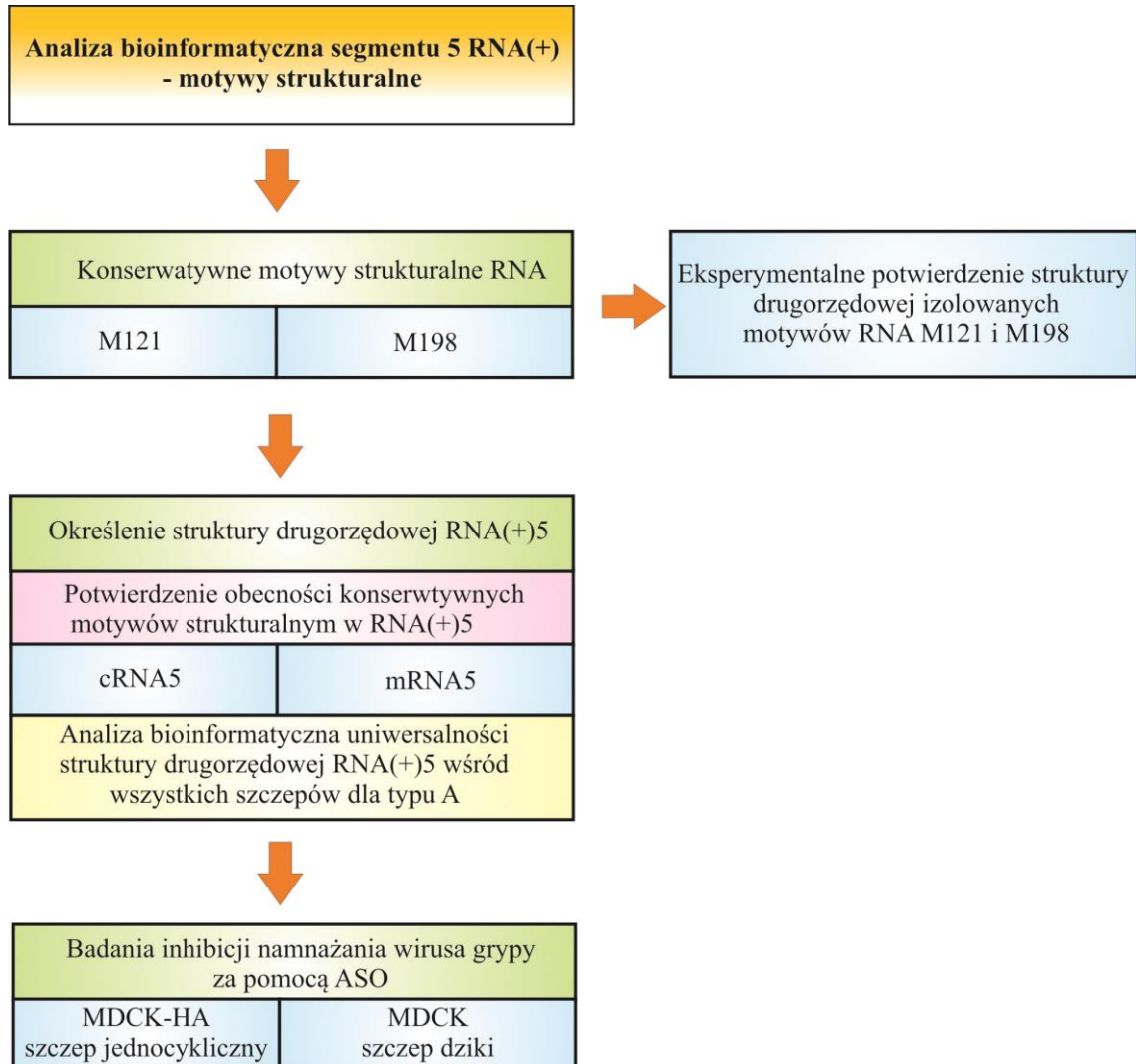
Z tych powodów koniecznym wydaje się poszukiwanie konserwatywnych motywów strukturalnych RNA wirusa grypy, zarówno metodami eksperymentalnymi, jak i bioinformatycznymi. Biorąc pod uwagę dużą zmienność sekwencyjną RNA wirusa grypy konserwatywne motywy strukturalne dają możliwość poznania biologii wirusa. Jednocześnie, wiedza na temat konserwatywnej struktury drugorzędowej RNA wirusa pozwoliłaby na projektowanie nowych alternatywnych leków nacelowanych na dany motyw strukturalny. W wirusie grypy dobrze scharakteryzowany jest motyw strukturalny *panhandle* utworzony przez 5' oraz 3' końce vRNA, motywy strukturalne biorące udział w alternatywnym składaniu mRNA segmentu 7 oraz motyw strukturalny segmentu 8 mRNA.

W roku 2016 po raz pierwszy określono strukturę drugorzędową całego vRNA, był to segment 8 szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) o 82,6% uniwersalności parowania dla wirusa grypy typu A. Dla struktury drugorzędowej pozostałych segmentów, zarówno nici (+), jak i (-) istnieją tylko ich przewidywania bioinformatyczne, często dotyczące jedynie określenia nielicznych konserwatywnych motywów strukturalnych.

Obiektem badań przedstawionym w niniejszej pracy były nowo zidentyfikowane konserwatywne motywy strukturalne: M121, M198 występujące w segmencie 5 RNA(+) oraz cały segment 5 RNA(+) wirusa grypy typu A. Schemat badań przedstawiony jest na załączonej poniżej rycinie. Do badań eksperymentalnych wybrano cRNA segmentu 5 oraz rejon kodujący segmentu 5 modelowego szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Cząsteczka RNA(+) wirusa grypy powstaje w czasie cyklu namnażania wirusa grypy. Genomowy RNA (vRNA) służy, jako matryca do

STRESZCZENIE

syntezy cząsteczek komplementarnych (cRNA). Te, z kolei służą do syntezy potomnych vRNA. Cząsteczka mRNA również powstaje z vRNA, a dalej stanowi matrycę do syntezy wirusowych białek.



Rycina 1. Schemat badań.

W wyniku analiz bioinformatycznych zidentyfikowano dwa rejony segmentu 5 RNA(+), rejon 1–160 oraz 1031–1250 mogące tworzyć trwale termodynamicznie i konserwatywne motywy strukturalne. Nazwano je odpowiednio M121 i M198.

W kolejnym etapie badań otrzymano, poprzez transkrypcję *in vitro*, odpowiednie RNA, które posłużyły do charakterystyki strukturalnej M121 oraz M198. Do określenia i zweryfikowania struktury drugorzędowej wykorzystano metodę SHAPE oraz mapowanie chemiczne z odczynnikami: siarczanem dimetylu, CMCT oraz ketoksalem. Wykonano także mapowanie z użyciem macierzy izoenergetycznych oraz hydrolizę RNA indukowaną RNazą H w obecności oligomeru DNA. Dodatkowo, do badań

STRESZCZENIE

struktury drugorzędowej M121 wykorzystano metodę mapowania enzymatycznego oraz hydrolizę RNA w obecności jonów ołowiu. Po wprowadzeniu wyników uzyskanych z mapowań chemicznych do programu RNAstructure5.5 wygenerowano strukturę drugorzędową M121 oraz M198.

Wykazano, że M121 tworzy wieloramienną pętlę z trzema strukturami typu spinki do włosów. Jedna z nich zawiera czteronukleotydową pętlę oraz długą helisę charakteryzującą się dużą stabilnością termodynamiczną. RNA o konsensusowej sekwencji tworzyło strukturę zgodną z przewidywaniami bioinformatycznymi. Z kolei, M198 składa się z 3 struktur typu spinka do włosów. Pierwsza ze struktur spinkowych (rejon 2-59) była zgodna z analizą bioinformatyczną i charakterystyczna dla typu A wirusa. Pozostałe spinki są zachowawcze dla podtypu H5N1.

W celu weryfikacji modelu struktury drugorzędowej M121 oraz M198 wykonano analizę bioinformatyczną. Przy pomocy programu RNAstructure 5.5 oszacowano prawdopodobieństwo występowania określonych par zasad oraz niesparowanych nukleotydów. Wykazano, że są one wysoce zachowawcze w obu prezentowanych motywach. Porównując modele strukturalne M121 oraz M198 z zestawieniem unikatowych sekwencji dla typu A wirusa grypy wykazano, że pary zasad wykazują odpowiednio 91,0% oraz 86,9% konserwatywności.

Następnie na podstawie modeli struktury drugorzędowej zaprojektowano antysensowe oligonukleotydy w celu hamowania namnażania wirusa grypy. Pod uwagę wzięto wyniki z macierzy izoenergetycznych, które wskazywały miejsca dostępne dla oligonukleotydów. Rejony jednoniciowe potwierdzono wykorzystując hydrolizę RNA indukowaną RNazą H w obecności oligomeru DNA. Antysensowe oligonukleotydy zawierały 2'-O-metylonukleotydy oraz modyfikowane reszty nukleotydowe typu LNA.

Do badań motywu M121 wykorzystano jednocykliczny wirus grypy A/California/04_NYICE_E3/2009 (H1N1) oraz modyfikowane komórki MDCK-HA, w których wirus może się namnażać. Szczep ten wybrano, ze względu na możliwość kontynuacji badań na modelu mysim w laboratorium prof. Luisa Martinez-Sobrido (Wydział Mikrobiologii i Immunologii, University of Rochester, USA). Potencjał przeciwwirusowy oligonukleotydów testowano także w liniach komórkowych MDCK zainfekowanych naturalnym wirusem grypy szczepu A/California/04/2009 (H1N1). Do badań M198 wykorzystano naturalny wirus grypy A/California/04/2009 (H1N1) oraz komórki MDCK. Korzystając z metody immunofluorescencyjnej oraz PCR w czasie rzeczywistym wykazano, że oligonukleotydy antysensowe nacelowane na motyw M121

STRESZCZENIE

znacząco hamowały namnażanie wirusa grypy. Natomiast, oligomery zaprojektowane na podstawie struktury drugorzędowej M198 powodowały nieznaczne obniżenie namnażania wirusa grypy. Sprawdzone, że użyte do badań antysensowe oligomery nie wykazują cytotoksycznego efektu na komórki MDCK.

Badania eksperymentalne potwierdziły istnienie oraz funkcjonalne znaczenie motywu konserwatywnego M121. Zaburzenie strukturalne motywu M121 poprzez wiązanie oligonukleotydów antysensowych wpływa na namnażanie wirusa grypy. Funkcjonalność motywu M198 musi zostać potwierdzona także innymi badaniami (np. mutacjami punktowymi). Położenie (zawiera kodon START) i konserwacja spinki M198 dla typu A wirusa grypy wydaje się przesądzać, że taka struktura drugorzędowa może być istotna w regulacji translacji białka NP.

W kolejnej części badań określono strukturę drugorzędową segmentu 5 RNA(+). Było istotne potwierdzenie czy motywy M121 i M198 stanowią część struktury całego segmentu RNA. Do cząsteczek segmentu 5 RNA(+) należą cRNA oraz mRNA. cRNA segmentu 5 liczy 1565 nukleotydów i uczestniczy w replikacji, natomiast mRNA koduje jedno białko, a mianowicie nukleoproteinę. Dane na temat struktury drugorzędowej opisywanego segmentu były w momencie podjęcia prac szczątkowe i opierające się na bioinformatycznych analizach. Do badań eksperymentalnych wybrano modelowy szczep A/Vietnam/1203/2004 (H5N1).

W początkowym etapie badań przystąpiono do mapowań chemicznych cRNA segmentu 5, z wykorzystaniem takich odczynników jak: siarczan dimetylu, CMCT oraz ketoksal. Ze względu na fakt, iż wirus potrafi namnażać się w różnych temperaturach, badania wykonano w temperaturach 23°C oraz 37°C (*Struktury 23 i 37*). Wykonano także mapowanie z użyciem macierzy izoenergetycznych oraz hydrolizę RNazą H. Po wprowadzeniu wyników uzyskanych z mapowań chemicznych do programu RNAstructure 5.5 wygenerowano modele struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5 o najniższej energii swobodnej i zgodne z danymi eksperymentalnymi. Wykazano, że struktury mapowane w temperaturach 23°C oraz 37°C są niemal identyczne. Różnice dotyczą 4 regionów (283-290/328-334, 577-593, 797-815/1403-1410, 833-907/1245-1256). Wynik ten, świadczy o dużej termodynamicznej stabilności uzyskanych struktur drugorzędowych. Najbardziej termodynamicznie stabilna struktura drugorzędowa cRNA segmentu 5 (mapowana zarówno w temperaturze 23°C, jak i 37°C) charakteryzuje się obecnością domen, a w nich podstawowych motywów strukturalnych RNA, takich jak: dupleksów, spinek do włosów, wybrzuszeń wewnętrznych i pętli

STRESZCZENIE

wieloramiennych. Zauważono, że pięć reszt nukleotydowych z 5' oraz 3' końców pozostaje niesparowanych, ale następne tworzą dupleks.

Strukturę drugorzędową cząsteczki cRNA segmentu 5 rozważano również w oparciu o możliwość fałdowania się RNA w czasie replikacji/transkrypcji, w sytuacji, kiedy 5' koniec RNA jest już syntezowany, natomiast brak jest 3' końca. Dane literaturowe wskazują, że największą odległością dzielącą nukleotydy pary zasad w rybosomie jest 600 nukleotydów. Z tego powodu skorzystano z funkcji „*maximum paring distance - 600*” w programie RNAstructure 5.5, która ograniczała oddziaływania regionów RNA do 600 nukleotydów. Wygenerowano strukturę na podstawie danych z mapowań chemicznych, techniki SHAPE oraz korzystając z funkcji „*maximum paring distance - 600*”. Do analizy wykorzystano dane eksperymentalne uzyskane w temperaturze 23°C. Wygenerowana struktura (*Struktura 600*) charakteryzuje się wolnym 5' końcem oraz obecnością przy 3' końcu helisy 1421-1430/1553-1562 oraz 4 struktur typu spinki do włosów, a mianowicie: 1433-1451, 1453-1477, 1478-1528, 1530-1552. Pozostałe motywy strukturalne są zgodne z modelami *Struktury 23* oraz *Struktury 37* (wprowadzone dane z mapowań w odpowiedniej temperaturze bez dodatkowego parametru „*maximum paring distance - 600*”).

Wydaje się, że struktura uzyskana bez dodatkowego parametru „*maximum paring distance - 600*” jest ważna na etapie rozpoznania promotora przez wirusową polimerazę. Wirusowa polimeraza rozpoznaje oddziałujące ze sobą 3' i 5' końce cRNA. W *Strukturze 23* oraz *37* takie oddziaływania są możliwe. Wiadomo także, że replikacja czy też transkrypcja wirusowych RNA są procesami bardzo dynamicznymi. Możliwe jest, że na innym etapie cyklu dochodzi do rearanżacji struktury i funkcjonalna staje się *Struktura 600*.

Obecność rejonów jednoniciowych w modelach struktury cRNA segmentu 5 została dodatkowo sprawdzona przy użyciu metody hydrolizy RNazą H w obecności oligomerów DNA oraz wykorzystaniu metody mapowania mikromacierzowego przy użyciu macierzy izoenergetycznych. Metody te dodatkowo wskazywały rejonu dostępne dla oligonukleotydów.

W celu weryfikacji modeli struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5 wykonano analizę bioinformatyczną. Przy pomocy programu RNAstructure 5.5 określono prawdopodobieństwo występowania par zasad oraz niesparowanych nukleotydów.

STRESZCZENIE

Wykazano, że wspólne motywy strukturalne wszystkich trzech modeli (*Struktura 23*, *Struktura 37*, *Struktura 600*) są wysoce prawdopodobne.

Wykonano również analizę bioinformatyczną zachowawczości par zasad struktury drugorzędowej dla typu A wirusa grypy. Dało to obraz uniwersalności struktury dla typu A wirusa. Porównując modele strukturalne cRNA segmentu 5 z zestawieniem liczącym 15533 sekwencji wirusa grypy pokazano, że pary zasad wykazują odpowiednio 85,4% konserwatywności dla *struktury 23*, oraz 85,8% konserwatywności dla *struktury 600*. Co więcej, analiza bioinformatyczna wykazała występowanie kompensacyjnych mutacji w motywach wspólnych (te same motywy stanowią około 85% par zasad), które związane są ze zmiennością sekwencyjną przy zachowaniu struktury drugorzędowej. Prezentowany model struktury drugorzędowej jest w wysokim stopniu uniwersalny dla typu A wirusa grypy. Zachowawczość struktury motywów najprawdopodobniej wiąże się z pełnioną przez nie ważną biologiczną funkcją.

Region kodujący segmentu 5 RNA(+) posiada taką samą sekwencję, jak rejon od 46 do 1539 nukleotydu cRNA segmentu 5. Wykazano, że obie cząsteczki fałdują się w niemal identyczne struktury. Jedyne różnice stanowią regiony 577-593 oraz 833-931 (numeracja podana dla cRNA segmentu 5). Sugeruje się, że zmiana struktury w wymienionych rejonach może być związana z brakiem końców niekodujących. Zarówno struktura 5' i 3' końców UTR, jak i potencjalnie labilne strukturalnie rejony segmentu 5 RNA(+) mają najprawdopodobniej znaczenie funkcjonalne, na przykład, wpływając na aktywność mRNA.

W ostatnim etapie badań, na podstawie prezentowanych modeli struktur segmentu 5 RNA(+) oraz rejonu kodującego segmentu 5, a także wykorzystując wiedzę o miejscach hybrydyzacji oligonukleotydów do mikromacierzy izoenergetycznych i eksperymentów z RNazą H zaprojektowano antysensowe oligonukleotydy. Nowe oligomery zaprojektowano tak, aby były komplementarne do niesparowanych oraz labilnych strukturalnie regionów modeli badanych cząsteczek RNA i rejonów innych niż motywy M121 i M198.

Potencjał inhibujący antysensowych oligonukleotydów badano wykorzystując linie komórkową MDCK, wirus grypy szczepu A/California/04/2009 (H1N1) oraz metodę immunofluorescencyjną i PCR w czasie rzeczywistym. Wykazano, że oligomer 727A komplementarny do rejonu (722-732, numeracja podana dla cRNA segmentu 5) hamuje namnażanie wirusa grypy w ponad 87%, a oligomer 400A o 63%. Antysensowe oligonukleotydy 600A, 615A, 640A, 760A (komplementarne odpowiednio do rejonów:

STRESZCZENIE

591-608, 609-621, 628-644, 745-763, numeracja podana dla cRNA segmentu 5) hamowały namnażanie wirusa grypy dwukrotnie. Można przypuszczać, że motywy strukturalne, na które zostały nacelowane skuteczne oligonukleotydy antysensowe są rzeczywiście istotne w namnażaniu wirusa grypy.

ABSTRACT

ABSTRACT

Influenza virus is a research objects of many laboratories. Influenza A virus is a threat to humans due to seasonal epidemics and infrequent, but dangerous, pandemics that lead to widespread infection and death. There is no enough efficient drug to deal with flu. New vaccine is needed every year and any universal one doesn't exist. Also, influenza virus can generate new strains which are resistance to drugs targeting protein. The alternative therapy could be one targeting virus RNA instead of protein.

Influenza is a member of the *Orthomyxoviridae* family. Members of this family contain genome build with single-stranded viral RNA segments of negative polarity.

Three types of the influenza virus can be distinguished: A, B and C. Additionally, the influenza A virus is divided into subtypes based on two viral surface proteins: hemagglutinin and neuraminidase. There are 18 different hemagglutinin and 9 different neuraminidase subtypes. Type A is responsible for seasonal flu epidemics each year and occasional pandemics. Types B and C are less threat to human.

Viral particles of all influenza viruses are made of a viral envelope containing hemagglutinin, neuraminidase and M2 protein. Viral capsid is made of M1 protein. The central core contains the viral RNA genome, nucleoprotein (NP) and viral polymerase (PB1, PB2, PA). This complex forms ribonucleoprotein (vRNP). NS1, NS2 (NEP), PB1-F2 are also important in influenza life cycle. In the last years, new viral protein: PB2-S2, N40, PA-X, PA-N155 and PA-N182 were identified.

Influenza virus's genome consist of eight single-stranded viral RNA segments of negative polarity (vRNA). Segments differ in length and encode all viral proteins.

Influenza life cycle can be divided into 5 stage: entry into the host cell, import vRNA to nucleus, replication and transcription, export of vRNPs from the nucleus, assembly and budding at the host cell's plasma membrane.

RNA take part in every process of viral life cycle, such as replication and transcription. It is postulated that RNA adopt specific secondary structure that is necessary to propagate new viral particle. Secondary structure RNA motifs are often conserved in many viruses such as: IRES in *Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Discistroviridae* as well as RRE in HIV, motifs at 5' and 3' UTR HCV and Dengue virus, HDV ribozyme and TLS in plant viruses.

It is huge need to search new influenza RNA motifs using bioinformatics and experimental methods. For understanding role of RNA in virus's life cycle and

ABSTRACT

designing new drug the information about RNA secondary structure is of critical importance. There are some well-known motifs in influenza virus RNA: *panhandle* motifs at 5' and 3' of vRNA, motif taking part in splicing of segment 7 mRNA and motif in segment 8 mRNA.

In 2016 secondary structure entire influenza RNA segment was published for the first time. It was segment 8 vRNA of strain A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) that has thermodynamically stable and evolutionarily conserved RNA structure (82,6%). Beside, bioinformatics analysis predicts probability of existence structure motif in RNA(+) and RNA(-) for other RNA segments of influenza.

The aim of the study was to determine secondary structure of new conserved motifs in segment 5 RNA(+) (M121 and M198) and secondary structure of entire segment 5 RNA(+) [cRNA and coding region of model strain A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)]. In influenza virus cRNA and mRNA, take part in viral life cycle. Replication begins with vRNA acting as a template to produce a cRNA intermediate which in turn becomes the template for producing more vRNA strands. The viral polymerase is also capable of using vRNA for producing mRNA.

Two regions (1-160, 1031–1250) were identified by bioinformatics analysis as capable to form potential conserved, thermodynamic stable structure motifs in influenza virus A.

Next, M121 and M198 were synthesized *in vitro* for structure mapping. RNAs were chemically mapped using SHAPE method and dimethyl sulfate, CMCT and kethoxal. Moreover, the isoenergetic microarrays, selective hydrolysis with ribonuclease H were used to study secondary structure of M121 and M198. Additionally, enzymatic mapping and lead cleavage were used for mapping of M121. M121 and M198 secondary structures were determined after introduction data from SHAPE and chemical mapping into RNAstructure 5.5 program.

M121 consists of three hairpins with one being especially thermodynamically stable. This structure was the same as structure predicted by bioinformatics analysis. M198 consist of three hairpins with one (2-59) being especially conserved among Influenza A virus. Others two hairpins were characteristic for H5N1 subtype.

In order to verify the accuracy of secondary structures of M121 and M198, the bioinformatics analysis was made. Using RNAstructure 5.5 the probability of base pairing and single stranded regions was calculated. The study show that predict base pairing and the single stranded regions are very probable in M121 and M198.

ABSTRACT

Furthermore, the bioinformatics analysis unique sequence of M121 and M198 for type A revealed that the proposed M121 and M198 motifs showed respectively 91,0% and 86,9% structure conservation among influenza A strains.

On the basis of secondary structure of M121 and M198 antisense oligonucleotides were designed to inhibit influenza propagation. Targeting regions were chosen based on analysis of microarray mapping with isoenergetic microarrays results and selective hydrolysis with ribonuclease H. All antisense oligonucleotide consisted of 2'-O-methyl-RNA and some of them contained LNA modifications.

For studying oligonucleotides targeting M121, single-cycle infectious influenza A virus A/California/04_NYICE_E3/2009 (H1N1) and MDCK-HA cell line were used. The strain was chosen due to collaboration and the possibility to do the future research in mice model in Luis Martinez-Sobrido laboratory (Department of Microbiology and Immunology, University of Rochester, USA). For studying oligomers targeting M121 and M198 also natural virus A/California/04/2009 (H1N1) was used. Immunofluorescent method and real-time PCR showed that antisense oligonucleotides targeting M121 significantly inhibit influenza propagation, but oligonucleotides targeting M198 insignificantly inhibit influenza propagation. In the last step, oligonucleotides were proved to be not cytotoxic for cells.

Experiments revealed that M121 is important in influenza life cycle. Rearrangement of structure M121 by antisense oligonucleotide led to stop viral propagation. For showing role of M198 in influenza life cycle, more study is needed, for example point mutations. Position of hairpin in M198, containing START codon and conservation of structure let to assume that M198 takes part in regulating of translation of NP protein.

In the next part of study, secondary structure of segment 5 RNA(+) was determined. It was important to confront if M121 and M198 motifs exist in entire structure of segment 5 RNA(+). Segment 5 RNA(+) can be divided to cRNA and mRNA. cRNA5 consist of 1565 nucleotides and is needed in replication, mRNA5 encodes nucleoprotein. Knowledge of influenza secondary structure of segment 5 RNA(+) was limited at the time the research started, only bioinformatics predictions were published. For studying segment 5 RNA(+) secondary structure a model strain A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) was chosen.

In vitro synthesized cRNA5 was chemically mapped using SHAPE method and dimethyl sulfate, CMCT and kethoxal. Experiments were conducted in 23°C and 37°C due to fact that influenza can propagate in different temperatures. Also, the isoenergetic

ABSTRACT

microarrays and selective hydrolysis with ribonuclease H were used to study secondary structure of cRNA5. Experimental data from chemical mapping were introduced to RNAstructure 5.5 to generate structures with the lowest free energies and agreeing with experimental data.

Structures mapping in 23°C and 37°C (*Structure 23* and *Structure 37*) were almost identical. Only four regions (283-290/328-334, 577-593, 797-815/1403-1410, 833-907/1245-1256) were different in these structures. *Structure 23* and *37* consist of domains with characteristic RNA structural motifs such as helices, hairpins, bulges, internal loops. Five nucleotides from 5' and 3' end are unpaired, next nucleotides create helices.

Secondary structure of cRNA5 was also considered in the circumstances in which RNA is synthesizing and folding at the same time. Data show that 600 nucleotides is a maximum distance between two nucleotides in base pair in ribosome. For that reason „*maximum pairing distance - 600*” function was used in RNAstructure 5.5, preferring pairing in local region no more than 600 nucleotides. Structure 600 was predicted using data from chemical mapping at 23°C and „*maximum pairing distance - 600*” function (*Structure 600*). 5' end of *Structure 600* is unpaired, 3' end consist of helix and four hairpins 1433-1451, 1453-1477, 1478-1528, 1530-1552. Besides this regions, remaining motifs are the same as in *Structures 23* and *37*.

Structure 23 or *37* could be recognized by viral polymerase because this enzyme identifies specific structure - promotor at 3' and 5' of cRNA. On the other hand, structure could be changed during life cycle and structure 600 could be functional.

In order to verify single stranded region in cRNA5 models, isoenergetic microarrays and selective hydrolysis with ribonuclease H were used. Additionally, this method show regions accessible for oligonucleotides.

In order to verify the accuracy of cRNA5 secondary structures models, the bioinformatics analysis was made. Using RNAstructure 5.5 the probability of base pairing and the present of single stranded regions was calculated. The study showed that the same motifs in all models were probable. Moreover, the bioinformatics analysis of 15533 unique sequence of cRNA5 from NCBI database revealed that the proposed models showed respectively 85,4% (*Structure 23*) and 85,8% (*Structure 600*) conservation among influenza A strains. The analysis also showed that mutations (consistent and compensatory) preserve secondary structure. The data showed that

ABSTRACT

proposed cRNA5 models could be conserved among influenza A strains. Conservation of secondary structure could be link with biological function.

Coding region of segment 5 respond to region 46 – 1539 of cRNA5. Structure of coding region and entire cRNA5 were almost identical. Only structures of two regions (577-593, 833-931) were different. It let to assume that lack of 3' and 5' ends could generate the difference. Both, structures of 3'and 5' UTR ends and structural labile regions could be functional, for example in mRNA5.

In the last stage of study, based on cRNA and coding region secondary structure models, experiments with isoenergetic microarrays and ribonuclease H cleavages results, antisense oligonucleotides were designed. Oligomers were complementary to unpaired and structural labile regions.

For studying oligonucleotides targeting segment 5 RNA(+) the influenza A virus A/California/04/2009 (H1N1) in MDCK cell line and immunofluorescent method together with real-time PCR were used. From tested oligonucleotides targeting different motifs than M121 and M198, oligomer 727A and 400A decreased influenza propagation respectively about 87% and 63%. Two times decreasing of propagation of influenza virus caused oligomers 600A, 615A, 640A, 760A. The cells experiments results of viral life cycle inhibition indicate the functionality of the secondary structure motifs of segment 5 RNA(+) targeted by effective oligonucleotides.

WSTĘP LITERATUROWY

1. Wprowadzenie

Wirus grypy jest obiektem zainteresowania wielu grup badawczych na całym świecie. Przyczyną tego stanu rzeczy jest fakt, że coroczne epidemie grypy pochłaniają wiele ofiar śmiertelnych, a powikłana pogrypowe są równie groźne i mogą powodować trwałe uszczerbek na zdrowiu. Ponadto, wirus posiada tendencje do wywoływania pandemii. Wielkie żniwo ofiar śmiertelnych wśród ludzi oraz zwierząt pochłonęły pandemie znane pod nazwą: grypa „hiszpanka”, ptasia grypa oraz świńska grypa (1).

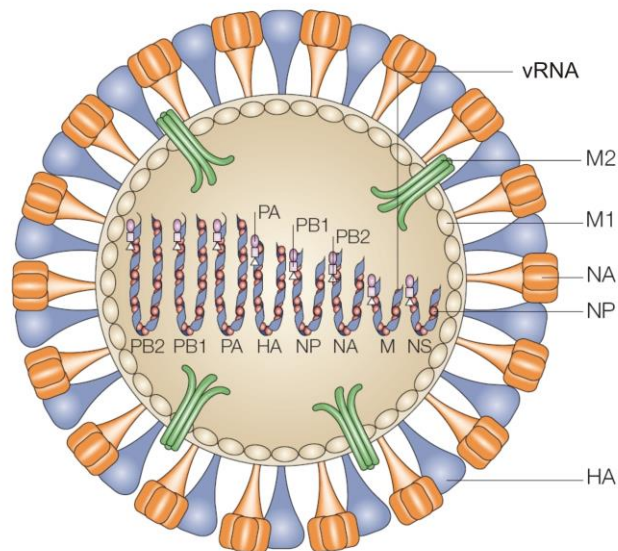
Dlatego też ważny jest rozwój metod leczenia oraz zapobiegania chorobom wirusowym. Obecnie stosuje się najczęściej dwa podejścia: szczepienie, zapobiegające ewentualnej infekcji oraz podawanie różnego rodzaju terapeutyków, które mają na celu hamowanie namnażania się wirusów wewnątrz zakażonego organizmu (2). Z powodzeniem stosuje się szczepionki przeciw m.in.: chorobie Heinego-Medina, odrze, wirusowemu zapaleniu wątroby typu B (3-5). Niestety, przeciw wirusowi grypy, mimo usilny prac wielu zespołów badawczych, nie udaje się stworzyć uniwersalnej szczepionki. Corocznie dostępne szczepionki sezonowe zabezpieczają jedynie przed wybranymi szczepami wirusa grypy. Dzieje się tak, gdyż w genomie wirusa grypy dochodzi do nagromadzenia się mutacji punktowych, co jest przyczyną corocznej zmienności wirusa (6).

Ważny jest rozwój szerokiej gamy preparatów wykorzystywanych, jako biofarmaceutyki, które byłyby nakierowane na różne komponenty biorące udział w namnażaniu wirusa. Dla przykładu, w przypadku wirusa HIV stosuje się inhibitory odwrotnej transkryptazy, proteazy oraz integrazy wirusa (7). Podobnie, w przypadku wirusa grypy używa się głównie inhibitory działające na białka wirusowe. Dostępne są preparaty blokujące białka M2 takie jak amantadyna i rymantadyna czy też leki działające na powierzchniową glikoproteinę, jaką jest neuraminidaza, takie jak: zanamivir, oseltamivir oraz peramivir. Jednak zidentyfikowano szczepy odporne na wyżej wymienione farmaceutyki. Obecnie brakuje skutecznego leku przeciw wirusowi grypy (8).

2. Budowa wirusa grypy

Rodzinę *Orthomyxoviridae*, do której należy wirus grypy typu A, stanowią wirusy posiadające otoczkę i materiał genetyczny w postaci jednoniciowego, antysensownego, podzielonego na segmenty RNA.

W klasyfikacji wirusa grypy wyróżnia się 3 główne typy: A, B oraz C. Typ A jest odpowiedzialny za sezonowe epidemie oraz okazjonalne pandemie. Natomiast pozostałe typy wirusa grypy stanowią mniejsze zagrożenie dla człowieka. Typ A można podzielić na kilka podtypów, które klasyfikowane są w zależności od odmiany powierzchniowych glikoprotein: hemaglutyniny i neuraminidazy. Znanych jest 18 typów hemaglutyniny i 9 rodzajów neuraminidazy.



Rysunek 1. Schemat budowy wirionu wirusa grypy. Wirion posiada postać kulistą. Otoczkę wirusa zaznaczono kolorem białym. W niej umieszczone są: neuraminidaza (NA), hemaglutynina (HA), białko M2. Kapsyd tworzy białko M1. We wnętrzu wirionu znajduje się vRNA w kompleksie z nukleoproteiną (NP) oraz trzema podjednostkami wirusowej polimerazy (PB1, PB2, PA) (9).

Wiriony wirusa grypy przyjmują różne kształty, od kulistych po sferyczne (Rysunek 1). Otoczone są dwuwarstwą lipidową, która pochodzi z błony komórkowej gospodarza. Około 80% jej białek stanowią hemaglutynina i neuraminidaza, której jest 4-krotnie mniej. Białko M2 występuje w ilości od 16 do 20 cząstek na wirion (10).

Hemaglutynina oraz neuraminidaza są najbardziej zmiennymi białkami wirusa grypy. Hemaglutynina jest podstawowym antygenem wirusowym, umożliwia wirusowi wniknięcie do komórek nabłonkowych. Z kolei neuraminidaza jest enzymem, który rozszczepia reszty kwasu sialowego, przez co możliwe jest uwolnienie nowo

WSTĘP LITERATUROWY

powstałych wirusów. Ponadto, umożliwia przyłączenie się wirusa do komórek nabłonka w czasie infekcji.

Białko M2 tworzy kanał jonowy, który otwiera się w niskim pH, wywołując przepływ protonów, konieczny do uwolnienia wirusowego materiału w trakcie infekcji. Białko M1 określane jest białkiem macierzowym, gdyż tworzy kapsyd otaczający rdzeń wirusa grypy, a także bierze udział w procesie pakowania cząsteczek wirusa, pączkowania oraz transporcie jądrowym.

Rdzeń wirusa stanowi RNA chroniony przez nukleoproteinę oraz kompleks wirusowej polimerazy. Kompleks RNA, wirusowej polimerazy oraz nukleoproteiny określa się, jako rybonukleoproteinę (vRNP). Nukleoproteina jest głównym białkiem strukturalnym. Bierze udział w transkrypcji, replikacji, pakowaniu wirionu, transporcie wirusowych cząstek. Oddziałuje z wirusową polimerazą, białkiem M2, aktyną, komórkowymi białkami zaangażowanymi w transport jądrowy, jądrową RNA helikazą oraz wieloma innymi białkami komórkowymi.

RNA zależna wirusowa polimeraza RNA składa się z trzech podjednostek: PB1, PB2 oraz PA. PB1 zawiera aktywność polimerazową, podczas gdy podjednostki PB2 oraz PA/P3 są odpowiedzialne odpowiednio za wiązanie kapu oraz jego odcięcie od mRNA gospodarza.

W cyklu namnażania wirusa ważne są także białka NS1 oraz NS2 (NEP), PB1-F2. Pierwsze jest wielofunkcyjnym białkiem, które m.in. hamuje komórkową odpowiedź interferonową we wczesnym stadium infekcji. Natomiast białko NS2 bierze udział w transporcie jądrowym wirusowych cząsteczek. Z kolei, PB1-F2 m.in. odgrywa rolę w modyfikacji komórkowej odpowiedzi immunologicznej oraz wywołuje apoptozę makrofagów oraz limfocytów T.

W ostatnich latach odkryto nowe wirusowe białka. PB2-S2 powstaje na drodze alternatywnego składania mRNA segmentu 2. Lokalizuje się w mitochondriach, wykazano jego rolę w hamowaniu komórkowej odpowiedzi interferonowej. N40 oraz PA-X są kodowane odpowiednio przez segment 1 oraz 3. Rola pierwszego białka nie jest znana, natomiast PA-X bierze udział w wyciszaniu genów gospodarza. Odkryto także nowe formy białka PA, określane PA-N155 oraz PA-N182. Wykazano ich udział w cyklu replikacyjnym wirusa grypy (11-21).

Genom wirusa A grypy złożony jest z 8 segmentów RNA (vRNA), które liczą od 890 do 2341 nukleotydów i koduje co najmniej 13 białek potrzebnych do efektywnej replikacji wirusa w komórkach gospodarza (22). Segmenty 1, 2 oraz 3 kodują wirusową

WSTĘP LITERATUROWY

polimerazę. Ponadto, segmenty 1 i 2 kodują odpowiednio białko PB2-S1 oraz PB1-F2. Informacja o budowie hemaglutyniny, neuraminidazy oraz nukleoproteiny jest zapisana odpowiednio w segmentach 4, 5 i 6. Segment 7 wykorzystuje mechanizm alternatywnego składania mRNA. W wyniku tego procesu powstaje białko MS1 oraz jego skrócona wersja - białko MS2. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku białka NS1 oraz NS2 kodowanych przez najkrótszy segment wirusa grypy, segment 8 (10).

Wszystkie wirusowe vRNA charakteryzują się podobną organizacją. Centralna część vRNA stanowi otwarta ramka odczytu, cechująca się antysensowną orientacją. Otoczona jest przez krótkie rejony nieulegające translacji o długości od 19 do 58 reszt nukleotydowych. Końce 5' oraz 3' w każdym segmencie są wysoce konserwatywne oraz częściowo komplementarne do siebie (23). Tworzą strukturę zwaną „panhandle” charakterystyczną dla RNA wirusa grypy.

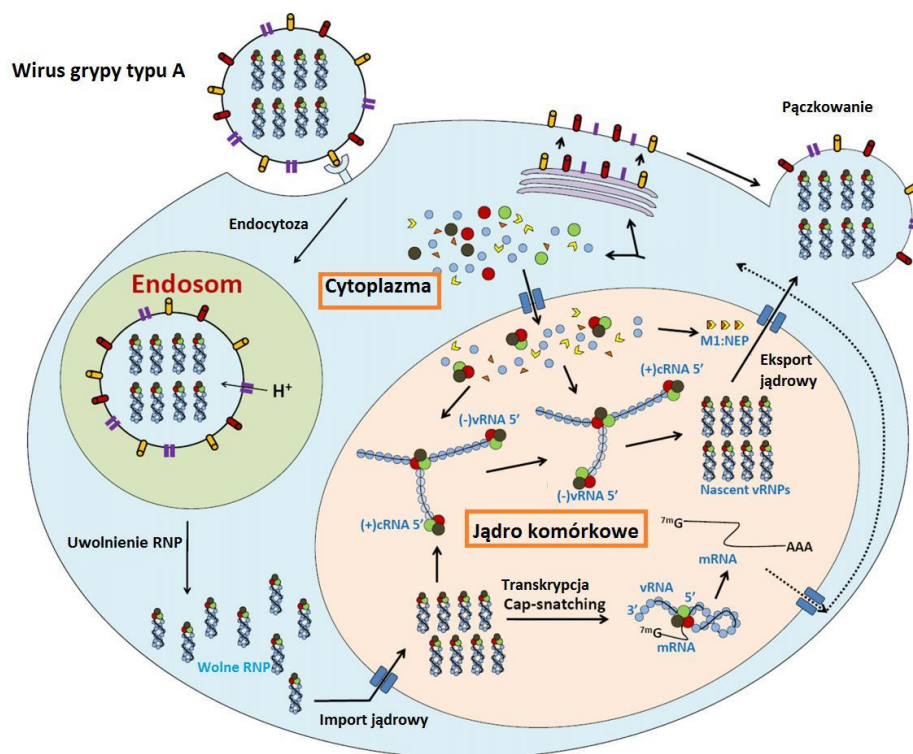
3. Cykl replikacyjny wirusa grypy

Wirus grypy atakuje nabłonek górnych dróg oddechowych wielu ssaków oraz ptaków. Do zakażenia dochodzi drogą kropelkową. Cykl replikacyjny wirusa grypy składa się z kilku etapów. Wiele z nich nie jest do końca scharakteryzowanych.

Pierwszym etapem cyklu replikacyjnego wirusa grypy jest wejście do komórek gospodarza (Rysunek 2). Na tym etapie ważną rolę odgrywa hemaglutynina, która rozpoznaje receptory obecne na powierzchni komórek gospodarza. Receptory te składają się z N-, O-glikoprotein oraz glikolipidów, a ich końcową resztę stanowi kwas sialowy. Dla rozpoznania receptorów istotne jest wiązanie między kwasem sialowym i galaktozą. Wirus grypy rozpoznaje wiązania $\alpha(2,6)$ oraz $\alpha(2,3)$ – glikozydowe. Pierwsze wiązanie jest charakterystyczne dla ludzkiego nabłonka górnych dróg oddechowych, natomiast drugie wiązanie jest spotykane u ptaków. Nabłonek górnych dróg oddechowych świni zawiera oba rodzaje wiązań, dlatego też, zwierzę to może być infekowana zarówno przez ludzkie jak i ptasie wirusy grypy (24).

Po związaniu wirusa do reszty kwasu sialowego, dochodzi do endocytozy, na skutek, której wirus wnika w endosomie do komórki gospodarza. Kwaśne środowisko endosomu wywołuje otwarcie kanału jonowego tworzonego przez białko M2 oraz zmiany konformacyjne hemaglutyniny, w wyniku, czego dochodzi do fuzji błony endosomu i otoczki wirusa. Ponadto, białko M1 uwolnienia vRNP, które dostaje się do cytoplazmy komórki gospodarza (25, 26).

WSTĘP LITERATUROWY



Rysunek 2. Cykl replikacyjny wirusa grypy (12).

Białka wchodzące w skład vRNP: NP, PA, PB1 oraz PB2 zawierają sygnał lokalizacji jądrowej, dzięki czemu vRNP rozpoznawany jest przez komórkową maszynę transportującą (27).

Replikacja oraz transkrypcja wirusowych RNA zachodzi w jądrze komórkowym. Oba procesy są przeprowadzane przez RNA zależną wirusową polimerazę, składającą się z podjednostek PA, PB1 oraz PB2. W reakcjach tych nie można pominąć roli nukleoproteiny. Każdy segment traktowany jest, jako niezależna jednostka replikacyjno-transkrypcyjna. Do zapoczątkowania replikacji enzym nie wymaga startera, natomiast konieczne są oddziaływania końca 5' oraz 3' wirusowego RNA. W wyniku replikacji tworzone są cząsteczki komplementarne do genomu (cRNA), które z kolei stanowią matrycę do syntezy potomnych vRNA (28).

W pierwszym etapie transkrypcji wirusowych RNA dochodzi do przyłączenia kapu do 5' końca wirusowych mRNA. Kap wraz z odcinkiem od 10 do 15 nukleotydów zostaje odcięty od mRNA gospodarza przez białko PB2, które zawiera aktywność endonukleazy. Proces ten określa się, jako „kradzież kapu” (ang. *cap snatching*). Fragment liczący od 10 do 15 nukleotydów stanowi starter, który jest niezbędny do inicjacji transkrypcji (29). Wirusowe mRNA zawiera także ogon poli A, który jest syntezowany przez wirusową RNA zależną polimerazę. Każdy wirusowy vRNA

WSTĘP LITERATUROWY

zawiera od 5 do 7 reszt U przy 5' końcu. Uważa się, że polimeraza przesuwa się po tym fragmencie kilkunastokrotnie, co umożliwia syntezę ogona poli-A na 3' końcu wirusowych mRNA (30).

Segmenty 2, 7 oraz 8 podlegają procesom alternatywnego składania mRNA. Wirus grupy wykorzystuje komórkową maszynię do alternatywnego składania mRNA, a także blokuje składanie komórkowych mRNA (31).

Dojrzały wirusowy mRNA transporowany jest do cytoplazmy i na jego matrycy dochodzi do syntezy białek wirusowych z wykorzystaniem komórkowej maszyny translacyjnej. Białka M1, NEP, polimeraza oraz nukleoproteina akumulowane są w jądrze komórkowym, oddziałują z nowo powstałymi vRNA tworząc kompleks vRNP. Następnie odbywa się eksport do cytoplazmy (32).

Kolejny etapem cyklu wirusa grypy jest składanie potomnych wirusów. Proces rozpoczyna się od oddziaływania hemaglutyniny, neuraminidazy oraz białka M1, następnie odbywa się transport wirusowych cząstek do apikalnej błony komórkowej komórki nabłonka. Białko M1 oddziałuje z vRNP. Sugeruje się ściśle uporządkowany sposób pakowania wirusowych vRNA. Przemawiają za tym obecność sygnałów pakowania na 3' oraz 5' końcach wirusowych vRNA. Przy uwolnieniu potomnych wirionów ważne są: białko M2 oraz neuraminidaza. Białko M2 odgrywa rolę w odcięciu błony komórkowej z komórki nabłonkowej gospodarza, a neuraminidaza odcina resztę kwasu sialowego od glikolipidów oraz glikoprotein. Nowo powstałe wirusy są zdolne do infekcji kolejnych komórek nabłonka (33, 34).

4. Konserwatywne motywy strukturalne wybranych wirusów RNA

RNA pełni istotną rolę w wielu procesach życiowych wirusów typu RNA – praktycznie na każdym etapie cyklu replikacyjnego. Ważną rolę w funkcjonowaniu RNA odgrywa jego struktura, która w porównaniu z DNA wykazuje dużą różnorodność funkcji oraz budowy. Istotna jest zarówno sekwencja nukleotydowa (struktura pierwszorzędowa), jak i struktura drugorzędowa oraz przestrzenna (trzeciorzędowa) RNA - w procesach, w jakich bierze udział. W przypadku, gdy RNA tworzy kompleksy z białkiem, ważne jest nie tylko dopasowanie sekwencji, ale również dopasowanie struktury przestrzennej (35).

Powstanie funkcjonalnych motywów strukturalnych w wirusowym RNA wynika z cech samego RNA. RNA zbudowany jest z pojedynczego łańcucha nukleotydowego,

który w procesie formowania fałduje się tworząc fragmenty helikalne oraz inne motywy struktury drugorzędowej i trzeciorzędowej. Głównym motywem strukturalnym kwasów rybonukleinowych jest podwójna helisa (dupleks) utworzona przez komplementarne pary zasad. Tworzą ją dwa łańcuchy rybonukleotydowe ułożone antyrównolegle względem siebie. W przeciwieństwie do DNA, gdzie fragmenty helikalne tworzą prawie całą strukturę cząsteczki, w RNA odcinki te stanowią nieco ponad 50% wszystkich elementów strukturalnych. Pozostałymi elementami struktury drugorzędowej są: pojedyncze niesparowania, wybrzuszenia jednostronne i dwustronne, terminalne niesparowanie nukleotydy, struktury spinki do włosów, pseudowęzły oraz pętle wieloramienne. Pseudowęzły, chociaż związane ze strukturą drugorzędową można zaliczyć do oddziaływań trzeciorzędowych, związanych z budową przestrzenną cząsteczki RNA. Wszystkie wymienione motywy strukturalne mają wpływ na trwałość i stabilność struktury RNA. Często motywy struktury drugorzędowej wielu wirusów są konserwatywne, co związane jest z pełnioną przez nie funkcją (36).

4.1. Element IRES

Ponad 25 lat temu, w czasie badań nad replikacją wirusa polio odkryto alternatywny mechanizm inicjacji translacji, który pozwalał szerokiej gamie wirusów na rozpoczęcie syntezy białek z wykorzystaniem rybosomów i czynników translacyjnych gospodarza. Proces odbywał się mimo braku kapu na 5' końcu wirusowego mRNA oraz bez skanowania w poszukiwaniu kodonu AUG. Okazało się, że mechanizm jest powszechny dla wirusów.

Obecnie wiadomo, że alternatywny mechanizm inicjacji translacji polega na wiązaniu małej podjednostki rybosomu zainfekowanej komórki do 5' UTR wirusa. Następnie dochodzi do złożenia kompleksu inicjacyjnego i przeprowadzenie syntezy białek. Region wirusowego RNA oddziałujący z podjednostką rybosomu nazwano elementem IRES (ang. *internal ribosome entry site*). Genomy różnych wirusów wykazują obecność konserwatywnych motywów strukturalnych w rejonie elementu IRES. Co więcej, aktywność elementu IRES jest ściśle zależna od jej struktury drugorzędowej (37).

- Element IRES rodziny *Flaviviridae*

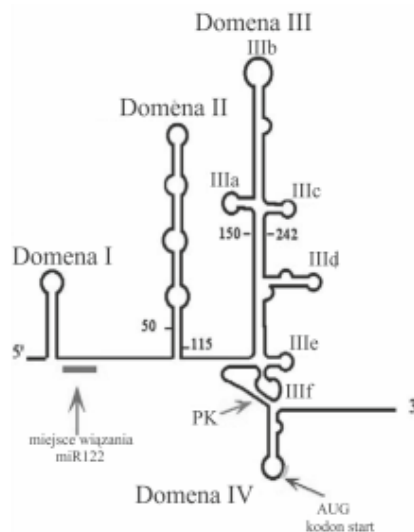
Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV ang. *hepatitis C virus*) należy do rodzaju *Hepacivirus*, który jest członkiem rodziny *Flaviviridae*. Posiada pojedynczą nić RNA o dodatniej polarności, o długości około 9,5 kb. Analiza genomu HCV wyizolowanego od

WSTĘP LITERATUROWY

chorych wykazała, że sekwencja IRES jest najbardziej konserwatywnym rejonem w genomie (38). Co więcej motywy strukturalne elementu IRES są konserwatywne wśród *Hepacivirus*, *Pestivirus*, a także wśród niektórych członków rodziny *Picornaviridae* (39).

Element IRES ma długość 340 nukleotydów zajmujących większość regionu 5' UTR oraz pierwsze 30-40 regionu kodującego (Rysunek 3). Zawiera konserwatywne pod względem struktury drugorzędowej motywy tworzące funkcjonalne domeny II, III, IV, które z kolei są podzielone na krótkie poddomeny. Domena II zawiera dwie poddomeny IIa oraz IIb, których łączna długości wynosi 75 nukleotydów. Omawiane poddomeny formują strukturę spinki do włosów z trzema wybrzuszeniami oraz pętlą apikalną. Badania wykazały, że domena II znacznie zwiększa aktywność całego IRES, natomiast nie jest niezbędna do rozpoczęcia syntezy białek (40). Domena III jest największą strukturą elementu IRES. Składa się z kilku helis oraz spinek do włosów nazywanych III a-f. Ciekawa jest poddomena IIIf, która współtworzy pseudowęzeł. Obecność pseudowęzła znajdującego się powyżej kodonu start AUG jest cechą typową dla HCV. W czasie inicjacji translacji domena III odpowiada za odpowiednie umiejscowienie kodonu start w prawidłowym miejscu podjednostki 40S rybosomu.

W badaniach nad HCV wykazano także, że konserwatywne struktury drugorzędowe leżące na 5' UTR biorą udział także w replikacji. Zaobserwowano, że 40 pierwszych nukleotydów z 5' końca oraz domena II wchodząca w skład elementu IRES są konieczne do przeprowadzenia procesu replikacji. Natomiast domeny III oraz IV elementu IRES nie są wymagane do efektywnego przeprowadzenia replikacji (41).



Rysunek 3. Struktura drugorzędowa 5' UTR HCV, PK-pseudowęzeł (37).

WSTĘP LITERATUROWY

Zespół badawczy Pestova oraz Hellen zaproponował oddziaływania między konserwatywnymi motywami elementu IRES, czynnikami translacyjnymi, białkami rybosomu oraz rybosomem. Wykazano, że inicjacja translacji jest niezależna od takich czynników translacyjnych jak: eIF4A, eIF4B, eIF4F, które w przypadku eukariota są konieczne. Podjednostka rybosomu 40S wiąże się do drugorzędowych struktur domeny III_d oraz III_e. W czasie tych oddziaływań dochodzi do kontaktu między motywami strukturalnymi z elementu IRES, a białkami rybosomu. Rezultatem jest zmiana konformacyjna, która prowadzi do usytuowania mRNA wirusa, a dokładniej kodonu AUG w miejscu P rybosomu. Element IRES poprzez pętle domen III_a i III_b oraz skrzyżowanie domen III_{abc} wiąże także inicjacyjny czynnik translacyjny eIF3. Oddziaływania te są niezbędne do związania czynnika translacyjnego eIF2-tRNA_i^{Met}. Kolejnym etapem jest uwolnienie czynnika eIF2 oraz związanie dużej podjednostki rybosomu. Następnie mRNA wirusa przechodzi etap elongacji i terminacji.

Dowodzono także, że na aktywację translacji mają wpływ oddziaływania dalekodystansowe między końcem 5' UTR, a 3' UTR. Oba końce zawierają konserwatywne motywy strukturalne z komplementarnymi do siebie sekwencjami. Interakcje prowadzą do cyrkularyzacji mRNA niezależnej od białek. Sytuacja taka ma miejsce nie tylko wśród hepatowirusów, ale także m.in. u części pikornawirusów czy retrowirusów (42).

- Element IRES rodziny *Picornaviridae*

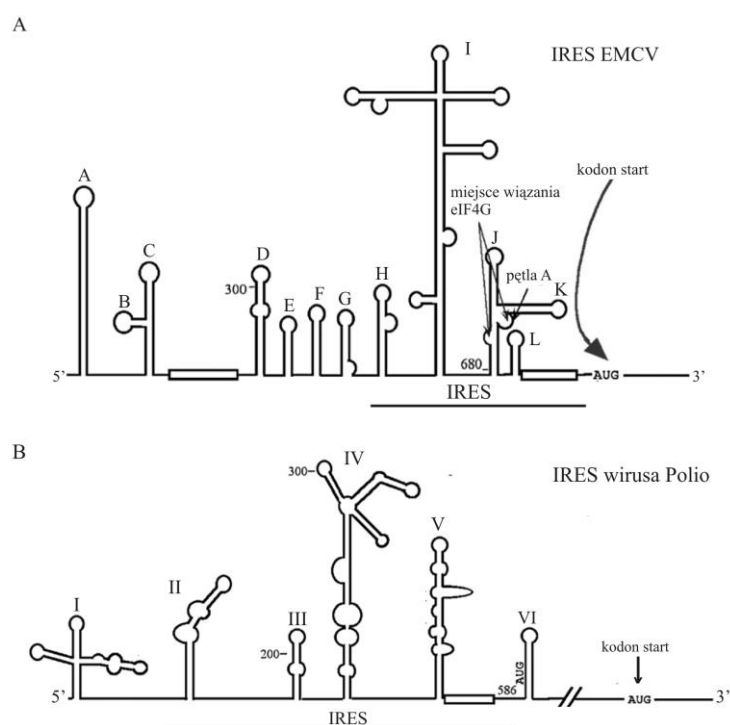
Picornaviridae są dużą rodziną wirusów zawierających genom w postaci pojedynczej nici RNA o dodatniej polarności (Rysunek 4). Długość RNA waha się od 7000 do 8500 pz, jego koniec 5' zawiera kowalencyjnie przyłączone białko VPg, natomiast koniec 3' charakteryzuje się ogonem poli-A. Ponadto, 5' UTR picornawirusów cechuje się bogactwem konserwatywnych motywów strukturalnych.

Na podstawie badań biochemicznych, strukturalnych oraz filogenetycznych wyodrębniono dwa typy sekwencji IRES u picornawirusów. W obydwu przypadkach występują konserwatywne motywy strukturalne. Do typu pierwszego zalicza się element IRES enterowirusów oraz rinowirusów, natomiast aphthowirusy wraz z cardiowirusami należą do II typu. Obydwa typy IRES charakteryzują się obecnością motywu GNRA, który przybiera czteropętlową konformację, tworząc centralną domenę. Charakterystyczny jest także krótki odcinek bogaty w pirymidyny, leżący 20 do 25 nukleotydów powyżej kodonu AUG. W typie I IRES wspomniany kodon AUG nie jest faktycznym kodonem start, lecz następny, który rybosom odnajduje po

WSTĘP LITERATUROWY

przeskanowaniu 100 do 150 nukleotydów. Badania wykazały, że odległość między odcinkiem bogatym w pirymidyny oraz inicjatorowym AUG jest krytyczna dla bezpośredniego rozpoczęcia translacji bez skanowania mRNA. Co ciekawe, niektóre elementy struktury IRES są bardzo podobne do IRES HCV czy pestiwirusów.

Badania nad oddziaływaniem między eukariotycznymi czynnikami translacyjnymi, a elementem IRES wykazały, że kluczowym czynnikiem translacyjnym jest eIF4G zasocjowany z eIF4B. Czynniki te oddziałują bezpośrednio z domeną J-K enterowirusów oraz domeną V poliovirusów. Interakcje prowadzą do powstania kompleksu inicjatorowego. Ciekawy jest fakt, że atenuowane wirusy ze zmutowaną domeną V wchodzą w skład szczepionki Sabrina przeciw chorobie Polio (43).



Rysunek 4. Schemat 5' UTR picornawirusów, gdzie A typ I; B typ II (37).

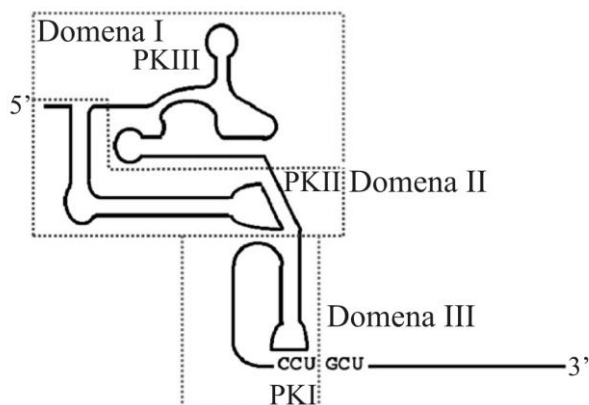
- IRES rodziny *Discistroviridae*

Ciekawy przykład elementu IRES można znaleźć w rodzinie *Discistroviridae*, która zawiera dwie sekwencje odpowiedzialne za inicjację translacji (Rysunek 5).

Genom wirusów z rodziny *Discistroviridae* stanowi niesegmentowany, liniowy, jednoniciowy RNA o długości od 8500 do 9500 nukleotydów. Koniec 5' zawiera kowalencyjnie dołączone białko VPg, a koniec 3' ogon poli A. Genom posiada dwie ramki odczytu ORF1 oraz ORF2, które są przedzielone regionem o długości 200 nukleotydów. Obydwie ramki odczytu ulegają ekspresji z oddzielnych elementów

IRES. Pierwszy element IRES leży w rejonie 5' UTR i umożliwia syntezę białek w obecności czynników translacyjnych, natomiast drugi element IRES (IGR) leży w rejonie między dwiema ramkami odczytu i pozwala na rozpoczęcie translacji nawet przy braku czynników translacyjnych i nieobecności inicjatorowego tRNA^{Met} (44).

Badania wykazały, że element IRES leżący między dwiema ramkami odczytu fałduje się w trzy struktury pseudowęzłów. Nazwano je domenami PKI, PKII, PKIII, a powstające struktury są wysoce konserwatywne.



Rysunek 5. Struktura IRES rodziny Discistroviridae, leżącego między dwiema ramkami odczytu, PK-pseudowęzeł (37).

Przeprowadzone badania ujawniły, że element IRES wiąże się z miejscem P i E rybosomu. PKIII oddziałuje z miejscem P rybosomu i przyjmuje strukturę, która przypomina strukturę tRNA^{Met}. W skutek interakcji między rybosomem, a strukturami pseudowęzłów rybosom zostaje "oszukany" i dochodzi do rozpoczęcia syntezy białek bez udziału czynników translacyjnych, tRNA^{Met} oraz hydrolizy GTP (45).

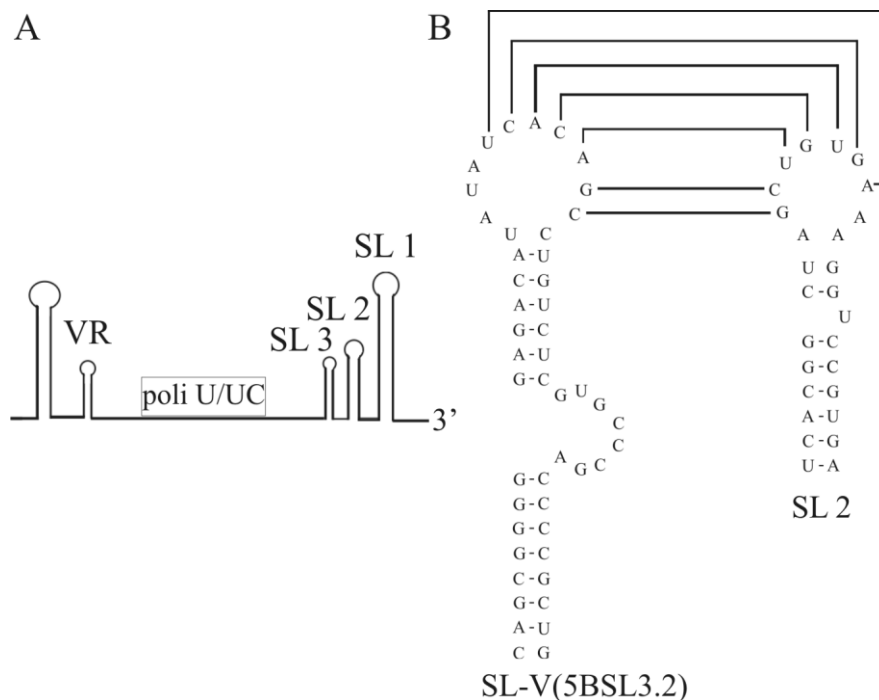
4.2. Motywy strukturalne 3' UTR HCV

3' UTR wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) liczy około 200 nukleotydów i posiada trzy wysoce konserwatywne motywy strukturalne: region o wysokiej zmienności (VR) (ang. *highly variable region*), trakt poli-U/UC oraz ogon 3'X, składający się z trzech spinek do włosów, które nazwano 3'SLI, 3'SLII, 3'SLIII (Rysunek 6). Badania wykazały, że formowanie się wymienionych struktur jest kluczowe dla replikacji wirusa. Co więcej, obszar kodujący białko NS5B fałduje się w struktury drugorzędowe. Wyróżnić możemy cztery spinki do włosów zwane SL-IV, SL-V (5BSL3.2), SL-VI oraz SL-VII. Struktury te wydają się być konserwatywne. Badania eksperymentalne wykazały istnienie oddziaływań między apikalną pętlą 5BSL3.2,

WSTĘP LITERATUROWY

należącą do spinki SL-V, a spinką 3'SLII z ogona 3'X. Interakcje te są niezbędne dla procesu replikacji (46).

Okazało się, że oddziaływania między motywami strukturalnym wirusa zapalenia wątroby typu C, a ludzkim białkiem La są etapem krytycznym w replikacji. Wykazano, że białko La oddziałuje z motywem GCAC znajdującym się blisko kodonu AUG, leżącego w domenie IV sekwencji IRES. Wykazano, że takie oddziaływania są kluczowe do połączenia końca 5' i 3' RNA, co jest niezbędne w replikacji (47).



Rysunek 6. A - schemat struktury 3' UTR wirusa zapalenia wątroby typu C. VR-region o wysokiej zmienności, poly-U/UC-trakt poli U/UC, SL1, SL2, SL3 - spinki ogona 3'X.; B - tzw. „kissing interaction” między pętlą apikalną 5BSL3.2, a spinką SL2 (48).

4.3. Motywy strukturalne 5' UTR i 3' UTR wirusa Dengi

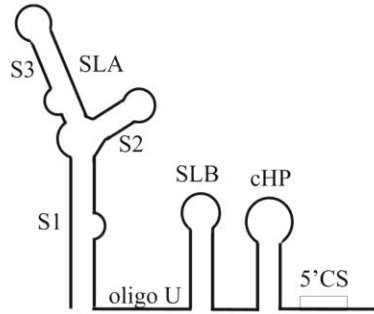
Wirus Dengi powoduje potencjalnie śmiertelną chorobę, przyjmującą postać gorączki krwotocznej, występującą u ludzi i niektórych małp. Należy do rodziny *Flaviviridae*, zawiera materiał genetyczny w postaci pojedynczej nici RNA o długości około 11000 nukleotydów i dodatniej polarności (Rysunek 7). Na końcu 5' posiada kap, natomiast koniec 3' nie zawiera ogona poli-A. Końce 3', jak i 5' UTR obfitują w konserwatywne struktury drugorzędowe, niezbędne do replikacji wirusowego genomu.

Koniec 5' UTR zawiera konserwatywne motywy strukturalne tworzące takie domeny jak: SLA, SLB, cHP oraz trakt oligo(U) i element 5'CS. Domena SLA liczy około 70 nukleotydów i przyjmuje strukturę o kształcie przypominającym literę Y. Trzy

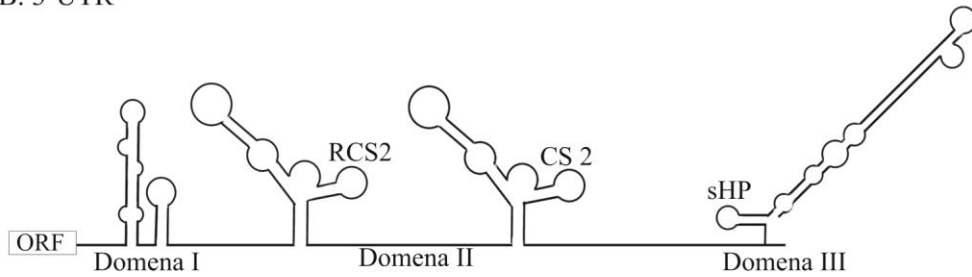
WSTĘP LITERATUROWY

obszary helikalne występujące w tej strukturze nazwano odpowiednio S1, S2, S3. Regiony S1 oraz S2 są jednym z najbardziej konserwatywnych elementów w całym 5' UTR rodziny *Flaviviridae*. Natomiast SLB tworzy strukturę „małej” spinki do włosów. Te dwie domeny oddzielone są od siebie traktem oligo(U). Między domeną SLB, a kodonem AUG, RNA przyjmuje strukturę kolejnej spinki do włosów nazwanej cHP.

A. 5' UTR



B. 3' UTR



Rysunek 7. A - struktura drugorzędowa 5' UTR wirusa Denga. SLA domena Y-kształtna, SLB, cHP-„spinki do włosów”, 5'CS - element zawierający konserwatywną sekwencję. B - struktura drugorzędowa 3'UTR wirusa Denga. RCS2, CS2 - elementy zawierające konserwatywne sekwencje, sHP - „mała” spinka do włosów (49).

Dotychczasowe dane badawcze sugerują, że domena SLA pełni funkcję promotora dla wirusowej polimerazy. Eksperymenty pokazały, że białko wirusowe NS5 o aktywności polimerazy wiąże się z dużym powinowactwem do domeny SLA i takie oddziaływania są kluczowe do zainicjowania replikacji. Badania pokazały, że mutacje zaburzające formowanie obszarów helikalnych S1 oraz S2 prowadzą do upośledzenia replikacji. Co więcej, delecja obszarów jednoniciowych S1 oraz S2 całkowicie hamuje proces namnażania genomu. Natomiast mutacje utrzymujące strukturę drugorzędową nie mają żadnego wpływu na replikację. Domena SLB wydaje się także brać udział w replikacji oraz w oddziaływaniach dalekodystansowych między RNA-RNA. Ponadto, sugeruje się, że domena cHP także jest konieczna do rozpoczęcia replikacji. Trakt oligo(U) jest elementem wzmacniającym replikację.

Z kolei koniec 3' UTR jest miejscem tworzenia się trzech drugorzędowych domen. Domena I znajduje się zaraz za kodonem stop i charakteryzuje się największą

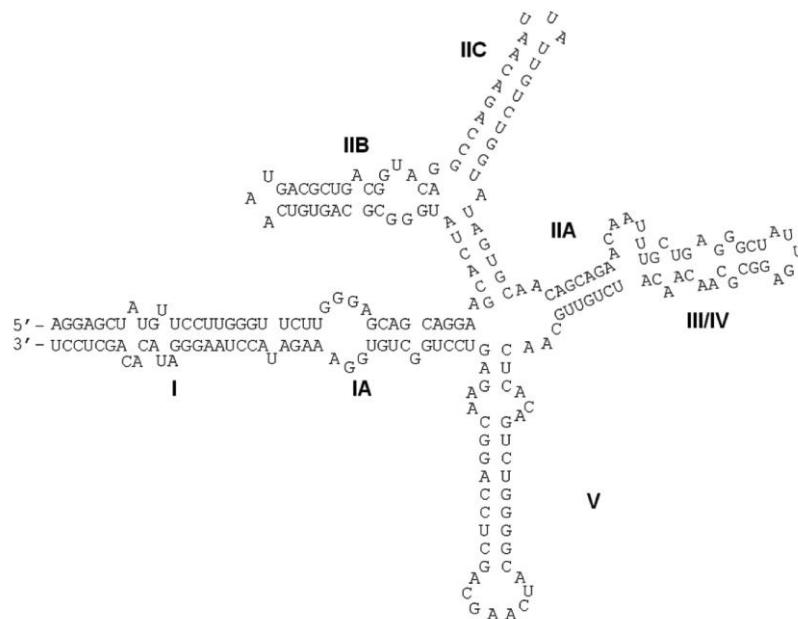
WSTĘP LITERATUROWY

zmiennością spośród wszystkich elementów strukturalnych końca 3' UTR. Domena II tworzy dwie identyczne, powtórzone struktury, zawierające konserwatywne sekwencje nazywane CS2 oraz RCS2. Postuluje się udział tych sekwencji w tworzeniu dwóch pseudowęzłów. Domena III jest najbardziej konserwatywnym regionem końca 3' UTR. Struktura taka występuje także u innych członków rodziny *Flaviviridae*. Zawiera element CS1 oraz dwie spinki do włosów. Mała spinka sHP, składa się z 14 nukleotydów, natomiast większa 3'SL, 93-nukleotydowa zawiera wewnętrzne wybrzuszenia w trzonie (49, 50).

4.4. Element RRE wirusa HIV

Ludzki wirus niedoboru odporności (HIV ang. *human immunodeficiency virus*) należy do rodzaju lentiwirusów oraz do rodziny retrowirusów. Jego genom stanowi dwuniciowy RNA o dodatniej polarności.

Jednym z elementów, bogatym w konserwatywne struktury drugorzędowe, jest rejon RRE (ang. *Rev responsive element*). RRE jest położony w drugim intronie genu *env*. Wykazano, że RRE działa, jako czynnik *cis* w procesie replikacji, bierze udział we wspomaganiu transportu jądrowego, wpływa na translacje oraz na stabilność transkryptu. Istnieją także doniesienia, że przeciwdziała integracji DNA do genomu gospodarza oraz ułatwia składanie wirionów, a także pełni funkcję mRNA i koduje białka (51).



Rysunek 8. Struktura drugorzędowa fragmentu RRE1 HIV-1 (52).

WSTĘP LITERATUROWY

RRE1 (pochodzący z HIV-1) zawiera motyw spinki do włosów I o długim obszarze helikalnym, motyw spinki do włosów II o krótkiej helisie oraz pozostałe spinki do włosów IIB, IIC, III, IV, V (Rysunek 8). Zaobserwowano różnice między RRE1 oraz RRE2 (RRE HIV-2) dotyczące między innymi wielkości i położenia pętli wewnętrznych i wybrzuszeń.

Rozgałęziony obszar obejmujący rejon IIA do IIC jest miejscem, które ma silne powinowactwo do białka Rev, które reguluje ekspresję białek wirusa HIV. Stwierdzono, że sekwencje obecne w pętlach III, IV oraz V nie są niezbędne do wiązania białka Rev. Także sekwencje pętli terminalnych IIC oraz IIB nie są konieczne dla rozpoznawania białka Rev (52).

4.5. Rybozym HDV

Wirus zapalenia wątroby typu D (HDV, ang. *Hepatitis delta virus*) posiada dwa rybozomy, z których jeden kodowany jest przez nić genomową, a drugi przez komplementarną antysensową nić (Rysunek 9). Wykazano, że rybozym jest zarówno aktywny *in vivo*, jak i *in vitro*, bez obecności białek.

Hydroliza wiązania fosfodiesterowego przeprowadzana przez rybozomy, ma znaczenie w procesie replikacji, która prowadzi do powstania wielu powtórzonych sekwencji genomowych HDV. Dzięki rybozymowi, powstaną nici RNA, z których każda będzie zawierała pojedynczą sekwencję HDV.

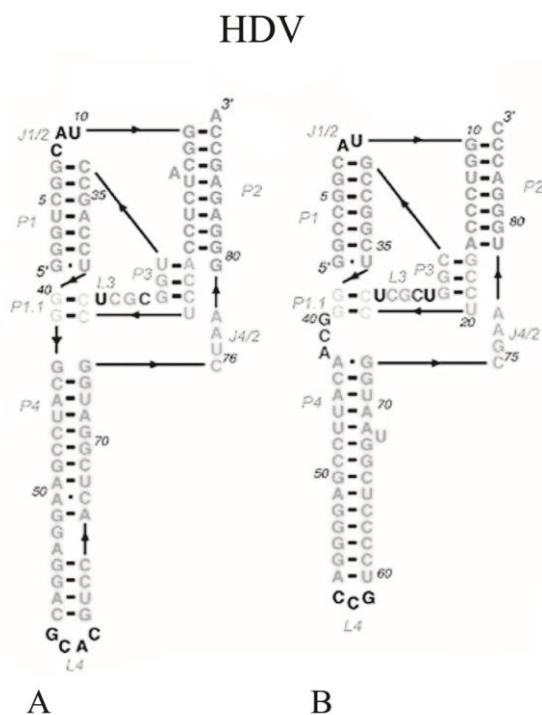
Strukturę drugorzędową rybozomu stanowi 5 parujących się ze sobą odcinków (oznaczone są litera P z kolejnymi numerami), które są połączone przez rejony jednoniciowe (oznaczane J,) J1/2 oraz J4/2. Rejony P oddziałują ze sobą współosiowo tak, że P2 oddziałuje z P3, natomiast P1 z P1.1 i P4. Miejsce aktywne jest formowane przez helisę P3 oraz nici L3 i J4/2. Hydroliza wiązania diesterowego RNA ma miejsce przy reszcie guanozyny w helisie P1. Rejon, który jest wystarczający, aby spełniać funkcję rybozomu obejmuje obszar od jednego nukleotydu powyżej do 70 nukleotydów poniżej miejsca cięcia RNA.

Obydwa rybozomy HDV posiadają po siedem par zasad w P1 i po 3 pary zasad w P3. Helisy P2 oraz P4 wykazują większą zmienność długości fragmentów w obu rybozymach. Rejon P4 odpowiada za stabilizację struktury rybozomu, jednak obecność tej helisy nie jest niezbędna, aby została zachowana aktywność.

W przeciwieństwie do struktury drugorzędowej sekwencje obu rybozymów są różne. Tylko niektóre pozycje zostają zachowane tak jak cytozyna obecna w miejscu

WSTĘP LITERATUROWY

aktywnym czy para zasad guanozyna - pirymidyna w helisie P1, ponadto adenozyzna w J4/2, która oddziałuje z P3 oraz para G-U w P3 (53, 54).



Rysunek 9. Struktura drugorzędowa rybozymów HDV: genomowego (A), antygenomowego (B) (53).

4.6. Domeny TLS

Domeny TLS (*ang. tRNA-like structure*) można spotkać na 3' końcach w genomach wirusów roślinnych, których materiał genetyczny stanowi RNA o dodatniej polarności (Rysunek 10).

Wyróżnia się trzy podstawowe typy domen TLS: domeny występujące u wirusów żółtej mozaiki rzepy (TYMV, *ang. Turnip yellow mosaic virus*), mozaiki tytoniu (TMV, *ang. Tobacco mosaic virus*), mozaiki stokłosa (BMV, *ang. Brome mosaic virus*). Struktury różnią się funkcją oraz stopniem podobieństwa do tRNA pomiędzy każdym z rodzajów, są natomiast wysoce konserwatywne wewnątrz każdego z nich. W pracy zostanie omówiona domena TLS TYMV, najbardziej przypominająca budową tRNA.

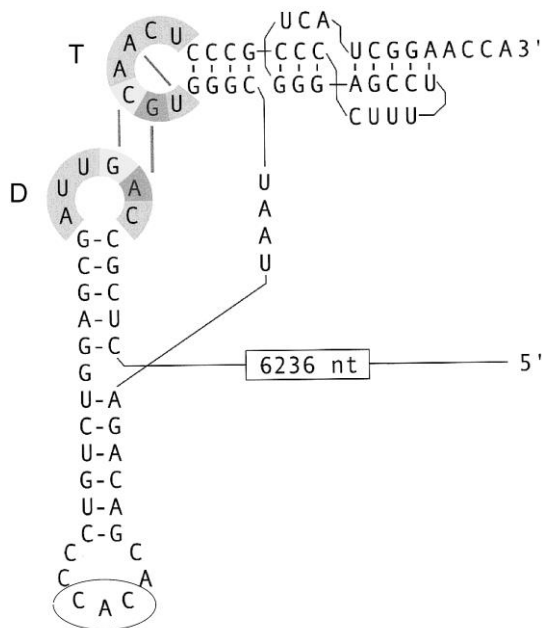
TLS TYMV stanowi odcinek RNA o długości 82 nukleotydów. Wśród konserwatywnych nukleotydów, występujących zarówno u TYMV TLS, jak i tRNA^{Val}, znajdują się między innymi A₅₆ oraz C₅₅, wchodzące w skład antykodonu.

W TLS TYMV można znaleźć strukturę przypominającą ramiona antykodonowe oraz akceptorowe tRNA. Na tworzenie struktury ramienia T-akceptorowego wpływa

WSTĘP LITERATUROWY

występująca przy 3' końcu struktura pseudowęzła. Obecność pseudowęzła powoduje, że pozostały RNA wirusa jest umieszczony pomiędzy ramionami TLS.

Trzeciorzędowa struktura przyjmuje konformację litery L, podobnie jak w tRNA. Za oddziaływania pomiędzy pętlami D oraz T odpowiadają, podobnie jak w przypadku tRNA, dwie pary zasad. Jedną z nich jest para G-C, która odpowiada parze G₁₉-C₅₆ w tRNA. Drugą jest G-U występująca zamiennie z A-U w wirusach posiadających domenę podobną do TLS TYMV, zamiast pary G₁₈-Ψ₅₅ (55).



Rysunek 10. Struktura drugorzędowa TLS TYMV. Literą T oraz D zaznaczono odpowiednio ramię T-akceptorowe i ramię D-antykononowe. W ramieniu T-akceptorowym widoczny jest pseudowęzeł. Linia między nukleotydami zaznaczonymi na szaro przedstawia oddziaływania trzeciorzędowe. Elipsą zaznaczono antykodon (55).

5. Konserwatywne motywy strukturalne wirusa grypy

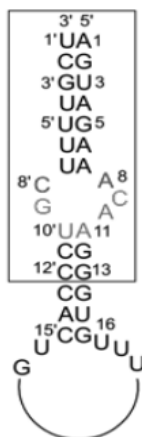
Motywy strukturalne RNA wirusa grypy są intensywnie badane i poszukiwane zarówno metodami eksperymentalnymi, jak i bioinformatycznymi. Zachowawczość motywu związana jest z pełnioną funkcją biologiczną. Dzięki poznawaniu struktury RNA można lepiej zrozumieć mechanizmy cyklu replikacyjnego wirusa. Jednocześnie, wiedza na temat konserwatywnej struktury drugorzędowej wirusa pozwala na projektowanie nowych alternatywnych leków przeciwko grypie, a naczelnym na dany motyw strukturalny.

5.1. Struktura „*panhandle*”

Struktura „*panhandle*” jest konserwatywna w vRNA wirusów z rodziny *Orthomyxoviridae*, w tym wirusa grypy oraz innych wirusów zawierających segmentowany materiał genetyczny o negatywnej polarności takich jak *Bunyaviridae* czy *Arenoviridae* (56).

Sugeruje się, że struktura „*panhandle*” determinuje kolistą budowę vRNA (Rysunek 11). Przepuszczalnie, na różnych etapach cyklu replikacyjnego wirusa struktura „*panhandle*” formowana przez vRNA podlega konformacyjnym zmianom zależnie od pełnionych funkcji. Przeprowadzono wiele badań struktury tworzonej przez 25 nukleotydowy fragment RNA formujący „*panhandle*”. Struktura ta pełni funkcję regulacyjną podczas inicjacji i terminacji wirusowej transkrypcji oraz poliadenylacji. Nukleotydy w pobliżu pętli są kluczowe dla wiązania polimerazy i aktywności transkrypcyjnej. Polimeraza nie reaguje z całkowicie dwuniciowymi fragmentami RNA, wiąże się natomiast specyficznie do czterech reszt ACAA, zlokalizowanych na wybrzuszeniu w regionie 5' struktury „*panhandle*”. Mają one bardziej elastyczny charakter konformacyjny niż typowy region par zasad Watsona-Cricka. Na podstawie badań tego 25-nukleotydowego fragmentu RNA przy pomocy spektroskopii NMR wiadomo, że chociaż reszty A10 i A12 są umieszczone w helisie, ich szkielety fosfodiesterowe są odkształcone (57, 58).

Większa elastyczność tego regionu niż pozostałej części struktury „*panhandle*” może być ważna dla interakcji białko-RNA. Cytosyna z ACAA paruje się z G25, a mutacje obu tych zasad znacznie zmniejszają wydajność inicjacji transkrypcji. Para ta może być, zatem ważna dla rozpoznawania i wiązania wirusowej polimerazy RNA. Reszty A12, A13 i G25 mają dynamiczną konformację pierścienia cukrowego. Analizy mutacji pokazały, że kluczowe dla wiązania polimerazy są trzy sąsiadujące ze sobą reszty GCU. Podobnie silne połączenia, wskazujące na elastyczną konformację pierścienia cukrowego zaobserwowano pomiędzy nukleotydami U18 i C19, a także G2 i C34. Rozpoznano również tetrapętlę UUCG, jako zapewniającą stabilność trzonu struktury (58).



Rysunek 11. Struktura „panhandle” na przykładzie terminalnych sekwencji vRNA segmentu 8 wirusa grypy A/PR/8/34 (59).

5.2. Motywy strukturalne zaangażowane w alternatywne składanie mRNA wirusa grypy

Badania nad wirusem grypy typu A wykazały, że przybranie struktury drugorzędowej przez RNA odgrywa kluczową rolę w procesie alternatywnego składania mRNA. Segment 7 koduje białko M1 oraz trzy jego alternatywne formy M2, M3 oraz M4. Białko M3 oraz M4 są najkrótsze i powstają sporadycznie (60).

Wykazano, że region RNA miejsca splicingowego 3' segmentu 7 o długości 63 nukleotydów może przybierać dwie konformacje: pseudowęzła oraz spinki do włosów (Rysunek 12). Struktura pseudowęzła oraz spinki do włosów są wysoko konserwatywne wśród szczepów wirusa grypy typu A.

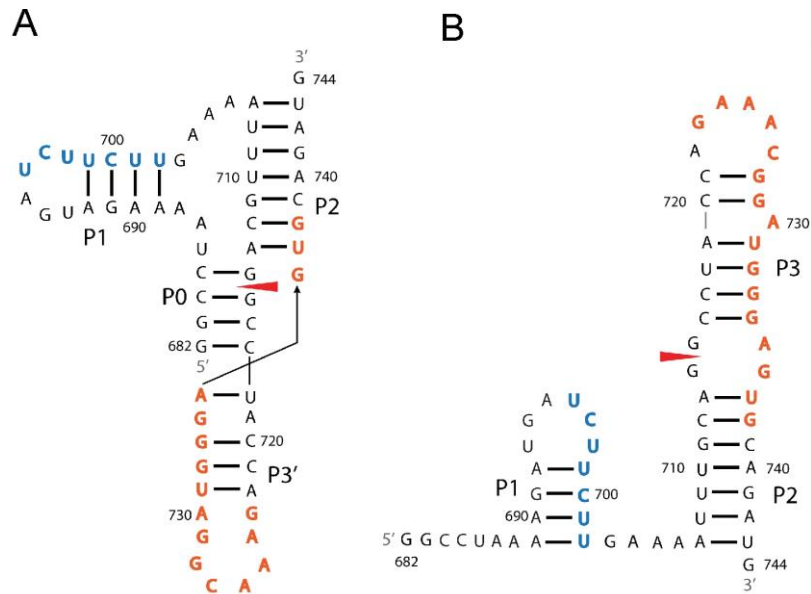
W strukturze spinki miejsce splicingowe 3' jest jednoniciowe, natomiast w strukturze pseudowęzła wchodzi w skład helisy, a więc jest trudno dostępne. Istnienie równowagi strukturalnej może mieć znaczenie w regulacji splicingu poprzez m.in. udostępnianie lub nie miejsca splicingowego. Przybranie odpowiedniej struktury drugorzędowej jest ważne dla związania ludzkiego czynnika splicingowego SF2/ASF. Trakt polipirymidynowy, który także znajduje się w obrębie struktury spinki lub pseudowęzła może wiązać czynniki splicingowe takie jak U2AF65 (61).

Szczegółowe badania ujawniły, że w strukturze spinki do włosów występują trzy obszary helikalne, które nazwano P1, P2 oraz P3. Wewnętrzna pętla między obszarem P2 oraz P3 zawiera miejsce splicingowe 3'. W pętli dochodzi prawdopodobnie do niekanonicznych oddziaływań między parami G-A oraz G-G. Podobne GA/GG pętle scharakteryzowano w motywie E rybosomu czy domenie wiążącej czynnik Rev wirusa HIV1. Uważa się, że takie pętle są miejscem oddziaływania RNA z białkami. Natomiast

WSTĘP LITERATUROWY

terminalna pętla wraz z sześci nukleotydowym trzonem z pojedynczym wybrzuszeniem jest miejscem wiązania czynnika splicingowego SF2/ASF.

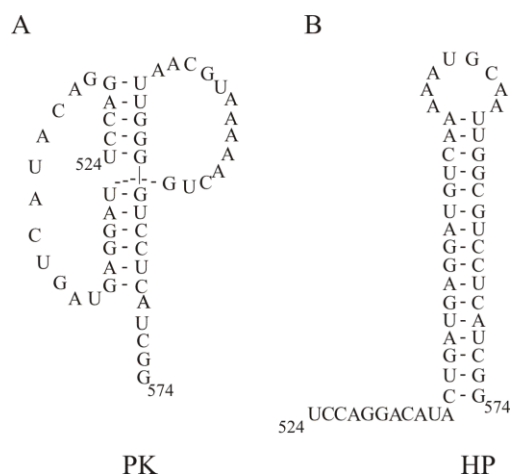
Z kolei w strukturze pseudowężła można wyróżnić obszary helikalne P0, P1, P2 oraz P3'. Region dwuniciowy P0 obejmuje miejsce splicingowe 3'. Często w pętli powyżej P3' występuje para G-A powtórzona do trzech razy, co dodatkowo stabilizuje strukturę (62).



Rysunek 12. A - Przewidywana struktura spinki miejsca splicingowego 3' mRNA segmentu 7 wirusa grypy typu A. B - przewidywana struktura pseudowężła miejsca splicingowego 3' mRNA segmentu 7 wirusa grypy typu A. Czerwona strzałka wskazuje miejsce splicingowe 3'. Na niebiesko zaznaczono trakt polipirymidynowy, na czerwono miejsce wiązania czynnika splicingowego SF2/ASF (62).

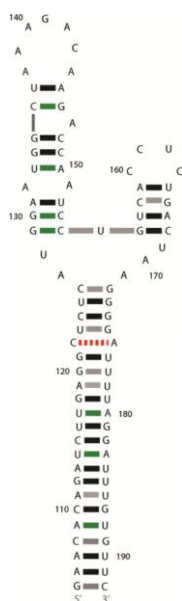
Podobny mechanizm regulacji procesu alternatywnego składania mRNA zaobserwowano dla miejsca splicingowego 3' segmentu 8 wirusa grypy typu A oraz B (Rysunek 13). Wykazano, że w regionie miejsca splicingowego 3' mRNA może fałdować w strukturę pseudowężła lub spinki do włosów. Powstające struktury są wysoce konserwatywne wśród wszystkich wirusów grypy typu A oraz B. Przejście między tymi strukturami jest bardzo dynamiczne i odgrywa kluczową rolę w procesie składania mRNA kodującego białka NS1/NS2. Co ciekawe, okazało się, że pojedyncza substytucja G563-C, faworyzuje strukturę spinki do włosów, a pseudowężel staje się mniej stabilny. Mutacja C563 wydaje się, być unikalna dla wirusa grypy typu A H5N1. Mechanizm opierający się na regulacji dostępności RNA dla czynników splicingowych i wydaje się być powszechny (63).

WSTĘP LITERATUROWY

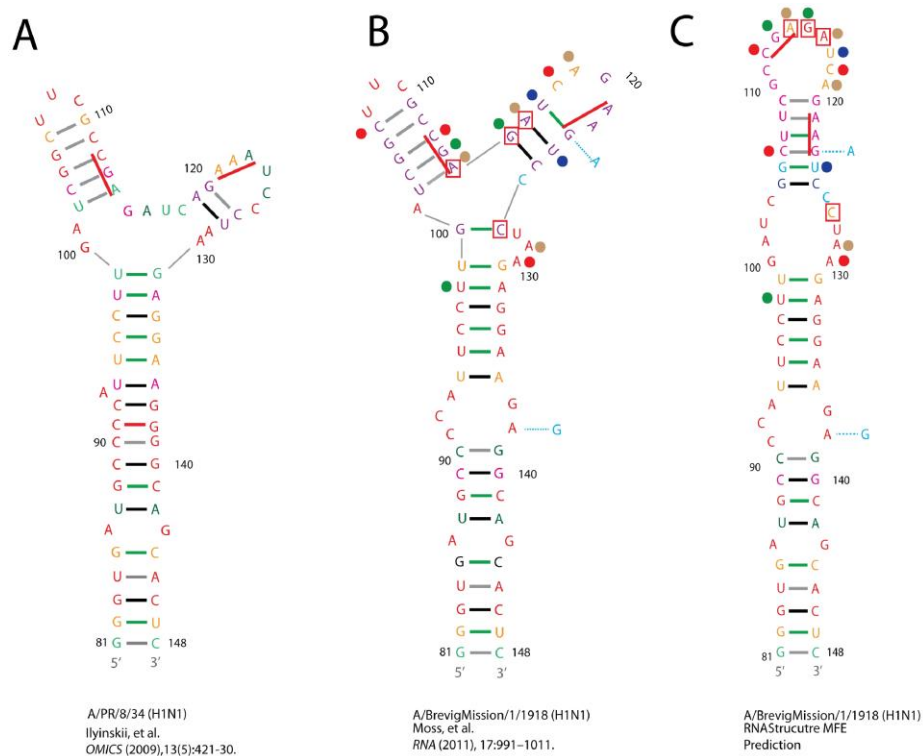


Rysunek 13. A - Przewidywana struktura pseudowęzła (PK) 3' miejsca splicingowego mRNA segmentu 8 wirusa grypy typu A. B - przewidywana struktura spinki (HP) 3' miejsca splicingowego mRNA segmentu 8 wirusa grypy typu A (63).

W pre-mRNA segmentu 7 zidentyfikowano kolejny konserwatywny motyw strukturalny, znajdujący się 79 nukleotydów przed miejscem splicingowym 5' białka M2 (Rysunek 14). Analiza bioinformatyczna oraz badania strukturalne wykazały, że rejon ten tworzy pętle wieloramienną. Lokalizacja przed miejscem splicingowym, wskazując, że struktura może być zaangażowana w regulację alternatywnego składania mRNA. Wydaje się, że omawiany motyw może być także zaangażowany w oddziaływania czwartorzędowe, gdyż takie struktury często pełnią rolę w tego typu oddziaływaniach. Czwartorzędowe interakcje, w które zaangażowana była struktura pętli wieloramiennej wykazano w RNA rybozomu *hammerhead* oraz w intronach grupy I (64).



Rysunek 14. Model struktury drugorzędowej fragmentu pre-mRNA (105-192 nt.) segmentu 7 wirusa grypy typu A (64).



Rysunek 15. Modele struktury drugorzędowej fragmentu mRNA (81-148 nt.) segmentu 8 wirusa grypy typu A. A - struktura zaproponowana przez Ilyinskiego, motyw posiada sekwencja szczepu A/PR/8/34 (H1N1) (65), B - struktura uzyskana z użyciem programu RNAalifold (66), C – struktura uzyskana z użyciem programu RNAstructure (67). B, C - przedstawia motyw o konsensusowej sekwencji. Nukleotydy pokolorowane są na podstawie prawdopodobieństwa występowania par zasad i rejonów jednoniciowych (prawdopodobieństwo $\geq 99\%$, $99\% > \text{prawdopodobieństwo} \geq 95\%$, $95\% > \text{prawdopodobieństwo} \geq 90\%$, $90 > \text{prawdopodobieństwo} \geq 80$, $80\% > \text{prawdopodobieństwo} \geq 70\%$, $70\% > \text{prawdopodobieństwo} \geq 60\%$, $60\% > \text{prawdopodobieństwo} \geq 50\%$, $\text{prawdopodobieństwo} < 50\%$). Prawdopodobieństwo zostało wyliczonego przez program RNAstructure. Oznaczono modyfikacje: NMIA (ang. *N-methylisatoic anhydride*) - czerwona kropka, DMS (siarczan dimetylu) - zielona kropka, NMIA+CMCT (ang. *N-Cyclohexyl-N'-(β-[N-methylmorpholino]ethyl)carbodiimide p-toluenesulfonate*) - grantowa kropka, NMIA+CMCT - brązowa kropka. Czerwonym prostokątem oznaczono środkowy nukleotyd regionu, do którego wiązała się sonda macierzy izoenergetycznych w buforze zawierającym 10 mM Tris-HCl, pH7, 300 mM KCl, 10 mM mgCl_2 . Czerwona kreska oznaczono kodony, które zamienione na kodon GCG powodowały zmianę ekspresji białka NS1.

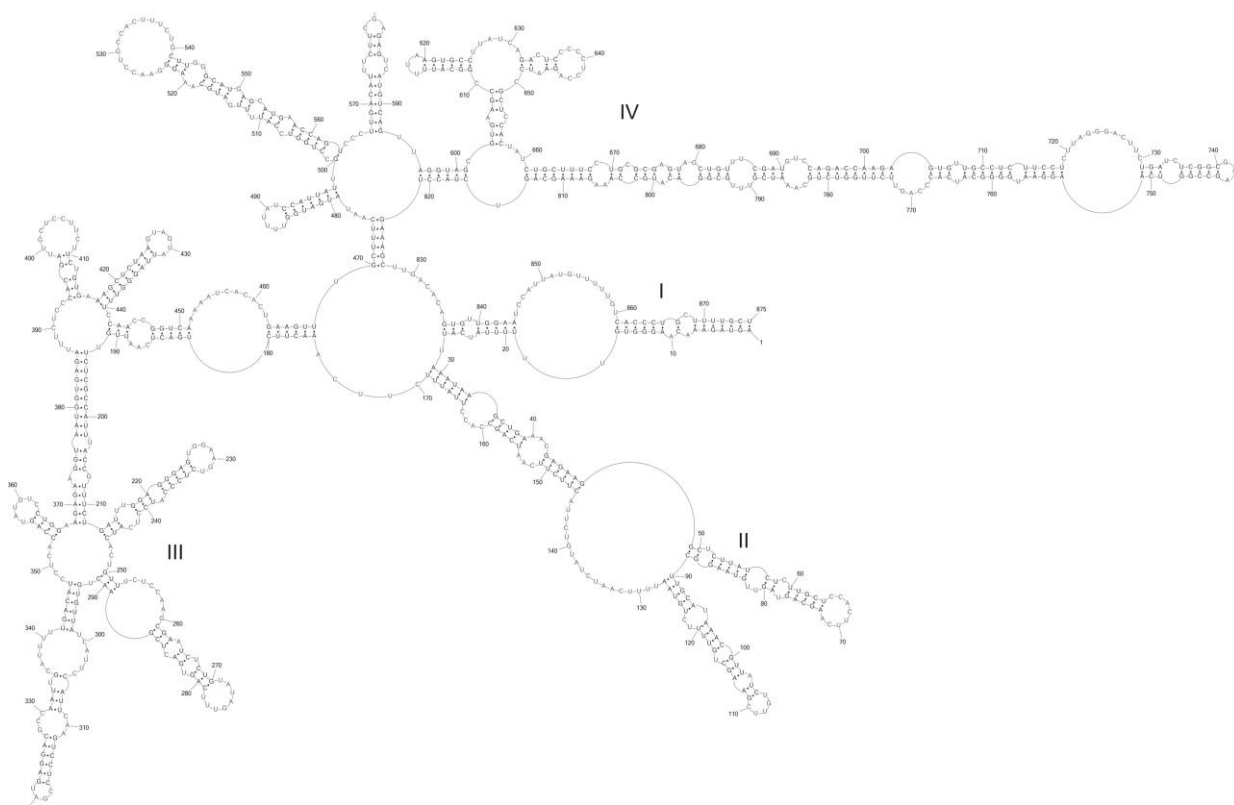
W ostatnich latach wykazano, że w segmencie 8 wirusa grypy typu A istnieje konserwatywny motyw strukturalny w rejonie mRNA intronu białka NS1. Początkowe badania nad szczepem A/PR/8/34 (H1N1) posłużyły do przewidzenia struktury drugorzędowej o kształcie przypominającym literę Y. Następnie do badań motywu wykorzystano szczep A/BrevigMission/1918 oraz program do przewidywania struktur drugorzędowych RNAalifold. W kolejnych latach wcześniejsze struktury drugorzędowe badanego fragmentu została skorygowana za pomocą mapowania chemicznego, badań z

WSTĘP LITERATUROWY

wykorzystaniem macierzy izoenergetycznych oraz programu do przewidywania struktur drugorzędowych (RNAstructure) (Rysunek 15). Przewidywana spinka do włosów zawiera wysoce reaktywną pętlę apikalną oraz trzy wybrzuszenia wewnętrzne. Przypuszcza się, że struktura spinki do włosów może pełnić funkcję regulacyjną w procesie składania genów. Jednak rola jej nie jest do końca wyjaśniona (65, 67).

5.3. Model struktury drugorzędowej vRNA segment 8 szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)

W roku 2016 po raz pierwszy określono strukturę drugorzędową całego vRNA segmentu 8 szczepu A/VietNam/1203/2004 (H5N1) (Rysunek 16). Jest to jedyny segment, którego struktura drugorzędowa została do tej pory określona.



Rysunek 16. Model struktury drugorzędowej vRNA segmentu 8 szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Cyframi rzymskimi zaznaczono domeny. Matryce dla kodonu start AUG stanowią nukleotydy 849-847 (68).

Wykazano, że cząsteczka vRNA 8 jest wysoce ustrukturalizowana, w jej strukturze drugorzędowej można wyróżnić 4 domeny. Sparowane końce 3 i 5', które opisano w literaturze jako istotne dla cyklu replikacyjnego wirusa stanowią część domeny I. Analiza bioinformatyczna ponad 8146 unikatowych sekwencji wirusa grypy wykazała, że pary zasad wykazują 82,6% konserwatywności. Co więcej, domena I wykazuje

najwyższy stopień konserwatywności (98,0%). Zachowawczość strukturalna poszczególnych motywów struktury vRNA8 świadczy o ich potencjalnie istotnej roli w cyklu replikacyjnym wirusa. Jednak, aby powiązać je z funkcją biologiczną potrzeba więcej badań. Położenie niektórych motywów sugeruje, że mogą mieć m.in. znaczenie w pakowaniu wirusa. Ponadto, wykazano, że spinka do włosów (661-814) może stanowić wydajny substrat dla enzymów ADAR (68).

5.4. Bioinformatyczne analizy genomu wirusa grypy

Segmentowany RNA wirusa grypy wzbudza duże zainteresowanie. Wykonano analizy bioinformatyczne, które wykazały, że w segmencie 6 RNA(+) przewidziano występowanie konserwatywnych motywów w regionie 551–670. Z kolei, w segmencie 3 RNA(+) zidentyfikowano potencjalne konserwatywne rejony w obszarze 1611–1860 oraz 1941–2120. Motywy strukturalne przewidziano także w segmentach 1 oraz 2 wirusa grypy. Segment 1 RNA(+) zawiera potencjalne konserwatywne motywy w rejonach 831–960, 1041–1160 oraz 2101–2220. Natomiast segment 2 w obszarach 51–170 oraz 491–610 (numeracja podana dla rejonu kodującego) (66, 69).

Dane bioinformatyczne przewidują, że w segmencie 5 RNA(+) oraz (-) występuje więcej konserwatywnych motywów strukturalnych w porównaniu z innymi segmentami wirusa grypy. Przewidziane motywy występują w następujących rejonach segmentu 5 RNA(+): 1–160, 1031–1250 oraz 1381–1494 (65, 66, 68, 69).

5.5. Praktyczne wykorzystanie konserwatywnych motywów strukturalnych

Konserwatywne motywy strukturalne występujące w wirusowym RNA są idealnymi celami nowych strategii walki z chorobami wirusowymi. Do nowych terapeutyków można zaliczyć m.in: niskocząsteczkowe ligandy, aptamery, DNAzyny, rybozomy, antysensowe oligonukleotydy czy siRNA.

Przykładem wykorzystania motywów struktury RNA, jako celów terapeutycznych są badania związane z wirusem HCV (70). W przypadku zapalenia wątroby typu C stworzono szereg DNAzymów, które były nacelowane na jednoniciowe rejony IRES. Okazało się, że najskuteczniejsze były DNAzyny nacelowane na pętle domeny SLIIId oraz SLIIb (Rysunek 6). DNAzyny jawią się, jako obiecujące narzędzie w walce z wirusem zapalenia wątroby typu C.

Podobne w przypadku wirusa HIV stosuje się strategie nacelowane na wirusowe RNA. W ostatnich latach prowadzono badania nad hamowaniem namnażania się HIV

WSTĘP LITERATUROWY

na liniach komórkowych HeLa, limfocytów T z wykorzystaniem enzymu edytującego RNA - ADAR1 (ang. *Adenosine Deaminase Acting on RNA 1*). ADAR1 przeprowadza hydrolityczną deaminację adeniny do inozyny, jeśli ta zaangażowana jest w tworzenie par zasad typu Watson-Crick. Analiza mutacyjna wykazała, że namnażanie HIV zostaje zahamowane, kiedy mutacje zostały wprowadzone głównie do RRE, *env*, *rev* (71).

Poznane elementy struktury RNA wirusa grypy wykorzystano, jako cele antysensowych oligonukleotydów (ASO, ang. *antisense oligonucleotides*). ASO składają się z około 11-25 nukleotydów, które są komplementarne do docelowego RNA. Wyróżnia się dwa mechanizmy działania. Pierwszy zakłada tworzenie zawady przestrzennej, która ma na celu maskowanie sekwencji sygnałowych, co prowadzi do zaburzenia procesów translacji oraz replikacji. Drugi mechanizm zakłada takie zaprojektowanie antysensowych oligomerów, aby aktywowały RNazy H, która z kolei hydrolizuje dupleks docelowy RNA/DNA.

Przykładem wykorzystania motywów struktury RNA jako celów terapeutycznych są badania związane z wirusem grypy szczepu A/California/04/2009 (H1N1). Oligomery zostały zaprojektowane, tak aby były komplementarne do regionów jednoniciowych vRNA segmentu 8. Jako cel działania ASO wybrano te rejony jednoniciowe, które były dostępne dla sond macierzy izoenergetycznych oraz ulegały silnym mapowaniom chemicznym. Badania wykonano w komórkach MDCK, zainfekowanych szczepem A/California/04/2009 (H1N1). Wykazano, że 10 z 14 zaprojektowanych oligonukleotydów znacząco hamowały namnażanie wirusa grypy. Z czego pięć najlepiej działających ASO inhibowało namnażanie wirusa grypy ponad 5-krotnie. Najlepiej działający antysensowy oligonukleotyd hamował namnażanie wirusa grypy 25-krotnie. Co więcej, sprawdzono specyficzność oraz cytotoksyczność zaprojektowanych antysensowych oligonukleotydów. Wykazano, że nie powodują cytotoksycznego efektu oraz działają specyficznie.

Wydaje się, że strategia ASO zaprojektowanych na bazie struktury drugorzędowej RNA może być dobrym narzędziem do inhibicji namnażania w walce z wirusa grypy. Ponadto, struktura drugorzędowa wirusowego RNA może być podstawą do projektowania siRNA czy rybozymów o potencjalnym działaniu przeciwwirusowym (72).

WYNIKI I DYSKUSJA

1. Identyfikacja konserwatywnych motywów strukturalnych w segmencie 5 RNA(+)

Badania bioinformatyczne sekwencji kodujących rejonów wszystkich segmentów wirusa grypy typu A przewidują, że w segmencie 5 RNA(+) oraz (-) występuje większa możliwość występowania trwałej termodynamicznie struktury drugorzędowej w porównaniu z innymi segmentami wirusa grypy (66). Dlatego, też segment 5 RNA(+) wydaje się być bardzo ciekawym obiektem badań strukturalno-funkcyjnych. Ponadto przewidziana obecność konserwatywnych motywów strukturalnych świadczy o ważniejszej roli, jaką odgrywa struktura segmentu 5 RNA(+) w cyklu replikacyjnym wirusa grypy (66).

Przeprowadzając kilku etapową analizę bioinformatyczną zidentyfikowano w segmencie 5 RNA(+) rejon o wysokim ustrukturalizowaniu w następujących rejonach segmentu 5 RNA(+): 1–160, 1031–1250 oraz 1381–1494, nie określając jednak ich budowy (66). W pracy zostaną zweryfikowane i zaprezentowane po raz pierwszy dwa konserwatywne motywy strukturalne segmentu 5 RNA(+). Pierwszy motyw zawierający kodon start obejmuje rejon 1-182 sekwencji kodującej. Dalej będzie określany, jako M198 (analizowany rejon został wydłużony do 198 nukleotydów). Drugi prezentowany motyw liczy 121 nukleotydów i obejmuje rejon od 1051 do 1171 nukleotydu sekwencji kodującej segmentu 5 RNA(+) (numeracja sekwencji podana zgodnie z przyporządkowaniem sekwencji szczepów wirusa grypy typu A). Dalej będzie określany, jako M121.

2. Konserwatywny motyw strukturalny RNA wirusa grypy M121

2.1. Przewidywanie struktury drugorzędowej M121

W pierwszym etapie badań wykonano analizę bioinformatyczną w celu poszukiwania konserwatywnych motywów strukturalnych. W tym celu, wszystkie pełne sekwencje segmentu 5 (odrzucono te, które miały niezdefiniowane nukleotydy) wirusa grypy zostały pobrane z bazy danych NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*) Influenza Virus Resorce (73). Następnie usunięto identyczne sekwencje. Do analizy pozostawiono 15533 sekwencji wirusa grypy. Wyselekcjonowane sekwencje

WYNIKI I DYSKUSJA

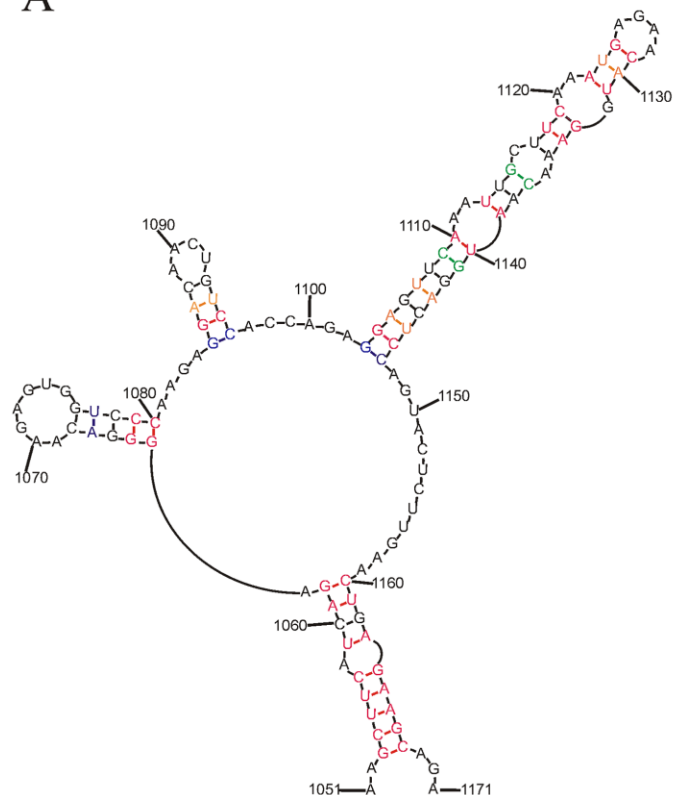
zestawiono w programie MAFFT stosując algorytm FFT-NS-1. Następnie stworzono zbiór unikalnych sekwencji, których pozostało 2515. Losowo wybierane 100 sekwencji RNA wirusa grypy było analizowane w programie RNAz w poszukiwaniu uwspólnionych struktur drugorzędowych, stosując okno (*window*) 120 nukleotyde o zmiennej 10 nukleotydów (*step*). Region, w którym stwierdzono prawdopodobieństwo występowania trwałej struktury drugorzędowej został wycięty z całego zestawienia sekwencji (program Geneious). To zestawienie następnie wprowadzono do programu RNAalifold (74), który przewidział konsensusową strukturę drugorzędową M121 dla badanego rejonu zgodną dla wszystkich zestawionych sekwencji, bez żadnych danych eksperymentalnych (Rysunek 17A). Analizy te wykonano we współpracy z profesorem Walterem N. Moss (Iowa State University, USA).

Przewidziano, że M121 tworzy wieloramienną pętlę z trzema strukturami typu spinki do włosów. Jedna z nich zawiera czteronukleotydową pętlę oraz długą helisę charakteryzującą się dużą termodynamiczną stabilnością (Rysunek 17A).

Porównując model struktury M121 z zestawieniem liczącym 15533 unikatowych sekwencji wirusa grypy wykazano, że pary zasad wykazują odpowiednio 91,0% konserwatywności. Ponadto, wykazano, że zmienność sekwencyjna nie zmienia struktury drugorzędowej M121. Mutacje występujące w tych rejonach mają charakter kompensacyjny (dotyczą dwóch nukleotydów z zachowaniem pary zasad) oraz synonimiczny (dotyczą pojedynczego nukleotydu z zachowaniem pary zasad). Takie neutralne dla struktury mutacje sugerują ważną rolę omawianego motywu strukturalnego (Rysunek 17B).

WYNIKI I DYSKUSJA

A



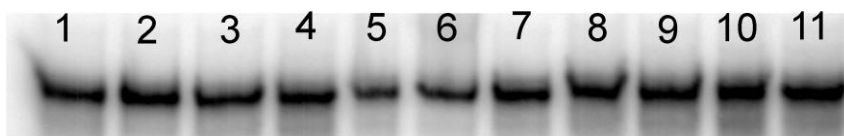
B

| M121 bp | i | j | GC | CG | AU | UA | GU | UG | GA | AG | AA | GG | UU | CC | AC | UC | CA | CU | %canonical bp |
|---------|------|------|------|------|------|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------|
| GC | 1053 | 1168 | 2191 | 0 | 1 | 0 | 279 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 39 | 0 | 0 | 0 | 98,33 |
| CG | 1054 | 1167 | 0 | 1422 | 0 | 1 | 0 | 1087 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 99,84 |
| UA | 1055 | 1166 | 0 | 0 | 0 | 2509 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 99,88 |
| UA | 1056 | 1165 | 0 | 0 | 0 | 1652 | 0 | 860 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 99,88 |
| CG | 1057 | 1164 | 0 | 2308 | 0 | 0 | 0 | 200 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 1 | 99,76 |
| UA | 1059 | 1163 | 0 | 0 | 0 | 2507 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 99,84 |
| CG | 1060 | 1162 | 0 | 1712 | 0 | 4 | 0 | 170 | 0 | 180 | 224 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 203 | 21 | 75,02 |
| AU | 1061 | 1161 | 0 | 0 | 2488 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 23 | 99,01 |
| GC | 1062 | 1160 | 1867 | 0 | 1 | 0 | 640 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 99,72 |
| GC | 1064 | 1080 | 2513 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 99,96 |
| GC | 1065 | 1079 | 2512 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100,00 |
| GC | 1066 | 1078 | 747 | 2 | 403 | 0 | 525 | 0 | 19 | 0 | 40 | 3 | 4 | 2 | 761 | 0 | 6 | 0 | 66,76 |
| AU | 1067 | 1077 | 5 | 0 | 2130 | 0 | 101 | 0 | 1 | 4 | 7 | 0 | 3 | 0 | 262 | 1 | 0 | 1 | 88,91 |
| CG | 1068 | 1076 | 0 | 1492 | 2 | 0 | 0 | 11 | 2 | 104 | 272 | 2 | 0 | 109 | 5 | 0 | 234 | 282 | 59,84 |
| GC | 1085 | 1096 | 2028 | 0 | 0 | 0 | 132 | 0 | 337 | 0 | 0 | 14 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 85,92 |
| GC | 1086 | 1095 | 2508 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 99,92 |
| AU | 1087 | 1094 | 0 | 0 | 1799 | 0 | 627 | 0 | 5 | 41 | 14 | 2 | 9 | 0 | 1 | 0 | 0 | 15 | 96,54 |
| CG | 1088 | 1093 | 0 | 1030 | 584 | 0 | 0 | 0 | 0 | 96 | 6 | 2 | 0 | 3 | 95 | 0 | 678 | 21 | 64,17 |
| GC | 1103 | 1147 | 1887 | 0 | 0 | 0 | 225 | 0 | 257 | 0 | 0 | 143 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 84,01 |
| GC | 1104 | 1146 | 2508 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 99,84 |
| AU | 1105 | 1145 | 0 | 0 | 1685 | 0 | 750 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 66 | 0 | 2 | 1 | 0 | 6 | 96,97 |
| GC | 1106 | 1144 | 1667 | 0 | 12 | 1 | 340 | 0 | 378 | 2 | 7 | 41 | 1 | 1 | 63 | 1 | 0 | 1 | 80,32 |
| UA | 1107 | 1143 | 0 | 1 | 0 | 2172 | 0 | 236 | 0 | 0 | 0 | 0 | 97 | 0 | 0 | 1 | 5 | 0 | 95,90 |
| UG | 1108 | 1142 | 0 | 298 | 0 | 46 | 0 | 1636 | 0 | 470 | 2 | 49 | 0 | 0 | 0 | 1 | 7 | 1 | 78,88 |
| CG | 1109 | 1141 | 1 | 2306 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 115 | 91 | 91,73 |
| AU | 1110 | 1140 | 0 | 0 | 2512 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 99,88 |
| UA | 1113 | 1139 | 0 | 0 | 0 | 2490 | 0 | 17 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 99,72 |
| UA | 1114 | 1138 | 1 | 34 | 2 | 1437 | 0 | 53 | 1 | 2 | 116 | 0 | 517 | 2 | 5 | 296 | 32 | 16 | 60,74 |
| GC | 1115 | 1137 | 2237 | 0 | 0 | 1 | 47 | 0 | 225 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 90,89 |
| UA | 1117 | 1135 | 0 | 26 | 1 | 1236 | 1 | 664 | 42 | 25 | 34 | 7 | 381 | 2 | 1 | 24 | 59 | 9 | 76,75 |
| UA | 1118 | 1134 | 0 | 1 | 0 | 2506 | 0 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 99,84 |
| CG | 1119 | 1133 | 0 | 2509 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 99,88 |
| AU | 1122 | 1131 | 0 | 0 | 2469 | 0 | 18 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 24 | 0 | 0 | 1 | 98,93 |
| UA | 1123 | 1130 | 0 | 14 | 0 | 2029 | 1 | 408 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0 | 0 | 4 | 53 | 0 | 97,53 |
| GC | 1124 | 1129 | 2035 | 0 | 0 | 0 | 476 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 99,84 |

Rysunek 17. A - Model struktury drugorzędowej M121 przewidziany przez program RNAalifold. Kolorami zaznaczono stopień konserwatywność par zasad obliczony dla wirusa grypy typu A: czerwony > 98%, 95% ≤ pomarańczowy < 98%, 90% ≤ zielony < 95%, 85 % ≤ niebieski < 90%. B - Stopień konserwatywności par zasad obliczony dla wirusa grypy typu A: czerwony > 98%, 95% ≤ pomarańczowy < 98%, 90% ≤ zielony < 95%, 85 % ≤ niebieski < 90% (ostatnia kolumna). Na zielono znaczone pary zasad charakteryzujące się mutacjami kompensacyjnymi.

2.2. Mapowanie struktury drugorzędowej M121

RNA o sekwencji odpowiadającej M121 został syntezowany w celu eksperymentalnego określenia struktury drugorzędowej. Możliwość alternatywnego fałdowania się cząsteczki została sprawdzona używając różnych buforów do fałdowania ze zmienną ilością jonów Mg^{2+} lub $[Co(NH_3)_6]^{3+}$. Zwiększenie stężenia magnezu faworyzuje tworzenie się pseudowężła, $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ wykazuje od 3 do 5 razy większe powinowactwo do pseudowężła w porównaniu do struktury typu spinki do włosów (75, 76). Znane są konserwatywne motywy strukturalne wirusa grypy, które formują strukturę typu spinki do włosów lub pseudowężel w zależności od stężenia jonów magnezu czy obecności $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ (62). Naturalna dynamika strukturalna konserwatywnego motywu strukturalnego może być ściśle powiązana z jego funkcją biologiczną. W przypadku M121 struktura jest bardzo stabilna w różnym zakresie stężeń jonów 2- i 3-wartościowych, nie wykazano zmian strukturalnych pod wpływem wysokiego stężenia Mg^{2+} oraz $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ (Rysunek 18).



Rysunek 18. Rozdział M121 na 6% natywnym żelu poliakrylamidowym. Ścieżki 1-4 - M121 fałdowane w buforze zawierającym 10 mM Tris (pH 7), 100 mM KCl oraz odpowiednio różne stężenie $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ (5; 10; 15; 25 mM). Ścieżki 5-11 - M121 fałdowane w buforze zawierającym 10 mM Tris (pH 7), 100 mM KCl oraz odpowiednio różne stężenie magnezu (0; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 oraz 25 mM).

Do dalszych badań wybrano bufor fałdujący zawierający 5 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 50 mM HEPES, pH 7. Mapowanie cząsteczki wykonano w temperaturze 23°C. Mapowanie chemiczne wykonano używając takich odczynników jak CMCT [modyfikuje azot w pozycji 3 reszty urydyny (N3-U) oraz azotu w pozycji 1 reszty guanozyny (N1-G), do modyfikacji dochodzi tylko w rejonach niesparowanych], siarczan dimetylu (DMS) [metyluje azot w pozycji 1 reszty adenozy (N1-A) oraz azot w pozycji 3 reszty cytydyny (N3-C), do metylacji dochodzi w rejonach jednoniciowych], ketoksal (modyfikuje guanozynę, znajdującą się w rejonach jednoniciowych). Wykorzystano także metodę SHAPE z odczynnikiem NMIA [acetyluje grupę hydroksylową w pozycji 2' rybozy konformacyjnie labilnych nukleotydów]. Dla M121 wykonano również hydrolizę RNA w obecności jonów ołowiu oraz mapowanie enzymatyczne stosując RNazę S1 [powoduje hydrolizę RNA po

WYNIKI I DYSKUSJA

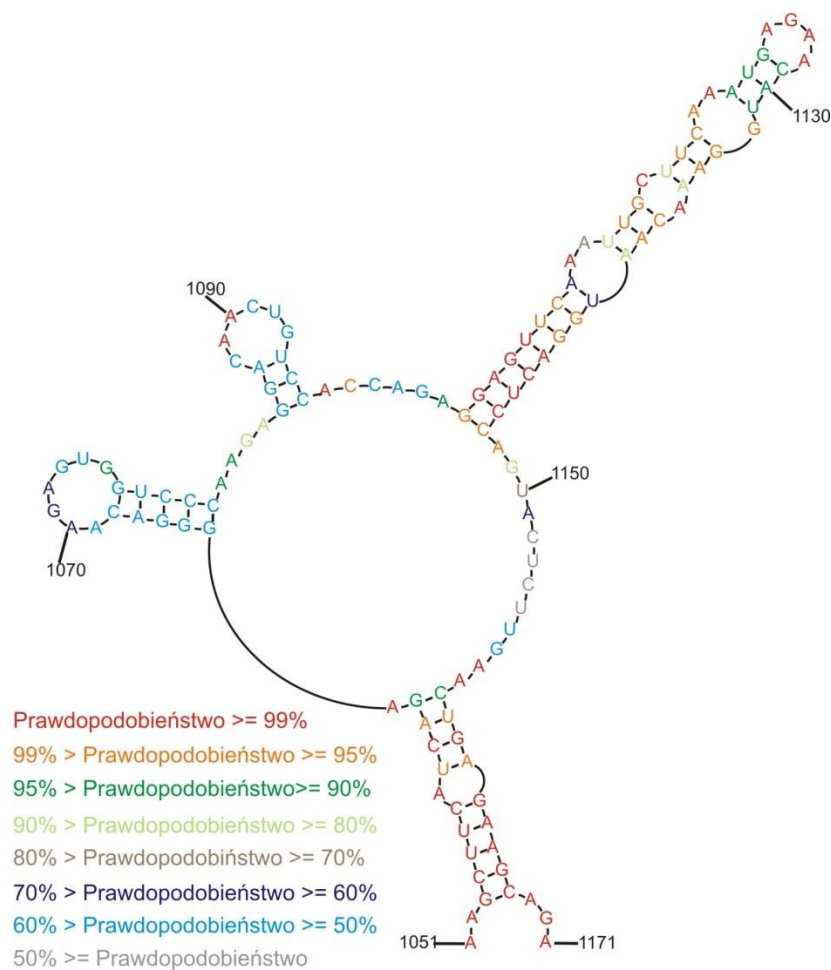
każdym niesparowanym nukleotydzie], RNazę T1 [hydrolizuje RNA po każdej niesparowanej reszcie guanozyny] oraz RNazę V1 [przeprowadza reakcję hydrolizy RNA po każdym sparowanym nukleotydzie].

SHAPE uwidoczniał 16 mocnych modyfikacji oraz 7 średnich (Rysunek 21), DMS - 9 mocnych modyfikacji oraz 3 średnie. Z kolei CMCT i ketoksal odpowiednio 3 i 5 mocne modyfikacje oraz po 3 średnie modyfikacje. Rezultaty mapowania chemicznego zostały wprowadzone do programu RNAstructure 5.5 (77), który wygenerował strukturę drugorzędową badanej cząsteczki M121.

Wykazano, że struktura drugorzędowa M121 wygenerowana przez program RNAstructure 5.5 po wprowadzeniu danych z mapowania chemicznego jest prawie identyczna z modelem struktury drugorzędowej przewidzianej przez program RNAalifold bez żadnych danych eksperymentalnych. Jediną różnicą jest para zasad (C1088-G1093), która według RNAstructure 5.5 nie paruje się ze sobą. Sytuacja taka miała miejsce ze względu na silną modyfikację (duża zawada przestrzenna) wprowadzoną przez CMCT przy 1094 reszcie urydyny. Poza tym wszystkie dane pochodzące z mapowania chemicznego zgadzają się z modelem struktury wygenerowanym przez program RNAalifold. Można, więc powiedzieć, że przewidziany motyw konserwatywny M121 na podstawie porównania sekwencji został potwierdzony eksperymentalnie dla konsensusowego RNA.

Używając programu RNAstructure 5.5 wyliczono prawdopodobieństwo występowania każdej pary zasad oraz rejonów jednoniciowych (78) w strukturach suboptymalnych. Wykazano, że są one są wysoce prawdopodobne, a w szczególności pary zasad w rejonach: 1102-1149, 1051-1063 oraz 1158-1171 (Rysunek 19).

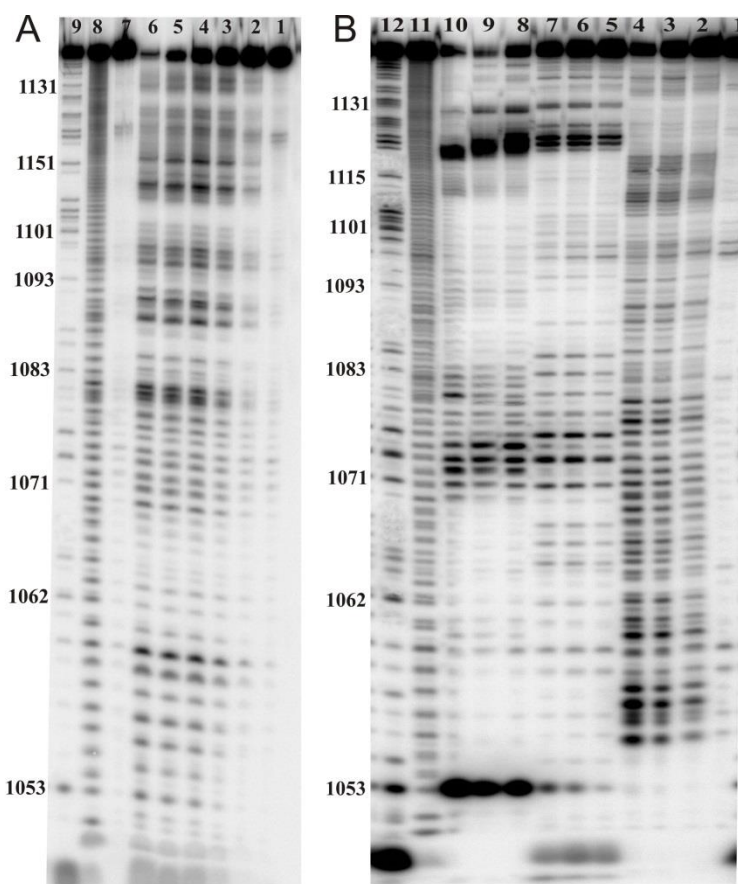
WYNIKI I DYSKUSJA



Rysunek 19. Model struktury drugorzędowej M121. Prawdopodobieństwo występowania par zasad i rejonów jednoniciowych oszacowane w programie RNAstructure 5.5.

Wyniki mapowania chemicznego oraz enzymatycznego pokrywają się i wskazują na dwa najbardziej dostępne rejony dla odczynników mapujących. Nukleotydy z rejonu 1070-1075 są najbardziej reaktywne, zostały zmapowane przez CMCT, NMIA oraz ketoksal. Co więcej, w tym rejonie wykazano cięcie przez RNazy T1 i S1. Program RNAstructure 5.5 wygenerował w tym rejonie pętlę. Kolejnym najbardziej reaktywnym miejscem są nukleotydy w rejonie 1124-1128. W tym rejonie zaobserwowano modyfikację DMS, NMIA oraz ketoksałem, a także hydrolizę RNA indukowaną przez jony ołowiu po 1124 i 1126 nukleotydzie. Ponadto, zauważono cięcie RNA powodowane przez RNazę T1 po 1124 i 1126 guanozynie, a także hydrolizę RNA po nukleotydach 1124-1128 przeprowadzoną przez RNazę S1. Potwierdzeniem obecności jednoniciowego rejonu był brak hydrolizy RNA przez RNazę V1.

WYNIKI I DYSKUSJA



Rysunek 20. A - hydroliza M121 indukowana przez jony ołowiu. RNA był inkubowany z 1 mM octanu ołowiu (II), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7 przez 0, 1, 5, 15, 30, 60 minut (ścieżki 1-6). Ścieżka 7 - kontrola: RNA inkubowane w buforze zawierającym 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7 przez 60 minut. Ścieżka 8 - drabinka formamidowa. Ścieżka 9 - drabinka T1 powstała przez działanie RNazy T1 na badane RNA w warunkach denaturujących. B - mapowanie enzymatyczne M121. Wszystkie reakcje zostały wykonane w temperaturze 23°C przez 30 minut. Ścieżka 1 - kontrola: RNA inkubowane w buforze zawierającym 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7 przez 30 minut, w temperaturze 23°C. Ścieżki 2-4 - hydroliza RNA indukowana przez RNazę V1 we wzrastającym stężeniu enzymu (0,5x10⁻³ U/ul, 1x10⁻³ U/ul, 3x10⁻³ U/ul); Ścieżki 5-7 - hydroliza RNA indukowana przez RNazę T1 we wzrastającym stężeniu enzymu (0,15 U/ul, 0,25 U/ul, 0,75U/ul). Ścieżki 8-10 - hydroliza RNA indukowana przez RNazę S1 we wzrastającym stężeniu enzymu (0,05 U/ul, 0,3 U/ul, 1U/ul). Ścieżka 11 - drabinka formamidowa; ścieżka 12 - drabinka T1.

Przewidziana struktura spinki do włosów z pętlą, którą tworzą reszty nukleotydowe 1087-1093 została słabiej zmapowana niż dwa wyżej opisane rejony. Reszty adenozyne 1089 oraz 1090 zostały zmodyfikowane przez DMS, natomiast reszta urydyny 1094 przez CMCT. Zauważono także hydrolizę RNA indukowaną jonami ołowiu po A1090. Natomiast, w opisywanym rejonie nie zaobserwowano cięć wywołanych przez stosowane RNazy.

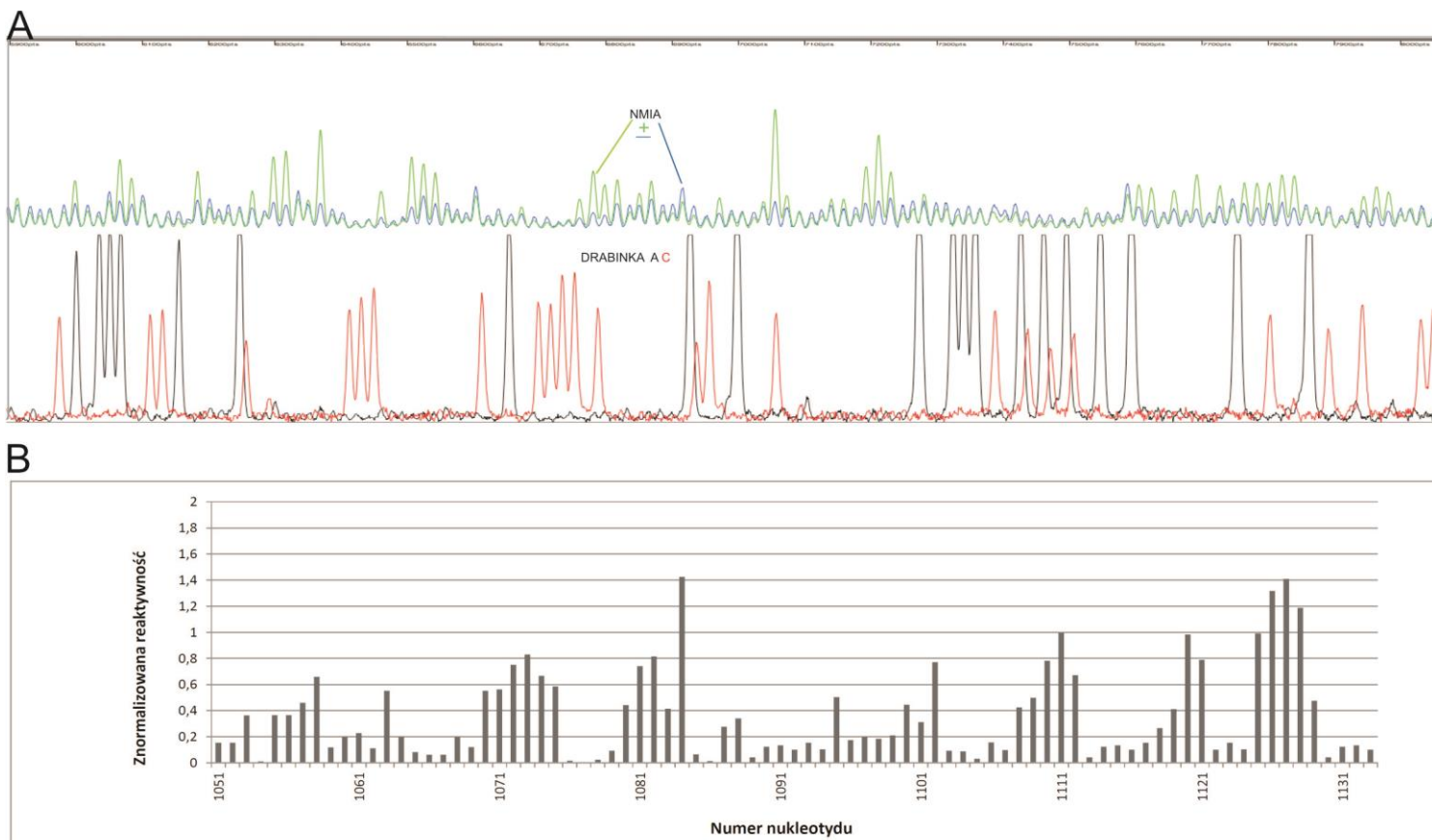
Jednoniciowy region między strukturami typu spinki do włosów ulegał silnej modyfikacji przy nukleotydach 1081-1084. W tym miejscu zaobserwowano

WYNIKI I DYSKUSJA

modyfikacje wprowadzoną przez NMIA, DMS oraz ketoksal, a także w rejonie 1080-1082 obserwowano hydrolizę RNA indukowaną przez jony ołowiu. Ten fragment jest bardziej dostępny niż pętla 1085-1096.

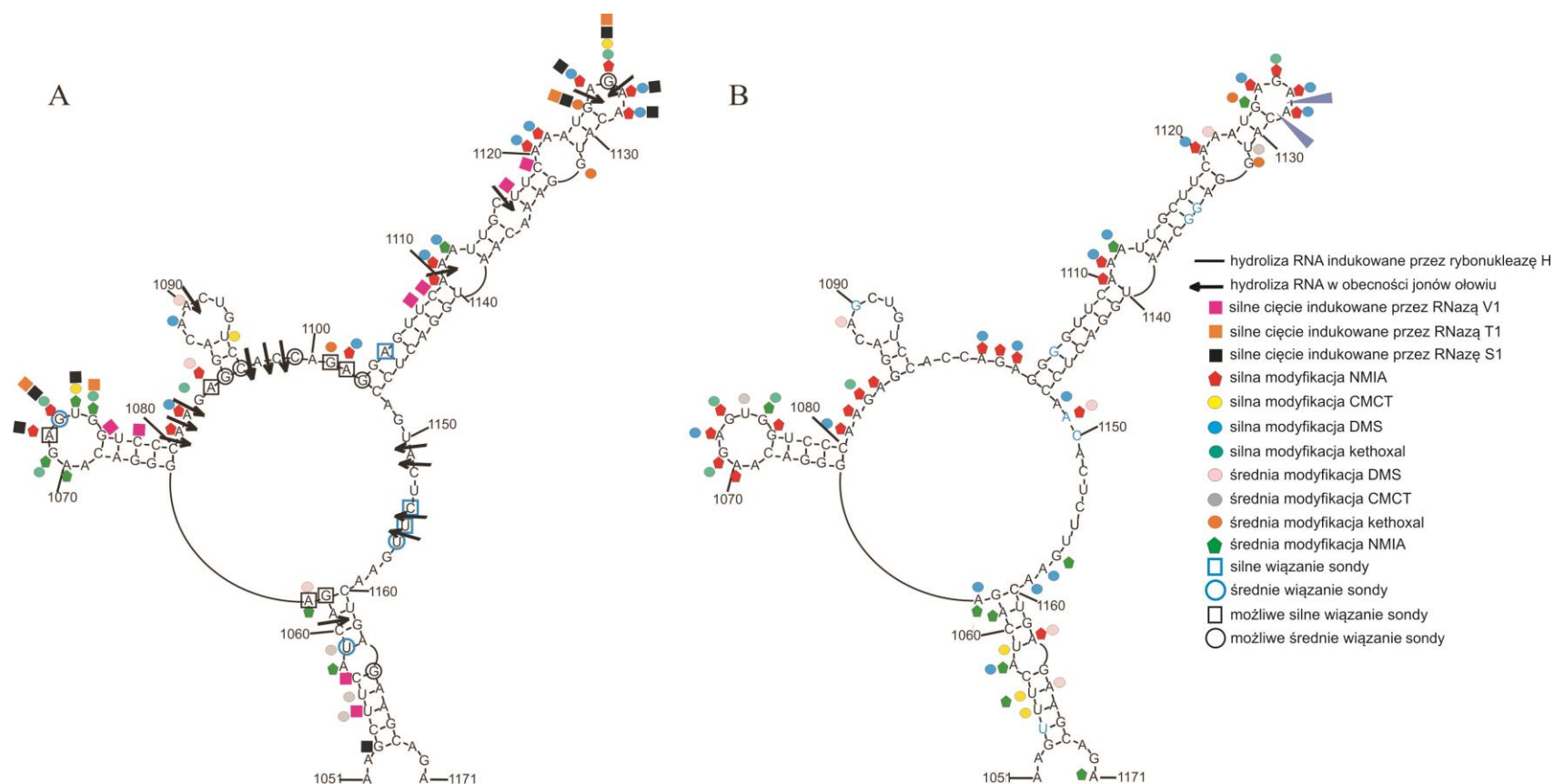
Indukowana hydroliza jonami ołowiu wskazała kolejne dostępne reszty nukleotydów: 1096-1098, 1150, 1151, 1154, 1155. W jednoniciowym regionie 1097-1102 zaobserwowano dwie modyfikacje. Region między 1133-1171 nukleotydem nie był odczytywany ze względu na ograniczenia odwrotnej transkrypcji. Struktury typu spinki do włosów 1064-1080, 1103-1147 oraz helisy 1053-1062/1168-1160 zostały dobrze potwierdzone w analizie strukturalnej. Dodatkowo, mapowania NMIA, DMS oraz ketoksałem potwierdzały wybrzuszenia wewnętrzne przy nukleotydach: 1111-1112, 1116, 1120-1121, 1132, 1058. Po nukleotydach 1110 oraz 1116 zaobserwowano silną hydrolizę RNA wywołaną jonami ołowiu. Hydroliza RNA po nukleotydzie 1110 było najsilniejsza dla całej cząsteczki. Cięciom RNazą V1 ulegały helisy w rejonie 1053-1057/1168-1164, 1064-1068/1076-1080, 1103-1110/1140-1147 oraz 1117-1119/1133-1135 (Rysunek 20 i 22).

WYNIKI I DYSKUSJA



Rysunek 21. A. - Przykład elektroforegramu powstającego po wykonaniu elektroforezy kapilarnej produktów cDNA powstałych podczas odczytu za pomocą odwrotnej transkrypcji wyników mapowania M121 metodą SHAPE, przy wykorzystaniu startera SM1. B. – Znormalizowane reaktywności nukleotydów M121. Mapowanie przeprowadzono w temperaturze 23°C.

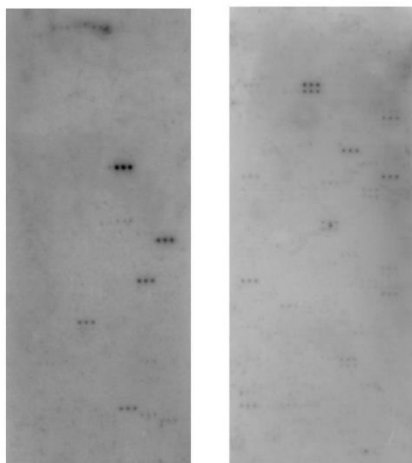
WYNIKI I DYSKUSJA



Rysunek 22. A - M121, 121-nukleotydowe RNA o konsensusowej sekwencji. Struktura drugorzędowa została wygenerowana przez program RNAstructure 5.5 po wprowadzeniu danych z mapowania chemicznego oraz metody SHAPE. Zaznaczono wyniki uzyskane przy użyciu metod mapowania chemicznego, w tym SHAPE, enzymatycznego, indukowanej hydrolizy RNA w obecności jonów ołowiu oraz hybrydyzacji do mikromacierzy izoenergetycznych. B – struktura drugorzędowa regionu odpowiadającemu M121 szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) wraz z zaznaczonymi wynikami mapowania chemicznego, techniki SHAPE, hydrolizy RNA w obecności RNazy H. Niebieskie litery wskazują różnice między sekwencją regionu odpowiadającemu M121 szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), a sekwencją konsensusową M121.

2.3. Hybrydyzacja M121 do macierzy izoenergetycznych

Dostępność M121 dla oligonukleotydów została sprawdzona dzięki wykorzystaniu metody mapowania mikromacierzowego z wykorzystaniem macierzy izoenergetycznych. Macierze izoenergetyczne powstały w Zespole Genomiki Strukturalnej RNA we współpracy z Zakładem Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych. Składają się z 5- lub 6-nukleotydowych sond, które zawierają modyfikacje typu LNA, 2'-O-metylo-RNA, 2,6-diaminopurynorybozyd w serii 2'-O-metylo-RNA oraz LNA (78-80). Wszystkie sondy są tak zaprojektowane, aby energia hybrydyzacji RNA do sondy była w przybliżeniu taka sama (81-84). Dodatkowo, wprowadzone modyfikacje podnoszą stabilność powstałego poprzez hybrydyzację dupleksu. Tak na przykład, 2,6-diaminopurynorybozyd, pochodna adenozyne pozwala na tworzenie dodatkowego wiązania wodorowego, czyniąc parę 2,6-diaminopurynorybozyd-urydyna podobnie stabilną jak guanozyna-cytydyna (81). W przypadku modyfikacji typu LNA obecność pojedynczego nukleotydu LNA zwiększa trwałość potencjalnego dupleksu o około 1,5 kcal/mol. Jak wykazano, możliwość związania z sondami zależy od struktury drugorzędowej badanego RNA (79, 85-87). Hybrydyzacja jest możliwa z rejonami jednoniciowymi RNA, natomiast rejony helikalne nie ulegają hybrydyzacji.



Rysunek 23. Przykładowy wynik hybrydyzacji M121 do sond macierzy izoenergetycznych w temperaturze 23°C.

WYNIKI I DYSKUSJA

Tabela 1. Wyniki hybrydyzacji M121 do macierzy izoenergetycznych.

| Miejsce wiązania M121 ^a | Sekwencja sondy ^b | Siła wiązania sondy ^c | | | Energia swobodna kompleksu komplementarna sonda/RNA $\Delta G^{\circ}_{37^{\circ}\text{d}}$ (kcal/mol) | Energia swobodna kompleksu alternatywna sonda/RNA $\Delta G^{\circ}_{37^{\circ}\text{e}}$ (kcal/mol) |
|------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|------|------|--|--|
| | | 4°C | 23°C | 37°C | | |
| 1055/ 1117 | GdAgCg | W | W | M | -9,54 | |
| 1056 | uGdDgg | W | W | - | -12,10 | -5,1 (1118/1119) |
| 1059 | uGdUgg | M | M | - | -9,04 | |
| 1060 | CuGaUg | M | W | - | -9,43 | |
| 1062 | CUcUgg | S | S | M | -9,14 | -9,7 (1100/1101) |
| 1063/ 1102 | CcUcUg | S | S | S | -12,03 | -9,39 (1101/1102) |
| 1065 | UcCcUg | W | W | - | -10,47 | -7,7 (1056) |
| 1072 | DcUcUg | S | S | S | -9,12 | -6,5 (1101) -6,3 (1061/1062) -4,5 (1105) |
| 1073 | CdCuCg | M | M | M | -8,64 | |
| 1081 | cUuGgg | W | W | | -12,05 | |
| 1084 | CcUcUg | S | S | S | -10,09 | -9,3 (1062/1063) -9,3 (1101/1102) |
| 1085 | uCcUcg | M | M | - | -9,99 | -8,1 (1103) |
| 1094 | GGdCDg | M | W | - | -10,65 | |
| 1096 | GUgGdg | M | M | M | -10,39 | -4,1 (1056/1057) |
| 1099 | cUgGug | M | M | M | -12,38 | -6,3 (1059/1060) |
| 1100 | UcUgGg | W | W | - | -9,91 | -6,1 (1080/1081) |
| 1101 | CUcUgg | S | S | M | 12,07 | -7,4 (1062) |
| 1102 | CcUcUg | S | S | S | -10,09 -12,03 | -9,3 (1062/1063) -7,4 (1084) |
| 1103 | uCcUcg | M | M | - | -9,99 | -8,1 (1103) -7,8 (1085) |
| 1105 | DcUcCg | S | S | M | -10,04 | |

WYNIKI I DYSKUSJA

| | | | | | | |
|---------------|--------|---|---|---|--------|---|
| 1117/ 1055 | GdAgCg | W | W | M | -9,54 | |
| 1118 | uGaDgg | M | W | - | -8,24 | -4,9 (1056) |
| 1126 | uUcUcg | S | M | M | -8,12 | -5,7 (1164) -5,2 (1103) -4,9 (1085) |
| 1154 | dDgDgg | M | S | M | -10,03 | |
| 1155 | cDdGdg | M | S | S | -9,49 | |
| 1156 | uCdDgg | W | M | - | -8,68 | |
| 1164 | uUcUcg | M | M | M | -8,12 | -5,4 (1126) -5,2 (1103) -4,9 (1085) |
| 1166 | gCuUcg | M | W | W | -11,62 | -4,6 (1105) |

a – miejsce wiązania sondy, czyli środkowy nukleotyd (lub dwa nukleotydy dla parzystych rejonów komplementarnych) rejonu wiązania badanego RNA do sondy, b – Duże litery (A, C, G, U, D) oznaczają nukleotydy typu 2'-O-metyloRNA, małe litery (a, c, g, u, d) oznaczają nukleotydy zawierające modyfikacje typu LNA, D lub d oznacza 2,6-diaminopurynoribozyd zawierający odpowiednio modyfikacje 2'-O-metyloRNA lub modyfikacje typu LNA. c – dupleks sonda/badane RNA został uznany, jako silny (S), średni (M), słaby (W) kiedy intensywność była $\geq 1/3 \geq 1/9$ oraz $\geq 1/27$ najwyższej intensywności. Brak wiązania oznaczono „-”. Warunki hybrydyzacji: 300 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM HEPES, pH 7,0. d - ΔG_{37}° obliczona dla dupleksu modyfikowana sonda/RNA (81). e - ΔG_{37}° obliczona przez program RNAstructure 5.5 dla dupleksu RNA/RNA, w nawiasach podano miejsca, dla których przedstawiono obliczenia. Zostały przedstawione jedynie alternatywne miejsca wiązania sond o termodynamicznej stabilności większej niż -4 kcal/mol.

Wyniki hybrydyzacji M121 do sond macierzy izoenergetycznych w trzech temperaturach (4, 23, 37°C) zebrane są w Tabeli 1. Wiązanie M121 do sond w temperaturach 4°C oraz 23°C jest niemal identyczne. Wyższa temperatura ogranicza wiązanie sond przez RNA, pozostawiając te najbardziej termodynamicznie stabilne i specyficzne.

Każda związana z M121 sonda była rozważana w oparciu o możliwość tworzenia alternatywnych miejsc wiązania. Możliwe alternatywne miejsca wiązania (termodynamicznie stabilne oraz niecałkowicie komplementarne) zebrane są w ostatniej kolumnie w Tabeli 1. Wszystkie miejsca wiązania w temperaturze 23°C zostały zaprezentowane na rysunku 22A. Wykazano, że dostępne miejsca wiązania sond są w rejonie jednoniciowym: 1073, 1154, 1155 oraz 1156 (miejsce wiązania sondy jest oznaczone przez środkowy nukleotyd regionu RNA, z którym oddziałuje sonda).

WYNIKI I DYSKUSJA

Zaobserwowano także wiązanie sondy w słabo ustrukturyzowanym regionie w sąsiedztwie wewnętrznego wybrzuszenia RNA (sonda 1059). Sonda DcUcCG (małe litery oznaczają modyfikacje typu LNA) wiąże się w miejscu 1105, które jest przewidziane, jako rejon helikalny. Wiązanie to jest prawdopodobne ze względu na to, że jest to rejon bogaty w adenozyne i guanozyne, przez co sonda może utworzyć tripleks. Dodatkowo, wykazano możliwość wiązania się sond w rejonach jednoniciowych: 1084–1085, 1096, 1099, 1101–1103, 1126. Hybrydyzacja w temperaturze 37°C dodatkowo potwierdza trwałe wiązanie sond do niektórych jednoniciowych rejonów M121.

2.4. Motyw M121 w segmencie 5 RNA(+) szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)

Postanowiono sprawdzić czy zidentyfikowany konserwatywny motyw strukturalny M121 potwierdzony dla izolowanego fragmentu RNA tworzy się również, jako część struktury całego, 1565 nukleotydowego RNA segmentu 5. Potwierdzenie istnienia motywu strukturalnego M121, jako stabilnego termodynamicznie w pełnej długości segmencie 5 RNA pośrednio ukazuje wysokie prawdopodobieństwo i termodynamiczne uprzywilejowanie tworzenia właśnie takiej struktury *in vivo*.

Do badań wybrano segment 5 RNA(+) szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Rejon odpowiadający M121 w segmencie 5 RNA(+) - 1051-1171 został zbadany z wykorzystaniem metody SHAPE oraz metod mapowania chemicznego z użyciem CMCT, DMS oraz ketoksalu. W reakcji odwrotnej transkrypcji użyto jeden starter, który umożliwił odczyt całego rejonu odpowiadającemu M121 (starter SM1). Do badań nad analogicznym rejonem M121 w segmencie 5 RNA(+) wykorzystano także metodę hydrolizy RNA w obecność RNazy H oraz oligomerów DNA. Ważny jest fakt, że sekwencja M121 szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) różni się od sekwencji konsensusowej M121 omówionej wcześniej. Różnice dotyczą nukleotydów w pozycjach 1054, 1090, 1105, 1135, 1136, 1149 oraz 1150. W każdym przypadku puryna zastąpiona jest inną puryną, a pirymidyna inną pirymidyną (Rysunek 22). Uzyskane wyniki mapowania zaprezentowano na rysunku 22B. Wyniki mapowań pozostają w zgodzie z modelem struktury drugorzędowej M121. Reaktywności wskazują na obecność struktur typu spinka do włosów w rejonach 1064-1080 oraz 1103-1147. Także, hydroliza RNA z użyciem RNazy H w obecności oligonukleotydu TGTTCTC, komplementarnego do rejonu 1124-1130 potwierdza obecność rejonu jednoniciowego,

WYNIKI I DYSKUSJA

który tworzy pętle w modelu M121. Zaobserwowano także modyfikacje w rejonie helisy 1053-1062/1168-1160. Reszta nukleotydu 1056 została zmapowana przez CMCT oraz NMIA. Modyfikację NMIA zaobserwowano przy resztach nukleotydów 1061 oraz 1163. Reszta nukleotydowa 1163 została dodatkowo zmodyfikowana przez DMS. Jedyna różnica między M121, a analogicznym rejonem w segmencie 5 RNA(+) dotyczy rejonu 1150-1156, który jest całkowicie niereaktywny w całym segmencie 5 RNA(+), natomiast w M121 cięcia RNA indukowane jonami ołowiu potwierdzają rejon jednoniciowy. Jednocześnie badania wykazały, że w rejonie M121 nie dochodzi do żadnych rearanżacji struktury drugorzędowej w szerokim spektrum warunków buforowych (zmienne stężenia jonów II i III wartościowych), (strona 81). Różnice w dostępności rejonu 1150-1156 można wyjaśnić trzeciorzędowymi oddziaływaniami z innym rejonem segmentu 5 RNA(+), tak na przykład z pobliskim rejonem 991-997, który jest komplementarny do 1150-1156. Oddziaływania dalekiego zasięgu są powszechne wśród wielu wirusów RNA (88, 89).

2.5. Inhibicja namnażania wirusa grypy w liniach komórkowych przez antysensowne oligonukleotydy nacelowane na M121

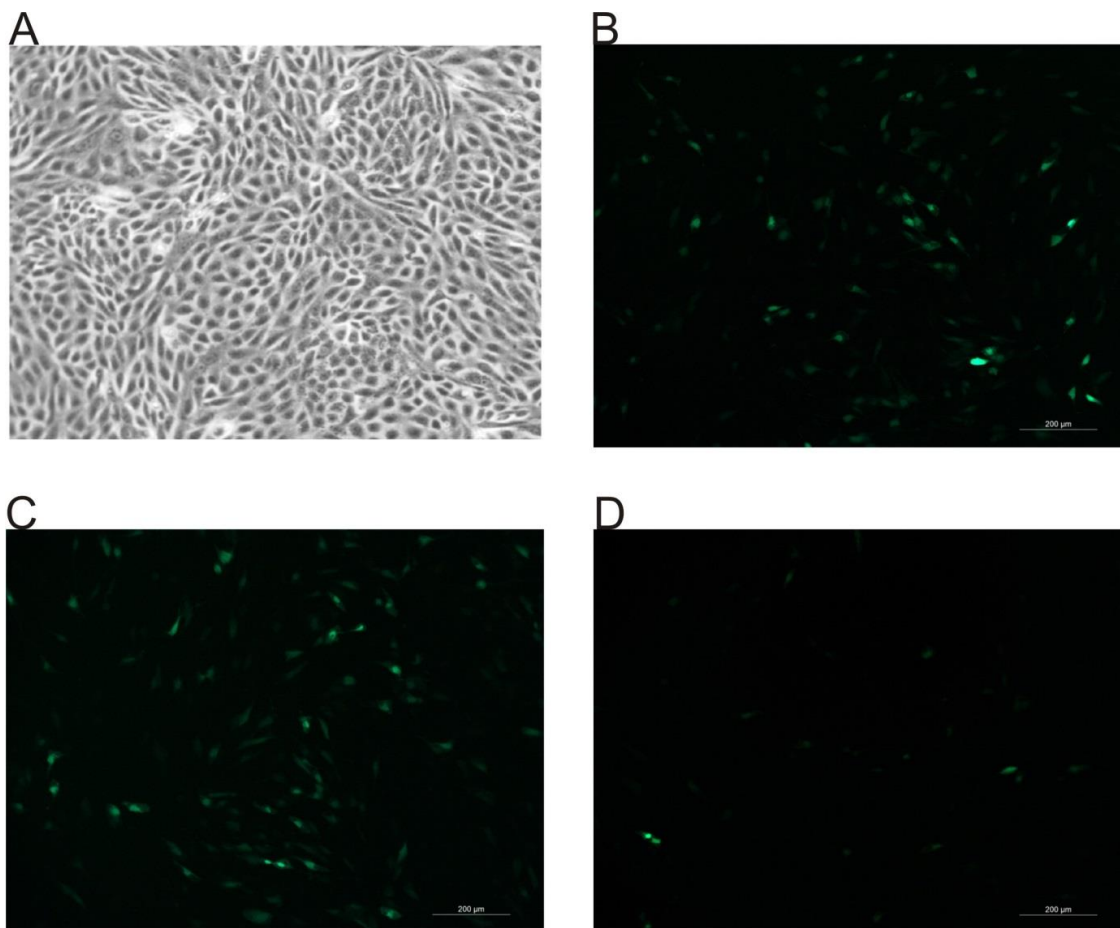
W celu hamowania namnażania wirusa grypy stosowano terapeutyki oddziałujące z białkami wirusa oraz antysensowne oligonukleotydy, siRNA oraz miRNA nacelowane na RNA wirusa grypy (90-93). Rejony RNA, które brały udział w oddziałyvaniach z potencjalnymi terapeutykami charakteryzowały się konserwatywną sekwencją, zawierały sygnały składania wirionu lub kodon start (94-97). Segmenty 1, 2, 3, 5 oraz 8 wirusa grypy były jak do tej pory celami badań nad inhibicją namnażania wirusa grypy poprzez wykorzystanie antysensownych oligonukleotydów (72, 94, 98-101).

M121, jako strukturalnie konserwatywny motyw może okazać się dobrym celem w badaniach inhibicji namnażania wirusa grypy. Postanowiono zaprojektować ASO nacelowane na M121 na podstawie jego struktury drugorzędowej. Kryterium wyboru były rejony jednoniciowe, dostępne dla sond mikromacierzy i/lub reagentów mapujących.

Potencjał inhibicyjny antysensownych oligonukleotydów został przetestowany w liniach komórkowych MDCK-HA oraz MDCK, które były infekowane jednocyklicznym lub naturalnym wirusem grypy szczepu A/California/04_NYICE_E3/2009 (H1N1) (naturalny lub jednocykliczny wirus grypy dostosowano do odpowiedniej linii komórkowej, w której wirus mógł się namnażać)

WYNIKI I DYSKUSJA

(Rysunek 24). Szczep A/California/04_NYICE_E3/2009 (H1N1) wybrano ze względu na istnienie jednocyklicznego oraz naturalnego wirusa grypy. Dodatkowo, za wyborem tego szczepu przemawia fakt istnienia systemu zwierzęcego (mysiego) do badań wirusa grypy wybranego szczepu w laboratorium prof. Luisa Martinez-Sobrido z University of Rochester, USA, z którym Zespół Genomiki Strukturalnej RNA od lat współpracuje.



Rysunek 24. Przykładowy obraz spod mikroskopu. A – komórki MDCK-HA, B – kontrola (brak ASO i brak lipofektaminy 2000), C – kontrola (lipofektamina 2000), D – efekt działania ASO - 2A.

Szczep A/California/04/2009 (H1N1) jest szczepem wyizolowanym w 2009 roku w Stanach Zjednoczonych. W tym też czasie doszło do wielu zachorowań na grypę spowodowanych tym szczepem o epidemiologicznym zasięgu, w sumie w 40 krajach. Omawiany szczep ma duży potencjał pandemiczny i jest na liście groźących pandemią i monitorowanych szczepów

Do badań wykorzystano metodę immunofluorescencją, z dwoma specyficznymi przeciwciałami, z których jedno było znakowane FITC (pochodna fluoresceiny) oraz technikę PCR w czasie rzeczywistym. Antysensowe oligonukleotydy zostały użyte w stężeniu 0,75 µM oraz 4 µM. Stężenie 4 µM zastosowano we wstępnych badaniach z

WYNIKI I DYSKUSJA

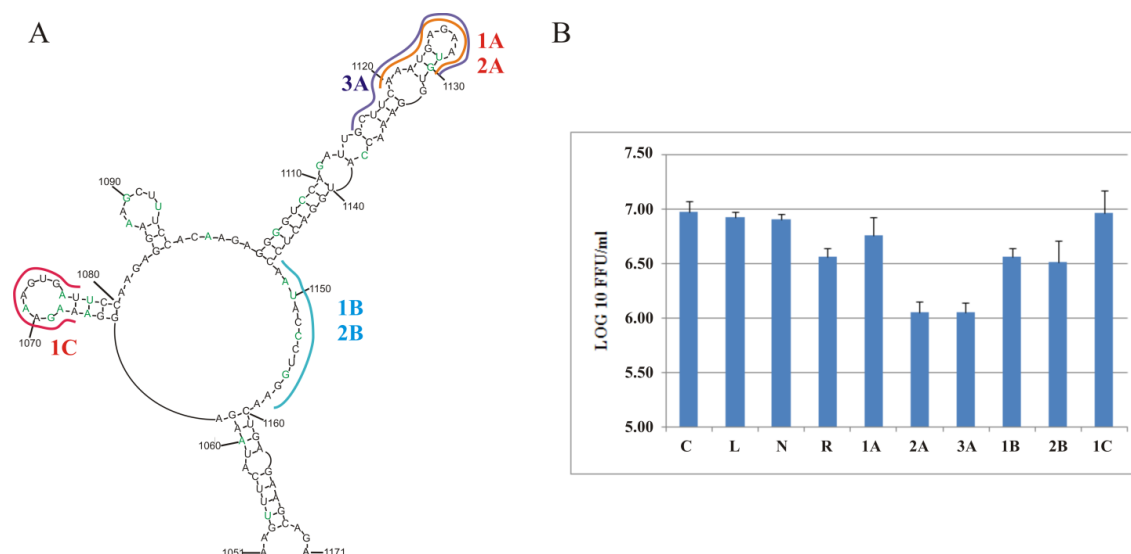
wykorzystaniem jednocyklicznego wirusa grypy. Stężenie 0,75 μM zostało wybrane na podstawie badań efektywności transfekcji. W tych badaniach testowano oligomery w stężeniu: 0,1 - 4 μM . Stwierdzono, że stosowanie większego stężenia niż 0,75 μM nie skutkuje zwiększeniem wydajności transfekcji.

Zaprojektowano oligonukleotydy będące w całości 2'-O-metylo-RNA, a ponadto zastosowano oligomery zawierające dodatkowo modyfikację typu LNA. Antysensowe oligonukleotydy z modyfikowanymi nukleotydami LNA tworzą trwalsze termodynamicznie duplekisy z RNA, są bardziej odporne na działanie komórkowych nukleaz, a także ich czas półtrwania jest dłuższy niż oligomerów bez modyfikacji (102).

Sekwencja rejonu M121 szczepu A/California/04/2009 (H1N1) różni się od sekwencji motywu konsensusowego M121. W czasie projektowania antysensowych oligonukleotydów wzięto pod uwagę różnice w sekwencji i potencjalne inhibitory zaprojektowano tak, aby były całkowicie komplementarne do docelowych rejonów wirusowego RNA. Jako miejsce oddziaływań antysensowych oligonukleotydów wybrano pętle dwóch dobrze scharakteryzowanych spinek (1064-1080 oraz 1103-2247) oraz rejon łączący dwie struktury typu spinki, który może brać udział w trzeciorzędowych oddziaływaniach (Rysunek 25).

Antysensowe oligonukleotydy 2A oraz 3A zawierające modyfikacje typu LNA oraz 2'-O-metyloRNA nacelowane na pętle spinki do włosów oraz wewnętrzne wybrzuszenie M121 (region 1120-1130 oraz 1115-1130) w sposób znaczący hamowały namnażanie jednocyklicznego wirusa grypy. Stopień inhibicji obu antysensowych oligonukleotydów był bardzo zbliżony i powodował 8,4-krotne obniżenie namnażania jednocyklicznego wirusa grypy w porównaniu z kontrolą, którą stanowiły komórki transfekowane samą lipofektaminą 2000 oraz komórki transfekowane oligomerem kontrolnym N (oligomer zawierający niespecyficzną sekwencję względem RNA wirusa grypy) (92, 94). Badana spinka wydaje się pełnić znaczącą rolę w namnażaniu wirusa grypy. Z kolei niemodyfikowany antysensowy oligonukleotyd oddziałujący z badaną spinką do włosów w sposób nieznaczny obniżał namnażanie wirusa grypy. Wyniki te świadczą o znaczącym wpływie modyfikacji typu LNA w oligonukleotydzie 2'-O-metyloRNA, które poprzez zwiększenie termodynamicznej stabilności dupleksu antysensowy oligonukleotyd/docelowy region RNA poprawiają inhibujące właściwości oligonukleotydu antysensowego. Silniejsze związanie ASO przekłada się na wyższy stopień inhibicji namnażania wirusa grypy.

WYNIKI I DYSKUSJA



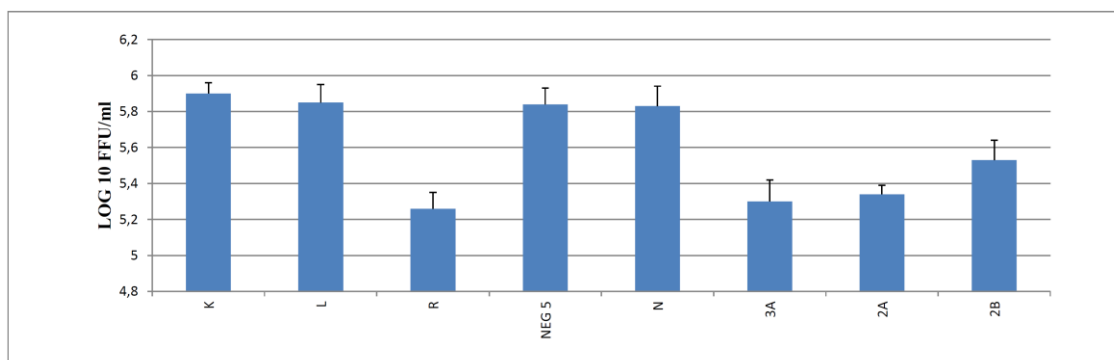
Rysunek 25. A - M121 z zaznaczonymi komplementarnymi regionami do antysensowych oligonukleotydów. Na zielono zaznaczono różnice w sekwencji między szczepem A/California/04/2009 a sekwencją konsensusową M121. B – Efekt działania antysensowych oligonukleotydów nacelowanych na M121 testowanych z użyciem jednocyklicznego wirusa grypy A/California/04_NYICE_E3/2009 w liniach komórkowych MDCK-HA. C - kontrola, L - kontrola z lipofektaminą 2000, N - negatywna kontrola z oligomerem N, R – pozytywna kontrola z rybawiryną. Wyniki uzyskano dzięki wykorzystaniu metody immunofluorescencyjnej.

Oddziaływania dalekiego zasięgu między regionami 1151-1157/991-997 są również możliwe dla szczepu A/California/04/2009. Jednak interakcje te są słabsze w porównaniu z oddziaływaniami, jakie mogą zajść w szczepie wirusa grypy A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Obniżenie stabilności oddziaływań związane jest z występowaniem dwóch niesparowań w omawianych regionach (5'ACCCUGG/3'UGAGAAC). Związanie się ASO 1B oraz 2B do regionu 1148-1158 powodowało odpowiednio 3,9- oraz 4,0-krotne hamowanie namnażania jednocyklicznego wirusa grypy (oligomery 1B oraz 2B posiadały te same sekwencje, z tym, że ASO 2B zawierał dodatkowo nukleotyd typu LNA). Oligomer 2B obniżał namnażanie wirusa nieznacznie lepiej niż 1B. Wyniki te pozostają w zgodzie z danymi, jakie uzyskano w trakcie mapowania *in vitro*. Wykazano, że region 1148-1159 jest częściowo chroniony przed modyfikacjami chemicznymi, a także nie obserwowano wiązania się do niego sond oligonukleotydowych. Co więcej, dochodzi do słabej hydrolizy RNA w obecności RNazy H oraz oligomeru TCAAGAGTG komplementarnego do rejonu 1150-1158. Dane wskazują, że rejon 1151-1157 może brać udział w słabych oddziaływaniach trzeciorzędowych.

WYNIKI I DYSKUSJA

Antysensowy oligonukleotyd 1C, komplementarny do regionu 1067-1077, nie wpływa znacząco na obniżenie namnażania jednocyklicznego wirusa grypy. Dane te sugerują, że spinka 1085-1096 nie odgrywa kluczowej roli w cyklu replikacyjnym wirusa grypy.

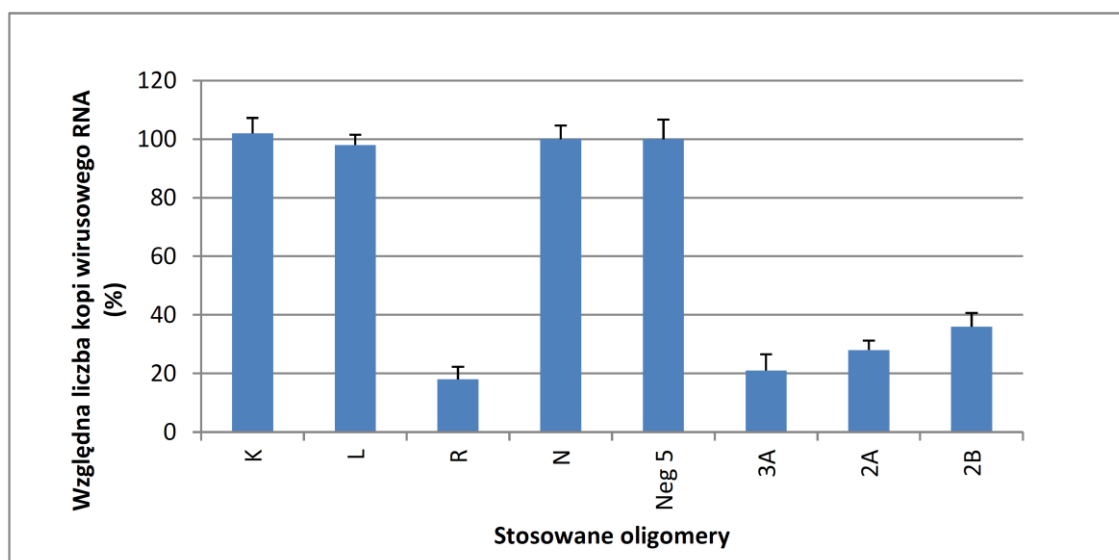
W kolejnym etapie badań wybrano antysensowe oligonukleotydy, które najlepiej hamowały namnażanie jednocyklicznego wirusa grypy (2A, 3A, 2B) i przetestowano je w linii komórkowej MDCK zainfekowanej naturalnym wirusem grypy A/California/04/2009 (H1N1). Wyniki tych badań potwierdziły inhibujący potencjał zaprojektowanych oligonukleotydów. Uzyskane wyniki były zgodne z danymi otrzymanymi w wyniku badań z jednocyklicznym wirusem grypy. Wykazano, że wszystkie przetestowane oligomery hamowały namnażanie wirusa grypy. Oligomer 3A hamował namnażanie wirusa grypy – 5,4-krotnie, oligomer 2A – 5,0-krotnie, natomiast oligomer 2B – 3,0-krotnie.



Rysunek 26. Efekt działania antysensowych oligonukleotydów nacelowanych na M121 testowanych z użyciem naturalnego wirusa grypy A/California/04/2009 w liniach komórkowych MDCK. K - kontrola, L - kontrola z lipofektaminą 2000, N - negatywna kontrola z oligomerem N, Neg 5 - negatywna kontrola z oligomerem Neg 5 (oligomer komplementarny do regionu helikalnego segmentu 5 RNA(+), R – pozytywna kontrola z rybawiryną. Wyniki uzyskano dzięki wykorzystaniu metody immunofluorescencyjnej.

Stopień inhibicji namnażania wirusa grypy przez antysensowe oligonukleotydy badano także, wykorzystując metodę PCR w czasie rzeczywistym. W tym wypadku wybrano do doświadczeń ASO najlepiej hamujące namnażanie wirusa grypy (2A, 3A, 2B) wyselekcjonowane z użyciem metody immunofluorescencyjnej.

WYNIKI I DYSKUSJA



Rysunek 27. Efekt działania antysensowych oligonukleotydów naczelnianych na M121 wirusa grypy A/California/04/2009 w liniach komórkowych MDCK. K - kontrola, L - kontrola z lipofektaminą 2000, N - negatywna kontrola z oligomerem N, Neg 5 – negatywna kontrola z oligomerem Neg 5, R – pozytywna kontrola z rybawiryną. Wyniki uzyskano dzięki wykorzystaniu metody PCR w czasie rzeczywistym.

Wykorzystując metodę PCR w czasie rzeczywistym wykazano znaczący stopień inhibicji namnażania wirusa grypy przy użyciu wszystkich testowanych antysensowych oligonukleotydów w porównaniu z oligomerami kontrolnymi N oraz Neg 5 niewpływającymi na namnażanie wirusa. Oligomer N jest to oligomer o niespecyficznej sekwencji względem RNA wirusa grypy (94), natomiast Neg 5 jest to ASO komplementarny do regionu helikalnego, występującego w segmencie 5 RNA(+) (Tabela 12). Zastosowano także kontrolę pozytywną z rybawiryną, która jest komercyjnie dostępnym środkiem o właściwościach przeciwwirusowych (103). Rybawiryna pozwoliła ocenić prawidłowy przebieg eksperymentu, natomiast mechanizm jej działania jest inny niż oligonukleotydów i bezpośrednio nie była z nimi porównywana.

W wyniku badań zaobserwowano inhibicję namnażania wirusa grypy na poziomie 79%, 72%, 64% odpowiednio przy użyciu oligomeru 3A, 2A oraz 2B. Wyniki inhibicji oligonukleotydów antysensowych są zgodne z danymi uzyskanymi metodą immunofluorescencyjną. Najsilniej inhibującym oligonukleotydem był 3A, a najslabiej 2B, lecz ze względu na czułość metod stopień inhibicji jest różny.

Dodatkowo, metoda PCR w czasie rzeczywisty uwidoczniła różnicę w działaniu między ASO 2A oraz 3A. Antysensowy oligonukleotyd 3A hamował namnażanie wirusa grypy nieznacznie lepiej niż oligomer 2A. Związane to może być z faktem, że

oligonukleotydy 3A oraz 2A oddziałują z tym samym miejscem, ale oligomer 3A jest dłuższy i dodatkowo blokuje jednonukleotydowe wybrzuszenie wewnętrzne.

2.6. Określenie cytotoksyczności użytych oligomerów antysensowych

W ostatnim etapie prac z antysensowymi oligonukleotydami badano ich potencjalną cytotoksyczność, jaką mogą wywierać na linii komórkowej MDCK. Do tego celu posłużono się testem redukcji soli tetrazolowej (test MTT). Do badań wybrano 3 antysensowe oligonukleotydy: 2A, 3A oraz 2B. Testowano je w zakresie stężeń od 0,1 do 4 μM . Wykazano, że badane antysensowe oligonukleotydy nie wykazują cytotoksycznego efektu na komórki MDCK, w żadnym z zastosowanych stężeń.

3. Konserwatywny motyw strukturalny RNA wirusa grypy M198

3.1. Mapowanie struktury drugorzędowej M198

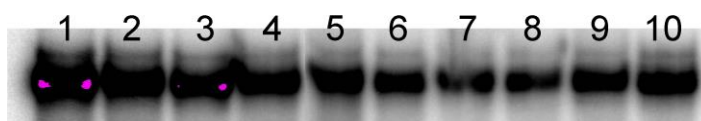
Do badań struktury drugorzędowej rejonu kodującego 1-160 segmentu 5 RNA(+), na którego ustrukturalizowanie wskazały wcześniejsze badania bioinformatyczne (73) wybrano RNA o sekwencji szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) zawierające interesujący rejon 1-160 wydłużony o 38 nukleotydów od 3' końca. RNA nazwano M198, a wydłużony rejon 3' pozwalał wykorzystać szerszy odczyt mapowań chemicznych z użyciem odwrotnej transkrypcji. Dodatkowo, prowadząc równocześnie badania na całym segmencie 5 RNA(+) (dalsza część pracy doktorskiej) stwierdzono, że M198 może wykazywać ustrukturalizowanie uniwersalne dla wirusa grypy typu A. Konsensusowa sekwencja tego rejonu jest identyczna (oprócz jednej reszty nukleotydowej G51 zamiast A51) z sekwencją modelowego szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), a całe badane 198 nukleotydowe RNA posiada sekwencje konsensusową dla podtypu H5N1. Badania M198 pozwoliły również odnieść wyniki do modelowego szczepu H5N1.

Do analizy bioinformatycznej wykorzystano wszystkie pełne sekwencje segmentu 5 RNA(+) znajdujące się w bazie danych NCBI Influenza Virus Resorce (73). Następnie usunięto identyczne sekwencje oraz te, które miały niezdefiniowane nukleotydy. Wyselekcjonowane sekwencje, w liczbie 15533 zestawiono w programie MAFFT stosując algorytm FFT-NS-1. Wykonano analizę z użyciem programów RNAalifold i RNAz. Używając nowszych wersji tych programów i szerszego zestawu sekwencji stwierdzono występowanie konserwatywnej struktury spinkowej w rejonie 2-

WYNIKI I DYSKUSJA

59. W pozostałym rejonie dla typu A nie występowała w przewodzie jedna struktura drugorzędowa, lecz kilka równorzędnych. Badania eksperymentalne M198 miały na celu potwierdzenie struktury konserwatywnej i określenie struktury drugorzędowej tego rejonu.

M198 został syntezowany w celu mapowani *in vitro* jego struktury drugorzędowej. Możliwość alternatywnego fałdowania się cząsteczki została sprawdzona używając różnych buforów do fałdowania. Bufory do fałdowania zawierały różne stężenie Mg^{2+} oraz $[Co(NH_3)_6]^{3+}$. Żele natywne pokazały, iż badane RNA w różnych warunkach fałduje się w jedną strukturę (Rysunek 28). Wybrano bufor zawierający 50 mM HEPES pH 7.0, 300 mM KCl oraz 10 mM $MgCl_2$, w którym prowadzono dalsze eksperymenty.



Rysunek 28. Rozdział M198 na 6% poliakrylamidowym żelu natywnym. Ścieżki 1-5 - M198 fałdowane w buforze zawierającym 10 mM Tris (pH7), 100 mM KCl oraz odpowiednio różne stężenie magnezu (0; 10; 7,5; 5 oraz 2,5 mM). Ścieżki 6-10 - M121 fałdowane w buforze zawierającym 10 mM Tris (pH 7), 100 mM KCl oraz odpowiednio różne stężenie $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ (2,5; 5; 10; 15; 25 mM).

Mapowanie cząsteczki wykonano w temperaturze 23°C. Mapowanie chemiczne wykonano używając CMCT, DMS oraz ketoksal. Wykorzystano także technikę SHAPE z odczynnikiem NMIA.

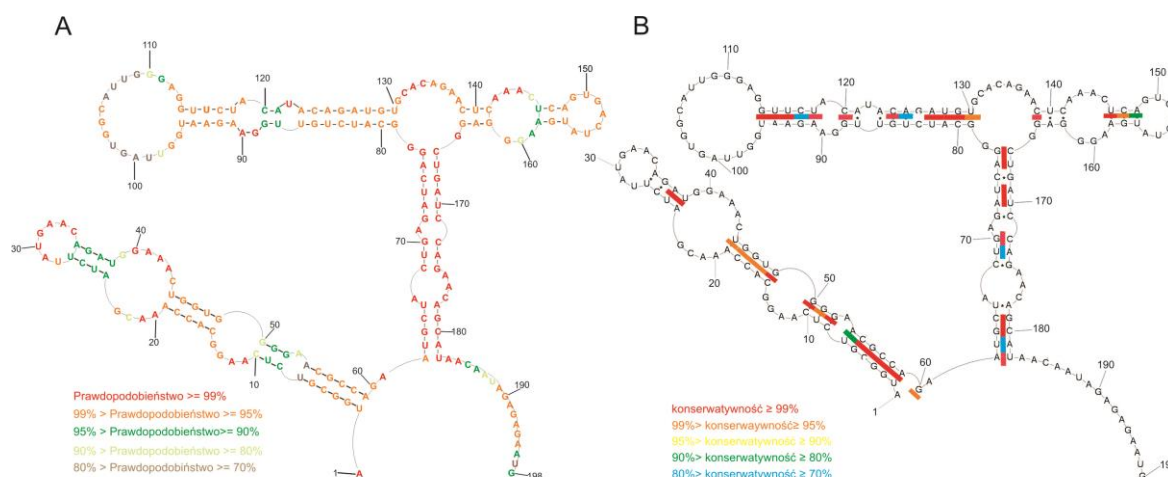
Stosując metodę SHAPE uzyskano 16 mocnych modyfikacji oraz 20 średnich. W mapowaniu odczynnikiem DMS uzyskano 14 mocnych modyfikacji oraz 9 średnich. Z kolei w reakcji z CMCT otrzymano 6 mocnych modyfikacji i 6 średnich, a z ketoksałem 3 mocne i 2 średnie modyfikacje.

Rezultaty mapowania chemicznego w tym SHAPE zostały wprowadzone do programu RNAstructure 5.5 (77), który wygenerował strukturę drugorzędową badanej cząsteczki zgodną z danymi eksperymentalnymi. W strukturze tej potwierdzono występowanie konserwatywnej dla typu A struktury spinki 2-59.

Z zastosowaniem programu RNAstructure 5.5 wyliczono prawdopodobieństwo występowania każdej pary zasad oraz rejonów jednoniciowych (78). M198 charakteryzuje się wysokim prawdopodobieństwem występowania regionów jednoniciowych oraz dwuniciowych. Tylko jedna para zasad 7/54, krótkie regiony jednoniciowe 99-102, 106-109 oraz pojedynczy nukleotyd - 197 charakteryzują się prawdopodobieństwem występowania, które mieści się w przedziale 70-80%. Pozostałe

WYNIKI I DYSKUSJA

pary zasad oraz rejonu jednoniciowego wykazują większe niż 80% prawdopodobieństwo występowania (Rysunek 29).



Rysunek 29. Model struktury drugorzędowej M198. A- Prawdopodobieństwo występowania par zasad i rejonów jednoniciowych oszacowane w programie RNAstructure 5.5. B – Stopień konserwatywności M198 obliczony dla wirusa grypy typu A. Kolorami zaznaczono stopień konserwatywności par zasad: czerwony > 98%, 95% ≤ pomarańczowy < 98%, 90% ≤ zielony < 95%, 85% ≤ niebieski < 90%.

Wyniki mapowania chemicznego M198 wskazują na dwa rejonu o najwyższej reaktywności. Pierwszy region 29-34 został silnie modyfikowany przez NMIA, DMS oraz CMCT. W tym obszarze pojawiają się także średnie modyfikacje NMIA oraz DMS. RNAstructure 5.5 przewidział w tym rejonie pętlę, znajdującą w spince. Najdłuższy i zarazem bardzo reaktywny region jednoniciowy, został utworzony przez nukleotydy 96-113. Zaobserwowano w tym miejscu szereg średnich oraz mocnych modyfikacji NMIA, DMS, CMCT oraz ketoksalem. Dobrze zmapowane jest jednonukleotydowe wybrzuszenie, które tworzy reszta adenozyyny 71. Zaobserwowano tu silną modyfikację NMIA oraz DMS. Kolejna struktura tego typu (wybrzuszenie reszty urydyny 122) została zmodyfikowana przez CMCT, lecz brak jest tu modyfikacji NMIA. W wygenerowanej strukturze pojawiają się także obszary o średniej reaktywności. Rejon 12-15 został zmapowany przez NMIA oraz DMS. Program RNAstructure 5.5 przewidział w tym miejscu wybrzuszenie wewnętrzne. Nukleotydy 39-44 zostały silnie zmodyfikowane przez NMIA oraz DMS, występują w tym miejscu średnie modyfikacje DMS oraz ketoksalu. Odczynnik DMS zmodyfikował nukleotydy 21 oraz 22, które wchodzi w skład dłuższego rejonu jednoniciowego, przy którym nie zaobserwowano więcej mapowań. Rejonu 20-23 i 39-44 tworzy dwustronne wewnętrzne wybrzuszenie. Łącznik między dwiema strukturami typu spinki (131-138) został częściowo zmapowany przez NMIA, DMS oraz ketoksalem. Zmodyfikowane

WYNIKI I DYSKUSJA

zostało także niesymetryczne wewnętrzne wybrzuszenie 89-90/119. Pojawiają się tutaj silne modyfikacje DMS oraz ketoksalu. Silna modyfikacja NMIA została zaobserwowana w opisywanym niesymetrycznym wewnętrznym wybrzuszeniu, reszty nukleotydu 91. Reszty adenozyiny 61 oraz 62 zostały zmodyfikowane przez NMIA, dodatkowo A61 silnie zmodyfikował DMS. Wokół jednonukleotydowego wybrzuszenia, utworzonego przez A54 doszło do silnej modyfikacji NMIA oraz średnich modyfikacji DMS oraz CMCT. Sytuacja taka jest możliwa, ze względu na mniejszą termodynamiczną stabilność tego regionu powodowaną pojawieniem się wewnętrznego wybrzuszenia. Kodon START AUG został częściowo sparowany. Pierwsza reszta nukleotydu kodonu START pozostaje niesparowana i została w średnim stopniu zmodyfikowana przez NMIA. Pozostałe dwa nukleotydy kodonu START wchodzi w skład helisy. W przypadku *Flavivirów* wykazano, że ważna jest struktura małej spinki do włosów, która znajduje się przed kodonem START. Struktura tej spinki wpływa na skanujący mRNA kompleks rybosomu, czyniąc mRNA dostępny lub nie do syntezy białek. Dostępność kodonu start umożliwia regulację translacji (102). W badaniach prezentowanych w niniejszej pracy wykazano, że przed kodonem START znajduje się konserwatywna spinka do włosów (wyniki omówione na stronie 79). Na dostępność kodonu START może wpływać też konserwatywna spinka M198. Położenie obu motywów spinkowych sugeruje rolę w regulacji translacji białek.

Z kolei wewnętrzne wybrzuszenie 67/175-177 zostało zmodyfikowane tylko jednostronnie (modyfikacja DMS reszty A67). Region 143-198 nie został zmapowany ze względu na ograniczenie reakcji odwrotnej transkrypcji. Sytuacja ta spowodowana jest koniecznością użycia startera komplementarnego do 3' końca badanej cząsteczki. Odczyt regionu komplementarnego do startera oraz regionu w najbliższym sąsiedztwie startera jest w takim wypadku niemożliwy (Rysunek 31).

Obliczono również prawdopodobieństwo par zasad analizując sekwencje wszystkich szczepów typu A (Tabela 2, Rysunek 29B). Prawdopodobieństwo to wynosi 86,9% dla M198, w tym dla spinki 2-59 wynosi 93,3%. Jest to wysokie prawdopodobieństwo, świadczące o konserwatywności motywu strukturalnego M198.

WYNIKI I DYSKUSJA

Tabela 2. Stopień konserwatywności par zasad M198 obliczony dla wirusa grypy typu A: czerwony > 98%, 95% ≤ pomarańczowy < 98%, 90% ≤ zielony < 95%, 85 % ≤ niebieski < 90% (ostatnia kolumna). Na zielono znaczone pary zasad charakteryzujące się mutacjami kompensacyjnymi.

| pz | pary zasad (pz) | | GC | CG | AU | UA | GU | UG | GA | AG | AA | GG | UU | CC | AC | UC | CA | CU | Stopień |
|----|----------------------|----|-------|-------|-------|-------|------|------|----|----|-----|----|------|----|-----|----|------|----|---------|
| | konserwatywności (%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| UA | 2 | 59 | 0 | 0 | 0 | 15536 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 | 0 | 0 | 99,8 |
| GC | 3 | 58 | 15563 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| GC | 4 | 57 | 15533 | 0 | 0 | 0 | 23 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| CG | 5 | 56 | 0 | 15535 | 0 | 0 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 1 | 99,9 |
| GC | 6 | 55 | 15512 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 31 | 11 | 0 | 0 | 99,7 |
| UA | 7 | 54 | 0 | 9 | 5 | 9047 | 0 | 3799 | 4 | 2 | 81 | 0 | 2481 | 0 | 0 | 34 | 99 | 0 | 82,6 |
| CG | 8 | 52 | 0 | 15431 | 0 | 0 | 0 | 121 | 1 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 99,9 |
| UC | 9 | 51 | 0 | 3798 | 0 | 3743 | 0 | 7218 | 2 | 3 | 5 | 1 | 150 | 12 | 0 | 14 | 450 | 78 | 95,4 |
| CG | 10 | 50 | 0 | 15457 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 4 | 0 | 99,9 |
| CG | 15 | 49 | 0 | 15447 | 0 | 0 | 0 | 27 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 100,0 |
| AU | 16 | 48 | 0 | 0 | 15343 | 0 | 3 | 0 | 0 | 32 | 173 | 0 | 0 | 2 | 10 | 0 | 0 | 0 | 98,6 |
| CG | 17 | 47 | 0 | 11134 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4422 | 1 | 71,6 |
| CG | 18 | 46 | 0 | 15261 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 295 | 1 | 98,1 |
| AU | 19 | 45 | 0 | 0 | 15244 | 0 | 1 | 0 | 0 | 27 | 20 | 0 | 0 | 0 | 270 | 0 | 0 | 0 | 98,0 |
| AU | 24 | 38 | 0 | 0 | 11215 | 0 | 4346 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 100,0 |
| UA | 25 | 37 | 0 | 0 | 0 | 15510 | 0 | 4 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 30 | 0 | 99,7 |
| CG | 26 | 36 | 0 | 10488 | 0 | 2 | 0 | 5 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 5065 | 0 | 67,4 |

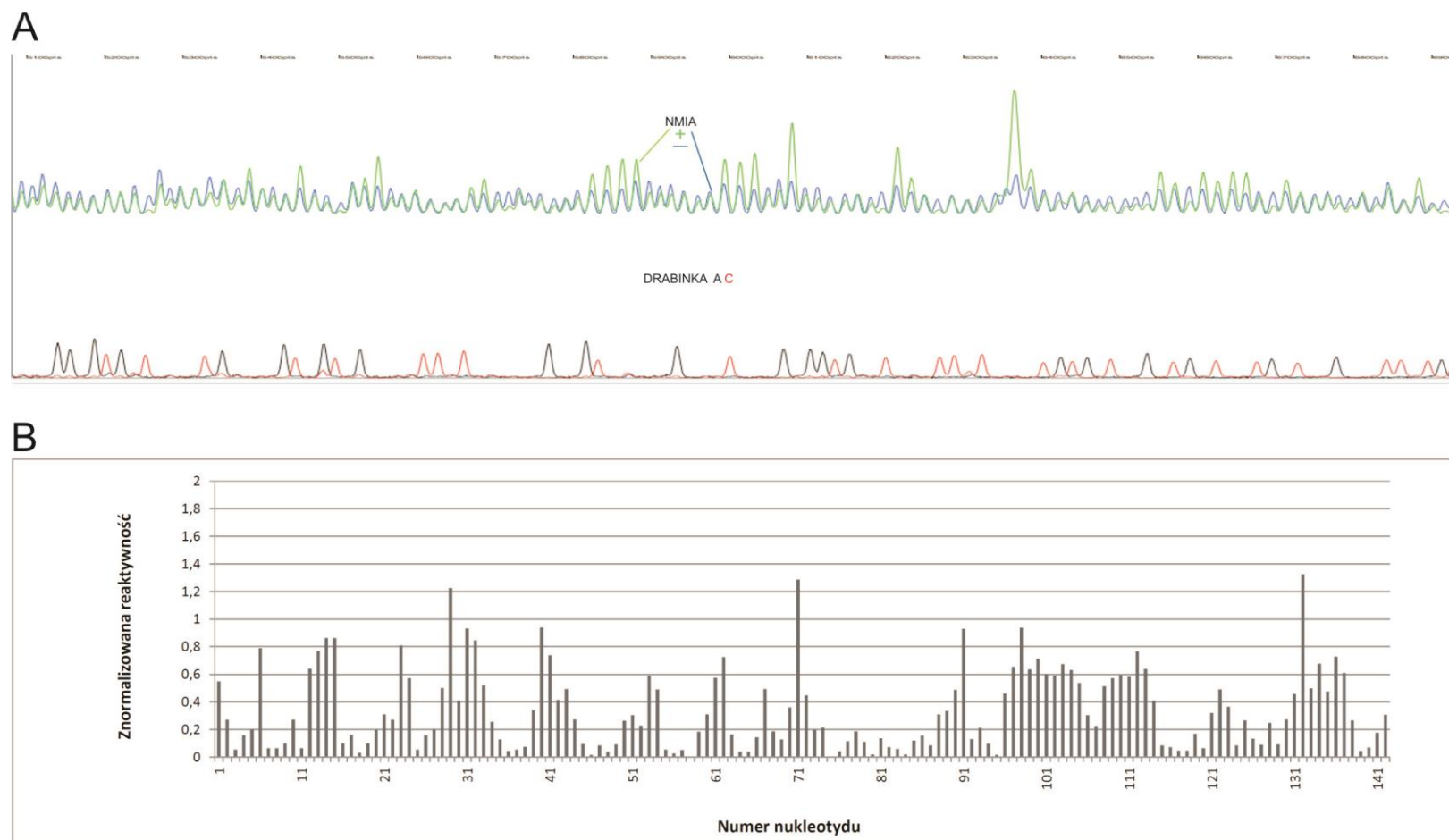
WYNIKI I DYSKUSJA

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|----|-----|-------|-------|-------|-------|-------|------|-----|----|------|---|------|----|------|------|------|-----|-------|
| UA | 27 | 35 | 0 | 0 | 0 | 10732 | 0 | 0 | 120 | 0 | 3688 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1020 | 0 | 69,0 |
| AU | 62 | 182 | 0 | 0 | 15534 | 0 | 19 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 99,9 |
| UA | 63 | 181 | 0 | 0 | 0 | 11123 | 0 | 16 | 0 | 0 | 3 | 0 | 4243 | 1 | 0 | 67 | 106 | 2 | 71,6 |
| GC | 64 | 180 | 14670 | 0 | 35 | 0 | 777 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 54 | 22 | 0 | 0 | 99,5 |
| CG | 65 | 179 | 0 | 15545 | 0 | 0 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| UA | 66 | 178 | 0 | 0 | 0 | 2867 | 0 | 1 | 38 | 1 | 4467 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8187 | 0 | 18,4 |
| CG | 68 | 174 | 0 | 10032 | 0 | 1 | 0 | 1 | 25 | 19 | 30 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5448 | 1 | 64,5 |
| UA | 69 | 173 | 0 | 0 | 0 | 11611 | 0 | 0 | 102 | 0 | 3717 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 131 | 0 | 74,6 |
| GC | 70 | 172 | 15558 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| GC | 72 | 171 | 5819 | 0 | 1171 | 0 | 677 | 0 | 16 | 0 | 34 | 0 | 0 | 4 | 7836 | 1 | 0 | 2 | 49,3 |
| AU | 73 | 170 | 0 | 0 | 15551 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| UA | 74 | 169 | 0 | 0 | 0 | 15449 | 0 | 91 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 17 | 2 | 0 | 99,9 |
| CG | 75 | 168 | 0 | 7634 | 0 | 62 | 0 | 2947 | 0 | 25 | 9 | 0 | 5 | 73 | 0 | 0 | 4419 | 386 | 68,4 |
| AU | 76 | 167 | 0 | 0 | 15506 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 54 | 99,7 |
| GC | 77 | 166 | 12140 | 0 | 0 | 0 | 3394 | 0 | 1 | 0 | 0 | 7 | 0 | 1 | 15 | 1 | 0 | 0 | 99,8 |
| GU | 79 | 130 | 1 | 0 | 37 | 0 | 15098 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 422 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 97,3 |
| CG | 80 | 129 | 0 | 15553 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 100,0 |
| AU | 81 | 128 | 0 | 0 | 15375 | 0 | 101 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 64 | 0 | 6 | 0 | 0 | 16 | 99,4 |
| UA | 82 | 127 | 0 | 0 | 0 | 15548 | 0 | 6 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 99,9 |
| CG | 83 | 126 | 0 | 7095 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8467 | 0 | 45,6 |
| UA | 84 | 125 | 0 | 0 | 0 | 10944 | 0 | 2 | 69 | 0 | 62 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4484 | 0 | 70,3 |
| GC | 85 | 124 | 15548 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 99,9 |
| UA | 86 | 123 | 0 | 0 | 0 | 7175 | 0 | 119 | 3 | 0 | 0 | 0 | 217 | 2 | 0 | 8044 | 1 | 0 | 46,9 |

WYNIKI I DYSKUSJA

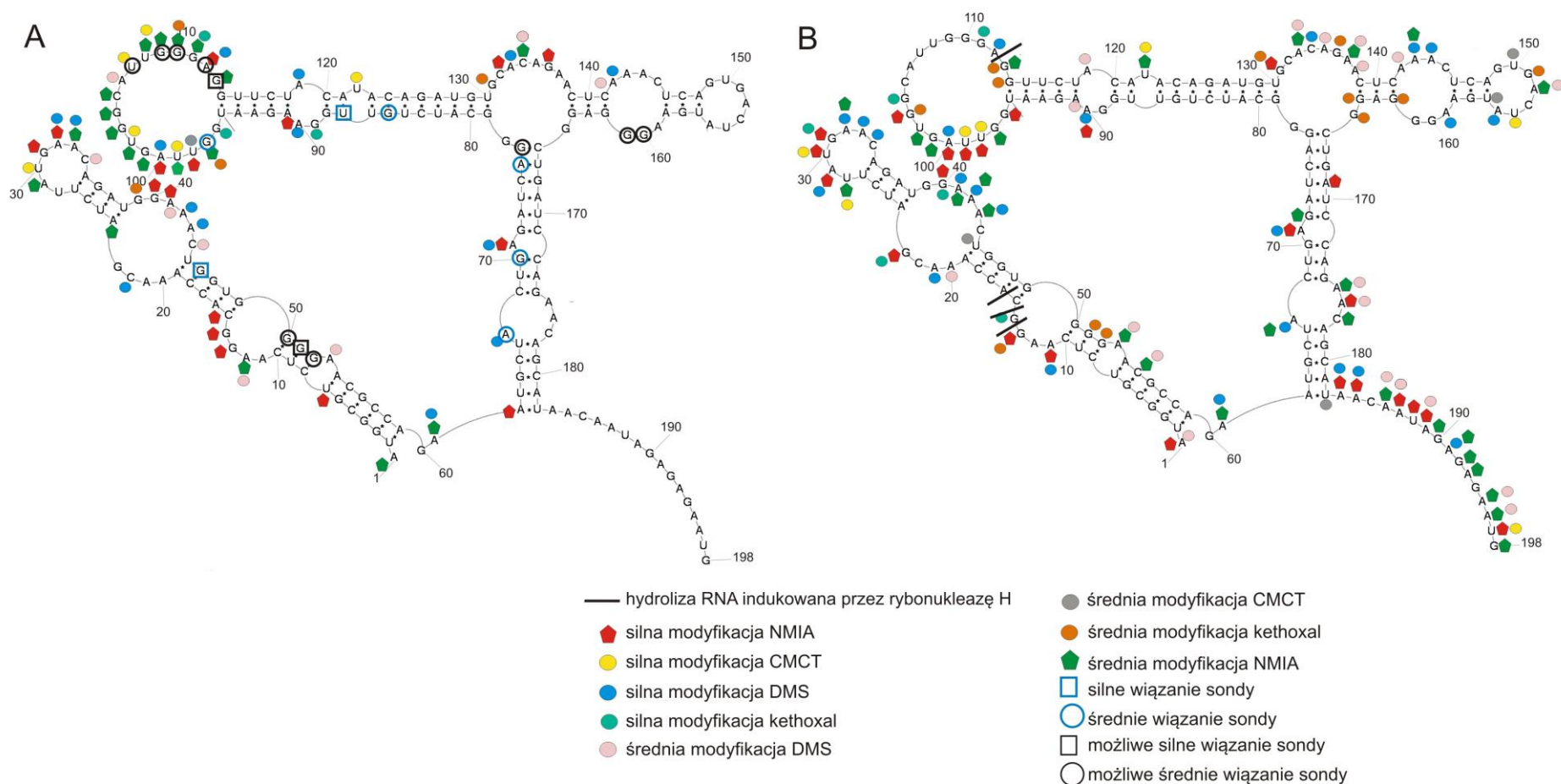
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-------|-------|-------|-------|------|------|----|-----|----|----|----|----|------|------|------|----|-------|
| UA | 87 | 121 | 0 | 111 | 0 | 6892 | 0 | 278 | 51 | 2 | 64 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8164 | 0 | 46,8 |
| GC | 88 | 120 | 15040 | 0 | 0 | 0 | 520 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| AU | 91 | 118 | 0 | 0 | 15495 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 53 | 99,7 |
| GC | 92 | 117 | 10448 | 0 | 7 | 0 | 1626 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3480 | 0 | 0 | 0 | 77,6 |
| AU | 93 | 116 | 0 | 0 | 11189 | 0 | 4358 | 0 | 3 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 99,9 |
| AU | 94 | 115 | 0 | 0 | 15557 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| UG | 95 | 114 | 0 | 0 | 0 | 12568 | 0 | 2977 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | 99,9 |
| CG | 139 | 164 | 0 | 15536 | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 5 | 99,9 |
| UA | 140 | 163 | 0 | 0 | 0 | 7456 | 0 | 4 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8101 | 0 | 0 | 47,9 |
| CG | 141 | 162 | 0 | 5659 | 0 | 1146 | 0 | 3325 | 3 | 13 | 76 | 1 | 25 | 84 | 0 | 0 | 5212 | 18 | 65,1 |
| UA | 146 | 158 | 0 | 0 | 0 | 15560 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| CG | 147 | 157 | 0 | 15296 | 0 | 0 | 0 | 98 | 0 | 134 | 0 | 33 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 98,9 |
| AU | 148 | 156 | 28 | 0 | 13726 | 0 | 31 | 0 | 1 | 53 | 97 | 2 | 0 | 0 | 1623 | 0 | 0 | 0 | 88,6 |

WYNIKI I DYSKUSJA



Rysunek 30. A - Przykład elektroforegramu powstającego po wykonaniu elektroforezy kapilarnej produktów cDNA powstałych podczas odczytu za pomocą odwrotnej transkrypcji wyników mapowania M198 metodą SHAPE, przy wykorzystaniu startera RT198. B – Znormalizowane reaktywności nukleotydów M198. Mapowanie przeprowadzono w temperaturze 23°C.

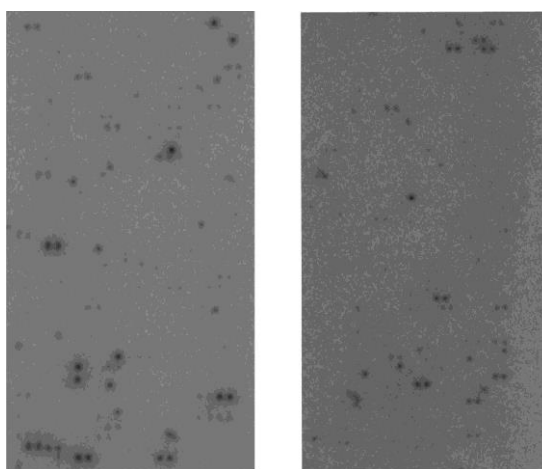
WYNIKI I DYSKUSJA



Rysunek 31. A – M198 - 198-nukleotydowe RNA konserwatywnego motywu. Struktura drugorzędowa została wygenerowana przez program RNAstructure 5.5 po wprowadzeniu danych z mapowania chemicznego oraz metody SHAPE. Zaznaczono wyniki uzyskane przy użyciu metod mapowania chemicznego, metody SHAPE, oraz macierzy izoenergetycznych. B – Motyw M198 w strukturze całego segmentu 5' RNA(+) szczepiu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) wraz z zaznaczonymi wynikami mapowania chemicznego, techniki SHAPE, hydrolizy RNA w obecności RNazy H oraz oligomerów DNA.

3.2. Hybrydyzacja M198 do macierzy izoenergetycznych

Dostępność M198 dla oligonukleotydów została sprawdzona dzięki wykorzystaniu macierzy izoenergetycznych. Wyniki hybrydyzacji M198 do sond macierzy izoenergetycznych w dwóch temperaturach (23°C oraz 37°C) zebrane są w tabeli 3. Każda związana sonda z M198 była rozważana w oparciu o możliwość tworzenia alternatywnych miejsc wiązania. Możliwe alternatywne miejsca zebrane są w ostatniej kolumnie w tabeli 3. Wszystkie miejsca wiązania w temperaturze 23°C zostały zaprezentowane na rysunku 31A.



Rysunek 32. Przykładowy wynik hybrydyzacji M198 do sond macierzy izoenergetycznych w temperaturze 23°C.

Zaobserwowano wiązanie się sondy w rejonie jednoniciowym 97, który jest także dobrze zmapowany. Wykazano, że dostępne miejsca wiązania sond znajdują się zgodnie z przewidywaniem w obszarach słabo ustrukturyzowanych, w miejscach 67, 70 oraz 87. Także miejsca 46 i 76 są dostępne dla sond. W strukturze drugorzędowej M198 w tych rejonach występuje helisa, znajdującą się w sąsiedztwie obszaru jednoniciowego. Wyjaśnia to hybrydyzację sond w tych miejscach i jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami (79). Zaobserwowano także, wiązanie sondy w miejscu 85. Rejon M198, który oddziałuje z sondą tworzy asymetryczne jednonukleotydowe wybrzuszenie wewnętrzne, co może wpływać na obniżenie termodynamicznej stabilności całego regionu. Dodatkowo, prawdopodobne jest wiązania się sond w miejscach jednoniciowych: 107, 109, 110, 112, 113, 160, 161 a także w słabych strukturalnie miejscach wiązania 50, 51, 52, 78, w pobliżu wybrzuszenia lub pary GU.

WYNIKI I DYSKUSJA

Tabela 3. Wyniki hybrydyzacji M198 do macierzy izoenergetycznych.

| Miejsce wiązania ^a | Sekwencja sondy ^b | Siła wiązania sondy ^c | | Energia swobodna kompleksu komplementarna sonda/RNA ΔG°_{37} ^d (kcal/mol) | Energia swobodna kompleksu alternatywna sonda/RNA ΔG°_{37} ^e (kcal/mol) |
|-------------------------------|------------------------------|----------------------------------|------|---|---|
| | | 23°C | 37°C | | |
| 85 | cDdCdG | M | M | -10,74 | |
| 46 | CdCcAg | S | M | -11,10 | |
| 87 | CcDdCg | S | S | -9,25 | |
| 109 | CcCdA | M | M | -8,23 | -5,3 (160) |
| 50 | CcCcA | M | M | -9,88 | -5,8 (110) -5,7 (161) |
| 161 | UcCcUg | S | S | -10,47 | -7,3 (77) -6,4 (110/111) |
| 52 | UUcCcG | S | S | -11,60 | -5,5 (161/162) -5,5 (110/111) |
| 97 | uDdCcG | M | M | -8,72 | |
| 107 | CcDdUg | M | M | -10,80 | -5,0 (87) |
| 112 | CcUcC | M | M | -9,51 | -4,7 (50) |
| 113 | dCcUcG | S | S | -10,22 | -5,6 (51) |
| 76 | dDcCug | M | M | -8,48 | |
| 67 | DgUdGg | M | M | -9,42 | |
| 70 | CUcDgg | M | M | -9,32 | |
| 110 | uCcCa | S | S | -8,86 | -6,9 (51) -6,9 (161) -4,7 (78) |

a – miejsce wiązania sondy, zdefiniowane, jako środkowy nukleotyd (lub dwa nukleotydy dla parzystych rejonów komplementarnych) miejsca wiązania badanego RNA do sondy. b – duże litery (A, C, G, U, D) oznaczają nukleotydy typu 2'-O-metyloRNA, małe litery (a, c, g, u, d) oznaczają nukleotydy zawierające modyfikacje typu LNA, D lub d oznacza 2,6-diaminopurynorybozyd w serii odpowiednio 2'-O-metyloRNA lub LNA. c – dupleks sonda/badane RNA został uznany, jako silny (S), średni (M), słaby (W) kiedy intensywność była $\geq 1/3 \geq 1/9$ oraz $\geq 1/27$ najwyższej intensywności. Brak wiązania oznaczono „-”. Warunki hybrydyzacji: 300 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM HEPES, pH 7,0. d - ΔG°_{37} obliczona dla dupleksu modyfikowana sonda/RNA (81). e - ΔG°_{37} obliczona przez program RNAstructure 5.5 dla dupleksu RNA/RNA, w nawiasach podano miejsca, dla których przedstawiono obliczenia. Jedyne alternatywne miejsca wiązania sond o termodynamicznej stabilności większej niż -4 kcal/mol zostały przedstawione.

3.3. Motyw M198 w segmencie 5 RNA(+) szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)

Struktura drugorzędowa motywu M198 została zweryfikowana w całym segmencie 5 RNA(+) szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Rejon odpowiadający M198 w segmencie 5 RNA(+) (1-198), sekwencja podana dla rejonu kodującego, pierwszy nukleotyd stanowiła reszta adenozyliny kodonu start (AUG) został zbadany z wykorzystaniem techniki SHAPE oraz metod mapowania chemicznego z użyciem taCMCT, DMS oraz ketoksal. Wykorzystano także metodę indukowanej hydrolizy RNA w obecności RNazy H oraz oligonukleotydu DNA. W reakcji odwrotnej transkrypcji użyto jeden starter, który umożliwił odczyt całego rejonu odpowiadającemu M198 (Tabela 8).

Wyniki mapowań pozostają w zgodzie z modelem struktury drugorzędowej M198. Reaktywności wskazują na obecność struktur typu spinka do włosów w rejonach 2-59, 79-130, 139-164. Mapowanie chemiczne wykazało następujące rejony o wysokiej reaktywności: 28-34, 40-43, 96-104, 111-114, 133-138, 175-177 oraz 183-198. Dobrze zmapowane są także jednonukleotydowe wybrzuszenia wewnętrzne, pozycjach 67, 71, 98 oraz 122. Do średnio reaktywnych regionów należą 65-68 i 150-155. Obecność jednoniciowych rejonów potwierdzają badania z RNazą H. Do hydrolizy RNA indukowanej obecnością RNazy H doszło po reszcie nukleotydowej w pozycji 58, 59 oraz 60 z użyciem oligonukleotydu 5'TTTCCCTTT oraz po 157 z wykorzystaniem oligomeru 5'CTCCCAATG.

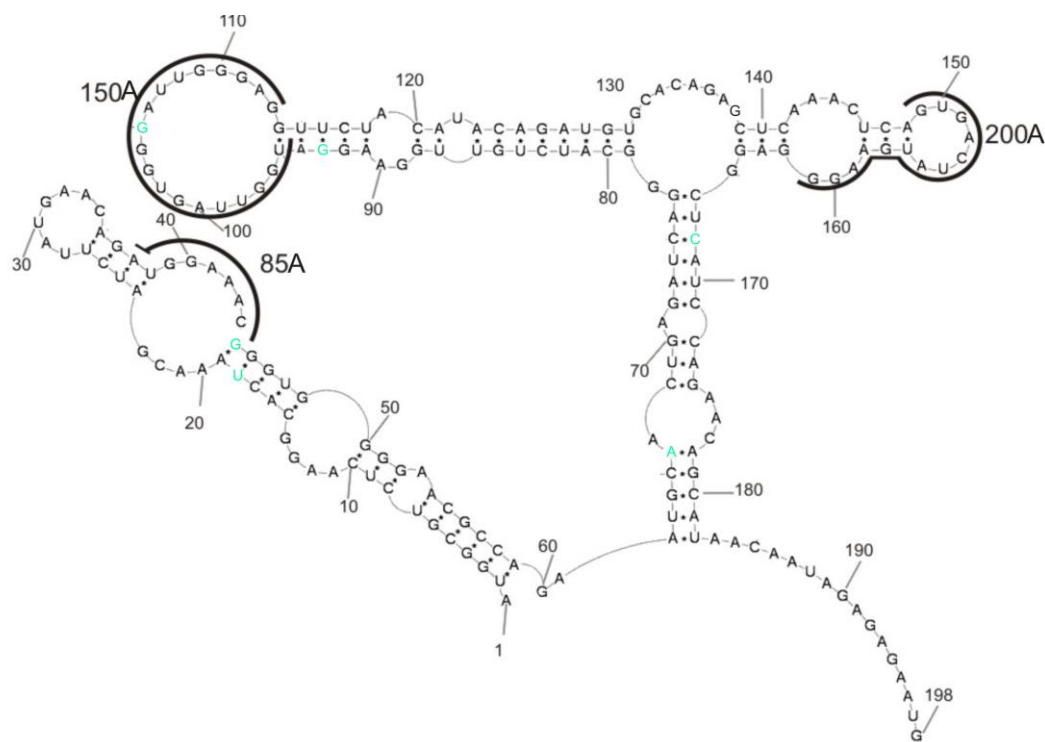
Jedyna różnica między M198 a analogicznym rejonem w segmencie 5 RNA(+) dotyczy krótkiego rejonu 105-111, który jest całkowicie niereaktywny w całym segmencie 5 RNA(+), natomiast w M198 pojawiają się modyfikacje NMIA, DMS, ketoksalem oraz CMCT. Fakt ten można wytłumaczyć trzeciorzędowymi oddziaływaniami, które mogą mieć miejsce w całym segmencie 5 RNA(+), na przykład, między regionami 153-155/1463-1465 może tworzyć się dupleks 5'UGG3'/3'ACC5'.

3.4. Inhibicja namnażania wirusa grypy w liniach komórkowych przez antysensowe oligonukleotydy nacelowane na M198

Potencjał inhibicyjny antysensowych oligonukleotydów komplementarnych do rejonów jednoniciowych M198 został przetestowany w liniach komórkowych MDCK, które były infekowane naturalnym wirusem grypy szczepu A/California/04/2009

WYNIKI I DYSKUSJA

(H1N1). Do badań wykorzystano metodę immunofluorescencyjną, z dwoma specyficznymi przeciwciałami oraz technikę PCR w czasie rzeczywistym.



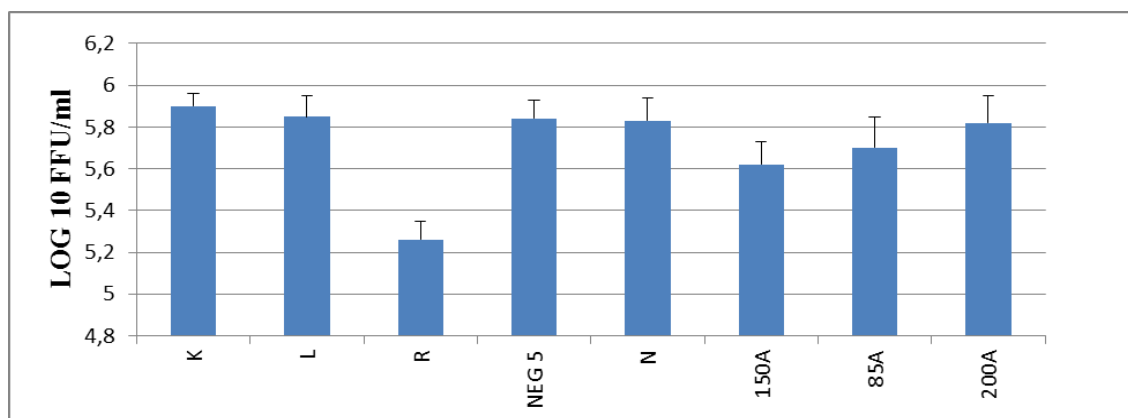
Rysunek 33. M198 [ze szczepu A/California/04/2009 (H1N1)] z zaznaczonymi komplementarnymi regionami do antysensownych oligonukleotydów. Na zielono zaznaczono nukleotydy różne między szczepami A/California/04/2009 a A/Vietnam/1203/2004 (H5N1).

Sekwencja rejonu M198 szczepu A/California/04/2009 (H1N1) różni się od sekwencji A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), różnice te jednak nie wpływają na zmianę zaproponowanej struktury drugorzędowej konserwatywnego motywu. W czasie projektowania antysensownych oligonukleotydów wzięto pod uwagę różnice w sekwencji, a potencjalne inhibitory zaprojektowano tak, aby były całkowicie komplementarne do docelowych rejonów oddziaływań RNA. Na podstawie badań, zarówno izolowanego M198, jak i segmentu 5 RNA(+), jako miejsce oddziaływań ASO 85A, 150A oraz 200A (Tabela 12) wybrano wybrzuszenie wewnętrzne (39-44), pętle dobrze scharakteryzowanej mapowaniami spinki do włosów (96-113) oraz pętle spinki do włosów i wybrzuszenie wewnętrzne (194-206) (Rysunek 33). Rejon 96-113 wybrano na podstawie silnych mapowań chemicznych, dostępności dla sond oligonukleotydowych macierzy izoenergetycznych oraz wyników hydrolizy RNA indukowanej przez RNazę H. Z kolei rejon 39-44 wybrano na podstawie obecności wielu mapowań chemicznych oraz wyliczonego prawdopodobieństwa występowania rejonów jednoniciowych w programie RNAstructure 5.5. Reaktywność względem

WYNIKI I DYSKUSJA

odczynników mapujących regionu 194-206, która została odczytana w całym segmencie 5 RNA(+) szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) wskazała na dostępność tego rejonu.

Przy użyciu metody immunofluorescencyjnej wykazano, że antysensowe oligonukleotydy w sposób nieznaczny hamowały namnażanie wirusa grypy. Antysensowy oligonukleotyd 85A obniżał namnażanie wirusa grypy jedynie o 10%, natomiast antysensowy oligonukleotyd 150A obniżył namnażanie wirusa grypy o 40%. Oligomer 200A nie powodował różnic w namnażaniu wirusa grypy (Rysunek 34).

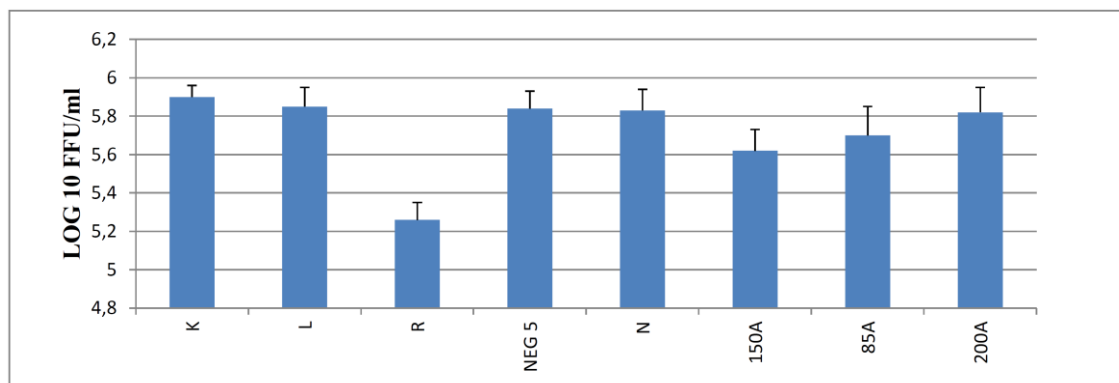


Rysunek 34. Efekt działania antysensowych oligonukleotydów nacelowanych na M198 testowanych z użyciem naturalnego wirusa grypy A/California/04/2009 w liniach komórkowych MDCK. K - kontrola, L - kontrola z lipofektaminą 2000, N - negatywna kontrola z oligomerem N, Neg 5 – negatywna kontrola z oligomerem Neg 5, R - pozytywna kontrola z rybawiryną. Wyniki uzyskano dzięki wykorzystaniu metody immunofluorescencyjnej.

Do badań z użyciem metody PCR w czasie rzeczywisty wybrano antysensowy oligonukleotyd 150A. Korzystając z tej metody zaobserwowano obniżenie namnażania wirusa grypy o 45% w stosunku do prób kontrolnych (Tabela 12), jakim był oligonukleotyd komplementarny do rejonu heliakalnego w segmencie 5 RNA(+) (oznaczony, jako Neg 5) oraz oligonukleotydu o sekwencji niespecyficznej względem RNA wirusa grypy (oznaczony, jako N) (Rysunek 35). Powyższe dane świadczą, że wybrane rejony jednoniciowe 39-44, 96-113 oraz 194-206 nie są dobrymi celami strategii antysensowych. Jednak konserwatywność strukturalno-sekwencyjna motywu M198, a szczególnie struktury spinkowej obejmującej kodon START przekonuje, że taka struktura ma znaczenie funkcjonalne, wpływając chociażby na udostępnienie kodonu START i pobliskiego rejonu. Wyniki jednak świadczą, że w warunkach komórkowych na wybrane rejony działają dodatkowe czynniki wirusowe lub komórkowe skutecznie niwelując lub uniemożliwiając inhibitorowe działanie oligonukleotydów. Mimo niskiej inhibicji przez oligomer 150A, efekt jego działania

WYNIKI I DYSKUSJA

jest dostrzegalny i powtarzalny. Konieczne są dalsze badania, aby potwierdzić funkcjonalność M198.



Rysunek 35. Efekt działania antysensownych oligonukleotydów nacelowanych na M198 wirusa grypy szczepu A/California/04/2009 w liniach komórkowych MDCK. K - kontrola, L-kontrola z lipofektaminą 2000, N - negatywna kontrola z oligomerem N, Neg 5 – negatywna kontrola z oligomerem Neg 5, R – pozytywna kontrola z rybawiryną. Wyniki uzyskano dzięki wykorzystaniu metody PCR w czasie rzeczywistym.

3.4. Określenie cytotoksyczności użytych oligonukleotydów antysensownych

W ostatnim etapie prac z antysensownymi oligonukleotydami badano ich potencjalną cytotoksyczność, jaką mogą wywierać na linię komórkową MDCK. Do tego celu posłużono się testem MTT. Do eksperymentów wybrano antysensowny oligonukleotyd: 150A. Testowano go w zakresie stężeń od 0,1 do 4 uM. Wykazano, że badany antysensowny oligonukleotyd nie wykazuje cytotoksycznego efektu na komórki MDCK, w żadnym z zastosowanych stężeń.

4. Segment 5 RNA(+) wirusa grypy typu A

Segment 5 RNA(+) liczy około 1565 nukleotydów i koduje jedno białko – nukleoproteinę. Do cząsteczek segmentu 5 RNA(+) należą cRNA oraz mRNA. Obiektem badań niniejszej pracy są cRNA oraz rejon kodujący segmentu 5. Antygenomowy, kodujący RNA wirusa cRNA powstaje z vRNA i jest matrycą pozwalającą na replikację vRNA. mRNA powstaje również z vRNA. Cząsteczka mRNA różni się tym od cRNA, że posiada 5'-kap i jest poliadenylowana. Należy zwrócić uwagę, że w przeprowadzonych badaniach *in vitro*, RNA o sekwencji cRNA segmentu 5 może posiadać cechy struktury drugorzędowej również istotne dla mRNA, w związku z tym, że sekwencje obu cząsteczek są, z wyjątkiem końców, identyczne.

Dane na temat struktury drugorzędowej opisywanego segmentu RNA wirusa grypy w momencie podjęcia badań były szczątkowe. Jak wspomniano w rozdziale o

identyfikacji konserwatywnych motywów strukturalnych (strona 46) z danych literaturowych wynika, że w segmencie 5 RNA(+) bioinformatycznie wykazano możliwość występowania ustrukturalizowanych rejonów (66). Kolejna grupa badawcza, również korzystając z analizy bioinformatycznej przewidziała występowanie pięciu struktur typu spinka do włosów w regionach 16-39, 89-105, 577-593, 922-938 oraz 1476-1530 (numeracja podana dla cRNA segmentu 5) (69). Tylko jedna struktura znajduje się w rejonie nieulegającym translacji, natomiast pozostałe znajdują się w rejonie kodującym. Co więcej, cztery z pięciu przewidzianych struktur (16-39, 89-105, 1436-1475 oraz 1476-1530) znajdują się w RNA, w miejscach odpowiadających regionom zawierającym sygnały pakowania wirionu (104). Poza jedną strukturą (922-938) oba niezależne przewidywania są zgodne z sobą (66, 69, 105).

Segment 5 RNA(+) stał się także celem działania antysensowych oligonukleotydów. Grupa badawcza Zhanga testowała trzy ASO, które były komplementarne do następujących rejonów segmentu 5 RNA(+): 267-284 (NP267), 628-645 (NP 628), 749-766 (NP 749) (numeracja podana dla cRNA segmentu 5). Wszystkie testowane oligonukleotydy powodowały obniżenie namnażania wirusa grypy (106). Inne grupy badawcze stosowały antysensowe oligonukleotydy, których docelowym miejscem działania był kodon inicjacji translacji AUG mRNA segmentu 5 (107, 108).

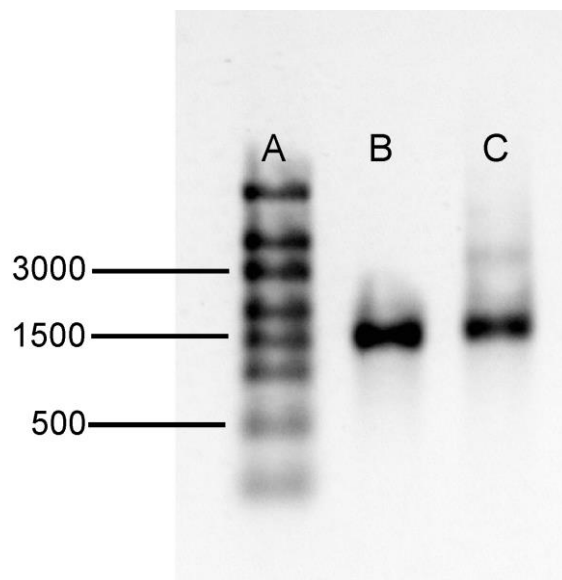
4.1. Mapowanie struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5

W celu określenia struktury drugorzędowej segmentu 5 RNA(+) wybrano do badań cRNA szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Szczep wirusa grypy A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) został wyizolowany w 2004 roku w Wietnamie i należy do typu A wirusa grypy, podtypu H5N1. Przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) został sklasyfikowany jako szczep, który może wywołać pandemię.

Możliwość alternatywnego fałdowania się cząsteczki została sprawdzona używając różnych buforów do fałdowania [różne stężenie Mg^{2+} (5-25 mM)]. Z rezultatów wynikało, że w różnym zakresie jonów dwuwartościowych cRNA segmentu 5 fałduje się w jedną strukturę. Do dalszych badań wybrano bufor fałdujący zawierający 5 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 50 mM HEPES, pH 7. Mapowanie cząsteczki wykonano w temperaturze 23°C oraz 37°C, używając takich odczynników jak: CMCT, DMS oraz ketoksal. Wykorzystano także technikę SHAPE z odczynnikiem NMIA oraz metodę hydrolizy RNA RNazą H w obecności oligonukleotydów (wykorzystano 19 oligomerów DNA, Tabela 11). W reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystano 6 starterów

WYNIKI I DYSKUSJA

zebranych w Tabela 8, które pozwoliły na odczyt całej cząsteczki, za wyjątkiem 3' końca (rejon 1506-1565). Zastosowane metody dały dobry wgląd w strukturę drugorzędową badanej cząsteczki.



Rysunek 36. Rozdział cRNA segmentu 5 w 0,8% żelu agarozowym. A - marker wielkości RNA; B – cRNA segmentu 5 poddane fałdowaniu w buforze zawierający 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 50 mM HEPES, pH 7, C – cRNA segmentu 5 bezpośrednio po transkrypcji, na wysokości 3000 nukleotydów widoczny prążek odpowiadający cząsteczce homodimeru cRNA5.

4.1.1. Model struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5

Mapowanie wykonane w temperaturze 23°C dało następujące rezultaty. Metoda SHAPE uwidoczniała 146 mocnych modyfikacji oraz 151 średnich, mapowanie DMS dało 118 mocnych modyfikacji oraz 100 modyfikacji średnich. Z kolei, mapowanie CMCT i ketoksalem uwidocznilo odpowiednio 57 i 35 mocnych modyfikacji oraz 46 i 41 średnich modyfikacji.

Rezultaty mapowania chemicznego wykonanego w temperaturze 23°C zostały wprowadzone do programu RNAstructure 5.5 (77), który wygenerował strukturę drugorzędową badanej cząsteczki zgodną z danymi eksperymentalnymi (Rysunek 37 Rysunek 39). Dodatkowo, w oparciu o wcześniejsze badania, do programu wprowadzono pary zasad 1082/1191, 1083/1190, 1085/1189, które wymusiły utworzenie motywu M121. Uzyskana struktura w dalszej części pracy będzie określana, jako *Struktura 23*.

Aby zweryfikować model struktury drugorzędowej wykorzystano program RNAstructure 5.5, który wyliczył prawdopodobieństwo występowania każdej pary

WYNIKI I DYSKUSJA

zasad oraz rejonów jednoniciowych (77, 78). Wykazano, że obszary 1-335, 451-483, 1478-1565 oraz wszystkie rejony jednoniciowe są wysoce zachowawcze (Rysunek 37).

Najbardziej termodynamicznie stabilna struktura drugorzędowa cRNA segmentu 5 (*Struktura 23*) ma charakter domenowy i charakteryzuje się obecnością podstawowych motywów strukturalnych RNA takich, jak: dupleksy, spinki do włosów, wybrzuszenia wewnętrzne, pętle wieloramienne (Rysunek 39). Zauważono, że pięć pierwszych nukleotydów z 5' oraz 3' końca pozostaje niesparowanych, a następnie nukleotydy z 5' oraz 3' końca tworzą helisę.

Dane literaturowe, bazując na zdjęciach z elektronowego mikroskopu wykazały, że cRNP (kompleks cRNA, białka NP oraz wirusowa polimeraza) tworzy kompleks zawierający ustrukturalizowane RNA. Na jednym końcu tego kompleksu znajduje się pętla cRNA, która oddziałuje z kilkoma cząsteczkami białka NP, koniec 3' oraz 5' cRNA tworzy drugi biegun kompleksu, który oddziałuje z wirusową polimerazą (108). Podobna organizacja strukturalna występuje w cząsteczkach vRNA (109). Kolejne dane literaturowe donoszą, że oddziałujące ze sobą końce 5' i 3' cRNA tworzą promotor dla wirusowej polimerazy (110). Przedstawiony w niniejszej pracy model struktury cRNA segmentu 5 (*Struktura 23* i *Struktura 37*) wydaje się być zgodny z danymi prezentowanym w literaturze. Końce 3' i 5' znajdują się w bliskim sąsiedztwie, tylko pięć pierwszych nukleotydów pozostaje niesparowanych, a oddziaływania pomiędzy rejonami 5' i 3' tworzą stabilne helisy. Cząsteczka cRNA pozostaje wysoce ustrukturalizowana, możliwe jest tworzenie kompleksu takiego jak opisano w literaturze na podstawie zdjęć elektronowych.

Możliwa jest także sytuacja, w której wybrane rejony pod wpływem oddziaływania z białkiem NP ulegają rozpleceniu w zależności od momentu cyklu i tylko niektóre elementy struktury drugorzędowej są tworzone i aktywne funkcjonalnie.

Mapowanie chemiczne wskazuje na bardzo reaktywne regiony *Struktury 23*: 73-79, 141-149, 228-234, 303-306, 411-426, 470-477, 602-607, 682-687, 703-708, 781-784, 843-846, 897-899, 907-914, 945-948, 983-986, 1067-1071, 1096-1102, 1107-1110, 1136-1138, 1150-1154, 1199-1202, 1217-1219, 1254-1257 oraz 1318-1322. Program RNAstructure 5.5 wygenerował w tych miejscach rejony jednoniciowe, które tworzą pętle (73-79, 141-149, 303-306, 411-426, 470-477, 602-607, 703-708, 843-846, 1096-1102, 1150-1154 i 1318-1322), wybrzuszenia wewnętrzne (682-687, 781-784, 897-899, 945-948 oraz 1136-1138) lub rejony jednoniciowe (228-234, 907-914, 1067-1071, 1107-1110, 1199-1202 i 1254-1257) między strukturami typu spinka do włosów czy

WYNIKI I DYSKUSJA

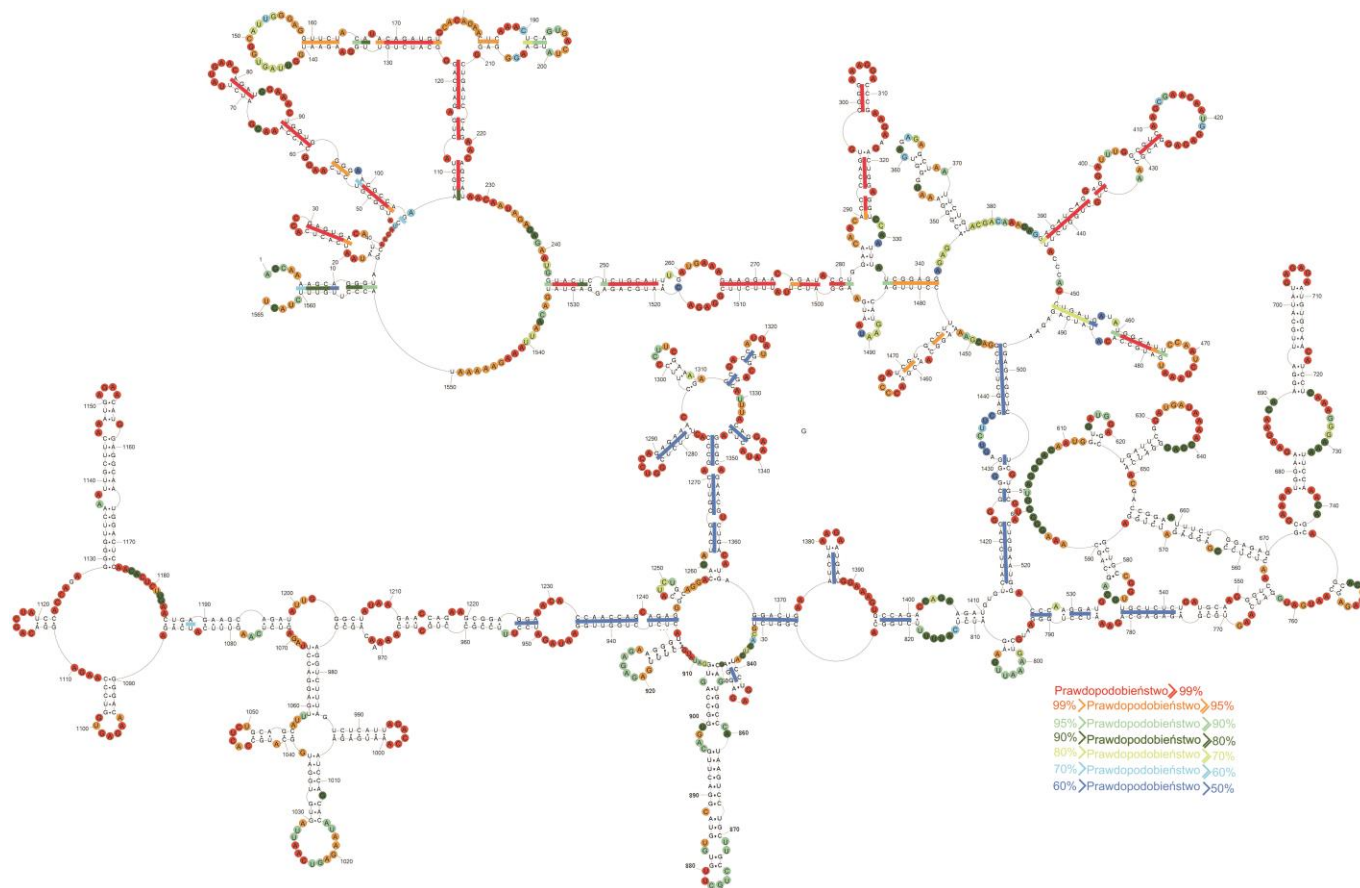
helisami. Jedynie rejon 983-986 wchodzi w skład helisy. Obszar ten znajduje się przy rejonie jednoniciowym, co więcej występuje tu niekanoniczna para zasad G-U, co umożliwia pojawienie się mapowań i powoduje również obniżenie termodynamicznej stabilności regionu.

Takie jednoniciowe rejony, szczególnie otoczone silnie ustrukturalizowanym RNA (np. dostępne pętle spinek, wybrzuszenia otoczone stabilnymi helisami) mogą być istotnymi, wysuniętymi na zewnątrz cząsteczki elementami rozpoznawalnymi przez czynniki wirusowe lub komórkowe podczas replikacji. W kompleksie cRNP białko NP oddziałując preferencyjnie z tymi rejonami mogą wpływać na globalne ułożenie struktury trzeciorzędowej kompleksu cRNP5.

Rozważając jak struktura RNA wpływa na kompleks cRNP5 można posłużyć się analogią do bardziej zbadanego kompleksu vRNP (109) wiedząc, że jak dotychczas zauważono między nimi podobieństwa. Wiadomo, że monomery białka NP nie oddziałują z całym vRNA, tylko część vRNA pozostaje niezwiązana (jeden monomer przypada średnio na 32 reszty nukleotydów, podczas gdy pełne wysycenie byłoby przy 12). Sugeruje się, że taki układ pozwala na wypełnienie RNA i tworzenie lokalnych drugorzędowych motywów strukturalnych. Zakładamy, że szczególnie istotne w prezentowanym modelu struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5 są lokalne motywy strukturalne - chociażby potwierdzony konserwatywny motyw M121. Nie wszystkie motywy strukturalne mogą istnieć w danym momencie cyklu wirusowego. Struktura drugorzędowa RNA w cRNP5 może mieć charakter dynamiczny i niektóre elementy struktury mogą być charakterystyczne dla danego cyklu procesu wirusowego. Oprócz motywów M121 i M198 opisanych wcześniej, można wyróżnić kolejne motywy interesujące pod względem potencjalnego znaczenia funkcyjnego, takie jak: 347-376, 577-593, 865-891, 914-931 oraz 1375-1388.

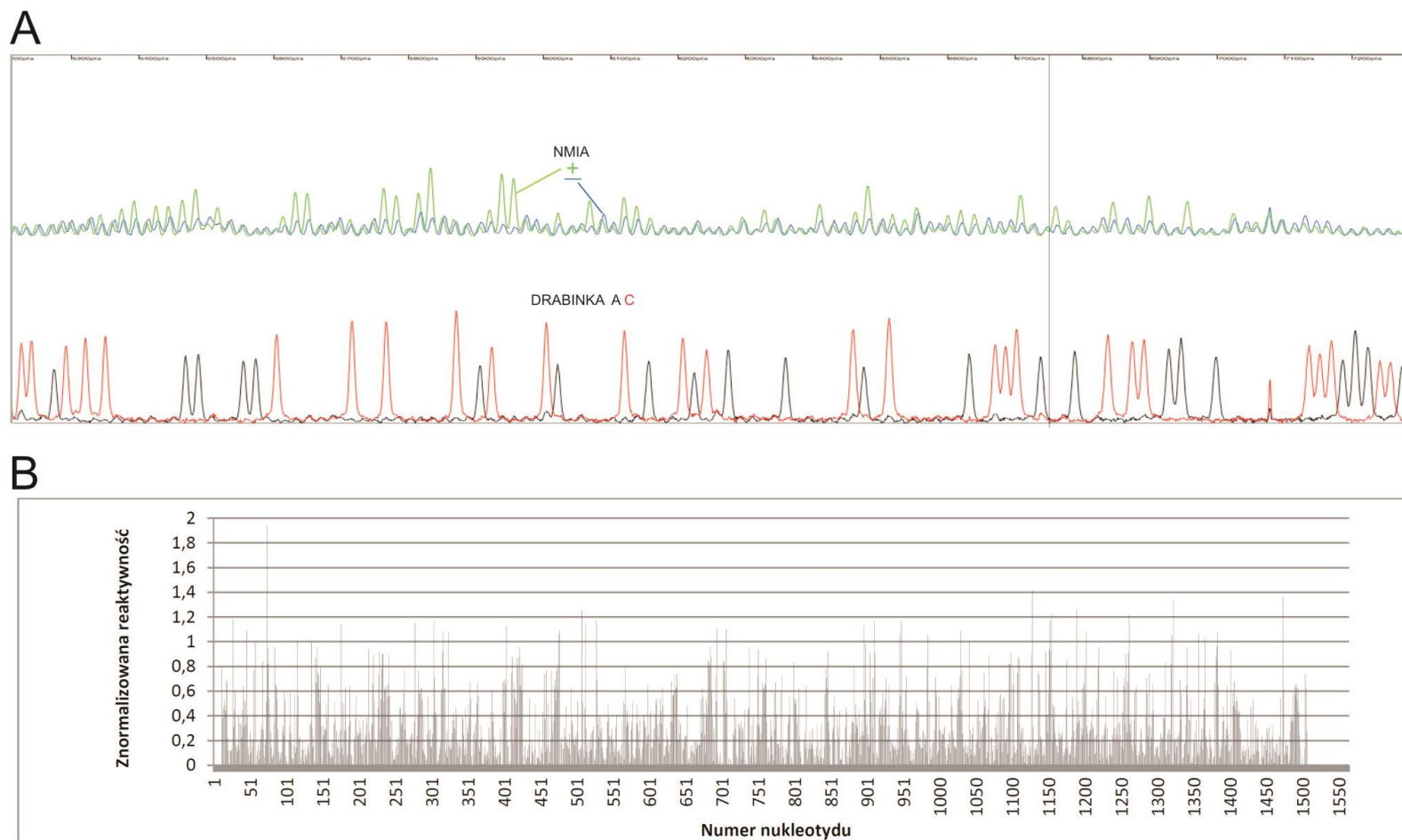
Zaproponowana struktura drugorzędowa posiada potwierdzone mapowaniami, oprócz rejonów jednoniciowych, także jednonukleotydowe wybrzuszenia wewnętrzne: 46, 98, 112, 116, 167, 278, 324, 508, 528, 905, 1041 i 1241. Pojawiają się tu silne lub średnie modyfikacje NMIA i silne bądź średnie mapowania DMS, CMCT oraz ketoksalem.

WYNIKI I DYSKUSJA



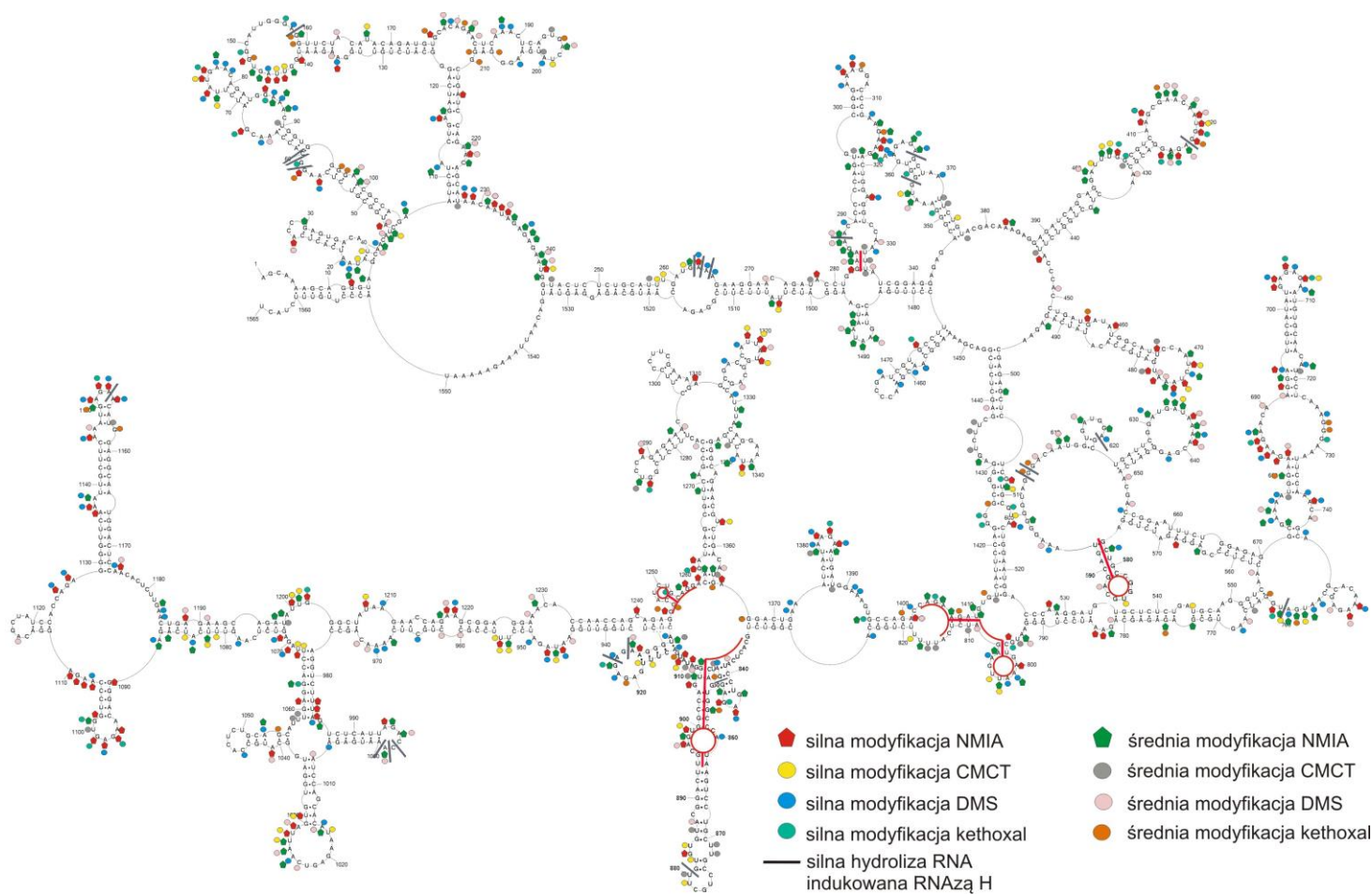
Rysunek 37. Model struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5 szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) - *Struktura 23*. Prawdopodobieństwo występowania par zasad i rejonów jednoczłonowych oszacowane w programie RNAstructure 5.5.

WYNIKI I DYSKUSJA



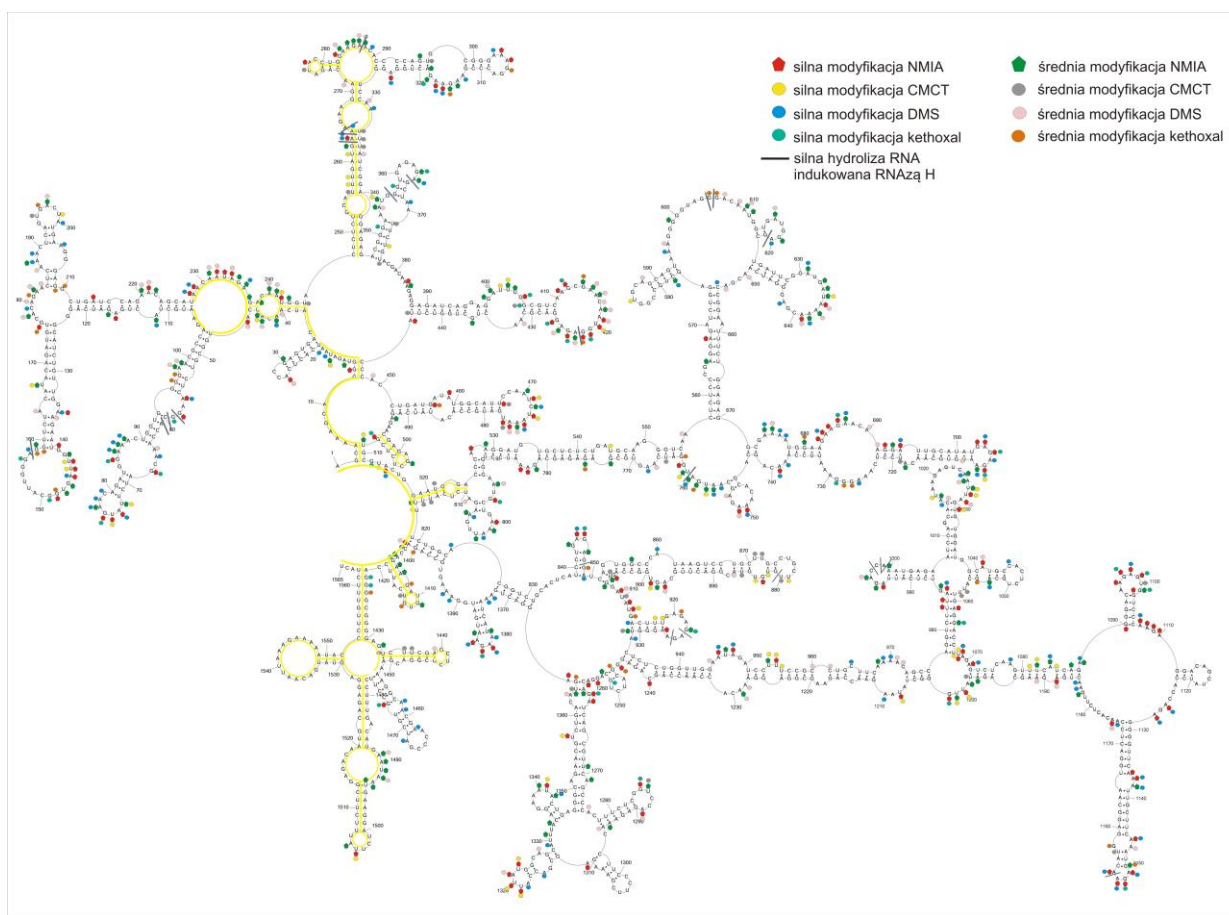
Rysunek 38. A - Przykład elektroforegramu powstającego po wykonaniu elektroforezy kapilarnej produktów cDNA powstałych podczas odczytu za pomocą odwrotnej transkrypcji wyników mapowania cRNA segmentu 5 metodą SHAPE, przy wykorzystaniu startera M2. B – Znormalizowane reaktywności nukleotydów cRNA segmentu 5. Mapowanie przeprowadzono w temperaturze 23°C.

WYNIKI I DYSKUSJA



Rysunek 39. Model struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5 szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) – *Struktura 23*. Struktura drugorzędowa została wygenerowana przez program RNAstructure 5.5 po wprowadzeniu danych z mapowania chemicznego oraz metody SHAPE wykonanego w temperaturze 23°C. Zaznaczono wyniki uzyskane przy użyciu metod mapowania chemicznego, SHAPE oraz hydrolizy RNA RNAzą H w obecności oligomeru DNA. Na czerwono zaznaczono motywy, które nie występują w *Strukturze 37*.

WYNIKI I DYSKUSJA



Rysunek 40. Model struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5 szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) – *Struktura 600*. Struktura drugorzędowa została wygenerowana przez program RNAstructure 5.5 po wprowadzeniu danych z mapowania chemicznego, metody SHAPE oraz dodatkowego parametru „*maximum pairing distance - 600*”. Zaznaczono wyniki uzyskane przy użyciu metod mapowania chemicznego, techniki SHAPE, hydrolizy RNA RNazą H w obecności oligomeru DNA. Na żółto zaznaczono motywy nie występujące w *Strukturze 23* oraz *Strukturze 37*.

WYNIKI I DYSKUSJA

Słabiej zmapowane zostały jednonukleotydowe wybrzuszenia wewnętrzne 164 (średnia modyfikacja DMS), 258 (silna modyfikacja CMCT), 436 (średnia modyfikacja NMIA), 964 (silna modyfikacja DMS), 1158 (średnia modyfikacja ketoksalem), 1271 (średnia modyfikacja NMIA) oraz 1458 (silna modyfikacja DMS). Dobrze zmapowane zostały wybrzuszenia wewnętrzne dwunukleotydowe: 883-884, 954-955, 1137-1138, 1146-1147, 1218-1219 oraz 1504-1505. Natomiast regiony 369-370, 432-433, 717-718, 859-860, 871-872, 1423-1424 uległy słabszym modyfikacjom.

Zaobserwowano także, rejony o średniej reaktywności (przewaga średnich modyfikacji NMIA nad silnymi lub brak modyfikacji NMIA i obecność średnich lub silnych mapowań chemicznych) takie, jak: 18-20, 40-44, 56-59, 86-90, 156-159, 176-183, 187-189, 195-201, 220-222, 235-243, 261-265, 283-289, 313-219, 354-355, 364-365, 399-405, 512-514, 631-639, 672-678, 690-694, 738-741, 750-769, 794-797, 800-807, 815-818, 879-887, 921-927, 1081-1085, 1340-1342, 1400-1408 oraz 1489-1494. Miejsca te zostały przewidziane, jako rejony jednoniciowe. Najprawdopodobniej są one mniej dostępne dla reagentów znajdując się wewnątrz struktury trzeciorzędowej RNA lub ulegają dynamicznym oddziaływaniom trzeciorzędowym RNA/RNA.

W określonym modelu struktury drugorzędowej znajdują się również rejony jednoniciowe, charakteryzujące się pojedynczymi modyfikacjami: 27-30, 65-68, 204-207, 328-334, 360-365, 377-387, 445-450, 457-459, 582-588, 615-620, 594-611, 722-732, 726-729, 875-880, 1018-1023, 1045-1050, 1114-1119, 1174-1185, 1228-1231, 1284-1289 oraz 1463-1468. Rejony te mogą być zaangażowane w oddziaływania trzeciorzędowe, co tłumaczy fakt pojedynczych modyfikacji w ich obrębie. Takie oddziaływania mogą wystąpić między rejonami 582-584/875-877, 1302-1304/1337-1339, 1301-1304/1513-1516, a także mogą wynikać z ustrukturalizowania pętli spinek czy wewnętrznych wybrzuszeń (powstawanie oddziaływań niekanonicznych).

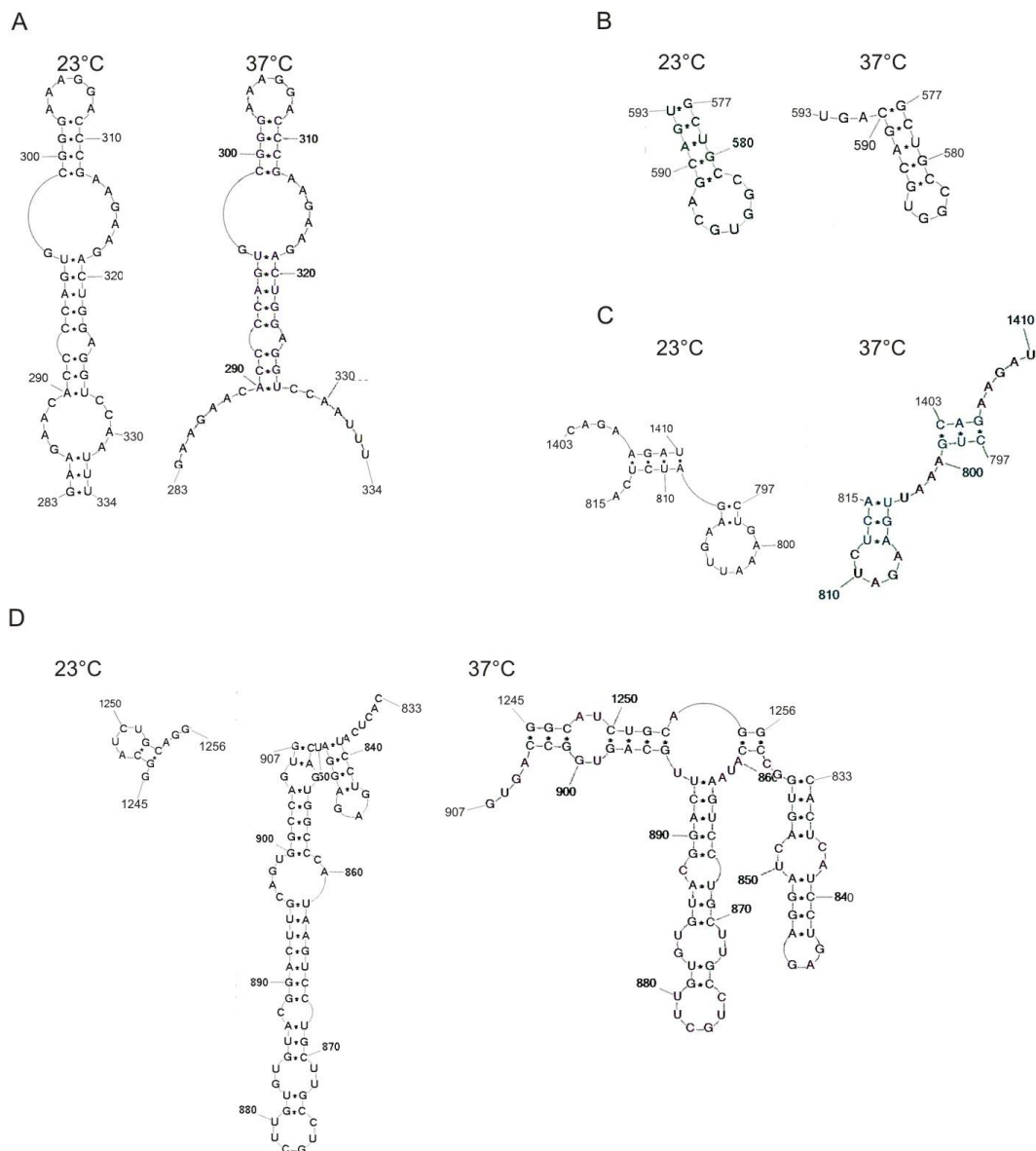
Podsumowując, można stwierdzić, że zaproponowany model struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5 bardzo dobrze koresponduje z danymi eksperymentalnymi uzyskanymi wszystkimi zastosowanymi metodami.

4.1.2. Porównanie modelu struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5 uzyskanego na podstawie danych z 23°C oraz 37°C

Wirus grypy infekuje m.in.: człowieka, trzodę chlewną oraz ptactwo. Temperatura, w jakiej namnaża się w ciele człowieka wynosi 37°C, natomiast u ptactwa 42°C. Wirus

WYNIKI I Dyskusja

także znosi różne temperatury, co najmniej w zakresie 4-42°C w czasie transmisji na swojego "żywiciela". W powyższych organizmach o różnych temperaturach ich ciała, wirus jest zdolny do przeprowadzenia cyklu replikacyjnego. Tak więc, postuluje się, że funkcjonalne motywy strukturalne występujące w wirusowych RNA zostają zachowane w pewnym zakresie temperatur.



Rysunek 41. Różnice w strukturze drugorzędowej cRNA segmentu 5 przy zmianie temperatury na 37°C. Różnice dotyczą rejonów: A - 283-290/332-334, B - 577-593, C - 797-815/1403-1410, D - 833-907/1245-1256.

W celu sprawdzenia czy zmiana temperatury spowodowała zmianę profilu mapowań i ewentualną zmianę struktury rezultaty mapowania chemicznego cRNA segmentu 5 wykonanego w temperaturze 37°C zostały wprowadzone do programu RNAstructure 5.5, który wygenerował strukturę drugorzędową badanej cząsteczki. Do

WYNIKI I DYSKUSJA

programu wprowadzono również pary zasad: 1082/1191, 1083/1190, 1085/1189, które zapewniły utworzenie motywu M121. Uzyskana struktura w dalszej części pracy będzie określana, jako *Struktura 37*. Postąpiono, więc w identyczny sposób, jak w przypadku analizy mapowania cRNA segmentu 5 w temperaturze 23°C.

Stwierdzono, że mapowania chemiczne wykonane w temperaturze 37°C są w większości zgodne z mapowaniami wykonanymi w temperaturze 23°C. Ustalono również, że *Struktura 37* jest niemal identyczna jak *Struktura 23*. Świadczy to o dużej termodynamicznej stabilności uzyskanej struktury drugorzędowej. Jedyne różnice między strukturami dotyczą kilku regionów wskazanych na rysunku 41.

Helisa 283-285/302-304 istniejąca w *Strukturze 23*, jest rozpleciona w *Strukturze 37* (Rysunek 41A). Zmiany dotyczą również wielkości pętli w rejonie 577-593. W strukturze mapowanej w 23°C pętla jest 7-nukleotydomowa (CGGUGCA), natomiast w 37°C jest to pętla 4-nukleotydomowa (CGGU), (Rysunek 41B). Co ciekawe, struktura spinki 577-593 została przewidziana w badaniach bioinformatycznych (69). Co więcej, pojawiają się doniesienia, że istnieją szczepy wirusa grypy, które posiadają delecje w opisywanej pętli. Delecje te zawsze dotyczą kodonu dla glicyny (110, 111). Wydaje się, że helisa jest w tym wypadku konserwatywna, natomiast pętla jest elementem zmiennym. Pozostaje to w zgodzie z przedstawionymi w niniejszej pracy badaniami cRNA segmentu 5. Dane z mapowań prowadzonych w temperaturach 23°C oraz 37°C wskazują, że helisa pozostaje stała w obydwu wypadkach, natomiast zmienna jest wielkość pętli.

Różnice można także wskazać w obszarze 797-814/1403-1410 (Rysunek 41C). *Struktura 23* posiada spinkę w regionie 797-808, natomiast w *Strukturze 37* występuję helisa (797-799/1403-1405), następnie pojawia się jedna niesparowana reszta nukleotydomowa oraz spinka (804-815). W *Strukturze 23* ta spinka nie występuje, a obszar 809-812/1407-1410 tworzy helisę. Kolejne różnice przedstawione są na rysunku 41D i dotyczą one regionu 833-907/1245-1256.

Niewielkie zmiany strukturalne w strukturze drugorzędowej cRNA segmentu 5 wynikające ze zmiany temperatury świadczą o dużej termodynamicznej stabilności większości motywów strukturalnych. Labilność kilku rejonów wskazanych na rysunku 41 wynika jasno z ich niskiej trwałości termodynamicznej. Z funkcjonalnego punktu widzenia zarówno trwałe termodynamicznie motywy strukturalne mogą być wykorzystywane w cyklu replikacyjnym wirusa (na przykład, jako elementy identyfikujące), jak i labilne, które mogą zmieniać się łatwo pod wpływem różnych

czynników np. czy komórkowego białka lub RNA, bądź czynników środowiskowych w komórce. Są to rejony warte dalszych badań oraz projektowania nacelowanych na nie potencjalnych terapeutyków.

4.1.3. Model struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5 z preferowanym fałdowaniem lokalnym

Metodę fałdowania RNA z „*maximum paring distance - 600*” wybrano bazując na publikacji Weeks'a (112). Autorzy wprowadzili ten parametr wychodząc z założenia, że najdłuższą odległością dzielącą pary zasad w rybosomie było 600 nukleotydów. Strukturę drugorzędową cząsteczki cRNA segmentu 5 rozważano również w oparciu o możliwość fałdowania się w czasie syntezy RNA, w sytuacji, kiedy 5' koniec RNA jest już syntezowany, natomiast brak jest 3' końca (113). Funkcja „*maximum paring distance - 600*” w programie RNAstructure 5.5, ogranicza oddziaływania regionów RNA do 600 nukleotydów. Wygenerowano strukturę na podstawie danych z mapowań chemicznych, metody SHAPE, wymuszając motyw M121 oraz korzystając z funkcji „*maximum paring distance - 600*”. Do analizy wykorzystano dane eksperymentalne uzyskane w temperaturze 23°C. Uzyskana struktura drugorzędowa będzie dalej określana, jako *Struktura 600* (Rysunek 40).

Struktura 600 charakteryzuje się wolnymi końcami 5' oraz 3'. Następnie na końcu 5' pojawia się krótka helisa (2-4/509-511) oraz jednoniciowy łącznik (5-10). Region 11-13/446-448 tworzy kolejną krótką helisę, po której następuje kolejny łącznik. Opisywany region (1-20) tworzy inne motywy strukturalne w porównaniu z *Strukturą 23* oraz *37*. W tych strukturach wolne końce 5' oraz 3' przechodzą dalej w helisę (6-14/1551-1560). Inne motywy strukturalne pojawiają się także na 3' końcu. *Struktura 600* charakteryzuje się obecnością przy 3' końcu helisy 1421-1430/1553-1562 oraz czterech struktur typu spinki do włosów, a mianowicie 1433-1451, 1453-1477, 1478-1528 oraz 1530-1552. Struktura spinki 1478-1528 została przewidziana bioinformatycznie przez grupę Gultyaev'a, z tym że przewidziana struktura zawiera dwa wybrzuszenia wewnętrzne, przedzielone krótką helisą (66, 69), natomiast spinka w *Strukturze 600* zawiera jedno duże wybrzuszenie wewnętrzne.

W *Strukturze 600* nie występuje helisa 244-281/1478-1533 występująca w strukturach bez dodatkowego parametru „*maximum paring distance - 600*”. Na jej miejsce w *Strukturze 600* powstała helisa 247-271/327-346.

WYNIKI I DYSKUSJA

W *Strukturze 600* oraz *Strukturze 23* (Rysunek 40) pojawiają się te same motywy spinki (21-35), motywy M198 oraz M121. Regiony 291-326, 347-445, 451-492, 529-808, 819-1403 także formują te same motywy strukturalne. Można stwierdzić, że większość motywów strukturalnych pozostaje niezmiennych w obu strukturach (Rysunek 40). Jest zatem wysoce prawdopodobne, że istnieją one *in vivo*, niezależnie czy preferowane byłoby fałdowanie następcze czy fałdowanie pełnej długości RNA.

Ciekawa wydaje się być mała spinka do włosów 21-35. Spinka ta istnieje we wszystkich rozważanych w pracy doktorskiej modelach struktur, co więcej bioinformatycznie została przewidziana przez niezależną grupę badawczą (105). Dodatkowo, lokalizacja omawianej spinki przed kodonem START oraz jej konserwacja struktury wskazuje, że struktura ta, mogąca istnieć w mRNA segmentu 5, może pełnić rolę w regulacji translacji (114, 115).

W dalszej części pracy będą dyskutowane *Struktury 23* oraz *Struktura 600*, ze względu na to, że obie są najprawdopodobniej funkcjonalne dla namnażania wirusa grypy.

4.2. Hydroliza RNA RNazą H w obecności oligomerów DNA

Obecność rejonów jednoniciowych w modelach struktury cRNA segmentu 5 została dodatkowo sprawdzona przy użyciu metody hydrolizy RNA RNazą H w obecności oligomerów DNA. Do badań użyto 19 oligomerów (Tabela 11). Metoda ta dodatkowo wskazywała rejony dostępne dla oligonukleotydów.

Miejsca oddziaływania oligomerów DNA z cRNA wybrano na podstawie badań z wykorzystaniem macierzy izoenergetycznych, które opisane są w kolejnym rozdziale.

Wyniki zostały zebrane w tabeli 4 oraz na rysunku 39. Wykazano, że silna hydroliza RNA RNazą H następuje po nukleotydach: 58-60, 157, 262-264, 287, 356, 365, 422/847/924-926, 604-605, 620, 642, 760, 880, 997-999 oraz 1153 (miejsca rozdzielone ukośnikiem oznaczają hydrolizę RNA w obecności tego samego oligomeru DNA). Do słabszej hydrolizy RNA RNazą H dochodzi po nukleotydach: 473, 705, 729 i 1181.

Miejsca silnej hydrolizy RNA po 157, 262-264, 365, 422/847/924-926, 604-605, 642, 880 nukleotydach dobrze korespondują z wynikami uzyskanymi z mapowania mikromacierzowego, co potwierdza ich dostępność do hybrydyzacji dla sond mikromacierzowych (Tabela 5). Wyjątek stanowią rejony w pobliżu nukleotydów 287, 356, 621, 760, 1153, gdzie nie zaobserwowano duplesu hybrydyzacyjnego na macierzy izoenergetycznej. Obserwację hydrolizy RNA RNazą H można wytłumaczyć

WYNIKI I DYSKUSJA

innym mechanizmem, który prowadzi do przecięcia RNA, gdy tylko utworzy się dupleks, natomiast na mikromacierzy detekcji ulegają stabilne termodynamicznie dupleksy hybrydazyjne.

Miejsca, w których dochodzi do hydrolizy RNA są zgodnie z modelami struktur cRNA segmentu 5 (*Struktury 23, 37 oraz 600*). Na wygenerowanych strukturach drugorzędowych tworzą się wybrzuszenia wewnętrzne (58-60, 287, 356, 729), pętle (157, 365, 422, 473, 620, 642, 705, 880, 924-926, 997-999, 1153), łączniki (604-605, 760, 1181). Rejon hydrolizy RNA RNazą H:262-264 znajduje się na granicy helisy oraz pętli (*Struktura 600*), natomiast w *Strukturze 23* oraz *Strukturze 37* rejon ten tworzy wybrzuszenie wewnętrzne. Z kolei hydroliza RNA po 847 nukleotydzie przypada w helisie we wszystkich wygenerowanych strukturach, lecz specyficzny oligonukleotyd CTCTCCATT jest komplementarny do rejonu 843-848, który tworzy pętle oraz współtworzy helisę i być może rozplata strukturę. Ten fakt tłumaczy hydrolizę po 847 nukleotydzie. Do słabej hydrolizy RNA RNazą H w obecności oligomerów DNA dochodzi w miejscach dobrze zmapowanych przez odczynniki chemiczne, takich jak: 473, 705, 880 oraz 1181. Niską lub brak dostępności dla oligonukleotydów potwierdzają wyniki mapowania mikromacierzowego.

Wykazano brak hydrolizy RNA RNazą H w obecności oligomeru DNA AAGGTCCTC komplementarnego do regionu 1060-1068. Sytuacja ta jest zgodna ze wszystkimi prezentowanymi strukturami, gdyż oligomer DNA jest komplementarny do helisy.

Brak hydrolizy RNA RNazą H wykazano w obecności dwóch oligomerów DNA: CAAATCCTC oraz GGATCTATT. Oligomery te są komplementarne do obszarów tworzących wybrzuszenia wewnętrzne na prezentowanych strukturach (396-404, 943-953). Sytuację tą można wytłumaczyć prawdopodobnie niesprzyjającą wiązaniu oligonukleotydów konformacją przestrzenną tych regionów. Regiony są dostępne dla stosunkowo małych odczynników chemicznych takich, jak NMIA, CMCT, DMS, ketoksal, natomiast nie wiążą się tu stosunkowo duże oligonukleotydy. Brak wiązań sond mikromacierzowych w tych rejonach potwierdza to założenie.

WYNIKI I DYSKUSJA

Tabela 4. Wyniki hydrolizy RNazą H segmentu 5 cRNA szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) w obecności oligomerów DNA.

| Nukleotyd po którym następowała hydroliza RNA RNazą H | Sekwencja oligomeru DNA, w którego obecności dochodziło do hydrolizy RNA | Rejon w segmencie 5 cRNA, do którego komplementarny jest oligomer DNA |
|---|--|---|
| 157 ^s | CTCCAATG | 150-158 |
| 423 ^s , 847 ^s , 923 ^s , 925 ^s | CTCTCCATT | 418-426 |
| 604-605 ^s | CTACCCC | 598-604 |
| 262-264 ^s | CTTTCATCA | 258-266 |
| 287 ^s | GTTCTTCCA | 281-289 |
| 365 ^s | CTCTCTCAC | 358-365 |
| 760 ^s | CCATCATTG | 755-763 |
| 356 ^s | CCCATTTC | 350-358 |
| 620 ^s | GCTCCATC | 615-622 |
| 642 ^s | CTCGTTTTA | 635-643 |
| 1153 ^s | TGTTCTCA | 1149-1156 |
| 58-60 ^s , 997-999 ^s , 729 ^w | TTCCCTTT | 724-732 |
| 880 ^w | CACAAGCAG | 875-883 |
| 473 ^w | ATTTAGATTG | 468-477 |
| 1181 ^w | TCAAGAGTG | 1176-1184 |
| 705 ^w | ATTCTCTCA | 703-710 |
| - | CAAATCCTC | 396-404 |
| - | AAGGTCCTC | 1060-1068 |
| - | GGATCTATT | 943-953 |

s –silna hydroliza RNA przez RNazę H, w- słaba hydroliza RNA przez RNazę H, "-", brak hydrolizy RNA przez RNazę H

4.3. Hybrydyzacja cRNA segmentu 5 do macierzy izoenergetycznych

Dostępność cRNA segmentu 5 dla oligonukleotydów została sprawdzona dzięki wykorzystaniu metody mapowania mikromacierzowego z wykorzystaniem macierzy izoenergetycznych. Bibliotekę izoenergetycznych sond Zespołu Genomiki Strukturalnej RNA i Zakładu Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych uzupełniono o 19 nowych sond, komplementarnych do cRNA segmentu 5 (Tabela 9 i 10).

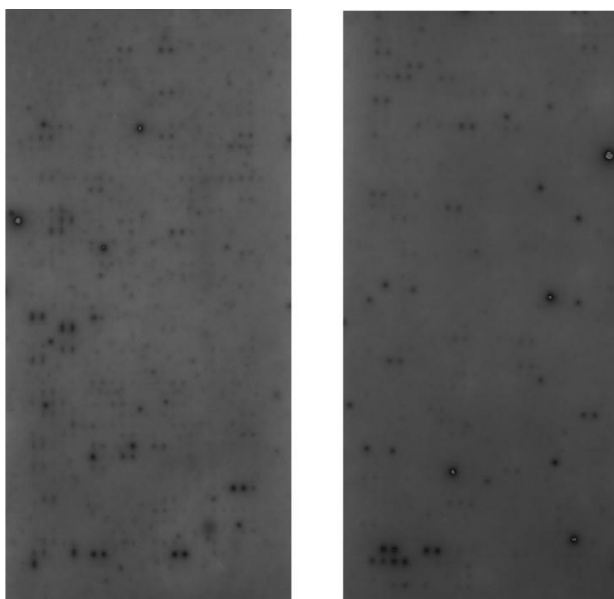
1565-nukleotydowa cząsteczka cRNA segmentu 5 okazała się trudnym przedmiotem badań przy użyciu macierzy izoenergetycznych ze względu na dużą ilość miejsc alternatywnego wiązania sond, zwłaszcza w temperaturze hybrydyzacji 4°C. Dlatego też przeprowadzono hybrydyzacje w wyższych temperaturach. Pod uwagę

WYNIKI I DYSKUSJA

brano tylko silne i średnie miejsca formowania się dupleksów hybrydacyjnych powstających w temperaturze 23°C oraz 37°C. Wyniki hybrydyzacji wykonanej w temperaturach 23°C oraz 37°C były niemal identyczne, różnice dotyczyły jednej sondy o sekwencji AcCcUg (miejsce wiązania sondy to pozycje 12, 551 oraz 929). Silną hybrydyzację obserwowano w temperaturze 23°C, natomiast w temperaturze 37°C wiązanie to cechowało się średnią siłą wiązania.

W analizie miejsc wiązania sond, przydatne były wyniki hydrolizy RNA RNazą H w obecności oligomerów DNA.

Pełne wyniki hybrydyzacji cRNA segmentu 5 do sond macierzy izoenergetycznych w temperaturze 37°C zebrane są w tabelach 5 oraz 6. Każda związana sonda z cRNA segmentu 5, której miejsce hybrydyzacji nie rozstrzygnięto eksperymentem z RNazą H była rozważana w oparciu o możliwość alternatywnych miejsc wiązania oraz porównywana z wynikami dla izolowanych motywów M121 i M198. Możliwe alternatywne miejsca takich sond zebrane są w ostatniej kolumnie w tabeli 6. Wszystkie miejsca wiązania w temperaturze 37°C zostały zaprezentowane na rysunku 43.



Rysunek 42. Przykładowy wynik hybrydyzacji cRNA segmentu 5 do sond macierzy izoenergetycznych w temperaturze 23°C.

WYNIKI I DYSKUSJA

Tabela 5. Wiązania sond potwierdzonych przez hydrolizę RNA w obecności RNazy H oraz oligomeru DNA.

| Miejsce wiązania ^a | Potwierdzone miejsce wiązania ^a | Sila wiązania ^b | Sekwencja sondy ^c | oligomer DNA | Rejon w segmencie 5 cRNA, do którego komplementarny jest oligomer DNA | Energia swobodna kompleksu komplementarna sonda/RNA ΔG_{37}° ^d (kcal/mol) wyliczona dla potwierdzonych miejsc wiązania | Miejsce hydrolizy RNA |
|---|--|----------------------------|------------------------------|--------------|---|--|-----------------------|
| 154/ 1202 ^a | 154 | M | CcCdA | CTCCCAATG | 150-158 | -8.23 | 157 |
| 155/ 791 | 155 | S | uCcCa | CTCCCAATG | 150-158 | -8.86 | 157 |
| 156/ 207/ 1430 | 156 | S | CUcCc | CTCCCAATG | 150-158 | -9.16 | 157 |
| 264 | 264 | M | UcUuUcA | CTTTCATCA | 258-266 | -9.12 | 262-264 |
| 13/ 601/ 930 | 601 | M | UdCcCg | CTACCCC | 598-604 | -9.85 | 604-605 |
| 365/ 501/ 753/ 778/ 1311 | 365 | M | GcUcUg | CTCTCTCAC | 358-365 | -10.26 | 365 |
| 237/ 344/ 364/ 366/ 424/ 500/ 668 /705/ 775/ 777/ 845/ 921/ 923 | 424/845/921/923 | S | CUcUcg | CTCTCCATT | 418-426 | -9.08 (424/845/921/923) | 422/847/924- 926 |

WYNIKI I DYSKUSJA

| | | | | | | | |
|---|------------|---|--------|-----------|---------|-------------------|-----------------|
| 343/ 389/ 423/ 568/ 667/ 1515 | 423 | S | UcUcGg | CTCTCCATT | 418-426 | -9.81 | 422/847/924-926 |
| 386/ 425/ 669/ 846/ 1089/ 1110/ 1128/ 1243/ 1526 | 425 846 | M | CcUcUg | CTCTCCATT | 418-426 | -10.09 (425, 846) | 422/847/924-926 |
| 206/ 605/ 644/ 728/ 1091 | 644 | S | UcCcUg | CTCGTTTTA | 635-643 | -10.47 | 642 |
| 645 | 645 | S | AuCcCg | CTCGTTTTA | 635-643 | -9.11 | 642 |
| 880/ 1556 | 880 | S | DcDdGg | CACAAGCAG | 875-883 | -7.73 | 880 |

a – miejsce wiązania sondy, zdefiniowane przez środkowy nukleotyd miejsca wiązania badanego RNA do sondy. b- dupleks sonda/badane RNA został uznany, jako silny (S), średni (M), słaby (W) kiedy intensywność była odpowiednio $\geq 1/3$ $\geq 1/9$ oraz $\geq 1/27$ najwyższej intensywności. Warunki hybrydyzacji: 300 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM HEPES, pH 7,0, 37°C. c – duże litery (A, C, G, U, D) oznaczają nukleotydy typu 2'-O-metylo-RNA, małe litery (a, c, g, u, d) oznaczają nukleotydy zawierające modyfikacje typu LNA, D lub d oznacza 2,6-diaminopurynorybozyd w serii 2'-O-metylo-RNA lub LNA. d - ΔG°_{37} obliczona dla dupleksu modyfikowana sonda/RNA (δI). e - nukleotyd, po którym następowała hydroliza RNA RNazą H w obecności oligomeru DNA.

WYNIKI I DYSKUSJA

Tabela 6. Prawdopodobne miejsca wiązania sond mikromacierzy izoenergetycznej do cRNA segmentu 5.

| Miejsce wiązania ^a | Sekwencja sondy komplementarnej do cRNA5 ^b | Sila wiązania ^c | Energia swobodna kompleksu: komplementarna sonda/RNA $\Delta G_{37}^{\circ d}$ (kcal/mol) | Nukleotyd komplementarny do 3'g sondy | Energia swobodna kompleksu: alternatywna sonda/RNA $\Delta G_{37}^{\circ e}$ (kcal/mol) |
|-------------------------------|---|----------------------------|---|---------------------------------------|---|
| 11/ 122/ 1422 | CCcUg | S | (-9.22) 11 (-9.22) 122 (-9.22) 1422 | 11C 122C 1422C | -6.4 (643) -6.4 (205) -6.3 (727) -6.2 (1422) -6.0 (1428) -5.8 (550) -5.5 (11) -5.4 (122) |
| 12 /551 /929 | AcCcUg | M | (-12.12) 12 (-10.18) 551 (-10.18) 929 | 12C 551A 929A | -8.6 (1422) -7.9 (122) -7.6 (929) -7.3 (600) -7.0 (551) |
| 95 | CcCcA | M | (-9.88) 95 | 95U | -8.6 (1428) -8.1 (1130) -5.7 (154) |
| 96/ 1429 | UCcCc | M | (-9.54) 1429 | 96A | |

WYNIKI I DYSKUSJA

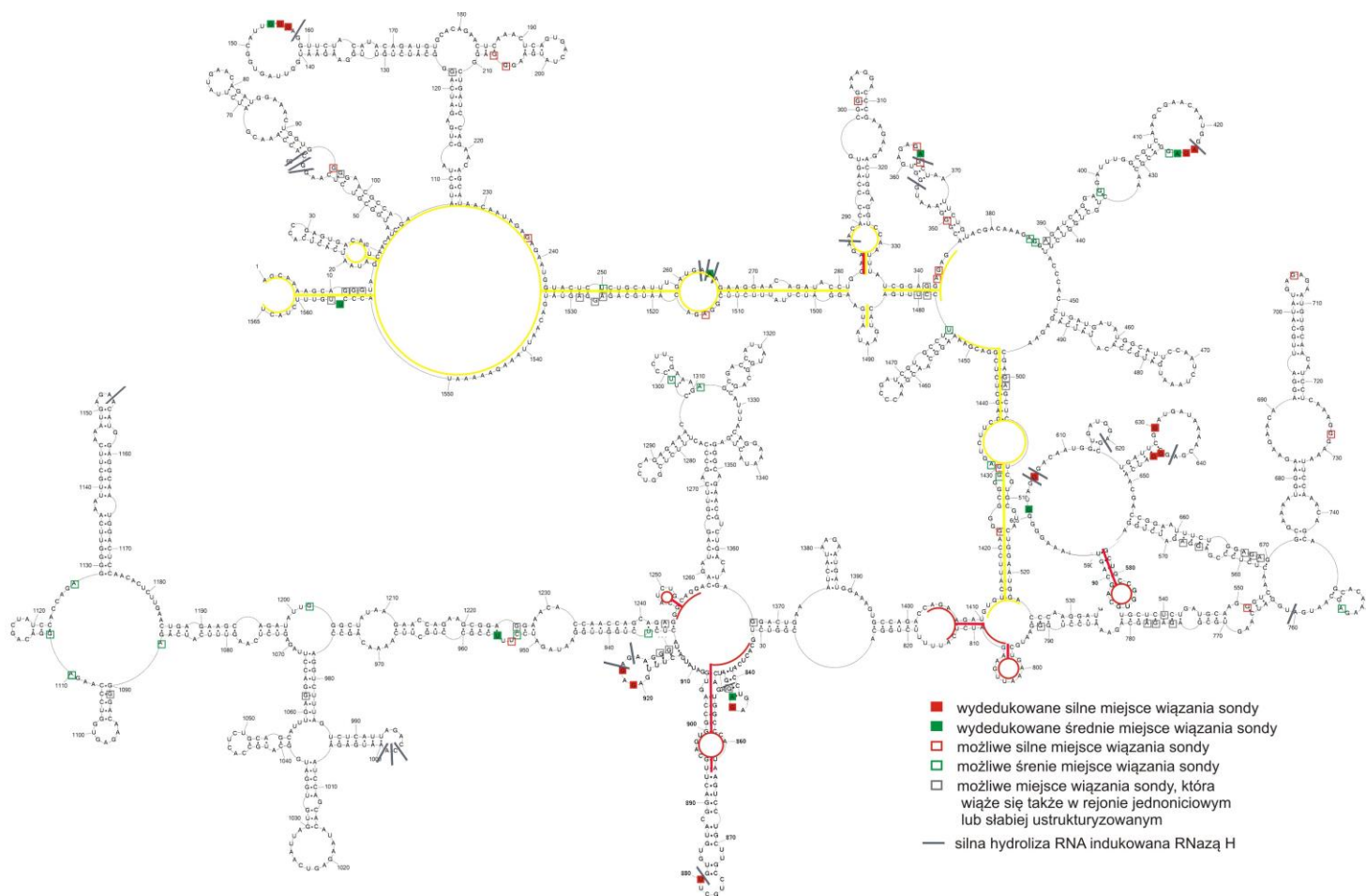
| | | | | | |
|--|--------|---|---|---|-------------------------------|
| | | | (-9.54) 96 | 1429A | |
| 250/ 540/ 936 | dGdGdg | M | (-12.84) 250 (-12.84) 936 (-12.84) 540 | 250C 936C 540C | -5.1 (1281) |
| 301 (350) | uCcCg | S | - (-9.61) 30 1 - (-9.61) 350 | 301C 350C | -6.3 (155) -5.7 (95) |
| 341/ 387/ 398/ 426/, 566/, 847/ 1062/, 1111/ 1225/ 1367/ 1527 | uCcUcg | M | (-12.42) 1062 (-9.99) 341 (-9.99) 387 (-9.99) 398 (-9.99) 426 (-9.99) 566 (-9.99) 847 (-9.99) 1111 (-9.99) 1225 (-9.99) 1367 (-9.99) 1527 | 341A 387A 398G 426G 566A 847A 1062C 1111A 1225A 1367U 1527U | -8.1 (1428/1429) -7.2 (96) |
| 630 | AuCcGg | S | (-8.65) 630 | 630G | |
| 953/ 1479 | dDgGdg | M | (-10.59) 953 (-10.59) 1479 | 953A 1479U | -3.9 (1554) |
| 954/ 1480 | dDdGgg | S | (-7.93) 1480 | 1480U | |

WYNIKI I DYSKUSJA

| | | | | | |
|------------|--------|---|--------------------------------|----------------|----------------|
| | | | (-7.93) 954 | 954U | |
| 956 | gGdDdg | M | (-11.68) 956 | 956C | |
| 1299/ 1477 | GgDdGg | M | (-12.75) 1477 (-12.75) 1299 | 1477C 1299C | -7.2 (955/956) |
| 1431/ 1529 | DcUcCg | M | (-10.04) 1431 (-10.04)1529 | 1431G 1529A | |
| 1555 | CDdGgg | M | (-12.32) 1555 | 1555C | |

a – miejsce wiązania sondy, zdefiniowane przez środkowy nukleotyd (lub dwa nukleotydy dla parzystych rejonów komplementarnych) miejsca wiązania badanego RNA do sondy. b - duże litery (A, C, G, U, D) oznaczają nukleotydy typu 2'-O-metylo-RNA, małe litery (a, c, g, u, d) oznaczają nukleotydy zawierające modyfikacje typu LNA, D lub d oznacza 2,6-diaminopurynorybozyd zawierający odpowiednio modyfikacje 2'-O-metylo-RNA lub modyfikacje typu LNA. c – dupleks sonda/badane RNA został uznany, jako silny (S), średni (M), słaby (W) kiedy intensywność wiązania była odpowiednio $\geq 1/3$ $\geq 1/9$ oraz $\geq 1/27$ najwyższej intensywności. Brak wiązania oznaczono „-„. Warunki hybrydyzacji: 300 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM HEPES, pH 7,0. d - ΔG_{37}° dla dupleksu RNA/RNA, w nawiasach podano energię swobodną - ΔG_{37}° obliczoną dla dupleksu modyfikowana sonda/RNA (81), podano miejsca dla których przedstawiono obliczenia. e - ΔG_{37}° obliczona przez program RNAstructure 5.5 dla dupleksu RNA/RNA, podano miejsca, dla których przedstawiono obliczenia. Jedynie alternatywne miejsca wiązania sond o termodynamicznej stabilności większej niż -4 kcal/mol zostały przedstawione.

WYNIKI I DYSKUSJA



Rysunek 43. Wynik hybrydyzacji cRNA segmentu 5 do macierzy izoenergetycznych. Dodatkowo zaznaczono wyniki hydrolizy RNA RNazą H w obecności oligomeru DNA. Wyniki zaprezentowano na *Strukturze 23*. Uwzględniono różnice pomiędzy modelami *Struktury 23, 37 oraz 600*. Na żółto zaznaczono różnice między *Strukturą 23* a *600*, na czerwono między *Strukturą 23* a *37*.

WYNIKI I DYSKUSJA

Zaobserwowano wiązanie sond w miejscach: 154, 155, 156, 264, 365, 423, 424, 425, 601, 605, 630, 644, 645, 845, 846, 880, 921, 923, 956 oraz 1555. Dostępne rejony dla sond zostały potwierdzone przez hydrolizę RNA RNazą H w obecności oligomeru DNA (sondy, których miejsce wiązania przypadało w pozycjach: 154, 155, 156, 264, 423, 424, 425, 605, 845, 846, 880, 921 oraz 923). Te miejsca wiązania uznane zostały za pewne. Dodatkowo, zauważono, że niektóre sondy posiadają miejsca alternatywnego wiązania, dla których istnieją sondy komplementarne. Brak wiązania sondy komplementarnej w rejonie, pozwala na uznanie go za miejsce niedostępne dla oligonukleotydów. To założenie pozwoliło na uznanie miejsc wiązania sond (430, 601, 630, 956, 1555) za potwierdzone.

Obydwa modele struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5 (*Struktura 600* oraz *Struktura 23*) są zgodne z wiązaniami sond. Miejsca wiązania sond znajdują się w rejonach jednoniciowy, są to pętle spinek (miejsca wiązania sond: 154, 155, 156, 365, 630, 845, 880, 921, 923), wybrzuszenia wewnętrzne (miejsca wiązania sond: 264, 1555), łączniki (miejsca wiązania sond: 601, 605). Wykazano także wiązanie się sondy w miejscu 664 oraz 645. Do wiązania sond dochodzi na granicy pętli oraz helisy. Co więcej, w tym rejonie występuje motyw GGG, co może wzmacniać oddziaływanie RNA z sondą oligonukleotydową. Podobna sytuacja ma miejsce, dla sondy wiążącej się w rejonie 846. Natomiast do wiązania się sondy w miejscu 956 dochodzi na granicy helisy oraz wybrzuszenia wewnętrznego.

Dodatkowo, wykazano możliwość wiązania się sond w alternatywnych miejscach, w obszarach jednoniciowych. W tym wypadku nie można zweryfikować dokładnego miejsca wiązania. Taka sytuacja dotyczy następujących prawdopodobnych miejsc wiązania sond: 95, 206, 207, 237, 250, 301, 343, 344, 350, 364, 366, 386, 387, 389, 398, 426, 551, 705, 728, 753, 936, 953, 954, 1089, 1110, 1111, 1128, 1202, 1299, 1310, 1422, 1431, 1429, 1430, 1477 oraz 1515.

Silne i potwierdzone miejsca wiązania zaobserwowano w motywie 839-931, labilnym pod wpływem wzrostu temperatury. Taki wynik potwierdza dostępność dla oligonukleotydów (a więc też dla czynników zawierających kwasy nukleinowe) oraz tendencję do rearanzacji struktury tego rejonu.

Bardzo interesujące są również wyniki dla domeny 557-670, która jest domeną silnie wiążącą oligonukleotydy. Możliwe, że jej łatwe i silne oddziaływanie związane jest konieczną funkcjonalną dostępnością spinki 577-593.

WYNIKI I DYSKUSJA

Konserwatywny motyw M121, jak i konserwatywna spinka wchodząca w skład M198 (w pozycji 45-105) są słabo dostępne dla sond mikromacierzy w porównaniu z innymi rejonami cRNA5 (Tabela 6, Rysunek 22, 31, 43). W związku z tym, że oba konserwatywne motywy są dobrze potwierdzone w cRNA5 przez mapowania chemiczne przyczyną niskiej dostępności dla sond mogą być oddziaływania trzeciorzędowe – omówione wcześniej (rozdziały 2.4 i 3.3). Zachowawczość tych struktur i potwierdzony brak labilności są wskazaniem, że być może jedną z ich ról jest rozpoznawalność przez czynniki białkowe, związane z replikacją wirusa. Rolę motywu 45-105, tak jak wspomniano wcześniej ze względu na jej położenie można łączyć z translacją białka NP, jeśli ten element jest zachowany również w mRNA.

4.4. Strukturalno-sekwencyjna analiza bioinformatyczna

Jak wspomniano na początku tego rozdziału, wybrany szczep był szczepem modelowym. Jednak przeprowadzone na nim badania połączone z analizą bioinformatyczną sekwencji pozostałych szczepów pozwala na ocenę uniwersalności jego modelu struktury drugorzędowej. Analizę strukturalno-bioinformatyczną wykonano dla struktur otrzymanych dzięki programowi RNAstructure 5.5 po wprowadzeniu danych z mapowania w temperaturach 23°C oraz 37°C oraz dla *Struktury 600*. Jak już to omówiono *Struktura 23* zawiera większość motywów zgodnych ze *Strukturą 37*, dlatego też omówione zostaną modele *Struktur 23* oraz *600*.

Do badań wykorzystano wszystkie pełne sekwencje segmentu 5 RNA(+) znajdujące się w bazie danych NCBI Influenza Virus Resorce (73). Następnie usunięto identyczne sekwencje oraz te, które miały niezdefiniowane nukleotydy. Wyselekcjonowane sekwencje zestawiono w programie MAFFT stosując algorytm FFT-NS-1 (116). W chwili wykonywania analiz było ich 15533. Konserwatywność struktury drugorzędowej wygenerowanego modelu pod względem możliwość występowania danych par zasad analizowano w programie Excel, na podstawie tego zestawienia sekwencji. Analizę bioinformatyczną przeprowadził profesor Walter N. Moss (Iowa State University, USA).

Wykazano, że model struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5 (*Struktura 23*) jest konserwatywny w 85,4%, *Struktura 600* wykazuje 85,8 % konserwatywności. Jest to bardzo wysoki procent zachowawczości, który pozwala przypuszczać, że motywy strukturalne określone w cRNA segmentu 5 dla modelowego szczepu

WYNIKI I DYSKUSJA

A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) występują także, w innych szczepach wirusa grypy typu A.

Co więcej, analiza bioinformatyczna wykazała występowanie kompensacyjnych mutacji, które związane są ze zmiennością sekwencyjną przy zachowaniu struktury drugorzędowej (Tabela 7). Konserwacja struktury wiąże się najprawdopodobniej z pełnioną biologiczną funkcją RNA. Analiza bioinformatyczna wykonana dla *Struktury 23* wykazała, że najbardziej konserwatywne są pary zasad mieszczące się w regionach: 6-10/1556-1560, 21-26/30-35, 53-55/95-97, 60-64/90-94, 266-272/1506-1512, 279-281/1497-1499, 565-569/660-664, 745-746/754-755, 797-798/807-808, 1079-1083/1190-1194, 1148-1150/1155-1157, 1246-1247/1252-1253, 1375-1379/1384-1388 oraz 1459-1462/1469-1472 (Rysunek 44). Pary zasad charakteryzują się konserwatywnością bliską 100%. Ponadto, wysoki procent zachowawczości występuje dla M198 oraz M121.

Struktura 600 charakteryzuje się takim samym stopniem konserwatywności wspólnych motywów strukturalnych. Specyficzne struktury drugorzędowe na 5' i 3' końcu również wykazują wysoki stopień konserwatywności. Krótka helisa przy 5' końcu, helisa przy 3' końcu 1421-1430/1553-1562 oraz cztery struktury typu spinki, a mianowicie: 1433-1451, 1453-1477, 1478-1528 oraz 1530-1552 cechują się konserwatywnością bliską 100% (Rysunek 45).

Analiza bioinformatyczna nie wyklucza, ani nie preferuje żadnego z modeli, pozwalając domniemywać, że zarówno oddziaływania determinujące cykliczną lub liniową strukturę segmentu 5 RNA(+) są istotne.

WYNIKI I DYSKUSJA

Tabela 7. Pary zasad cechujące się występowaniem mutacji kompensacyjnych. Obliczenie przedstawono dla modelu *Struktury 23* dla typu A wirusa grypy. Kolorami zaznaczono stopień konserwatywność par zasad obliczony dla wirusa grypy typu A: czerwony > 98%, 95% ≤ pomarańczowy < 98%, 90% ≤ zielony < 95% (ostatnia kolumna).

| pz | pary zasad (pz) | | GC | CG | AU | UA | GU | UG | GA | AG | AA | GG | UU | CC | AC | UC | CA | CU | Stopień |
|----|--------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|------|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----------------------|
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | konserwatywności (%) |
| UA | 53 | 97 | 0 | 15431 | 0 | 0 | 0 | 121 | 1 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 99,9 |
| CG | 60 | 94 | 0 | 15447 | 0 | 0 | 0 | 27 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 100,0 |
| AU | 69 | 83 | 0 | 0 | 11215 | 0 | 4346 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 100,0 |
| GC | 109 | 225 | 14670 | 0 | 35 | 0 | 777 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 54 | 22 | 0 | 0 | 99,5 |
| UA | 119 | 214 | 0 | 0 | 0 | 15449 | 0 | 91 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 17 | 2 | 0 | 99,9 |
| GC | 133 | 165 | 15040 | 0 | 0 | 0 | 520 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| AU | 138 | 161 | 0 | 0 | 11189 | 0 | 4358 | 0 | 3 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 99,9 |
| UG | 140 | 159 | 0 | 0 | 0 | 12568 | 0 | 2977 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | 99,9 |
| GU | 244 | 1533 | 4291 | 0 | 47 | 0 | 11196 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 23 | 99,8 |
| CG | 249 | 1528 | 0 | 12217 | 0 | 1 | 0 | 3205 | 0 | 92 | 0 | 37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | 99,1 |
| UA | 256 | 1520 | 0 | 0 | 0 | 15522 | 0 | 34 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 100,0 |
| AU | 267 | 1511 | 4 | 0 | 9489 | 0 | 6063 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100,0 |
| GU | 270 | 1508 | 5 | 0 | 8412 | 0 | 7137 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| AU | 276 | 1501 | 0 | 0 | 14089 | 0 | 1464 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| UA | 277 | 1500 | 0 | 1 | 0 | 11746 | 0 | 3615 | 0 | 0 | 0 | 0 | 193 | 0 | 0 | 6 | 1 | 0 | 98,7 |

WYNIKI I DYSKUSJA

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|-----|----|----|-----|---|-----|---|-----|----|-------|
| CG | 279 | 1499 | 0 | 9140 | 0 | 0 | 0 | 6416 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 100,0 |
| UA | 281 | 1497 | 0 | 0 | 0 | 13632 | 0 | 1905 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 9 | 1 | 0 | 99,8 |
| CG | 291 | 326 | 0 | 4978 | 0 | 0 | 0 | 10581 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 100,0 |
| GC | 302 | 309 | 8451 | 0 | 0 | 0 | 7105 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| GU | 338 | 1482 | 20 | 0 | 2769 | 0 | 12747 | 0 | 5 | 1 | 1 | 10 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 99,8 |
| GU | 339 | 1481 | 0 | 0 | 6978 | 0 | 8579 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| GC | 341 | 1479 | 11804 | 0 | 9 | 0 | 3401 | 0 | 18 | 1 | 0 | 42 | 0 | 0 | 284 | 1 | 0 | 0 | 97,8 |
| GU | 349 | 374 | 1 | 0 | 49 | 0 | 15504 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100,0 |
| GC | 350 | 373 | 15138 | 0 | 0 | 0 | 415 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 100,0 |
| UG | 359 | 366 | 0 | 35 | 0 | 11332 | 0 | 4142 | 5 | 4 | 10 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 32 | 0 | 99,7 |
| GC | 407 | 429 | 5824 | 0 | 1 | 0 | 9685 | 0 | 32 | 2 | 2 | 4 | 0 | 1 | 9 | 0 | 0 | 0 | 99,7 |
| AU | 501 | 1442 | 0 | 0 | 11995 | 0 | 3566 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| CG | 505 | 1438 | 0 | 15391 | 0 | 0 | 0 | 165 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 100,0 |
| CG | 507 | 1429 | 0 | 2949 | 0 | 1 | 0 | 12178 | 0 | 424 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 97,2 |
| GC | 518 | 1419 | 15321 | 0 | 0 | 0 | 239 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| AU | 519 | 1418 | 2 | 0 | 10641 | 0 | 4714 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 121 | 0 | 0 | 0 | 0 | 83 | 98,7 |
| CG | 525 | 792 | 0 | 3244 | 0 | 8184 | 0 | 3202 | 0 | 0 | 0 | 0 | 42 | 6 | 0 | 3 | 814 | 56 | 94,1 |
| UG | 536 | 780 | 8972 | 0 | 0 | 0 | 6582 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| CG | 537 | 779 | 0 | 14241 | 0 | 0 | 0 | 1313 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 100,0 |
| CG | 541 | 775 | 0 | 14261 | 0 | 0 | 0 | 1289 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 100,0 |

WYNIKI I DYSKUSJA

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|----|-----|---|----|-----|---|----|----|-----|----|-------|
| UA | 542 | 774 | 0 | 1 | 0 | 12825 | 0 | 2700 | 0 | 0 | 2 | 0 | 26 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 99,8 |
| UG | 545 | 773 | 0 | 2 | 0 | 6 | 0 | 15548 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| CG | 561 | 666 | 0 | 8187 | 0 | 0 | 0 | 7240 | 0 | 111 | 0 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 99,2 |
| GC | 566 | 663 | 14143 | 0 | 0 | 0 | 1405 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 100,0 |
| GU | 567 | 662 | 0 | 0 | 8572 | 0 | 6983 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| GU | 569 | 660 | 3719 | 0 | 17 | 0 | 11817 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100,0 |
| GC | 575 | 654 | 6721 | 0 | 0 | 0 | 8835 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| GC | 613 | 622 | 7535 | 0 | 75 | 0 | 7906 | 0 | 15 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 25 | 0 | 0 | 0 | 99,7 |
| UG | 614 | 621 | 0 | 2967 | 0 | 7614 | 0 | 4235 | 3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 735 | 0 | 95,2 |
| AU | 625 | 647 | 0 | 0 | 15243 | 0 | 307 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 99,9 |
| UA | 626 | 646 | 0 | 0 | 0 | 15213 | 0 | 336 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 99,9 |
| UG | 672 | 742 | 0 | 5899 | 0 | 8 | 0 | 9424 | 0 | 190 | 0 | 33 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 98,6 |
| GC | 680 | 735 | 6410 | 0 | 0 | 0 | 9140 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| AU | 681 | 734 | 0 | 0 | 11441 | 0 | 3898 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 185 | 0 | 1 | 0 | 0 | 30 | 98,6 |
| AU | 694 | 719 | 0 | 0 | 12552 | 0 | 2998 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 100,0 |
| GC | 697 | 714 | 15306 | 0 | 0 | 0 | 247 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| UG | 700 | 711 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 15541 | 0 | 1 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 99,9 |
| UA | 812 | 1407 | 0 | 0 | 0 | 14524 | 0 | 936 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 | 0 | 0 | 46 | 1 | 0 | 99,4 |
| UA | 829 | 1369 | 0 | 0 | 0 | 11282 | 0 | 4269 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 100,0 |
| UA | 854 | 904 | 0 | 0 | 0 | 15476 | 0 | 74 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 100,0 |

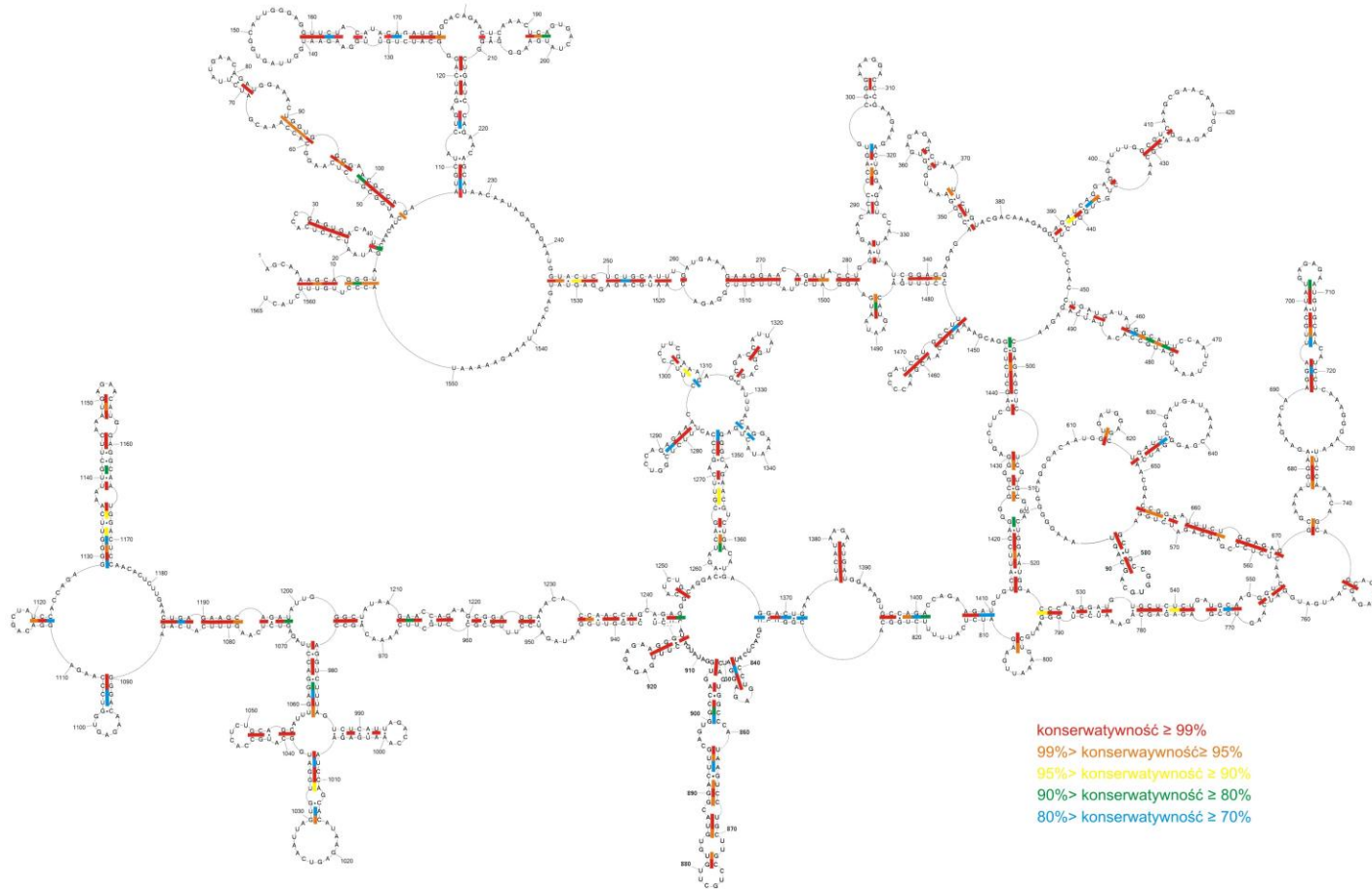
WYNIKI I DYSKUSJA

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|---|----|---|---|-----|---|-----|----|----|----|-------|
| UG | 861 | 895 | 0 | 5495 | 0 | 55 | 0 | 9992 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 99,9 |
| GU | 873 | 882 | 248 | 0 | 3457 | 0 | 11728 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 91 | 0 | 21 | 8 | 0 | 2 | 99,2 |
| GC | 940 | 1236 | 6226 | 0 | 1 | 0 | 9322 | 0 | 5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 99,9 |
| UA | 941 | 1235 | 0 | 0 | 0 | 15188 | 0 | 357 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 5 | 3 | 0 | 99,9 |
| UA | 956 | 1224 | 0 | 0 | 0 | 14827 | 0 | 600 | 0 | 2 | 4 | 0 | 100 | 0 | 0 | 21 | 3 | 0 | 99,2 |
| CG | 957 | 1223 | 0 | 14319 | 0 | 0 | 0 | 1211 | 0 | 26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 99,8 |
| GC | 959 | 1221 | 4503 | 0 | 7895 | 0 | 2892 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 4 | 0 | 263 | 0 | 0 | 0 | 98,3 |
| CG | 975 | 1204 | 0 | 9732 | 0 | 0 | 0 | 5823 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100,0 |
| GC | 979 | 1065 | 3348 | 0 | 1538 | 0 | 10553 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 119 | 0 | 0 | 0 | 99,2 |
| UA | 992 | 1001 | 0 | 0 | 0 | 15529 | 0 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 6 | 4 | 0 | 99,9 |
| CG | 1044 | 1051 | 0 | 13556 | 0 | 0 | 0 | 1990 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 4 | 2 | 99,9 |
| UA | 1073 | 1197 | 0 | 0 | 0 | 11422 | 0 | 4128 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 100,0 |
| UA | 1075 | 1195 | 0 | 2 | 0 | 12926 | 0 | 2603 | 1 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 3 | 6 | 10 | 0 | 99,8 |
| UG | 1080 | 1193 | 0 | 8724 | 0 | 1 | 0 | 6832 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| UA | 1082 | 1191 | 0 | 0 | 0 | 11604 | 0 | 3953 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| CG | 1083 | 1190 | 0 | 14675 | 0 | 3 | 0 | 873 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 1 | 99,9 |
| GC | 1079 | 1194 | 13902 | 0 | 2 | 0 | 1500 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 150 | 0 | 0 | 0 | 99,0 |
| GC | 1088 | 1186 | 12935 | 0 | 1 | 0 | 2588 | 0 | 6 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 28 | 0 | 0 | 0 | 99,8 |
| GU | 1131 | 1171 | 0 | 0 | 9808 | 0 | 5550 | 1 | 0 | 4 | 0 | 0 | 154 | 0 | 3 | 0 | 0 | 38 | 98,7 |
| UA | 1280 | 1293 | 0 | 0 | 0 | 13259 | 0 | 2299 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 100,0 |

WYNIKI I DYSKUSJA

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|------|------|---|-------|-------|---|-----|------|---|----|---|---|---|---|---|---|----|---|-------|
| CG | 1281 | 1292 | 0 | 10935 | 0 | 1 | 0 | 4621 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100,0 |
| CG | 1316 | 1324 | 0 | 15539 | 0 | 0 | 0 | 16 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 100,0 |
| CG | 1317 | 1323 | 0 | 14782 | 0 | 0 | 0 | 675 | 0 | 90 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 4 | 99,3 |
| AU | 1459 | 1472 | 0 | 0 | 15172 | 0 | 385 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 4 | 0 | 0 | 1 | 100,0 |

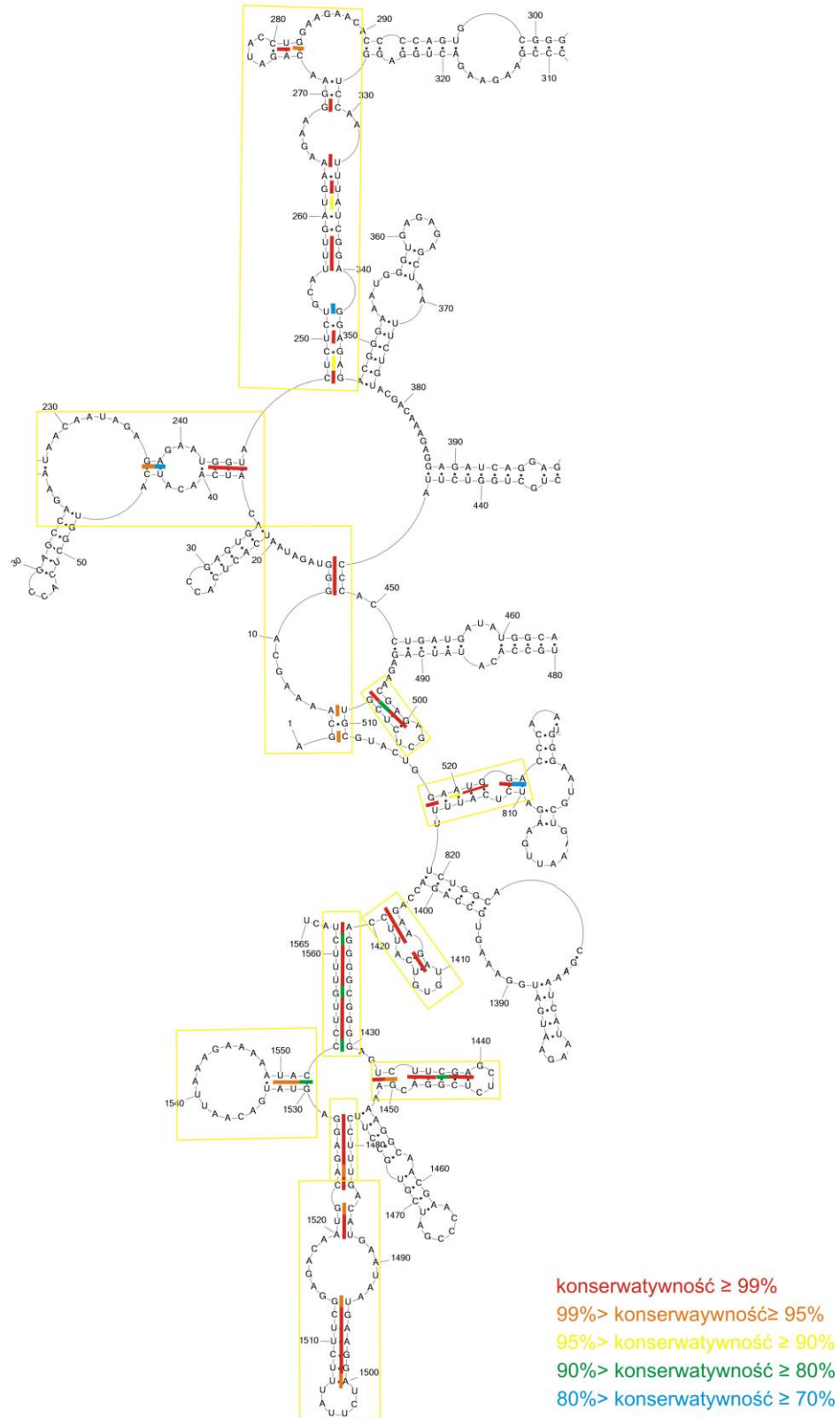
WYNIKI I DYSKUSJA



WYNIKI I DYSKUSJA

Rysunek 44. Stopień konserwatywności par zasad dla typu A w modelu struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5 (*Struktura 23*).

WYNIKI I DYSKUSJA



Rysunek 45. Stopień konserwatywność par zasad we fragmencie modelu struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5 (*Struktura 600*). Konserwatywność zaznaczono dla par zasad występujących tylko w *Strukturze 600*. Żółtymi prostokątami zaznaczono regiony występujące tylko w modelu *Struktury 600*.

5. Podsumowanie badań struktury drugorzędowej RNA(+) segmentu 5

W pracy zaprezentowano trzy struktury cRNA segmentu 5; strukturę opartą na mapowaniach w temperaturach 23°C oraz 37°C oraz strukturę z dodatkowym parametrem „*maximum pairing distance - 600*” wprowadzonym do programu RNAstructure 5.5 (Rysunek 39 i 40). Jak pokazano na rysunku 40, *Struktura 23* oraz *Struktura 600* różnią się w rejonach 5' i 3' końca cząsteczki, podczas gdy pozostałe elementy strukturalne są identyczne. Wydaje się, że *Struktura 23* jest ważna na etapie rozpoznania promotora przez wirusową polimerazę. Wirusowa polimeraza rozpoznaje oddziałujące ze sobą 3' i 5' końce cRNA. W strukturze bez dodatkowego parametru „*maximum pairing distance - 600*” takie oddziaływania są możliwe. Musimy mieć na uwadze, że rozważamy RNA(+) segmentu 5, którego zdeterminowana struktura *in vitro* może zawierać funkcjonalne motywy istotne zarówno dla cRNA, jak i mRNA. Wiadomo także, że replikacja czy też transkrypcja wirusowych RNA są procesami bardzo dynamicznymi. Możliwe jest, że na innym etapie cyklu funkcjonalna staje się *Struktura 600*. Model struktury drugorzędowej cRNA5 ukazuje trwałe oraz labilne termodynamicznie motywy strukturalne. Co ciekawe, labilność dotyczy motywów powstałych z udziałem oddziaływań dalekiego zasięgu. Hipotetycznie mogą być to "zarodki" rearanżacji struktury od struktury cyklicznej (Rysunek 39) w kierunku struktury liniowej (Rysunek 40) (i na odwrót) z udziałem dodatkowych czynników, takich jak białka wirusowe lub komórkowe związane z danym etapem cyklu wirusa.

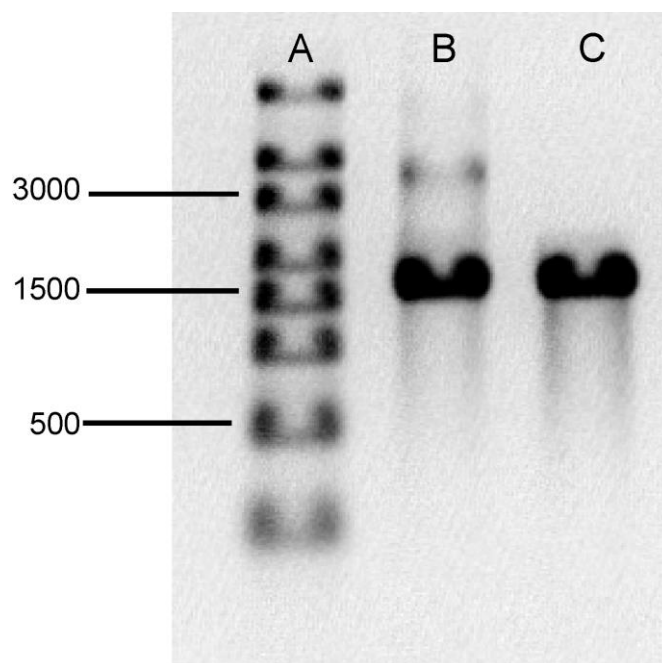
Zjawisko cyrkularyzacji genomu znane jest choćby u wirusów z rodziny *Flaviviridae*. Zachowawczą cechą genomu tych wirusów jest obecność komplementarnych sekwencji na 5' i 3' końcu. Komplementarność sekwencji sprzyja cyrkularyzacji genomu, która odbywa się w czasie replikacji (49).

6. Struktura drugorzędowa rejonu kodującego segmentu 5 RNA(+)

Rejon kodujący segmentu 5 RNA(+) szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) liczy 1494 nukleotydy. Stanowi centralną część mRNA segmentu 5 RNA(+). W pracy chciano wykazać, czy fałdowanie rejonu zachodzi niezależnie od 3' oraz 5' niekodujących końców.

6.1. Mapowanie struktury drugorzędowej rejonu kodującego segmentu 5 RNA(+) szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)

RNA o sekwencji rejonu kodującego segmentu 5 RNA(+) szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) został syntezowany w celu mapowania *in vitro* struktury drugorzędowej. Możliwość alternatywnego fałdowania się cząsteczki została sprawdzona używając różnych buforów do fałdowania [różne stężenie Mg^{2+} (5-25 mM)]. Wykazano, że cRNA segmentu 5 fałduje się w jedną strukturę w stosowanych buforach. Do dalszych badań wybrano bufor fałdujący zawierający 5 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 50 mM HEPES, pH 7 (Rysunek 46). Mapowanie cząsteczki wykonano w temperaturze 23°C, używając takich odczynników modyfikujących jak: CMCT, DMS oraz ketoksal. Wykorzystano także technikę SHAPE z odczynnikiem NMIA. W reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystano 6 starterów (Tabela 8), które pozwoliły na odczyt całej cząsteczki za wyjątkiem 3' końca (rejonu 1461-1494).



Rysunek 46. Rozdział rejonu kodującego RNA(+) segmentu 5 w 0,8% żelu agarozowym. A - marker wielkości RNA; B – RNA poddane fałdowaniu w buforze zawierającym 5 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 50 mM HEPES, pH 7, C – RNA bezpośrednio po transkrypcji, na wysokości około 3000 widoczny prążek odpowiadający cząsteczce homodimeru.

Mapowanie wykonane w temperaturze 23°C dało następujące rezultaty pokazane na rysunku 49. Metodą SHAPE otrzymano 131 mocnych modyfikacji oraz 160 średnich, mapowanie DMS dało 98 mocnych modyfikacji oraz 87 średnich. Z kolei reakcje z

WYNIKI I DYSKUSJA

CMCT i ketoksalem doprowadziły do odpowiednio 53 i 46 mocnych modyfikacji oraz 41 i 27 średnich.

Rezultaty mapowania chemicznego wykonanego w temperaturze 23°C zostały wprowadzone do programu RNAstructure 5.5 (77), który wygenerował strukturę drugorzędową badanej cząsteczki. Do programu wprowadzono również parę zasad 1037/1146, która wymusiła utworzenie motywu M121.

Z wykorzystaniem programu RNAstructure 5.5 wyliczono prawdopodobieństwo występowania każdej pary zasad oraz rejonów jednoniciowych (78). Wykazano, że obszary: 2-6/55-59, 62-77/166-182, 79-95/114-130, 139-141/162-164, 199-236/14521488, 245-252/274-283, 254-257/764-767, 302-314/321-331, 343-364/382-399, 406-421/433-447, 1408-1417/1424-1432 oraz prawie wszystkie rejony jednoniciowe są wysoce zachowawcze (Rysunek 47).

Mapowanie chemiczne wskazuje na bardzo reaktywne następujące regiony: 28-34, 96-104, 183-189, 258-262, 366-381, 425-432, 637-642, 658-663, 798-805, 852-854, 860-869, 900-903, 1022-1026, 1051-1057, 1062-1064, 1091-1093, 1105-1109, 1172-1174, 1273-1277, 1334-1339 oraz 1355-1359.

Program RNAstructure 5.5 wygenerował w tych miejscach obszary jednoniciowe, które tworzą pętle (28-34, 96-104, 258-262, 366-381, 425-432, 658-663, 1105-1109, 1273-1277, 1334-1339), wybrzuszenia wewnętrzne (637-642, 852-854, 860-869, 900-903, 1091-1093, 1172-1174, 1355-1359) lub łączniki (183-189, 1022-1026, 1062-1064) między strukturami typu spinka do włosów czy helisami. Jedynie miejsce 798-805 zostało pofałdowane w helisę przez program RNAstructure 5.5. Obszar ten znajduje się przy rejonie jednoniciowym, co więcej występuje tu niekanoniczna para zasad G-U, co może powodować pojawienie się mapowań.

Dobrze zmapowane są także jednonukleotydowe wybrzuszenia wewnętrzna w pozycjach: 53, 71, 122, 233, 379, 463, 483, 860, 996 oraz 1195. Pojawiają się tu silne lub średnie modyfikacje NMIA i silne bądź średnie mapowania DMS, CMCT i ketoksalem. Słabiej zmapowane zostały jednonukleotydowe wybrzuszenia wewnętrzne: 67 (średnia modyfikacja NMIA), 119 (średnia modyfikacja DMS), 213 (silna modyfikacja CMCT), 391 (średnia modyfikacja NMIA), 919 (silna modyfikacja DMS), 1113 (silna modyfikacja ketoksalem), 1226 (średnia modyfikacja NMIA), 1413 (silna modyfikacja DMS). Dobrze zmapowane zostały wybrzuszenia wewnętrzne dwunukleotydowe: 838-839, 909-910, 1092-1093, 1101-1102, 1173-1174, 1459-1460.

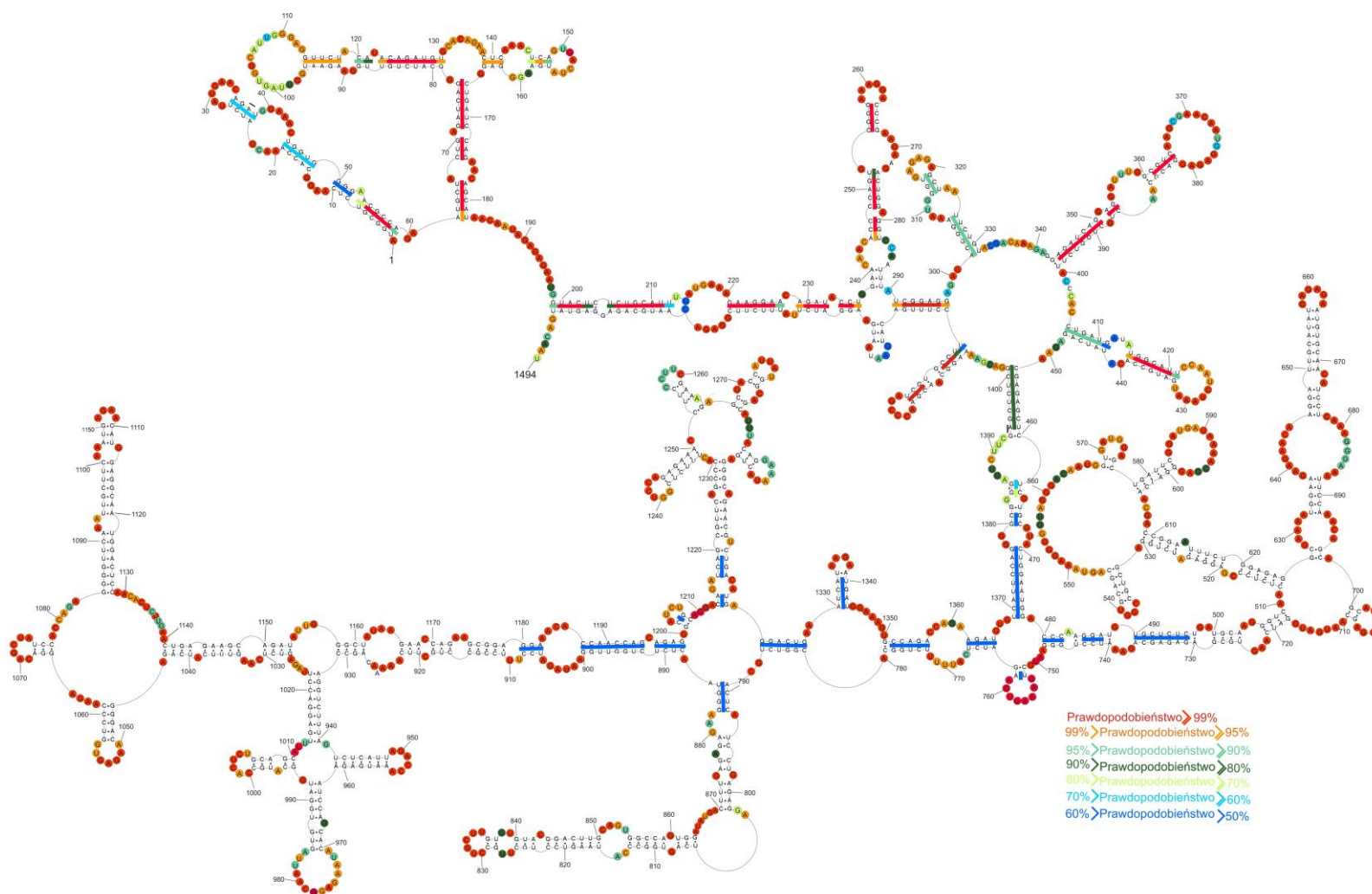
WYNIKI I DYSKUSJA

Słabiej uległy mapowaniom regiony: 324-325, 387-388, 672-673, 814-815, 826-827, 1378-1379.

Zaobserwowano także, rejony o średniej reaktywności (przewaga średnich modyfikacji NMIA nad silnymi lub brak modyfikacji NMIA i obecność średnich lub silnych mapowań chemicznych): 40-43, 110-114, 131-138, 142-144, 150-155, 175-177, 190-198, 216-220, 238-243, 268-274, 308-313, 316-320, 354-359, 468-469, 586-594, 627-631, 681-684, 693-696, 705-718, 755-761, 768-773, 834-839, 876-803, 1152-1157, 1239-1241, 1295-1297, 1360-1362 oraz 1444-1449. Miejsca te zostały przewidziane, jako rejony jednoniciowe.

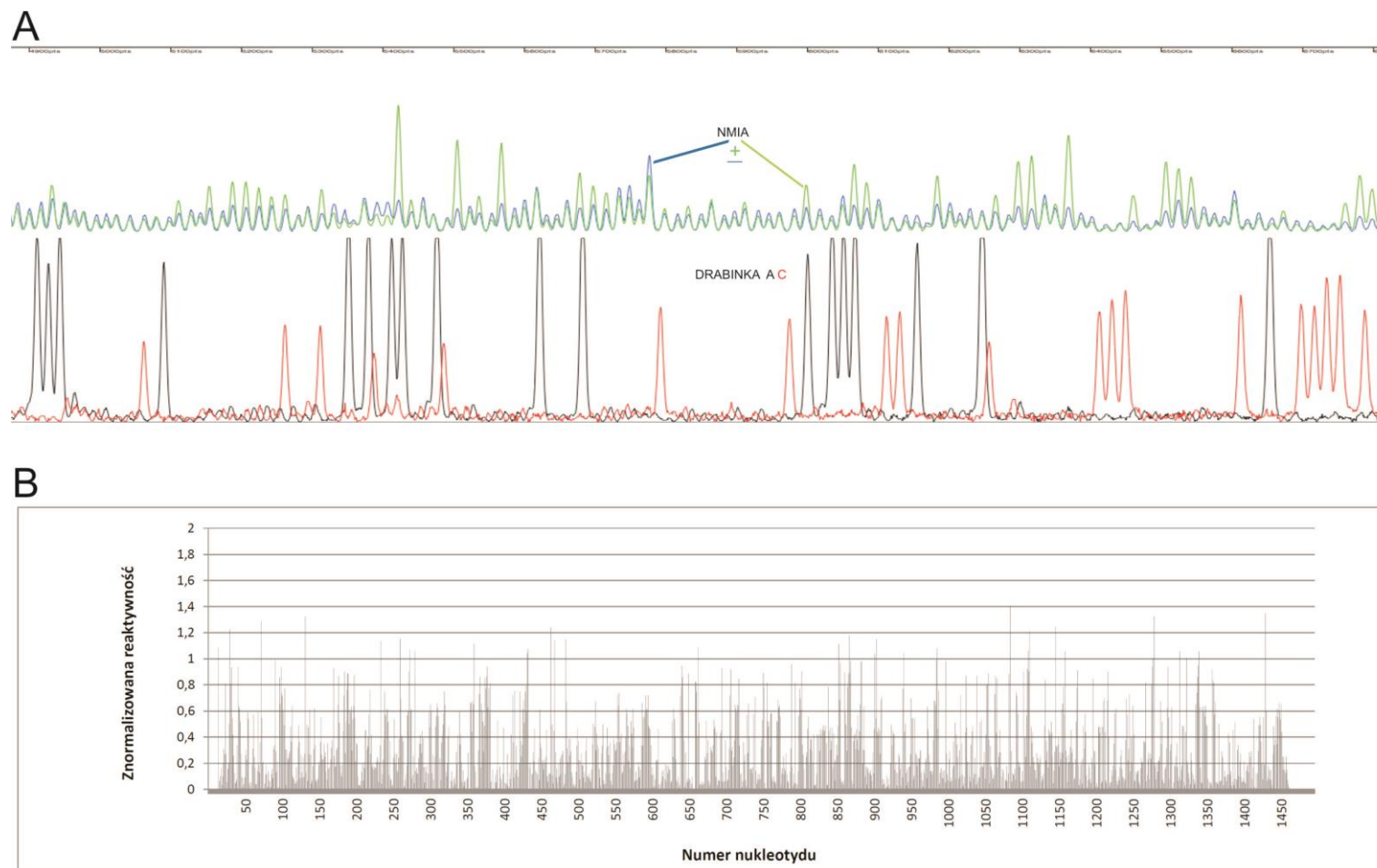
Program RNAstructur 5.5 wygenerował rejony jednoniciowe, charakteryzujące się pojedynczymi modyfikacjami lub brakiem modyfikacji w następujących pozycjach: 20-23, 150-156, 283-287, 332-342, 400-405, 411-413, 546-567, 570-575, 830-835, 973-978, 1000-1005, 1069-1076, 1129-1140, 1183-1186 oraz 1418-1423. Rejony te mogą być zaangażowane w oddziaływania trzeciorzędowe, co tłumaczy fakt pojedynczych modyfikacji.

WYNIKI I DYSKUSJA



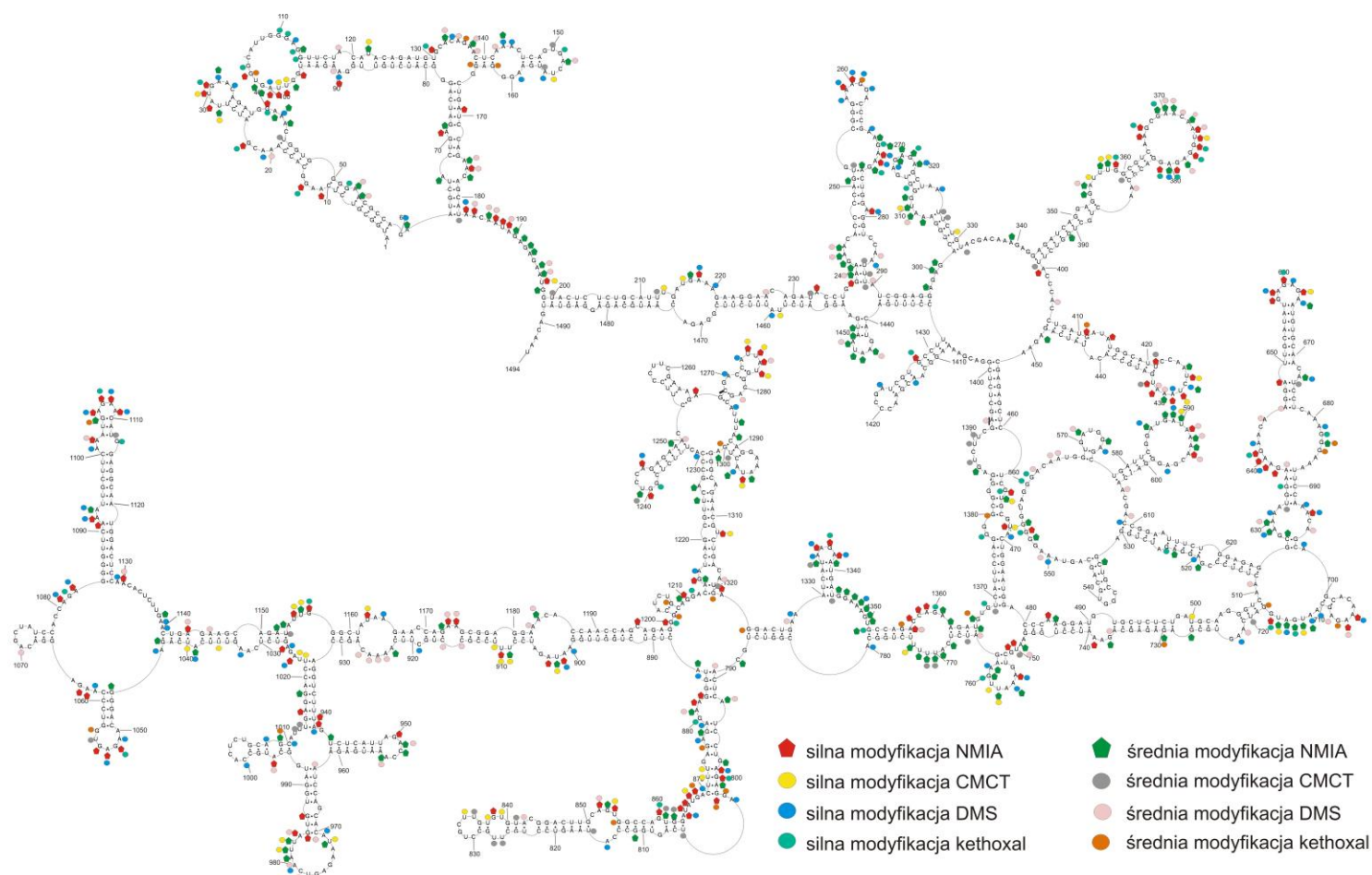
Rysunek 47. Model struktury drugorzędowej rejonu kodującego segmentu 5' RNA(+). Prawdopodobieństwo występowania par zasad i rejonów jednoniciowych oszacowane w programie RNAstructure 5.5.

WYNIKI I DYSKUSJA



Rysunek 48. A - Przykład elektroforegramu powstającego po wykonaniu elektroforezy kapilarnej produktów rejonu kodującego segmentu 5 powstałych podczas odczytu za pomocą odwrotnej transkrypcji wyników mapowania rejonu kodującego segmentu 5 metodą SHAPE, przy wykorzystaniu startera M2. B - Znormalizowane reaktywności nukleotydów cRNA segmentu 5. Mapowanie przeprowadzono w temperaturze 23°C.

WYNIKI I DYSKUSJA



Rysunek 49. Model struktury drugorzędowej rejonu kodującego segmentu 5 szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Struktura drugorzędowa została wygenerowana przez program RNAstructure 5.5 po wprowadzeniu danych z mapowania chemicznego oraz metody SHAPE. Zaznaczono wyniki uzyskane przy użyciu metod mapowania chemicznego oraz techniki SHAPE.

6.2. Porównanie rejonu kodującego segmentu 5 RNA(+) oraz cRNA segmentu 5 modelowego szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)

Region kodujący segmentu 5 RNA(+) posiada taką samą sekwencję jak rejon od 46 do 1539 nukleotydu cRNA segmentu 5. Wykazano, że obie cząsteczki we wspólnym obszarze sekwencji fałdują się w niemal identyczne struktury. Jedyne różnice stanowią regiony 577-593 oraz 832-931 (numeracja podana dla cRNA segmentu 5).

W przypadku rejonu 577-593 struktura drugorzędowa rejonu kodującego jest zgodna z strukturą cRNA segmentu 5 mapowanego w temperaturze 37°C, mimo że rejon kodujący został mapowany w temperaturze 23°C.

Fragment 833-931 regionu kodującego segmentu 5 RNA(+) tworzy długą spinkę przerywaną wybrzuszeniami wewnętrznymi. W modelu struktury cRNA rejon ten tworzy 3 spinki do włosów, które są różne w temperaturze 23°C oraz 37°C.

Na uwagę zwraca fakt, że zmiany modelu struktury segmentu 5 RNA(+) pozbawionego rejonów niekodujących zachodzą w rejonach labilnych w wyniku zmiany temperatury i szczególnie dostępnych dla oligonukleotydów, a więc wrażliwych na ogólnie pojęte czynniki zewnętrzne. Kierunek tych zmian jest w stronę modelu struktury z bardziej trwałymi motywami strukturalnymi wymienionych rejonów. Spinka 532-545 (Rysunek 49) posiada ΔG°_{37} równą -6,2 kcal/mol, podczas gdy spinka 577-593 (Rysunek 39) ma ΔG°_{37} mniej korzystną, równą -4,6 kcal/mol. Podobnie, domena 832-931 fałduje w strukturę bardziej stabilną termodynamicznie (Rysunek 39) ($\Delta G^{\circ}_{37} = -30,3$ kcal/mol) w stosunku do struktury o ΔG°_{37} wynoszącej -27,0 kcal/mol (Rysunek 49).

Niewykluczone, że obecność i odpowiednie ustrukturalizowanie rejonów 5' i 3' łącznie z rejonami niekodującymi ma wpływ na globalne pofałdowanie segmentu 5 RNA(+), wpływając na pofałdowanie dwóch labilnych domeny, a mianowicie 557-670 i 839-931 (numeracja podana dla cRNA segmentu 5). Struktura rejonów 5' i 3' RNA(+) może być istotna zarówno dla replikacji jak i translacji w zależności czy jest to cRNA czy mRNA wirusowe.

7. Inhibicja namnażania wirusa grypy w liniach komórkowych przez antysensowne oligonukleotydy nacelowane na segment 5 RNA(+)

Uzyskane modele struktury drugorzędowej segmentu 5 RNA(+) A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) posłużyły do zaprojektowania antysensownych

WYNIKI I DYSKUSJA

oligonukleotydów. Oligomery zaprojektowano tak, aby były komplementarne do niesparowanych oraz labilnych regionów modeli badanych cząsteczek.

Potencjał inhibicyjny zaprojektowanych oligomerów został przetestowany w liniach komórkowych MDCK, które były infekowane naturalnym wirusem grypy szczepu A/California/04/2009 (H1N1). W badaniach nie było możliwości użycia szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) ze względu na jego wysoką inwazyjność oraz brak szczepionki. Dodatkowo, za wyborem szczepu A/California/04/2009 (H1N1) przemawiał fakt, istnienia systemu zwierzęcego do badań wirusa grypy wybranego szczepu, oparty na szczepie A/California/04/2009 (H1N1).

W doświadczeniach wykorzystano metodę immunofluorescencyjną, z dwoma specyficznymi przeciwciałami oraz metodę PCR w czasie rzeczywistym.

Sekwencja segmentu 5 RNA(+) szczepu A/California/04/2009 (H1N1) różni się od sekwencji szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). W czasie projektowania antysensowych oligonukleotydów wzięto pod uwagę różnice w sekwencji, potencjalne inhibitory zaprojektowano tak, aby były całkowicie komplementarne do docelowych rejonów oddziaływać. Jako miejsce oddziaływać antysensowych oligonukleotydów wybrano rejony dostępne i jednoniciowe obecne na prezentowanych modelach struktur drugorzędowych (Rysunek 52 i 53). Wyjątek stanowią oligomery 840A, 950A, które są komplementarne do rejonów spinek na modelu cRNA segmentu 5, natomiast na modelu rejonu kodującego segmentu 5 oligomery te są komplementarne do helisy zawierającej wybrzuszenie wewnętrzne. Za cel działania antysensowych oligonukleotydów wybrano miejsca, które były silnie zmapowane chemicznie, dochodziło w nich do wiązania się sond mikromacierzowych oraz hydrolizy RNA RNazą H. Długość antysensowych oligonukleotydów była zróżnicowana i zależała od docelowego miejsca oddziaływać.

Wszystkie oligomery był to 2'-O-metyloRNA. Dodatkowo antysensowe oligonukleotydy 2A, 3A, 2B, 85A, 150A, 200A, 285A, 355A, 400A, 415A, 470A, 600A, 615A, 640A, 727A, 760A, 840A, 920A, 950A, 1320A, 1430A, Neg 5 posiadały modyfikację typu LNA (Tabela 12). Antysensowe oligonukleotydy były stosowane w stężeniu 0,75 μ M.

W wyniku badań z wykorzystaniem metody immunofluorescencyjnej wykazano, że oligomer 727A najlepiej spośród wszystkich zaprojektowanych antysensowych oligonukleotydów hamował namnażanie wirusa grypy. Zaobserwowano, że powodował on zmniejszenie namnażania wirusa grypy 7-krotnie w porównaniu z kontrolą negatywną, czyli komórkami traktowanymi lipofektaminą 2000 oraz kontrolami

WYNIKI I DYSKUSJA

negatywnymi. Dobrze koresponduje to z wynikami badań struktury drugorzędowej cRNA segmentu 5. Rejon, z którym oddziałuje antysensowy oligonukleotyd jest dostępny dla sond, zaobserwowano także słabą hydrolizę RNA indukowaną RNazą H w obecności oligomeru DNA, a także liczne mapowania chemiczne. Znaczące hamowanie namnażania wirusa grypy powodowały antysensowe oligonukleotydy 2A oraz 3A. Są to oligonukleotydy nacelowane na konserwatywny motyw-M121, omówione w podrozdziale poświęconym M121 (strona 60). Oligomer 400A komplementarny do miejsca 398-405 cRNA segmentu 5 powodował obniżone namnażania wirusa grypy 4,2-krotnie. Uzyskany wynik jest zgodny z badaniami struktury drugorzędowej. Region 398-405 tworzy wybrzuszenie wewnętrzne, które zostało zmapowane przez NMIA, DMS, CMCT oraz ketoksal. Zobserwowano tu także wiązanie się sondy mikromacierzowej.

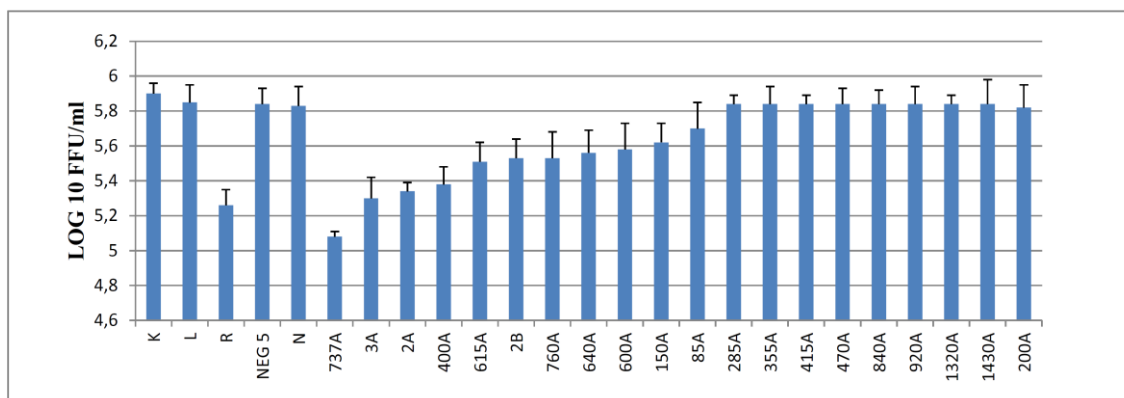
Metoda immunofluorescencyjna ujawniła, że oligomery: 600A, 615A, 640A, 760A, 2B hamowały namnażanie wirusa grypy dwukrotnie. Niewielki stopień inhibicji namnażania wirusa grypy uzyskano z wykorzystaniem oligonukleotydów 85A oraz 150A. Oligomer 200A nie powodował zmian w namnażaniu wirusa grypy (wyniki omówione na stronie 79).

Antysensowe oligonukleotydy 285A, 355A, 415A, 470A, 840A, 920A, 1320A oraz 1430A nie powodowały zmian w namnażaniu wirusa grypy. Brak różnic w namnażaniu wirusa grypy w przypadku antysensowych oligonukleotydów 415A oraz 470A koresponduje z brakiem hydrolizy RNA indukowanej RNazą H oraz brakiem wiązań sond. Natomiast, w miejscach tych dochodzi do licznych mapowań chemicznych. Regiony 467-477 oraz 399-404 wydają się być niedostępne dla oligonukleotydów. Podobnie, antysensowy oligonukleotyd 1320A jest komplementarny do rejonu, w których nie dochodzi do wiązania sond, brak jest danych dotyczących hydrolizy RNA indukowanej RNazą H. Natomiast, występują tu liczne mapowania chemiczne. Region 1308-1328 także wydaje się być niedostępny dla oligomerów. Oligomer 1430A również nie powodował obniżenia namnażania wirusa grypy. Możliwe, że w regionie 1427-1439 dochodziło do wiązania sond mikromacierzy, jednak to miejsce oddziaływania z sondami nie jest pewne. Biorąc pod uwagę dane z eksperymentów z antysensowymi oligonukleotydami wydaje się, że rejon 1427-1439 może być niedostępny dla oligomerów lub nie pełnić ważnej roli w namnażaniu wirusa grypy.

Rejony 280-290, 352-370, 843-848 oraz 919-926 zostały dobrze zmapowane, dochodziło tu także do hydrolizy RNA przez RNazę H w obecności oligomerów DNA oraz wiązania sond. Jednak antysensowe oligonukleotydy nie hamowały namnażania

WYNIKI I DYSKUSJA

wirusa grypy. Wydaje się, że rejony te nie są kluczowe w cyklu replikacyjnym wirusa grypy, gdyż blokowanie ich nie wpływa na stopień namnażania wirusa.

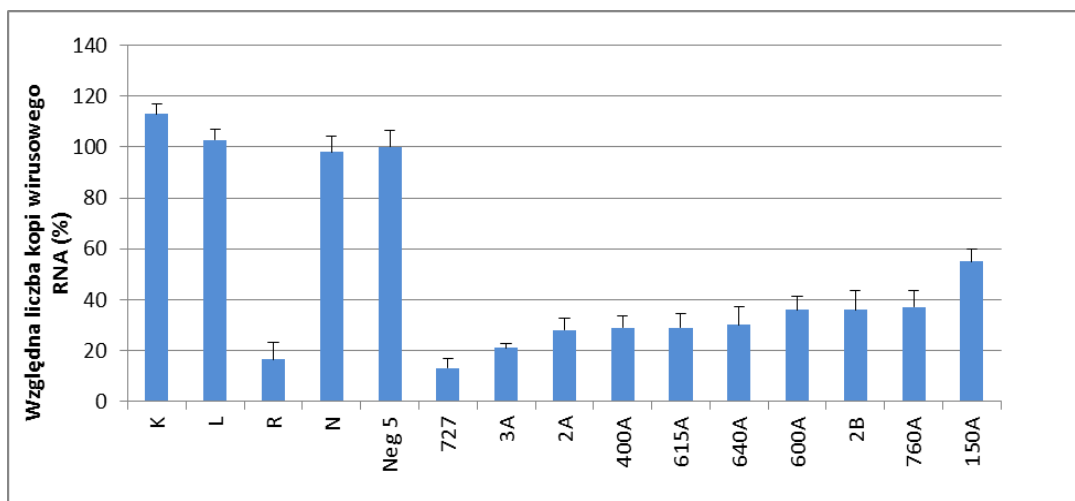


Rysunek 50. Efekt działania antysensowych oligonukleotydów nacelowanych na segment 5 RNA(+) wirusa grypy szczepu A/California/04 /2009 w liniach komórkowych MDCK. K - kontrola, L-kontrola z lipofektaminą 2000, N - negatywna kontrola z oligomerem N, Neg 5 – negatywna kontrola z oligomerem Neg 5, R – pozytywna kontrola z rybawiryną. Wyniki uzyskano dzięki wykorzystaniu metody immunofluorescencyjnej.

Stopień inhibicji namnażania wirusa grypy przez antysensowe oligonukleotydy badano także, wykorzystując metodę PCR w czasie rzeczywistym. W tym wypadku wybrano do doświadczeń ASO najlepiej hamujące namnażanie wirusa grypy (150A, 400A, 600A, 615A, 640A, 727A, 760A, 2A, 3A oraz 2B) wyselekcjonowane z użyciem metody immunofluorescencyjnej.

Wykorzystując metodę PCR w czasie rzeczywistym wykazano znaczący stopień inhibicji namnażania wirusa grypy w porównaniu z oligomerem kontrolnym (100% namnażania wirusa grypy) dla wszystkich testowanych antysensowych oligonukleotydów. W wyniku badań zaobserwowano inhibicję namnażania wirusa grypy na poziomie 87%, 79%, 72%, 71% oraz 70% odpowiednio przy użyciu ASO 727A, 3A, 2A, 615A oraz 640A. Słabiej namnażanie wirusa grypy hamowały oligonukleotydy 2B, 600A, 760A, 150A. Stopień inhibicji wynosił odpowiednio 64% dla oligomeru 2B oraz 600A, 63% dla antysensowego oligonukleotydu 760A oraz 45% dla oligomeru 150A. Wyniki inhibicji oligonukleotydów antysensowych są zgodne z danymi uzyskanymi metodą immunofluorescencyjną, lecz ze względu na czułość metody stopień inhibicji jest różny.

WYNIKI I DYSKUSJA



Rysunek 51. Efekt działania antysensownych oligonukleotydów nacelowanych na segment 5 RNA(+) wirusa grypy szczepu A/California/04 /2009 w liniach komórkowych MDCK. K - kontrola, L - kontrola z lipofektaminą 2000, N - negatywna kontrola z oligomerem N, Neg 5 – negatywna kontrola z oligomerem Neg 5, R - pozytywna kontrola z rybawiryną. Wyniki uzyskano dzięki wykorzystaniu metody PCR w czasie rzeczywistym.

W badaniach pierwszy raz zaprojektowano antysensowne oligonukleotydy na podstawie znanego modelu struktury segmentu 5 RNA(+). W literaturze znane są także badania, które prowadzono z antysensownymi oligonukleotydami nacelowanymi na cRNA segmentu 5 bez znanej struktury. Użyte antysensowne oligonukleotydy zawierały modyfikację tiofosforanowe, były komplementarne do następujących rejonów segmentu 5 RNA(+): 267-284 (NP267), 628-645 (NP 628) oraz 749-766 (NP 749) (numeracja podana dla cRNA segmentu 5) (106). Region 267-284 na modelu cRNA segmentu 5 mapowanego w temperaturze 37°C tworzy helisę przerwana dwoma wybrzuszeniami wewnętrznymi oraz region jednoniciowy. Oligomer NP267 powodował średnie obniżenie namnażania wirusa grypy. W prezentowanej rozprawie doktorskiej użyto oligomer 285A, którego cztery nukleotydy pokrywają się z oligomerem opisanym w literaturze. Oligomer 285A nie wykazywał wpływu na namnażanie wirusa grypy. Wydaje się, że znaczenie dla przeprowadzenia cyklu replikacyjnego wirusa grypy mają wewnętrzne wybrzuszenia, do których był komplementarny oligomer prezentowany w literaturze, a antysensowny oligonukleotyd 285A nie pokrywał tego rejonu.

Średnie obniżenie namnażania wirusa grypy powodował opisany w literaturze oligomer NP 749. Uzyskane wyniki są zgodne z prezentowanymi modelami strukturalnymi zarówno rejonu kodującego, jak i cRNA segmentu 5. Na prezentowanych w rozprawie doktorskiej modelach segmentu 5 RNA(+) region, z jakim oddziałuje NP 749 jest częściowo jednoniciowy. Rejon oddziaływania antysensownego

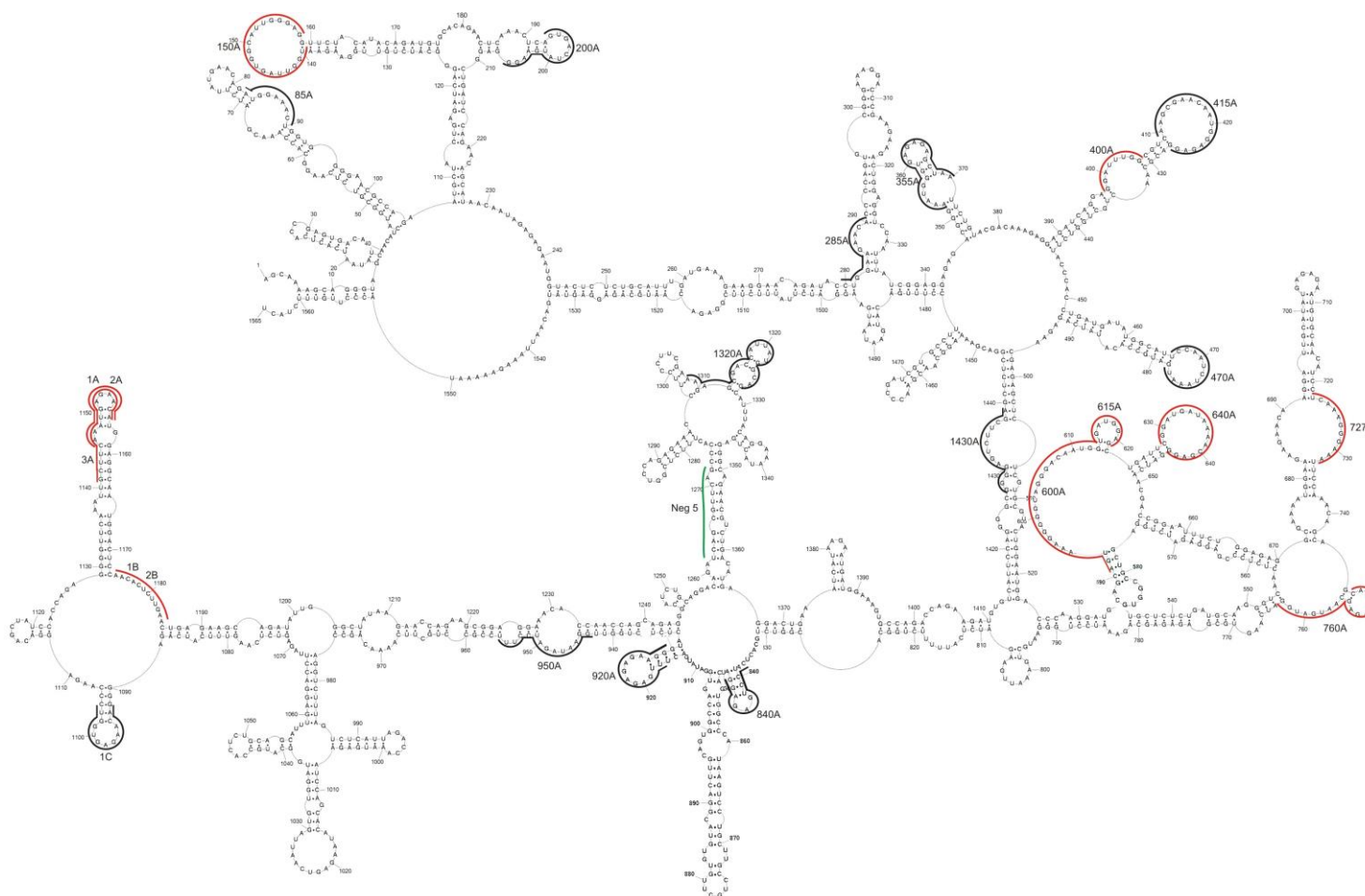
WYNIKI I DYSKUSJA

oligonukleotydu 760A w dużej mierze pokrywał się z oligomerem NP 749. Oligonukleotydy 760A również powodował obniżenie namnażania wirusa grypy.

Dane literaturowe wskazują oligomer NP 628, jako najlepiej działający spośród wszystkich testowanych antysensowych oligonukleotydów. Wynik ten dobrze koresponduje z wszystkimi modelami strukturalnymi cRNA segmentu 5 oraz modelem regionu kodującego tegoż samego segmentu prezentowanymi w niniejszej rozprawie. W rejonie oddziaływania z oligonukleotydem występuje duża pętla. W pracy również zaprojektowano oligonukleotydy komplementarne do omawianej pętli (640A), jednak stopień inhibicji uzyskany we własnych badaniach był niższy niż w przypadku oligonukleotydu prezentowanego w literaturze. Co więcej, siRNA komplementarne do tego rejonu również powodowało obniżenie namnażania wirusa grypy (dane nieopublikowane, badania z siRNA wykonane przez Julię Kęsy z naszej grupy badawczej). Na podstawie badań z siRNA (oddziałują tylko z mRNA) można stwierdzić, że omawiana pętla ma znaczenie w strukturze mRNA wirusa grypy. Natomiast nie można wykluczyć, że pętla ta odgrywa również rolę w cRNA segmentu 5.

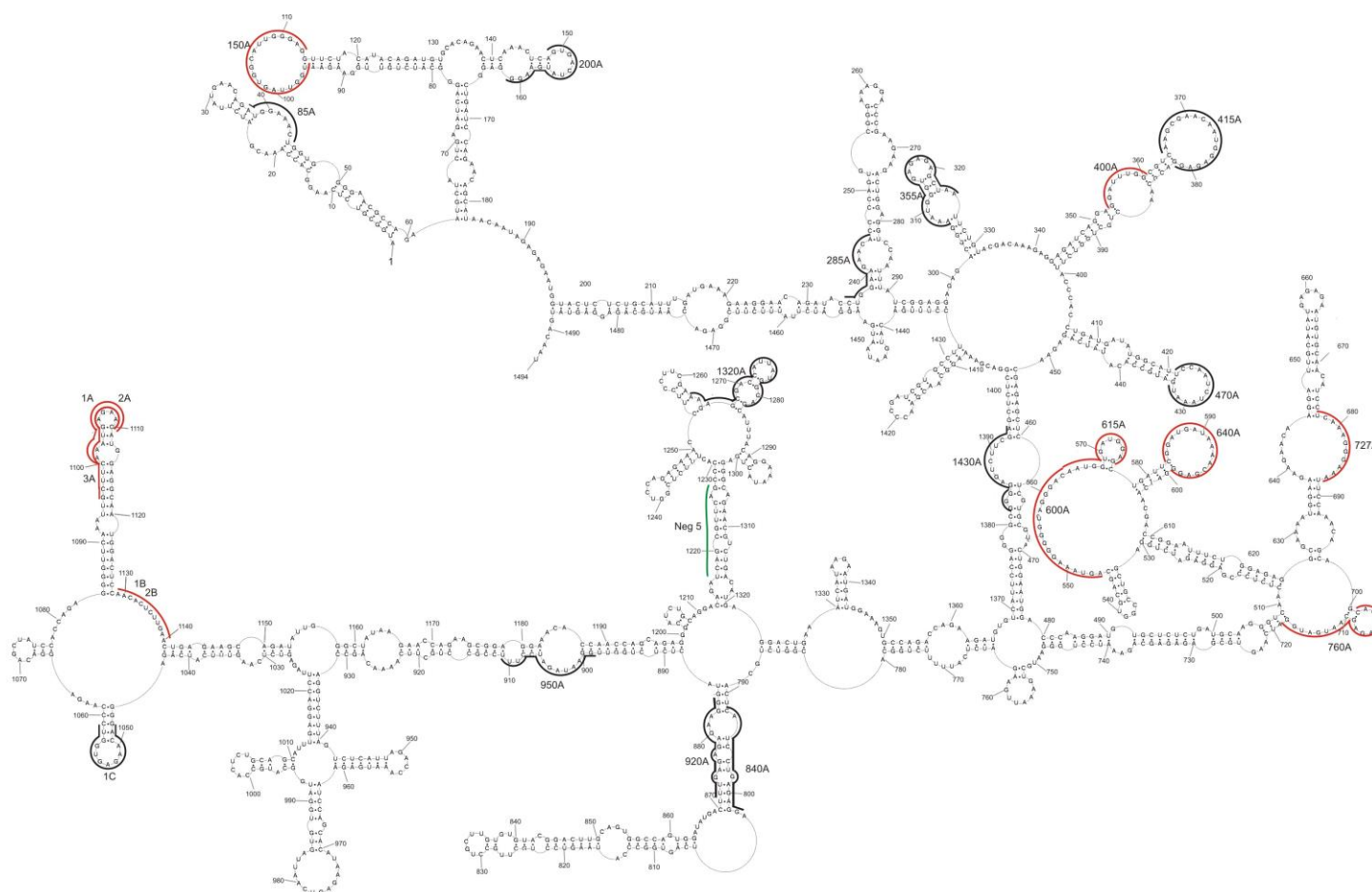
Oligomer 727A stosowany w prezentowanych badaniach w większym stopniu inhibował namnażanie wirusa grypy niż prezentowane w literaturze antysensowe oligonukleotydy. Dlatego też pętla, do której oligomer jest komplementarny wydaje się być ważna w cyklu replikacyjnym wirusa grypy.

WYNIKI I DYSKUSJA



Rysunek 52. Model struktury cRNA segmentu 5 z zaznaczonymi komplementarnymi regionami do antysensowych oligonukleotydów. Na zielono zaznaczono antysensowy oligonukleotyd kontrolny Neg 5, na czerwono zaznaczono antysensowe oligonukleotydy powodujące największe obniżenie namnażania wirusa grypy szczepu A/California/04/2009.

WYNIKI I DYSKUSJA



Rysunek 53. Model struktury rejonu kodującego segmentu 5RNA(+) z zaznaczonymi komplementarnymi regionami do antysensowych oligonukleotydów. Na zielono zaznaczono antysensowy oligonukleotyd kontrolny Neg 5, na czerwono zaznaczono antysensowe oligonukleotydy powodujące największe obniżenie namnazania wirusa grypy szczepu A/California/04/2009.

8. Określenie cytotoksyczności użytych oligonukleotydów antysensowych

W ostatnim etapie prac z antysensowymi oligonukleotydami badano ich potencjalną cytotoksyczność, jaką mogą wywierać na linii komórkowej MDCK. Do tego celu posłużono się testem redukcji soli tetrazolowej (test MTT). Do badań wybrano antysensowe oligonukleotydy: 737A, 400A, 615A, 640A, 600A oraz 760A. Testowano je w zakresie stężeń od 0,1 do 4 uM. Wykazano, że badane antysensowe oligonukleotydy nie wykazują cytotoksycznego efektu na komórki MDCK, w żadnym z zastosowanych stężeń

PODSUMOWANIE

W segmencie 5 RNA(+) zidentyfikowano konserwatywne motywy strukturalne (M121 oraz M198) i przeprowadzono ich analizę strukturalną. Wykazano, że M121 tworzy wieloramienną pętlę z trzema strukturami typu spinki do włosów. Jedna ze spinek zawiera czteronukleotydową pętlę oraz długą helisę charakteryzującą się dużą termodynamiczną stabilnością. M198 składa się z trzech struktur typu spinki, z których jedna (2-59) wykazuje wysoki stopień konserwatywności par zasad dla typu A wirusa.

Wykonując analizę bioinformatyczną wykazano, że pary zasad obu motywów wykazują odpowiednio 91,0% oraz 86,9% konserwatywności. Ponadto, wykazano pojawianie się mutacji w sekwencji motywów, które nie zmieniają struktury drugorzędowej M198 oraz M121. Taki wysoki stopień konserwatywności oraz pojawiające się mutacje nie zamieniających struktury pozwalają przypuszczać, że motywy te pełnią ważną rolę w cyklu replikacyjnym wirusa grypy.

W kolejnej części badań zaprojektowano antysensowe oligonukleotydy komplementarne do niesparowanych i dostępnych regionów badanych motywów. Wykazano, że oligonukleotyd komplementarny do 1141-1156 motywu M121 hamował znacząco namnażanie wirusa grypy w linii komórkowej MDCK oraz MDCK-HA. Pozostałe oligonukleotydy zaprojektowane na podstawie struktury M121 w mniejszym stopniu powodowały inhibicję namnażania wirusa grypy. Oligomery nacelowane na M198 (komplementarne do regionów: 82-92, 140-158) w sposób nieznaczny hamowały namnażanie wirusa grypy. Konieczne są dalsze badania aby potwierdzić funkcjonalność M198.

W celu potwierdzenia istnienia motywów M121 i M198 w strukturze całego RNA(+) segmentu 5 określono strukturę drugorzędową pełnej długości cRNA segmentu 5. Stwierdzono, że przy zmianie temperatury z 23°C na 37°C dochodzi do lokalnej rearanzacji w dwóch domenach. Zaproponowano także model struktury cRNA segmentu 5 z preferowanymi tworzeniem par zasad w odległości do 600 nukleotydów. Wykazano, że prezentowane modele struktury drugorzędowej cechują się wysoką konserwatywnością wśród szczepów wirusa grypy typu A. Wydaje się, że przedstawione motywy strukturalne mogą być funkcjonalne na różnym etapie cyklu replikacyjnego wirusa grypy. Na szczególną uwagę zwracają kilka wysoce konserwatywnych dla typu A i potwierdzonych eksperymentalnie struktur spinkowych. Dodatkowo, zidentyfikowane motywy M121 i M198 stanowią dobrze potwierdzone elementy struktury całego RNA(+) segmentu 5.

W pracy zaproponowano także strukturę drugorzędową rejonu kodującego segmentu 5. Wykazano, że struktura drugorzędowa tej cząsteczki jest niemal identyczna jak odpowiadający jej rejon cRNA segmentu 5, a motywy M121 i M198 są w niej zachowane (różnice dotyczą labilnych domen: 557-670 i 839-931, numeracja podana dla cRNA segmentu 5).

Na podstawie określonej struktury drugorzędowej RNA(+) segmentu 5 oraz wyników mapowania mikromacierzowego zaprojektowano kolejne antysensowe oligonukleotydy, które były komplementarne do dostępnych i jednoniciowych miejsc, innych niż te w motywach M121 i M198. Wykazano, że zaprojektowane oligonukleotydy antysensowe hamowały namnażanie wirusa grypy w różnym stopniu. Najlepiej działający z tej serii oligonukleotyd 727A hamował namnażanie wirusa grypy ponad 8-krotnie. O około połowę zmniejszyły namnażanie wirusa grypy oligonukleotydy 760A, 640A, 615A oraz 600A. Pozostałe antysensowe oligonukleotydy wywierały nieznaczny wpływ na namnażanie wirusa grypy. Zaprojektowane oligonukleotydy antysensowe nie wykazywały cytotoksycznego wpływu na komórki MDCK.

Reasumując, w pracy doktorskiej przedstawiono po raz pierwszy strukturę drugorzędową RNA(+) segmentu 5 wirusa grypy zawierającą konserwatywne dla typu A motywy strukturalne. Są to pierwsze doniesienia dotyczące struktury drugorzędowej segmentu 5 RNA(+). Są to również badania struktury drugorzędowej najdłuższej cząsteczki RNA wirusa grypy, jaką dotąd opublikowano.

MATERIAŁY I METODY

1. Materiały

1.1. Oligonukleotydy

Tabela 8. Startery do reakcji: PCR, odwrotnej transkrypcji oraz sekwencjonowania.

| Nazwa | Cząsteczka | Długość | Sekwencja 5'→3' |
|--------|--|---------|---|
| For_c5 | cRNA5 | 45 | GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGCAAAAGC AGGGTAGATAATC |
| Rev_c5 | cRNA5 | 22 | AGTAGAAACAAGGGTATTTTTC |
| Pr2* | cRNA5 | 23 | CCATAATGGTCGCTCTTTCGAAG |
| M1* | cRNA5 | 32 | AGTAGAAACAAGGGTATTTTCTTTAATTGTC |
| RTM5* | Rejon kodujący segmentu 5(+) | 27 | TTAATTGTCATACTCCTCTGCATTGTC |
| M2* | cRNA5/ Rejon kodujący segmentu 5(+) | 24 | CCATAATGGTCGCTCTTTCGAAG |
| M3* | cRNA/ Rejon kodujący segmentu 5(+) | 20 | GGTCCTCAAATGCTGCAGAG |
| M4* | cRNA5/ Rejon kodujący segmentu 5(+) | 24 | CAATTCAGCATTCCCAGGATTTCC |
| M5* | cRNA5/ Rejon kodujący segmentu 5(+) | 20 | CACATCCTTGGGTCCATTCC |
| M6* | cRNA5/ Rejon kodujący segmentu 5(+) | 25 | CCAGGTATCTGTTCTTCTTTCATC |
| S1 | cRNA5 | 19 | CCTCTTGGGACCACTCTTG |
| S2 | cRNA5 | 19 | GCCTCTCCAGAAATTCGG |
| S3 | cRNA5 | 22 | CCTTGCATCAGAGAGCACATCC |
| S5-1 | M121 | 82 | GCGTAATACGACTCACTATAGGAAGCTTCATCA |

MATERIALY I METODY

| | | | |
|--------|---------------------------------------|----|--|
| | | | GAGGGACAAGAGTGGTCCCAAGAGGACAAC TG TCCACCAGAGGAGTTCA |
| S5-2 | M121 | 81 | TCTGCTTCTCAGTTCAAGAGTACTGGAGTCCATT GTTTCCATGTTCTCATTGAAGCAATTTGAACTC CTCTGGTGGACAG |
| M_F | M121 | 35 | CACGAATTCGCGTAATACGACTCACTATAGGAA GC |
| M_R | M121 | 34 | CGCGACGTC TCTGCTTCTCAGTTCAAGAGTACT G |
| T1_F | M121 | 25 | TCTGCTTCTCAGTTCAAGAGTACTG |
| T2_R | M121 | 26 | GCGTAATACGACTCACTATAGGAAGC |
| SM1* | M121 | 20 | GCTGATCTGTCCTGCAGATG |
| Pr1* | M121 | 23 | TCTGCTTCTCAGTTCAAGAGTAC |
| M13F | M121 | 24 | CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC |
| M13R | M121 | 22 | TCACACAGGAAACAGCTATGAC |
| F198 | M198 | 40 | GCGTAATACGACTCACTATAGGGATGGCGTCTC AAGGCAC |
| R198 | M198 | 28 | CATTCTCTCTATTGTTATGCTGTTCTGG |
| RT198* | M198 | 28 | CATTCTCTCTATTGTTATGCTGTTCTGG |
| FM5 | Rejon kodujący segmentu 5(+) | 40 | GCGTAATACGACTCACTATAGGGATGGCGTCTC AAGGCAC |
| RM5 | Rejon kodujący segmentu 5(+) | 29 | TTAATTGTCATACTCCTCTGCATTGTCTC |
| RT | vRNA7 | 22 | ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG |
| KF | vRNA7 | 41 | TTCTGCAGTTACTCTAGCTCTATGTTGACAAAAT GACCATC |
| KR | vRNA7 | 34 | TTGAATTCATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAA C |
| PF | vRNA7 | 52 | GCGTAATACGACTCACTATAGGGTTACTCTAGC TCTATGTTGACAAAATGAC |
| PR | vRNA7 | 26 | ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAAC |
| S | vRNA7 | 24 | CAAGAAGGTCATCTTTCAGACCAG |
| QF | vRNA7 | 23 | AGACCAATCTTGTCACCTCTGAC |
| QR | vRNA7 | 26 | AGGGCATTTTGGACAAAGCGTCTACG |

MATERIAŁY I METODY

| | | | |
|---|-------|----|----------------------------|
| Q** | vRNA7 | 27 | TCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGC |
| <p>* Startery do odwrotnej transkrypcji, na 5' końcu zawierały 6-TAMRA, 5-FAM, 6-JOE, 5-ROX. ** Oligonukleotyd stosowany jako sonda TaqMan w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Na 5' końcu zawierał 6-TAMRE, a na 3' końcu 5-FAM. Podkreślone nukleotydy zawierają sekwencję promotora polimerazy RNA T7. Kolorem czerwonym zaznaczono sekwencję rozpoznawaną przez enzym restrykcyjny EcoRI, kolorem zielonym zaznaczono sekwencję rozpoznawaną przez enzym restrykcyjny PstI.</p> | | | |

Tabela 9. Sondy mikromacierzeowe z biblioteki Zespołu Genomiki Strukturalnej RNA i Zakładu Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych.

| Miejsce komplem entarne ^a | Sekwencja sondy ^b | Energia swobodna kompleksu modyfikowana sonda/RNA ΔG°_{37} (kcal/mol) ^c | Miejsce komplem entarne ^a | Sekwencja Sondy ^b | Energia swobodna kompleksu modyfikowana sonda/RNA ΔG°_{37} (kcal/mol) ^c |
|--------------------------------------|------------------------------|---|--------------------------------------|------------------------------|---|
| 3 | uUgCug | -7,92 | 788 | CdGgAg | -10,05 |
| 4 | uUuGcg | -7,76 | 789 | CCdGg | -9,20 |
| 5 | uUuUgg | -5,72 | 790 | CCcDG | -8,17 |
| 8 | uGcUug | -7,92 | 791 | uCcCa | -8,86 |
| 9 | cUgCug | -9,41 | 792 | UUcCcg | -9,17 |
| 10 | CcUgC | -9,74 | 793 | dUuCcg | -8,58 |
| 11 | CCcUg | -9,22 | 795 | GCdUug | -7,03 |
| 12 | AcCcUg | -12,12 | 796 | DgCdUg | -9,82 |
| 13 | UdCcCg | -9,85 | 797 | CdGcAg | -9,97 |
| 14 | CUdCcg | -9,12 | 798 | UCdGcg | -9,63 |
| 15 | uCuDcg | -8,39 | 799 | uUcDgg | -8,36 |
| 22 | GuGdUg | -8,80 | 804 | uCdDug | -6,75 |
| 23 | dGuGdg | -10,06 | 806 | cUuCdG | -8,20 |
| 24 | GdGUgg | -9,59 | 807 | uCuUcg | -7,82 |
| 25 | UGdGug | -11,04 | 809 | GdUcUg | -9,02 |
| 26 | GuGdGg | -9,64 | 810 | dGdUcg | -9,60 |
| 27 | GgUgDg | -12,76 | 811 | GdGdUg | -9,45 |
| 28 | CgGuGg | -10,37 | 812 | uGdGdg | -10,09 |
| 29 | UcGgUg | -12,01 | 813 | dUgDgg | -9,90 |
| 30 | CuCgGg | -10,29 | 815 | dDdUgg | -7,95 |
| 31 | DcUcGg | -12,16 | 818 | GdDdDg | -7,79 |
| 32 | CdCuCg | -10,76 | 819 | dGdDdg | -9,00 |
| 33 | uCdCug | -7,53 | 820 | CdGdDg | -9,07 |
| 34 | GUcDcg | -8,89 | 821 | CCdGdg | -10,27 |
| 35 | uGuCdG | -8,95 | 822 | GCcDG | -8,34 |
| 36 | dUgUcg | -9,25 | 823 | uGcCa | -9,09 |
| 37 | GdUgUg | -9,10 | 824 | GUgCc | -9,41 |
| 38 | uGdUgg | -9,04 | 825 | CgUgCg | -10,80 |
| 41 | uGuUgg | -7,96 | 826 | CcGuGg | -10,33 |

MATERIALY I METODY

| | | |
|----|--------|--------|
| 43 | GdUgUg | -9,10 |
| 46 | CdUgDg | -9,18 |
| 47 | CCdUgg | -9,22 |
| 49 | CGcCa | -9,24 |
| 50 | AcGcC | -9,31 |
| 51 | GDeGc | -9,09 |
| 52 | dGdCg | -8,69 |
| 53 | GdGdCg | -11,92 |
| 54 | uGdGdg | -10,09 |
| 55 | uUgDgg | -8,85 |
| 56 | cUuGdg | -10,82 |
| 57 | cCuUgg | -9,08 |
| 58 | GCcUug | -11,61 |
| 59 | UGcCug | -9,26 |
| 60 | GUgCc | -9,41 |
| 61 | gGuGc | -9,68 |
| 62 | UgGuGg | -9,69 |
| 63 | uUgGug | -10,89 |
| 68 | dUcGug | -8,30 |
| 69 | GdUcGg | -9,48 |
| 70 | dGdUcg | -12,03 |
| 71 | DdGdUg | -8,53 |
| 72 | uDdGdg | -8,78 |
| 73 | dUdDgg | -8,35 |
| 74 | CdUdDg | -9,65 |
| 75 | uCdUdg | -8,16 |
| 77 | gUuCdg | -8,22 |
| 78 | uGuUcg | -7,90 |
| 79 | cUgUug | -7,39 |
| 80 | UcUgUg | -8,97 |
| 81 | dUcUgg | -9,23 |
| 82 | CdUcUg | -10,53 |
| 83 | CCdUcg | -9,16 |
| 84 | UcCdUg | -8,97 |
| 85 | uUcCdg | -8,88 |
| 86 | uUuCcg | -7,53 |
| 90 | CCdGug | -8,67 |
| 91 | DcCdGg | -10,04 |
| 92 | CdCcAg | -11,10 |
| 93 | CCdCc | -8,71 |
| 94 | CCcDC | -7,72 |
| 95 | CcCcA | -9,88 |
| 96 | UCcCc | -9,54 |
| 97 | UUcCcg | -9,17 |
| 98 | gUuCcg | -9,04 |

| | | |
|-----|--------|--------|
| 827 | DcCgUg | -12,20 |
| 828 | GDcCg | -8,92 |
| 829 | AgDcC | -8,40 |
| 830 | CdGdCg | -9,41 |
| 831 | GCdGdg | -10,44 |
| 832 | UgCdGg | -10,04 |
| 833 | GUgCDg | -10,88 |
| 834 | DgUgCg | -10,74 |
| 835 | GdGUgg | -9,59 |
| 836 | UGdGug | -11,04 |
| 837 | dUgDgg | -9,90 |
| 838 | GdUGdg | -11,39 |
| 839 | GGdUgg | -9,69 |
| 840 | DgGdUg | -12,06 |
| 841 | CdGgAg | -10,05 |
| 842 | UCdGgg | -9,50 |
| 843 | CUcDgg | -12,25 |
| 844 | uCuCdg | -11,00 |
| 845 | CUcUcg | -9,08 |
| 846 | CcUcUg | -10,09 |
| 847 | uCcUcg | -9,99 |
| 848 | dUcCug | -8,74 |
| 849 | GDUcCg | -8,60 |
| 850 | uGdUcg | -8,98 |
| 851 | CuGdUg | -8,78 |
| 852 | DcUgDg | -9,71 |
| 853 | CdCuGg | -8,74 |
| 854 | CCdCug | -11,28 |
| 855 | GCcDC | -7,89 |
| 856 | GGcCA | -8,51 |
| 857 | GGGcC | -9,41 |
| 858 | UGgGc | -9,85 |
| 859 | AuGgGg | -9,25 |
| 860 | UdUgGg | -11,48 |
| 864 | GdCuUg | -7,90 |
| 865 | GgAcUg | -9,76 |
| 866 | DgGdC | -9,01 |
| 867 | CdGgAg | -10,05 |
| 868 | GCdGg | -9,37 |
| 869 | AgCdGg | -12,43 |
| 870 | dDgCdg | -12,42 |
| 871 | CDdGcg | -9,52 |
| 872 | GcDdGg | -9,87 |
| 873 | GgCdDg | -12,45 |
| 874 | AgGcAg | -10,26 |

MATERIAŁY I METODY

| | | |
|-----|--------|--------|
| 99 | cGuUcg | -8,58 |
| 100 | GcGuUg | -9,23 |
| 101 | GGcGUg | -9,86 |
| 102 | uGgCg | -9,88 |
| 103 | CUgGc | -9,43 |
| 104 | UcUgGg | -9,91 |
| 105 | uUcUgg | -11,11 |
| 108 | GCdUug | -7,03 |
| 109 | DgCdUg | -9,82 |
| 110 | UdGCdg | -9,30 |
| 111 | gUdGcg | -10,29 |
| 112 | DgUdGg | -9,42 |
| 113 | CdGuDg | -10,84 |
| 114 | uCdGug | -8,00 |
| 115 | CUcDgg | -9,32 |
| 116 | uCuCdg | -11,00 |
| 117 | dUcUcg | -9,17 |
| 118 | GdUcUg | -9,02 |
| 119 | uGdUcg | -8,98 |
| 120 | CuGdUg | -8,78 |
| 121 | CcUgDg | -10,68 |
| 122 | CCcUg | -9,22 |
| 123 | GcCcU | -10,34 |
| 124 | UGcCc | -9,77 |
| 125 | AuGcCg | -9,34 |
| 126 | GdUGcg | -9,82 |
| 127 | dGdUgg | -9,66 |
| 128 | CdGdUg | -10,96 |
| 129 | dCdGdg | -9,83 |
| 130 | dDcDgg | -9,15 |
| 131 | cDdCdg | -10,74 |
| 132 | CcDdCg | -9,25 |
| 133 | UcCdDg | -9,02 |
| 134 | uUcCdg | -8,88 |
| 135 | cUcCcg | -9,02 |
| 136 | uCuUcg | -7,82 |
| 140 | cCdUug | -7,39 |
| 141 | DcCdUg | -9,20 |
| 142 | dDcCdg | -9,67 |
| 143 | uDdCcg | -8,72 |
| 144 | CuDdCg | -7,86 |
| 145 | DcUdDg | -8,16 |
| 146 | cDcUdg | -9,07 |
| 147 | CCdCug | -8,20 |
| 148 | GCcDC | -7,89 |

| | | |
|-----|--------|--------|
| 875 | CdGgC | -9,72 |
| 876 | GCdGg | -9,37 |
| 877 | AgCdGg | -12,43 |
| 878 | dDgCdg | -12,42 |
| 879 | CDdGcg | -9,52 |
| 880 | DcDdGg | -8,73 |
| 881 | CdCdDg | -10,21 |
| 882 | dCdCDg | -7,72 |
| 883 | CdCdCg | -8,53 |
| 884 | dCdCDg | -7,72 |
| 885 | UdCdCg | -7,82 |
| 886 | gUdCdg | -8,85 |
| 887 | CgUdCg | -9,03 |
| 888 | CcGuDg | -9,94 |
| 889 | uCcGug | -9,12 |
| 890 | gUcCg | -9,25 |
| 891 | AgUcCg | -11,78 |
| 892 | dDgUcg | -9,38 |
| 893 | CDdGug | -7,36 |
| 894 | GcDdGg | -9,87 |
| 895 | uGcDdg | -11,80 |
| 896 | CuGcDg | -10,12 |
| 897 | DcUgCg | -10,27 |
| 898 | CdCuGg | -8,74 |
| 899 | CCdCug | -11,28 |
| 900 | GCcDC | -7,89 |
| 901 | GGcCA | -8,51 |
| 902 | UGgCc | -9,81 |
| 903 | CUgGc | -9,43 |
| 904 | DcUgGg | -10,14 |
| 905 | CdCuGg | -11,32 |
| 906 | CCdCug | -11,28 |
| 907 | UcCdCg | -9,36 |
| 908 | dUcCdg | -9,93 |
| 909 | UdUcCg | -8,80 |
| 910 | dUdUcg | -8,16 |
| 912 | uCdUdg | -8,16 |
| 913 | gUcDug | -7,94 |
| 914 | DgUcDg | -9,69 |
| 915 | dDgUcg | -9,38 |
| 916 | dDdGug | -7,40 |
| 917 | CdDdGg | -8,15 |
| 918 | uCdDdg | -10,02 |
| 919 | cUcDdg | -9,06 |
| 920 | uCuCdg | -8,87 |

MATERIALY I METODY

| | | |
|-----|--------|--------|
| 149 | uGcCa | -9,09 |
| 150 | AuGcCg | -9,34 |
| 151 | DdUgCg | -9,25 |
| 152 | cDdUgg | -8,44 |
| 153 | CcDdUg | -10,80 |
| 154 | CcCdA | -8,23 |
| 155 | uCcCa | -8,86 |
| 156 | CUcCc | -9,16 |
| 157 | CcUcC | -9,51 |
| 158 | dCcUcg | -10,22 |
| 159 | dDcCug | -8,48 |
| 160 | GdAcCg | -9,21 |
| 161 | DgDdCg | -9,16 |
| 162 | UdGdDg | -8,36 |
| 163 | gUdGdg | -9,73 |
| 164 | UgUdGg | -8,80 |
| 167 | gUdUgg | -8,68 |
| 169 | cUgUdg | -9,36 |
| 170 | UcUgUg | -8,97 |
| 171 | dUcUgg | -9,23 |
| 172 | CdUcUg | -10,53 |
| 173 | dCdUcg | -8,72 |
| 174 | CdCdUg | -8,14 |
| 175 | GCdCDg | -8,33 |
| 176 | UgCdCg | -9,59 |
| 177 | GUgCDg | -8,86 |
| 178 | uGuGcg | -10,00 |
| 179 | cUgUgg | -9,75 |
| 180 | UcUgUg | -10,91 |
| 181 | uUcUgg | -8,18 |
| 183 | dGuUcg | -8,52 |
| 185 | UGdGug | -7,96 |
| 186 | uUgDgg | -8,85 |
| 191 | UGdGug | -7,96 |
| 192 | CuGdGg | -9,62 |
| 193 | DcUgDg | -11,73 |
| 194 | CdCuGg | -8,74 |
| 195 | uCdCug | -10,61 |
| 196 | GUcDcg | -8,89 |
| 197 | DgUcDg | -9,69 |
| 198 | UdGuCg | -8,44 |
| 200 | CdUdGg | -8,42 |
| 201 | uCdUdg | -10,29 |
| 203 | cUuCdG | -8,20 |
| 204 | cCuUcg | -9,02 |

| | | |
|-----|--------|--------|
| 921 | CUcUcg | -9,08 |
| 922 | uCuCug | -7,68 |
| 923 | CUcUcg | -9,08 |
| 924 | uCuCug | -7,68 |
| 925 | uUcUcg | -8,12 |
| 926 | cUuCug | -7,01 |
| 927 | cCuUcg | -9,02 |
| 928 | CcCuUg | -9,50 |
| 929 | AcCcUg | -10,18 |
| 930 | UdCcCg | -9,85 |
| 931 | GUdCcg | -9,14 |
| 932 | DgUdCg | -8,97 |
| 933 | GdGUdg | -9,20 |
| 934 | DgDgUg | -10,26 |
| 935 | GdGdGg | -10,29 |
| 936 | dGdGdg | -12,84 |
| 937 | CdGdGg | -9,86 |
| 938 | CCdGdg | -12,40 |
| 939 | DcCdGg | -10,04 |
| 940 | dDcCdg | -11,80 |
| 941 | CdAcCg | -8,78 |
| 942 | CcDdCg | -9,25 |
| 943 | UcCdDg | -9,02 |
| 944 | uUcCdg | -8,88 |
| 945 | dUuCcg | -8,58 |
| 950 | GdUcUg | -9,02 |
| 951 | GGdUcg | -9,63 |
| 952 | DgGdUg | -10,12 |
| 953 | dDgGdg | -10,59 |
| 954 | dDdGgg | -9,43 |
| 955 | GdDdGg | -11,16 |
| 956 | gGdDdg | -11,69 |
| 957 | CgGdAg | -9,74 |
| 958 | GcGgA | -9,84 |
| 959 | GGcGG | -9,30 |
| 960 | AgGcG | -9,51 |
| 961 | CdGgC | -9,72 |
| 962 | GCdGg | -9,37 |
| 963 | AgCdGg | -12,43 |
| 964 | dDgCdg | -12,42 |
| 965 | GdAgCg | -9,54 |
| 966 | uGdDgg | -9,17 |
| 969 | uUuUgg | -5,72 |
| 972 | cUgUug | -7,39 |
| 973 | GcUgUg | -10,34 |

MATERIALY I METODY

| | | |
|-----|--------|--------|
| 205 | CcCuUg | -9,50 |
| 206 | UcCcUg | -10,47 |
| 207 | CUcCc | -9,16 |
| 208 | CcUcC | -9,51 |
| 209 | GCcUc | -9,33 |
| 210 | AgCcUg | -10,51 |
| 211 | CdGcC | -9,68 |
| 212 | UCdGcg | -9,63 |
| 213 | dUcDgg | -9,41 |
| 214 | GdUCdg | -10,90 |
| 215 | GGdUcg | -9,63 |
| 216 | UgGdUg | -9,50 |
| 217 | CUgGdg | -10,37 |
| 218 | UcUgGg | -9,91 |
| 219 | uUcUgg | -11,11 |
| 221 | uGuUcg | -7,90 |
| 222 | cUgUug | -7,39 |
| 223 | GcUgUg | -10,34 |
| 224 | uGcUgg | -10,28 |
| 225 | dUgCug | -12,05 |
| 226 | UdUgCg | -9,03 |
| 235 | cUcUdg | -9,28 |
| 236 | uCuCug | -7,68 |
| 237 | CUcUcg | -9,08 |
| 238 | uCuCug | -7,68 |
| 239 | uUcUcg | -8,12 |
| 242 | cCdUug | -7,39 |
| 243 | DcCdUg | -9,20 |
| 244 | uAcCdg | -8,78 |
| 245 | GUdCcg | -9,14 |
| 246 | DgUdCg | -8,97 |
| 247 | GdGUdg | -9,20 |
| 248 | DgDgUg | -10,26 |
| 249 | GdGdGg | -10,29 |
| 250 | dGdGdg | -12,84 |
| 251 | CdGdGg | -9,86 |
| 252 | GCdGdg | -12,57 |
| 253 | UgCdGg | -10,04 |
| 254 | dUgCdg | -12,29 |
| 255 | DdUgCg | -9,25 |
| 256 | dDdUgg | -7,95 |
| 257 | CdDdUg | -9,25 |
| 258 | uCdDdg | -7,89 |
| 259 | dUcDdg | -8,62 |
| 260 | CdUcDg | -8,69 |

| | | |
|------|--------|--------|
| 974 | GGcUg | -9,43 |
| 975 | UgGcUg | -12,68 |
| 976 | CUgGc | -9,43 |
| 977 | CcUgG | -9,61 |
| 978 | dCcUgg | -13,21 |
| 979 | GDeCUg | -10,67 |
| 980 | AgDcC | -8,40 |
| 981 | dDgDcg | -9,58 |
| 982 | dDdGag | -8,39 |
| 985 | DcUdDg | -8,16 |
| 986 | GdCUdg | -8,73 |
| 987 | dGdCug | -8,64 |
| 988 | GdGdCg | -9,84 |
| 989 | uGdGdg | -10,09 |
| 990 | dUgDgg | -9,90 |
| 992 | uDdUgg | -7,73 |
| 994 | uCuDdg | -8,05 |
| 995 | gUcUdG | -10,20 |
| 996 | GgUcUg | -10,15 |
| 997 | UgGuCg | -9,63 |
| 998 | uUgGug | -7,81 |
| 1003 | CUcDug | -7,39 |
| 1004 | uCuCdg | -8,87 |
| 1005 | uUcUcg | -8,12 |
| 1007 | GdUUcg | -7,72 |
| 1008 | gGdUug | -7,86 |
| 1009 | UgGdUg | -9,50 |
| 1010 | CUgGdg | -10,37 |
| 1011 | GcUgG | -9,78 |
| 1012 | uGcUgg | -13,21 |
| 1013 | gUgCug | -12,51 |
| 1014 | uGuGcg | -10,00 |
| 1015 | dUgUgg | -9,31 |
| 1021 | DcUcUg | -9,12 |
| 1022 | GdCuCg | -9,11 |
| 1023 | uGdCug | -8,02 |
| 1024 | uUgDcg | -8,40 |
| 1029 | DcUdDg | -8,16 |
| 1030 | cDcUdg | -9,07 |
| 1031 | dCdCug | -7,76 |
| 1032 | CdCdCg | -8,53 |
| 1033 | CCdCDg | -8,16 |
| 1034 | UcCdCg | -9,36 |
| 1035 | dUcCdg | -9,93 |
| 1036 | CdUcCg | -9,51 |

MATERIALY I METODY

| | | |
|-----|--------|--------|
| 261 | uCdUcg | -8,49 |
| 267 | cUuCug | -7,01 |
| 268 | cCuUcg | -9,02 |
| 269 | uCcUug | -7,69 |
| 270 | uUcCug | -7,69 |
| 271 | gUuCcg | -9,04 |
| 272 | uGuUcg | -7,90 |
| 273 | cUgUug | -7,39 |
| 274 | UcUgUg | -8,97 |
| 275 | dUcUgg | -9,23 |
| 277 | gUdUcg | -8,62 |
| 278 | GgUdUg | -9,14 |
| 279 | AgGuAg | -8,42 |
| 280 | CdGgUg | -10,15 |
| 281 | CCdGg | -9,20 |
| 282 | UcCdGg | -12,39 |
| 283 | uUcCdg | -11,01 |
| 284 | cUuCcg | -9,02 |
| 285 | uCuUcg | -7,82 |
| 288 | uGuUcg | -7,90 |
| 290 | GgUgUg | -10,23 |
| 291 | GgGUGg | -9,59 |
| 292 | GgGgU | -10,31 |
| 293 | UGgGg | -9,72 |
| 294 | CUgGg | -9,30 |
| 295 | DcUgGg | -12,72 |
| 296 | CdCuGg | -11,32 |
| 297 | GCdCug | -11,45 |
| 298 | CgCdCg | -10,27 |
| 299 | CcGcA | -9,59 |
| 300 | CCcGC | -9,22 |
| 301 | uCcCg | -9,61 |
| 302 | UUcCcg | -11,60 |
| 303 | uUuCcg | -7,53 |
| 306 | uCcUug | -7,69 |
| 307 | GUcCug | -8,67 |
| 308 | gGuCc | -9,45 |
| 309 | GgGuC | -9,31 |
| 310 | CgGgU | -9,81 |
| 311 | uCgGg | -9,69 |
| 312 | uUcGgg | -12,21 |
| 313 | cUuCgg | -11,49 |
| 314 | uCuUcg | -10,25 |
| 316 | cUuCug | -7,01 |
| 317 | uCuUcg | -7,82 |

| | | |
|------|--------|--------|
| 1037 | CCdUcg | -9,16 |
| 1038 | GcCDUg | -9,00 |
| 1039 | uGcCa | -9,09 |
| 1040 | AuGcCg | -9,34 |
| 1041 | CdUgCg | -9,74 |
| 1042 | GCdUgg | -9,39 |
| 1043 | GgCdUg | -12,32 |
| 1044 | uGgCa | -9,13 |
| 1045 | GUgGc | -9,45 |
| 1046 | DgUgGg | -10,61 |
| 1047 | GdGUgg | -12,52 |
| 1048 | DgDgUg | -12,20 |
| 1049 | CdGdGg | -9,86 |
| 1050 | GCdGdg | -12,57 |
| 1051 | UgCdGg | -10,04 |
| 1052 | CuGcDg | -12,14 |
| 1053 | GcUgCg | -11,41 |
| 1054 | uGcUgg | -10,28 |
| 1055 | dUgCug | -12,05 |
| 1056 | DdUgCg | -9,25 |
| 1057 | dDdUgg | -7,95 |
| 1058 | CdDdUg | -9,25 |
| 1059 | uCdDdg | -7,89 |
| 1060 | cUcDdg | -9,06 |
| 1061 | CcUcDg | -10,19 |
| 1062 | uCcUcg | -9,99 |
| 1063 | GUcCug | -8,67 |
| 1064 | gGuCc | -9,45 |
| 1065 | AgGuCg | -9,44 |
| 1066 | dDgGug | -8,99 |
| 1067 | uDdGgg | -9,21 |
| 1068 | CuDdGg | -10,89 |
| 1069 | uCuDdg | -10,18 |
| 1070 | cUcUdg | -9,28 |
| 1071 | DcUcUg | -9,12 |
| 1072 | GdCuCg | -9,11 |
| 1073 | dGdCug | -8,64 |
| 1074 | GdGdCg | -9,84 |
| 1075 | uGdGdg | -10,09 |
| 1076 | uUgDgg | -8,85 |
| 1077 | cUuGdg | -10,82 |
| 1079 | dDcUug | -9,69 |
| 1080 | dDdCug | -6,93 |
| 1081 | GdDdCg | -8,13 |
| 1082 | uGdDdg | -8,38 |

MATERIALY I METODY

| | | |
|-----|--------|--------|
| 319 | DgUcUg | -9,59 |
| 320 | CdGuCg | -9,15 |
| 321 | CCdGug | -8,67 |
| 322 | UcCdGg | -9,81 |
| 323 | CUcCdg | -11,97 |
| 324 | CcUcC | -9,51 |
| 325 | dCcUcg | -10,22 |
| 326 | GDcCUg | -8,73 |
| 327 | GGdCc | -9,18 |
| 328 | UgGdCg | -9,89 |
| 329 | uUgGdg | -9,41 |
| 330 | dUuGgg | -8,68 |
| 335 | GdUdDg | -8,06 |
| 336 | cGdUdg | -9,33 |
| 337 | CcGdUg | -10,14 |
| 338 | UcCgDg | -10,54 |
| 339 | CuCcGg | -10,25 |
| 340 | CcUcC | -9,51 |
| 341 | uCcUcg | -9,99 |
| 342 | CuCcUg | -9,79 |
| 343 | UcUcCg | -9,81 |
| 344 | CUcUcg | -9,08 |
| 345 | uCuCug | -7,68 |
| 346 | gUcUcG | -10,83 |
| 347 | CgUcUg | -9,65 |
| 348 | CcGuCg | -10,27 |
| 349 | cCcGU | -8,68 |
| 350 | uCcCg | -9,61 |
| 351 | UUcCcg | -11,60 |
| 352 | uUuCcg | -7,53 |
| 355 | cCdUug | -7,39 |
| 356 | CcCdUg | -10,17 |
| 357 | AcCcAg | -9,89 |
| 358 | CdCcC | -9,06 |
| 359 | UcDcC | -8,10 |
| 360 | CUcDcg | -8,87 |
| 361 | uCuCdg | -8,87 |
| 362 | CUcUcg | -9,08 |
| 363 | uCuCug | -7,68 |
| 364 | CUcUcg | -9,08 |
| 365 | GcUcUg | -10,26 |
| 366 | DGcUcg | -10,31 |
| 367 | UdGcUg | -9,55 |
| 368 | uUdGcg | -8,78 |
| 372 | DgDdUg | -8,77 |

| | | |
|------|--------|--------|
| 1083 | dUgDdg | -9,11 |
| 1084 | GdUGdg | -9,26 |
| 1085 | uGdUgg | -9,04 |
| 1086 | CuGdUg | -10,72 |
| 1087 | uCuGdg | -9,36 |
| 1088 | CUcUgg | -9,14 |
| 1089 | CcUcUg | -12,03 |
| 1090 | CcCuC | -9,21 |
| 1091 | UcCcUg | -10,47 |
| 1092 | GUcCc | -9,18 |
| 1093 | uGuCcg | -9,77 |
| 1094 | uUgUcg | -8,20 |
| 1098 | DcUcUg | -9,12 |
| 1099 | CdCuCg | -8,68 |
| 1100 | CCdCug | -8,20 |
| 1101 | DcCdCg | -9,59 |
| 1102 | GDcCAg | -8,44 |
| 1103 | GGdCc | -9,18 |
| 1104 | GGgDc | -9,46 |
| 1105 | UgGgAg | -10,53 |
| 1106 | UUgGgg | -9,31 |
| 1107 | cUuGgg | -12,05 |
| 1110 | CcUcUg | -10,09 |
| 1111 | uCcUcg | -9,99 |
| 1112 | GUcCug | -8,67 |
| 1113 | uGuCcg | -9,77 |
| 1114 | cUgUcg | -9,69 |
| 1115 | GcUgUg | -10,34 |
| 1116 | DGcUgg | -10,37 |
| 1117 | UdGcUg | -11,49 |
| 1118 | dUdGcg | -9,83 |
| 1119 | GdUdGg | -8,85 |
| 1120 | gGdUdg | -11,96 |
| 1121 | UgGdUg | -9,50 |
| 1122 | GUgGdg | -10,39 |
| 1123 | gGuGg | -9,55 |
| 1124 | UgGuGg | -12,27 |
| 1125 | cUgGug | -12,38 |
| 1126 | UcUgGg | -9,91 |
| 1127 | CUcUgg | -12,07 |
| 1128 | CcUcUg | -12,03 |
| 1129 | CcCuC | -9,21 |
| 1130 | CcCcU | -10,17 |
| 1131 | AcCcC | -9,60 |
| 1132 | dDcCc | -8,99 |

MATERIALY I METODY

| | | |
|-----|--------|--------|
| 373 | CdGdDg | -9,07 |
| 374 | dCdGdg | -9,83 |
| 375 | UdCdGg | -8,27 |
| 376 | gUdCdg | -10,98 |
| 377 | CgUdCg | -9,03 |
| 378 | uCgUdg | -9,22 |
| 379 | gUcGuG | -10,61 |
| 380 | uGuCgg | -9,31 |
| 381 | uUgUcg | -10,63 |
| 386 | CcUcUg | -10,09 |
| 387 | uCcUcg | -9,99 |
| 388 | CuCcUg | -9,79 |
| 389 | UcUcCg | -9,81 |
| 390 | dUcUcg | -9,17 |
| 391 | GdUcUg | -9,02 |
| 392 | uGdUcg | -8,98 |
| 393 | CuGdUg | -8,78 |
| 394 | CcUgDg | -10,68 |
| 395 | uCcUgg | -10,05 |
| 396 | CuCcUg | -11,73 |
| 397 | CcUcC | -9,51 |
| 398 | uCcUcg | -9,99 |
| 399 | dUcCug | -8,74 |
| 400 | DdUcCg | -9,02 |
| 401 | dDdUcg | -7,89 |
| 402 | CdDdUg | -7,31 |
| 403 | CcDdDg | -8,91 |
| 404 | GcCdAg | -9,90 |
| 405 | CGcCa | -9,24 |
| 406 | AcGcC | -9,31 |
| 407 | GDCGc | -9,09 |
| 408 | UgDcGg | -9,63 |
| 409 | uUgDcg | -10,83 |
| 410 | cUuGdg | -8,69 |
| 411 | gCuUgg | -9,25 |
| 412 | cGcUug | -11,68 |
| 413 | UcGcUg | -10,18 |
| 414 | uUcGcg | -9,41 |
| 415 | gUuCgg | -8,58 |
| 416 | uGuUcg | -10,33 |
| 420 | cCdUug | -10,47 |
| 421 | UcCdUg | -8,97 |
| 422 | CUcCdg | -9,84 |
| 423 | UcUcCg | -9,81 |
| 424 | CUcUcg | -9,08 |

| | | |
|------|--------|--------|
| 1133 | GdAcCg | -9,21 |
| 1134 | uGdDcg | -8,72 |
| 1140 | GcDdUg | -9,03 |
| 1141 | DgCdDg | -9,87 |
| 1142 | dDgCdg | -10,29 |
| 1143 | GdAgCg | -9,54 |
| 1144 | uGdDgg | -9,17 |
| 1150 | CUcDug | -7,39 |
| 1151 | uCuCdg | -8,87 |
| 1152 | uUcUcg | -8,12 |
| 1154 | uGuUcg | -7,90 |
| 1156 | CdUgUg | -8,67 |
| 1157 | CCdUgg | -9,22 |
| 1158 | UcCdUg | -10,91 |
| 1159 | CUcCdg | -9,84 |
| 1160 | CcUcC | -9,51 |
| 1161 | GCcUc | -9,33 |
| 1162 | UGcCug | -9,26 |
| 1163 | uUgCcg | -9,93 |
| 1164 | dUuGcg | -8,81 |
| 1166 | cCdUug | -10,47 |
| 1167 | UcCdUg | -8,97 |
| 1168 | GUcCDg | -8,63 |
| 1169 | AgUcCg | -9,70 |
| 1170 | GdGUcg | -9,53 |
| 1171 | GgDgUg | -10,82 |
| 1172 | UgGdGg | -10,34 |
| 1173 | uUgGdg | -11,54 |
| 1174 | gUuGgg | -9,14 |
| 1175 | uGuUgg | -10,89 |
| 1177 | DgUgUg | -9,67 |
| 1178 | GdGUgg | -9,59 |
| 1179 | DgDgUg | -12,20 |
| 1180 | dDgDgg | -10,03 |
| 1181 | cDdGdg | -11,62 |
| 1182 | uCdDgg | -8,68 |
| 1184 | gUuCdG | -8,22 |
| 1185 | dGuUcg | -8,52 |
| 1187 | uCdGug | -8,00 |
| 1188 | CUcDgg | -9,32 |
| 1189 | uCuCdg | -11,00 |
| 1190 | uUcUcg | -8,12 |
| 1191 | cUuCug | -7,01 |
| 1192 | gCuUcg | -9,19 |
| 1193 | uGcUug | -7,92 |

MATERIALY I METODY

| | | |
|-----|--------|--------|
| 425 | CcUcUg | -10,09 |
| 426 | uCcUcg | -9,99 |
| 427 | GUcCug | -8,67 |
| 428 | CgUcCg | -10,57 |
| 429 | GcGuC | -8,94 |
| 430 | uGcGug | -9,35 |
| 431 | uUgCgg | -9,47 |
| 432 | gUuGcg | -11,70 |
| 433 | dGuUgg | -8,58 |
| 435 | GCdGug | -8,84 |
| 436 | AgCdGg | -9,85 |
| 437 | CdGcAg | -11,72 |
| 438 | CCdGc | -9,33 |
| 439 | DcCdGg | -10,04 |
| 440 | GDcCAg | -10,19 |
| 441 | AgDcC | -8,40 |
| 442 | dDgDcg | -9,58 |
| 443 | uDdGdg | -8,78 |
| 444 | GuDdGg | -8,33 |
| 445 | GgUdDg | -11,21 |
| 446 | GgGuAg | -9,79 |
| 447 | UgGgUg | -10,63 |
| 448 | gUgGg | -9,85 |
| 449 | gGuGg | -9,55 |
| 450 | AgGuGg | -12,08 |
| 451 | CdGgUg | -12,09 |
| 452 | UCdGgg | -9,50 |
| 453 | dUcDgg | -12,34 |
| 454 | CdUcDg | -10,71 |
| 455 | uCdUcg | -8,49 |
| 457 | UdUcDg | -7,98 |
| 458 | dUdUcg | -8,16 |
| 460 | cCdUdg | -9,36 |
| 461 | GcCDUg | -9,00 |
| 462 | uGcCa | -9,09 |
| 463 | AuGcCg | -9,34 |
| 464 | DdUgCg | -9,25 |
| 465 | GDdUgg | -8,34 |
| 466 | GgDdUg | -11,27 |
| 467 | uGgDdg | -9,97 |
| 468 | uUgGdg | -9,41 |
| 469 | dUuGgg | -8,68 |
| 470 | GdUUgg | -10,71 |
| 471 | dGdUug | -10,38 |
| 479 | CdUcDg | -8,69 |

| | | |
|------|--------|--------|
| 1194 | cUgCug | -9,41 |
| 1195 | UcUgCg | -10,04 |
| 1196 | dUcUgg | -9,23 |
| 1198 | dUdUcg | -8,16 |
| 1200 | cDdUdg | -8,05 |
| 1201 | CcDdUg | -8,86 |
| 1202 | CcCdA | -8,23 |
| 1203 | GCcCA | -8,47 |
| 1204 | AgCcC | -9,93 |
| 1205 | UdGcC | -8,97 |
| 1206 | dUdGcg | -9,83 |
| 1213 | gGuUcg | -9,08 |
| 1214 | UgGuUg | -8,42 |
| 1215 | cUgGug | -9,30 |
| 1216 | UcUgGg | -9,91 |
| 1217 | uUcUgg | -11,11 |
| 1218 | cUuCug | -10,09 |
| 1219 | gCuUcg | -9,19 |
| 1220 | cGcUug | -8,60 |
| 1221 | CcGcU | -9,88 |
| 1222 | UcCgC | -9,60 |
| 1223 | CuCcGg | -10,25 |
| 1224 | CcUcC | -9,51 |
| 1225 | uCcUcg | -9,99 |
| 1226 | uUcCug | -7,69 |
| 1227 | uUuCcg | -7,53 |
| 1231 | GgUgUg | -10,23 |
| 1232 | UgGuGg | -9,69 |
| 1233 | uUgGug | -10,89 |
| 1234 | gUuGgg | -9,14 |
| 1235 | gGuUgg | -12,07 |
| 1236 | UgGuUg | -10,36 |
| 1237 | cUgGug | -9,30 |
| 1238 | GcUgG | -9,78 |
| 1239 | uGcUgg | -13,21 |
| 1240 | cUgCug | -12,49 |
| 1241 | UcUgCg | -10,04 |
| 1242 | CUcUgg | -9,14 |
| 1243 | CcUcUg | -12,03 |
| 1244 | CcCuC | -9,21 |
| 1245 | GcCcU | -10,34 |
| 1246 | UGcCc | -9,77 |
| 1247 | AuGcCg | -9,34 |
| 1248 | GdUGcg | -9,82 |
| 1249 | dGdUgg | -9,66 |

MATERIAŁY I METODY

| | | |
|-----|--------|--------|
| 480 | GCdUcg | -9,33 |
| 481 | GgCdUg | -10,38 |
| 482 | uGgCa | -9,13 |
| 483 | GUgGc | -9,45 |
| 484 | uGuGgg | -9,87 |
| 485 | dUgUgg | -12,24 |
| 487 | dUdUgg | -8,22 |
| 489 | uGdUdg | -8,65 |
| 490 | CuGdUg | -8,78 |
| 491 | uCuGdg | -9,36 |
| 492 | CUcUgg | -9,14 |
| 493 | uCuCug | -10,76 |
| 494 | uUcUcg | -8,12 |
| 496 | cGuUcg | -8,58 |
| 498 | CuGgUg | -9,35 |
| 499 | UcUcGg | -9,35 |
| 500 | CUcUcg | -11,51 |
| 501 | GcUcUg | -10,26 |
| 502 | DGcUcg | -10,31 |
| 503 | GdGcUg | -10,69 |
| 504 | dGdGCg | -10,04 |
| 505 | GdGdGg | -10,29 |
| 506 | CGdGdg | -12,37 |
| 507 | DcGdGg | -10,01 |
| 508 | CdGgDg | -11,73 |
| 509 | GCdCg | -8,42 |
| 510 | CgCdCg | -12,35 |
| 511 | dCgCdg | -10,69 |
| 512 | UdCgCg | -9,56 |
| 513 | GUdCgg | -8,68 |
| 514 | DgUdCg | -11,05 |
| 515 | CdGuDg | -8,82 |
| 516 | CCdGug | -8,67 |
| 517 | UcCdGg | -9,81 |
| 518 | uUcCdg | -11,01 |
| 519 | dUuCcg | -8,58 |
| 521 | cCdUug | -7,39 |
| 522 | UcCdUg | -8,97 |
| 523 | GUcCDg | -8,63 |
| 524 | gGuCc | -9,45 |
| 525 | GgGuC | -9,31 |
| 526 | UgGgUg | -10,63 |
| 527 | UUgGgg | -9,31 |
| 528 | cUuGgg | -12,05 |
| 529 | cCuUgg | -12,01 |

| | | |
|------|--------|--------|
| 1250 | CdGdUg | -10,96 |
| 1251 | GCdGdg | -10,44 |
| 1252 | UgCdGg | -10,04 |
| 1253 | CuGcDg | -12,14 |
| 1254 | CcUgC | -9,74 |
| 1255 | uCcUgg | -10,05 |
| 1256 | GUcCug | -11,75 |
| 1257 | uGuCcg | -9,77 |
| 1258 | cUgUcg | -9,69 |
| 1259 | UcUgUg | -8,97 |
| 1260 | dUcUgg | -9,23 |
| 1261 | GdUcUg | -10,96 |
| 1262 | uGdUcg | -8,98 |
| 1263 | CuGdUg | -8,78 |
| 1264 | GcUgDg | -10,85 |
| 1265 | CgCuGg | -10,48 |
| 1266 | DcGcUg | -12,35 |
| 1267 | DdCGcg | -9,43 |
| 1268 | GdDcGg | -9,22 |
| 1269 | uGdDcg | -11,15 |
| 1271 | GcUgDg | -10,85 |
| 1272 | GGcUg | -9,43 |
| 1273 | GgGcU | -10,42 |
| 1274 | UGgGc | -9,85 |
| 1275 | gUgGg | -9,85 |
| 1276 | DgUgGg | -13,19 |
| 1277 | dDgUgg | -12,37 |
| 1278 | dDdGug | -10,48 |
| 1279 | GdDdGg | -8,58 |
| 1280 | dGdDdg | -11,13 |
| 1281 | GdGdDg | -9,50 |
| 1282 | CGdGdg | -10,24 |
| 1283 | CcGdG | -9,48 |
| 1284 | ACcGdg | -12,03 |
| 1285 | GDcCg | -8,92 |
| 1286 | GGdCc | -9,18 |
| 1287 | UgGdCg | -9,89 |
| 1288 | CUgGdg | -10,37 |
| 1289 | UcUgGg | -9,91 |
| 1290 | CUcUgg | -12,07 |
| 1291 | uCuCug | -10,76 |
| 1292 | uUcUcg | -8,12 |
| 1296 | dGgUug | -8,43 |
| 1297 | dDgGug | -8,99 |
| 1298 | GdAgGg | -9,41 |

MATERIAŁY I METODY

| | | |
|-----|--------|--------|
| 530 | uCcUug | -10,77 |
| 531 | dUcCug | -8,74 |
| 532 | CdUcCg | -9,51 |
| 533 | dCdUcg | -8,72 |
| 534 | CdCdUg | -8,14 |
| 535 | GCdCDg | -8,33 |
| 536 | AgCdCg | -9,40 |
| 537 | GdGCdg | -10,44 |
| 538 | dGdGCg | -10,04 |
| 539 | GdGdGg | -10,29 |
| 540 | dGdGdg | -12,84 |
| 541 | CdGdGg | -9,86 |
| 542 | uCdGdg | -11,73 |
| 543 | dUcDgg | -9,41 |
| 544 | CdUcDg | -10,71 |
| 545 | GCdUcg | -9,33 |
| 546 | UgCdUg | -9,20 |
| 547 | uUgCdg | -9,11 |
| 548 | cUuGcg | -9,25 |
| 549 | cCuUgg | -9,08 |
| 550 | CcCuUg | -11,44 |
| 551 | AcCcUg | -10,18 |
| 552 | GAcCc | -8,79 |
| 553 | UgAcCg | -9,50 |
| 554 | uUgDcg | -8,40 |
| 555 | gUuGdg | -8,71 |
| 556 | dGuUgg | -8,58 |
| 558 | DgDgUg | -10,26 |
| 559 | GdGdGg | -10,29 |
| 560 | GgDgAg | -12,47 |
| 561 | GGgDg | -9,91 |
| 562 | CgGgA | -9,71 |
| 563 | uCgGg | -9,69 |
| 564 | CuCgGg | -12,87 |
| 565 | CcUcGg | -13,13 |
| 566 | uCcUcg | -12,42 |
| 567 | CuCcUg | -9,79 |
| 568 | UcUcCg | -9,81 |
| 569 | dUcUcg | -9,17 |
| 570 | GdUcUg | -9,02 |
| 571 | dGdUcg | -9,60 |
| 572 | CdGdUg | -9,02 |
| 573 | CCdGdg | -10,27 |
| 574 | UcCdGg | -9,81 |
| 575 | CUcCdg | -11,97 |

| | | |
|------|--------|--------|
| 1299 | GgDdGg | -12,75 |
| 1300 | GgGdAg | -11,99 |
| 1301 | AgGgAg | -10,34 |
| 1302 | dDgGg | -9,52 |
| 1303 | GdAgGg | -11,99 |
| 1304 | CGdDgg | -12,25 |
| 1305 | UcGdAg | -10,25 |
| 1306 | uUcGdg | -8,85 |
| 1311 | GcUcUg | -10,26 |
| 1312 | CgCuCg | -10,42 |
| 1313 | UcGcUg | -10,18 |
| 1314 | gUcGc | -9,42 |
| 1315 | GgUcGg | -10,61 |
| 1316 | UgGuCg | -11,71 |
| 1317 | dUgGug | -8,86 |
| 1318 | DdUgGg | -9,12 |
| 1319 | uDdUgg | -10,66 |
| 1321 | CdUdDg | -7,63 |
| 1322 | cCdUdg | -9,36 |
| 1323 | GcCDUg | -9,00 |
| 1324 | uGcCa | -9,09 |
| 1325 | CUGcCg | -9,66 |
| 1326 | GcUgCg | -11,41 |
| 1327 | uGcUgg | -10,28 |
| 1328 | dUgCug | -12,05 |
| 1329 | DdUgCg | -9,25 |
| 1330 | dDdUgg | -7,95 |
| 1332 | gUdDdg | -8,02 |
| 1334 | cUgUdg | -9,36 |
| 1335 | CcUgUg | -10,17 |
| 1336 | uCcUgg | -10,05 |
| 1337 | uUcCug | -10,77 |
| 1338 | uUuCcg | -7,53 |
| 1342 | DgUdUg | -8,58 |
| 1343 | CdGuDg | -8,82 |
| 1344 | uCdGug | -8,00 |
| 1345 | CUcDgg | -9,32 |
| 1346 | CcUcDg | -12,21 |
| 1347 | CcCuC | -9,21 |
| 1348 | GcCcU | -10,34 |
| 1349 | UGcCc | -9,77 |
| 1350 | CUGcCg | -9,66 |
| 1351 | UcUgCg | -10,04 |
| 1352 | uUcUgg | -8,18 |
| 1354 | cGuUcg | -8,58 |

MATERIALY I METODY

| | | |
|-----|--------|--------|
| 576 | gCuCc | -9,56 |
| 577 | DGcUcg | -10,31 |
| 578 | CdGcUg | -10,26 |
| 579 | GCdGc | -9,50 |
| 580 | GGCdGg | -9,64 |
| 581 | CgGcA | -9,63 |
| 582 | CCgGC | -9,26 |
| 583 | ACcGg | -8,83 |
| 584 | cDcCg | -9,02 |
| 585 | GCdCc | -8,88 |
| 586 | UgCdCg | -9,59 |
| 587 | CuGcDg | -10,12 |
| 588 | GcUgCg | -11,41 |
| 589 | uGcUgg | -10,28 |
| 590 | cUgCug | -12,49 |
| 591 | DcUgCg | -10,27 |
| 592 | UdCUgg | -7,98 |
| 597 | CcCuUg | -9,50 |
| 598 | CcCcU | -10,17 |
| 599 | CCcC | -9,51 |
| 600 | AcCcC | -9,60 |
| 601 | UdCcCg | -9,85 |
| 602 | CUdCcg | -9,12 |
| 603 | CcUdCg | -9,47 |
| 604 | CcCuAg | -9,69 |
| 605 | UcCcUg | -10,47 |
| 606 | GUcCc | -9,18 |
| 607 | uGuCcg | -9,77 |
| 608 | uUgUcg | -8,20 |
| 611 | cCdUug | -10,47 |
| 612 | DcCdUg | -9,20 |
| 613 | CdCcAg | -9,35 |
| 614 | UcDcC | -8,10 |
| 615 | dUcDcg | -8,96 |
| 616 | CdUcDg | -8,69 |
| 617 | CCdUcg | -9,16 |
| 618 | UcCdUg | -8,97 |
| 619 | CUcCdg | -9,84 |
| 620 | gCuCc | -9,56 |
| 621 | DGcUcg | -10,31 |
| 622 | CdGcUg | -10,26 |
| 623 | UCdGcg | -9,63 |
| 624 | dUcDgg | -9,41 |
| 625 | DdUcDg | -10,22 |
| 626 | GDdUcg | -8,28 |

| | | |
|------|--------|--------|
| 1355 | dCgUug | -7,48 |
| 1356 | GdCgUg | -9,63 |
| 1357 | dGdCg | -8,69 |
| 1358 | CdGdCg | -11,49 |
| 1359 | uCdGdg | -9,60 |
| 1360 | GUcDgg | -9,34 |
| 1361 | uGuCdg | -11,08 |
| 1362 | dUgUcg | -9,25 |
| 1363 | CdUgUg | -8,67 |
| 1364 | uCdUgg | -8,55 |
| 1365 | CUcDug | -10,47 |
| 1366 | CcUcDg | -10,19 |
| 1367 | uCcUcg | -9,99 |
| 1368 | GUcCug | -8,67 |
| 1369 | AgUcCg | -9,70 |
| 1370 | CdGuCg | -9,15 |
| 1371 | uCdGug | -8,00 |
| 1372 | uUcDgg | -8,36 |
| 1378 | UdUgDg | -8,47 |
| 1387 | CdUcDg | -8,69 |
| 1388 | CCdUcg | -9,16 |
| 1389 | UcCdUg | -8,97 |
| 1390 | uUcCdg | -8,88 |
| 1391 | uUuCcg | -7,53 |
| 1395 | GCdCug | -8,37 |
| 1396 | GGCdCg | -9,19 |
| 1397 | uGgCa | -9,13 |
| 1398 | CUgGc | -9,43 |
| 1399 | UcUgGg | -9,91 |
| 1400 | gUcUgg | -12,62 |
| 1401 | GgUcUg | -12,09 |
| 1402 | UgGuCg | -9,63 |
| 1403 | cUgGug | -9,30 |
| 1404 | UcUgGg | -9,91 |
| 1405 | uUcUgg | -11,11 |
| 1406 | cUuCug | -10,09 |
| 1407 | uCuUcg | -7,82 |
| 1409 | CdUcUg | -8,59 |
| 1410 | dCdUcg | -8,72 |
| 1411 | CdCdUg | -8,14 |
| 1412 | dCdCDg | -7,72 |
| 1413 | GdCdCg | -8,96 |
| 1414 | uGdCdg | -9,21 |
| 1415 | dUgDcg | -9,45 |
| 1417 | GDdUgg | -8,34 |

MATERIAŁY I METODY

| | | |
|-----|--------|--------|
| 627 | cGdDug | -7,92 |
| 628 | CcGdAg | -9,70 |
| 629 | UcCgDg | -10,54 |
| 630 | AuCcGg | -8,65 |
| 631 | CdUcCg | -11,59 |
| 632 | uCdUcg | -8,49 |
| 634 | UdUcDg | -7,98 |
| 641 | CuCgUg | -9,35 |
| 642 | CcUcGg | -10,55 |
| 643 | CcCuC | -9,21 |
| 644 | UcCcUg | -10,47 |
| 645 | AuCcCg | -9,11 |
| 646 | GDUcCg | -8,60 |
| 647 | uGdUcg | -8,98 |
| 649 | gUuGdg | -8,71 |
| 650 | cGuUgg | -8,64 |
| 652 | gUcGuG | -10,61 |
| 653 | GgUcGg | -10,61 |
| 654 | CgGuC | -8,81 |
| 655 | CcGgU | -9,77 |
| 656 | UCcGg | -9,12 |
| 657 | uUcCgg | -12,17 |
| 658 | dUuCcg | -11,01 |
| 662 | dGdDdg | -9,00 |
| 663 | CdGdDg | -9,07 |
| 664 | CCdGdg | -10,27 |
| 665 | UcCdGg | -9,81 |
| 666 | CUcCdg | -11,97 |
| 667 | UcUcCg | -9,81 |
| 668 | CUcUcg | -9,08 |
| 669 | CcUcUg | -10,09 |
| 670 | GcUc | -9,33 |
| 671 | cGcCU | -8,83 |
| 672 | UcGcC | -9,60 |
| 673 | uUcGcg | -9,41 |
| 678 | cCdUug | -7,39 |
| 679 | UcCdUg | -8,97 |
| 680 | uUcCdg | -8,88 |
| 681 | cUuCcg | -9,02 |
| 682 | uCuUcg | -7,82 |
| 684 | cUuCug | -7,01 |
| 685 | uCuUcg | -7,82 |
| 688 | uGuUcg | -7,90 |
| 691 | cCuUgg | -9,08 |
| 692 | uCcUug | -10,77 |

| | | |
|------|--------|--------|
| 1418 | GgDdUg | -11,27 |
| 1419 | uGgDdg | -9,97 |
| 1420 | CUgGdg | -10,37 |
| 1421 | CcUgG | -9,61 |
| 1422 | CCcUg | -9,22 |
| 1423 | CcCcU | -10,17 |
| 1424 | GCCcC | -9,33 |
| 1425 | CGcCC | -9,22 |
| 1426 | CcGCC | -9,22 |
| 1427 | CCcGC | -9,22 |
| 1428 | CCcCG | -9,05 |
| 1429 | UCcCc | -9,54 |
| 1430 | CUcCc | -9,16 |
| 1431 | DcUcCg | -10,04 |
| 1432 | GdCuCg | -9,11 |
| 1433 | dGdCug | -8,64 |
| 1434 | dDgDcg | -9,58 |
| 1435 | GdDgDg | -9,74 |
| 1436 | CGdDgg | -9,32 |
| 1437 | UcGdAg | -10,25 |
| 1438 | CuCgDg | -9,86 |
| 1439 | gCuCg | -9,10 |
| 1440 | DGcUcg | -12,74 |
| 1441 | GdGcUg | -10,69 |
| 1442 | dGdGCg | -10,04 |
| 1443 | GdGdGg | -10,29 |
| 1444 | CGdGdg | -12,37 |
| 1445 | CcGdG | -9,48 |
| 1446 | UcCgDg | -12,56 |
| 1447 | gUcCg | -9,25 |
| 1448 | CgUcCg | -12,65 |
| 1449 | uCgUcg | -9,55 |
| 1450 | uUcGug | -7,25 |
| 1455 | GcUcUg | -8,53 |
| 1456 | UGcCug | -9,26 |
| 1457 | uUgCcg | -9,93 |
| 1458 | gUuGcg | -9,27 |
| 1459 | cGuUgg | -8,64 |
| 1461 | uUcGug | -7,25 |
| 1462 | gUuCgg | -8,58 |
| 1463 | gGuUcg | -11,51 |
| 1464 | GgGuUg | -9,60 |
| 1465 | CgGgU | -9,81 |
| 1466 | uCgGg | -9,69 |
| 1467 | DuCgGg | -12,43 |

MATERIAŁY I METODY

| | | |
|-----|--------|--------|
| 693 | dUcCug | -8,74 |
| 694 | DdUcCg | -9,02 |
| 695 | cDdUcg | -8,38 |
| 696 | GcDdUg | -9,03 |
| 697 | uGcDdg | -9,67 |
| 698 | dUgCdg | -10,16 |
| 699 | UdUgCg | -9,03 |
| 700 | dUdUgg | -8,22 |
| 702 | uCdUdg | -8,16 |
| 703 | CUcDug | -7,39 |
| 704 | uCuCdg | -8,87 |
| 705 | CUcUcg | -9,08 |
| 706 | uCuCug | -7,68 |
| 707 | uUcUcg | -8,12 |
| 711 | CdCdUg | -8,14 |
| 712 | GCdCDg | -8,33 |
| 713 | UgCdCg | -9,59 |
| 714 | uUgCdg | -9,11 |
| 715 | gUuGcg | -9,27 |
| 716 | uGuUgg | -7,96 |
| 718 | GdUgUg | -9,10 |
| 719 | GGdUgg | -9,69 |
| 720 | DgGdUg | -12,06 |
| 721 | GDgGa | -8,87 |
| 722 | UGdGgg | -9,99 |
| 723 | uUgDgg | -11,78 |
| 727 | CcCuUg | -9,50 |
| 728 | UcCcUg | -10,47 |
| 729 | UUcCcg | -9,17 |
| 730 | uUuCcg | -7,53 |
| 734 | GgDdUg | -9,33 |
| 735 | uGgDdg | -9,97 |
| 736 | uUgGdg | -9,41 |
| 740 | cUgUug | -7,39 |
| 741 | GcUgUg | -10,34 |
| 742 | uGcUgg | -10,28 |
| 743 | cUgCug | -12,49 |
| 744 | GcUgCg | -11,41 |
| 745 | uGcUgg | -10,28 |
| 746 | gUgCug | -12,51 |
| 747 | uGuGcg | -10,00 |
| 748 | uUgUgg | -8,26 |
| 753 | GcUcUg | -10,26 |
| 754 | uGcUcg | -10,22 |
| 755 | uUgCug | -7,92 |

| | | |
|------|--------|--------|
| 1468 | GdUcGg | -12,06 |
| 1469 | cGdUcg | -12,09 |
| 1470 | DcGdUg | -9,17 |
| 1471 | CdCgDg | -9,71 |
| 1472 | GCdCg | -8,42 |
| 1473 | GGCdCg | -11,27 |
| 1474 | AgGcAg | -10,26 |
| 1475 | dDgGc | -9,65 |
| 1476 | GdAgGg | -9,41 |
| 1477 | GgDdGg | -12,75 |
| 1478 | DgGdDg | -12,19 |
| 1479 | dDgGdg | -10,59 |
| 1480 | dDdGgg | -9,43 |
| 1481 | CdDdGg | -10,73 |
| 1482 | uCdDdg | -10,02 |
| 1483 | gUcDdg | -9,08 |
| 1484 | uGuCdg | -8,95 |
| 1485 | dUgUcg | -9,25 |
| 1486 | CdUgUg | -8,67 |
| 1487 | uCdUgg | -8,55 |
| 1496 | cUuCdg | -8,20 |
| 1497 | cCuUcg | -9,02 |
| 1498 | uCcUug | -7,69 |
| 1499 | dUcCug | -8,74 |
| 1500 | GDUcCg | -8,60 |
| 1501 | dGdUcg | -9,60 |
| 1502 | DdGdUg | -8,53 |
| 1503 | uDdGdg | -8,78 |
| 1504 | dUdDgg | -8,35 |
| 1508 | dGdDdg | -9,00 |
| 1509 | dDgDdg | -9,24 |
| 1510 | GdDgDg | -9,74 |
| 1511 | CGdDgg | -9,32 |
| 1512 | CcGdAg | -11,45 |
| 1513 | UcCgDg | -10,54 |
| 1514 | CuCcGg | -10,25 |
| 1515 | UcUcCg | -11,89 |
| 1516 | gUcUcG | -10,83 |
| 1517 | uGuCug | -7,76 |
| 1518 | uUgUcg | -8,20 |
| 1521 | GCdUug | -10,11 |
| 1522 | UgCdUg | -9,20 |
| 1523 | CuGcDg | -10,12 |
| 1524 | UcUgCg | -10,04 |
| 1525 | CUcUgg | -9,14 |

MATERIAŁY I METODY

| | | | | | |
|-----|--------|--------|------|--------|--------|
| 756 | dUuGcg | -8,81 | 1526 | CcUcUg | -12,03 |
| 760 | CdUcDg | -8,69 | 1527 | uCcUcg | -9,99 |
| 761 | CCdUcg | -9,16 | 1528 | CuCcUg | -9,79 |
| 762 | UcCdUg | -8,97 | 1529 | DcUcCg | -10,04 |
| 763 | dUcCdg | -9,93 | 1530 | UdCUcg | -7,92 |
| 764 | GDUcCg | -8,60 | 1532 | CdUdCg | -7,97 |
| 765 | uGdUcg | -8,98 | 1533 | uCdUdg | -8,16 |
| 767 | cUuGdg | -8,69 | 1534 | gUcDug | -7,94 |
| 770 | GCdCug | -8,37 | 1535 | uGuCdg | -8,95 |
| 771 | CgCdCg | -10,27 | 1536 | uUgUcg | -8,20 |
| 772 | UcGCdg | -9,93 | 1551 | GgUdUg | -9,14 |
| 773 | CuCgCg | -10,42 | 1552 | GgGuAg | -9,79 |
| 774 | UcUcGg | -9,35 | 1553 | AgGgUg | -10,44 |
| 775 | CUcUcg | -11,51 | 1554 | dDgGg | -9,52 |
| 776 | uCuCug | -7,68 | 1555 | CDdGgg | -12,32 |
| 777 | CUcUcg | -9,08 | 1556 | DcDdGg | -11,31 |
| 778 | GcUcUg | -10,26 | 1557 | dDcDdg | -10,49 |
| 779 | uGcUcg | -10,22 | 1558 | dDdcDg | -8,47 |
| 780 | cUgCug | -9,41 | 1559 | GdDdCg | -8,13 |
| 781 | UcUgCg | -10,04 | 1560 | dGdDdg | -9,00 |
| 782 | uUcUgg | -8,18 | 1561 | UdGdDg | -8,36 |
| 786 | gGdUug | -7,86 | 1562 | gUdGdg | -9,73 |
| 787 | DgGdUg | -10,12 | 1563 | DgUdGg | -9,42 |

a – miejsce wiązania sondy, zdefiniowane przez środkowy nukleotyd miejsca wiązania cRNA segmentu 5 do sondy. b – duże litery (A, C, G, U, D) oznaczają nukleotydy typu 2'-O-getylo-RNA, małe litery (a, c, g, u, d) oznaczają nukleotydy zawierające modyfikacje typu LNA, D lub d oznacza 2,6-diagino-purynorybozyd w serii 2'-O-getylo-RNA lub LNA. c - ΔG_{37}° obliczona dla dupletu modyfikowana sonda/RNA (81).

Tabela 10. Izoenergetyczne sondy uzupełniające bibliotekę sond oligonukleotydowych.

| Nazwa | sekwencja ^a 5'→3' |
|-------|---------------------------------|
| M1 | UGaUuAuCU |
| M2 | AUuGuUaUG |
| M3 | UCuAuUgUU |
| M4 | UcUuUcA |
| M5 | CAuUuAgAU |
| M6 | AUcAuUuAG |
| M7 | CGuUuUaUC |
| M8 | CUcUuAuGU |
| M9 | CAaUuUgAA |
| M10 | CaUuUgA |

MATERIAŁY I METODY

| | |
|--|-----------|
| M11 | UUcUuAuAG |
| M12 | UgAuUuC |
| M13 | AUuCuUaUG |
| M14 | UcAuUcU |
| M15 | UUaUuCaUG |
| M16 | UCaUuAuUC |
| M17 | CUuUaAuUG |
| M18 | UUuCuUuAA |
| M19 | UAuUuUuCU |
| a – duże litery oznaczają nukleotydy 2'-O-metylowane, małe litery nukleotydy typu LNA. | |

Tabela 11. Oligomery DNA użyte do badań z wykorzystaniem RNazy H.

| Nazwa | Sekwencja 5'→3' | Miejsce wiązania do cRNA segmentu 5 |
|-------|-----------------|-------------------------------------|
| H1 | CTCCCAATG | 150-158 |
| H2 | CTCTCCATT | 418-426 |
| H3 | CTACCCC | 598-604 |
| H4 | CTTTCATCA | 258-266 |
| H5 | GTTCTTCCA | 281-289 |
| H6 | CTCTCTCAC | 358-365 |
| H7 | CCATCATTG | 755-763 |
| H8 | CCCATTTC | 350-358 |
| H9 | GCTCCATC | 615-622 |
| H10 | CTCGTTTTA | 635-643 |
| H11 | TGTTCTCA | 1149-1156 |
| H12 | TTTCCCTTT | 724-732 |
| H13 | CACAAGCAG | 875-883 |
| H14 | ATTTAGATTG | 468-477 |
| H15 | TCAAGAGTG | 1176-1184 |
| H16 | ATTCTCTCA | 703-710 |
| H17 | CAAATCCTC | 396-404 |
| H18 | AAGGTCCTC | 1060-1068 |
| H19 | GGATCTATT | 943-953 |

MATERIAŁY I METODY

Tabela 12. Antysensowe oligonukleotydy zaprojektowane do badań na liniach komórkowych.

| nazwa | dlugość | sekwencja^a 5'→3' | Miejsce wiązania do cRNA segmentu 5 |
|--------------|----------------|--|--|
| 1430A | 17 | CGaAGAcUCCcCGcCCC | 1427-1439 |
| 85A | 11 | CCaGUcUCcAU | 82-92 |
| 150A | 18 | CUcCCGAUUCcACcAAUC | 140-158 |
| 200A | 13 | CCaUCaUAAuCAC | 194-206 |
| 285A | 11 | UGcUCuUCuAG | 280-290 |
| 355A | 16 | UUcUCuCAUcCACuUU | 352-370 |
| 415A | 17 | UUcGCCaUUGuUUGCUU | 410-426 |
| 470A | 13 | CAuUCaGGUuGGA | 466-478 |
| 600A | 18 | GUuCCaACUcCUUuCACC | 591-608 |
| 615A | 13 | CUcCAuUGCcAUU | 609-621 |
| 640A | 17 | CCaCGUuUGAuCAUUCU | 628-644 |
| 760A | 19 | CCAuCAUuGCCcUCUgGGC | 745-763 |
| 840A | 12 | CCcCUcAGAAUG | 837-848 |
| 920A | 13 | CCuUCcCUUuCAA | 917-929 |
| 1320A | 21 | GCUGCCAuAACGGUUGCUCUU | 1308-1328 |
| 400A | 11 | CcAAAcUcUcC | 398-405 |
| 727A | 12 | AuUuUCcUuUGA | 722-732 |
| 950A | 14 | GAAuGGGuCUAuCC | 943-957 |
| 1A | 11 | CAUUCUCAUUU | 1146-1156 |
| 2A | 11 | CAuUCuCAuUU | 1146-1156 |
| 3A | 16 | CAuUCuCAuUUGAAGC | 1141-1156 |
| 1B | 11 | UCCAGGGUAUU | 1174-1184 |
| 2B | 11 | UCcAGgGUaUU | 1174-1184 |
| 1C | 11 | AUCACUUUCUU | 1093-1103 |
| Neg5 | 11 | CUGaACGCuUA | 1262-1272 |
| N* | 17 | AGACCUCUAUAGCAGCU | - |

a – duże litery oznaczają nukleotydy 2'-O-metylowane, małe litery nukleotydy typu LNA. *-oligonukleotyd zawierający sekwencję niespecyficzną względem RNA wirusa grypy (94).

1.2. Plazmidy

Plazmid pPol1 otrzymany od prof. Becka Kima, Wydział Mikrobiologii i Immunologii, Uniwersytetu w Rochester, USA. Plazmid zawierał sekwencję piątego segmentu wirusa grypy A/Vietnam/1203/2004 (H5N1).

Plazmid pUC19 – Invitrogen

1.3. Linie komórkowe

MDCK (ang. *Madin–Darby canine kidney epithelial cells*) – Sigma –Aldrich, linie komórkową MDCK-HA (ang. *Madin–Darby canine kidney epithelial cells-Hemagglutinin*) otrzymano od prof. Luisa Martinez-Sobrido, Wydział Mikrobiologii i Immunologii, Uniwersytetu w Rochester, USA (117, 118).

1.4. Wirus grypy typu A

Szczep wirusa grypy A/California/04/2009 otrzymano od prof. Luisa Martinez-Sobrido, Wydział Mikrobiologii i Immunologii, Uniwersytetu w Rochester, USA.

Jednocykliczy wirus grypy A/California/04_NYICE_E3/2009 otrzymano od prof. Luisa Martinez-Sobrido, Wydział Mikrobiologii i Immunologii, Uniwersytetu w Rochester, USA (117, 118).

1.5. Kompetentne komórki bakteryjne

Escherichia coli DH5 α – Invitrogen

1.6. Enzymy

Polimeraza DNA Pfu Plus – Eurx

Defosforylaza CIAP - Eurx

DNAza I - Ambion

Kinaza polinukleotydowa T4 – Eurx

Rekombinowany inhibitor RNaz – Promega

Rybonukleaza A – Sigma- Aldrich

Rybonukleaza H – Epicentre Biotechnologies

RNAza T1 - Ambion

RNAza S1 - Ambion

RNAza V1 - Ambion

SuperScript III Reverse Transcriptase - Invitrogen

MATERIAŁY I METODY

Enzymy restrykcyjne: EcoRI, PstI – Promega

Ligaza DNA T4 - Thermo Fisher Scientific

1.7. Izotop promieniotwórczy

[γ -32]ATP – Hartmann Analytic

1.8. Barwniki

6-TAMRA, 5-FAM, 6-JOE, 5-ROX – AnaSpec

1.9. Komercyjnie dostępne zestawy do biologii molekularnej

Zestaw do transkrypcji AmpliScribe™ T7 – *Flash*™ Kit - Epicentre Biotechnologies

Zestaw do odwrotnej transkrypcji Super Script® III – Invitrogen

Zestaw do oczyszczania produktów PCR - GeneMatrix PCR/DNA Clean-Up Purification Kit – Eurx

Zestawy do oczyszczania RNA – Rneasy MinElute Spin Column – Qiagen, NucAway™ Spin Columns- Thermo Fisher Scientific

Zestaw do sekwencjonowania – Thermo Sequenase™ Cycle Sequencing Kit - Affymetrix

Zestaw do real-time PCR – iTaq™ Universal Probes Supermix - Bio-Rad

1.10. Odczynniki, roztwory, bufony, pożywki

Agaroza– Bioshop

40% roztwór żelu poliakrylamidowego 29:1 (w/w) – Bioshop

Bromek etydyny – Sigma-Aldrich

N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine - Sigma-Aldrich

TRIzol Reagent - Thermo Fisher Scientific

Siarczek dimetylu (DMS) - Sigma-Aldrich

Dimetylosulfotlenek (DMSO) – Sigma-Aldrich

N-Cyclohexyl-*N'*-(β -[*N*-methylmorpholino]ethyl)carbodiimide *p*-toluenesulfonate (CMCT) –Sigma-Aldrich

3-ethoxy-1,1-dihydroxy-2-butanone (Ketoksal) - MP Biomedicals

N-methylisatoic anhydride (NMIA) - Invitrogen

Nadsiarczan amonu (APS) – Sigma-Aldrich

Foramid – Applied Biosystems

MATERIAŁY I METODY

Izopropyl- β -D-tiogalaktopiranozyd (IPTG) – Sigma-Aldrich

5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -D-galaktopiranozyd (x-Gal) – Sigma-Aldrich

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

Tris, pH 8.3 – Bioshop

Kwas borowy – Bioshop

EDTA – Fluka

HEPES - Bioshop

MgCl₂ - Sigma-Aldrich

KCl - Sigma-Aldrich

Co(NH₃)₆Cl₃ - POCH

Glicerol – Sigma-Aldrich

Błękit bromofenolowy - Sigma-Aldrich

Cyjanol ksylenowi - Sigma-Aldrich

Mocznik – Bioshop

NaCl - Sigma-Aldrich

Cytryniam sodu - Fluka

Tetraboran sodu - Sigma-Aldrich

SDS- Bioshop

CHAPS – Bioshop

Dekstroza – Bioshop

Lizat białkowy – Serva

Ekstrakt drożdżowy – Serva

Agar – Bioshop

Triton-X – Bioshop

Formaldehyd – Polyscience, Inc

1x TBE - bufor do elektroforezy w warunkach denaturujących

100 mM Tris, pH 8.3

100 mM kwas borowy

1 mM EDTA

0,1xTBE

10 mM Tris, pH 8.3

10 mM kwas borowy

MATERIAŁY I METODY

0,1 mM EDTA

1xTHEM - bufor do elektroforezy w warunkach natywnych

34 mM Tris

57 mM HEPES

0.1 mM EDTA

10 mM MgCl₂

Bufor obciążający do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w żelu agarozowym

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

25% (w/v) glicerol

0,2% (w/v) błękit bromofenolowy

0,2% (w/v) cyjanol ksylenowi

Bufor obciążający do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

8 M mocznik

0,2% (w/v) błękit bromofenolowy

0,2% (w/v) cyjanol ksylenowi

25% (w/v) glicerol

Bufor obciążający do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych

0,2% (w/v) błękit bromofenolowy

0,2% (w/v) cyjanol ksylenowi

25% (w/v) glicerol

0,1x TBE

Bufor do faldowania RNA

100 mM Tris-HCl, pH 7,0

100 mM KCl - Sigma-Aldrich

MgCl₂ w stężeniu od 2,5 do 25 mM lub Co(NH₃)₆Cl₃ w stężeniu 0,002 do 10 mM.

Bufory PBS do drukowania macierzy

3xSSC (450 mM NaCl, 45 mM cytryniam sodu pH 7,0)

0,05% SDS

0,001% CHAPS

Bufor do redukcji nadrukowanych sond

37 mM NaBH₄

72% Bufor PBS

28% Etanol

Bufor do znakowania barwnikami fluorescencyjnymi

0,1 M tetraboran sodu, pH 8,5

Bufor ALM1

50 mM dekstroza

10 mM EDTA

25 mM Tris, pH 8,0

Pożywka płynna LB

10 g lizatu białkowego

5 g ekstraktu drożdżowego

5 g NaCl

H₂O do 1000 ml

W przypadku pożywki stałej dodawano 15g agaru

Antybiotyki

Ampicylina – Sigma-Aldrich

1.11. Odczynniki do hodowli komórkowej

Medium DMEM – Gibco

Medium OptiMEM - Gibco

Lipofektamina® 2000 – Invitrogen

Inaktywowana bydlęca surowica płodowa (FBS) – Gibco

Zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS) - BioShop

MATERIAŁY I METODY

Penicylina-Streptomycyna-Glutamina – Gibco

Penicylina-Streptomycyna - Gibco

30% roztwór albuminy – Invitrogen

Trypsyna - Sigma-Aldrich

Trypsyny traktowanej TPCK - Sigma-Aldrich

Mysie monoklonalne przeciwciało anti-NP – Merck Millipore

Przeciwciało II rzędowe znakowane FITC (fluoroscencyjna izotiocjanina) – Merck Millipore

Medium hodowlane

1x DMEM

10% FBS

2 mM glutamina

1% roztwór penicyliny, streptomycyny

Medium infekcyjne

1x PBS

0,3% roztworu albuminy

1% roztwór penicyliny, streptomycyny

Medium postinfekcyjne

1x DMEM

0,3% roztworu albuminy

1% roztwór penicyliny, streptomycyny

2 mM glutamina

1 ug/ml trypsyny traktowanej TPCK

Medium do określania miana wirusa grypy

1x DMEM

1% roztwór penicyliny, streptomycyny, glutaminy

50 mM HEPES

Roztwór do utrwalania komórek

1x PBS

0,5% Triton-X

4% formaldehyd

1.12. Wzorce mas kwasów nukleinowych

Gene Rule™ Ladder mix - Thermo Fisher Scientific (wzorzec mas DNA)

RiboRuler™ High Range RNA Ladder - Thermo Fisher Scientific (wzorzec mas RNA)

2. Metody

2.1. Synteza oligonukleotydów

Startery, sondy do badań z macierzami izoenergetycznymi, oligomery DNA oraz antysensowne oligonukleotydy zostały syntezowane metodą aminofosforyną na podłożu stałym na syntetyzerze BioAutomation Corporation MerMade 12 w Zakładzie Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych. Zdjęcie z podłoża oraz odblokowanie wykonano według dostępnych protokołów (119, 120). Stężenie oligonukleotydów określono za pomocą pomiaru absorbancji przy długości fali $\lambda = 260$ nm (spektrofotometr UV Picodrop-Syngen).

2.2. Znakowanie oligonukleotydów barwnikami fluorescencyjnymi

Oligonukleotydy przeznaczone do znakowania barwnikami fluorescencyjnymi zawierały na 5' końcu C6 aminolinker zabezpieczony grupą MMT. Po zdjęciu z podłoża i usunięciu blokujących grup zasadolabilnych, odblokowano grupę aminową przez inkubację w 80% kwasie octowym w temperaturze pokojowej. Następnie kwas octowy odparowano do sucha, oligonukleotydy rozpuszczono w wodzie i dodano do 10 ml 1% nadchloranu sodu w acetonie. Następnie oligonukleotyd strącono i przepłukano zimnym acetonem. Pobrano 200 μ g oligonukleotydu na każdy barwnik i inkubowano z 200 μ g wybranego barwnika rozpuszczonego w 14 μ l DMSO (6-TAMRA, 5-FAM, 6-JOE, 5-ROX). Reakcję prowadzono w buforze do znakowania barwnikami fluorescencyjnymi przez 6 godzin w temperaturze pokojowej. Kolejnym krokiem było strącenie oligonukleotydów i ich oczyszczenie w denaturującym żelu poliakrylamidowym.

2.3. Spektroskopia mas

Wykonano analizę masową oligonukleotydów za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF, w celu potwierdzenia poprawności syntezy. Uzyskane wyniki porównano z obliczoną masą cząsteczek.

2.4. Strącanie kwasów nukleinowych

Roztwór RNA/DNA strącano 2,5 objętościami 96% etanolu z 0,3 M octanem sodu, pH 5,5 w temperaturze 4°C przez co najmniej 2 godziny.

2.5. Rozdział kwasów nukleinowych w żelach agarozowych

Rozdział elektroforetyczny w 0,8% natywnym żelu agarozowym przeprowadzono do badań nad fałdowaniem segmentu 5 RNA(+). Bromek etydyny do żelu dodano w końcowym stężeniu 0,1 ug/ml. Rozdział prowadzono przy 4 W przez 5 godzin w temperaturze 4°C. Odległość między elektrodami wynosiła 13 cm. Wyniki uwidaczniano w świetle UV na aparacie Gel Logic 200 – Imaging System.

Do oceny jakości produktów PCR oraz RNA po transkrypcji *in vitro* stosowano rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym w buforze 1xTBE. Bromek etydyny do żelu dodano w końcowym stężeniu 0,1 ug/ml. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 130 V, przez około 45 minut. Odległość między elektrodami wynosiła 13 cm. Wyniki uwidaczniano w świetle UV na aparacie Gel Logic 200 – Imaging System.

2.6. Rozdział kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych

Rozdział w 6% żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych zastosowano do badania fałdowania cząsteczek M121, M198. Elektroforezę wykonano w buforze 1xTHEM w 4°C. Rozdział prowadzono przy 6 W przez 7 godzin. Odległość między elektrodami wynosiła 28 cm.

Do oczyszczenia: oligomerów oraz RNA o długości poniżej 200 nukleotydów wykorzystano preparatywną elektroforezę w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Do badań hydrolizy RNA indukowanej w obecności jonów ołowiu oraz badań z wykorzystaniem RNAzy T1, S1 oraz V1 zastosowano żel analityczny. Rozdział prowadzono w buforze 1xTBE, moc prądu dostosowano do grubości i wielkości żelu. Wykorzystywano żele 8, 10, 12%. Wyniki uwidaczniano w świetle UV. W przypadku wykorzystania izotopu promieniotwórczego żel suszono, a następnie nakładano ekran odwzorowujący. Ekran skanowano na aparacie Phosphorimager FUJI.

2.7. Oczyszczanie DNA i RNA

Do oczyszczania DNA i RNA zastosowano komercyjnie dostępne kity. RNA o długości poniżej 200 nukleotydów był oczyszczany na żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących.

2.8. Otrzymanie matrycy do transkrypcji *in vitro* M121

Matryca DNA do syntezy M121 została uzyskana, dzięki zastosowaniu techniki PCR. Dwa częściowo komplementarne startery (S5-2, S5-2) zostały wykorzystane w pierwszej reakcji PCR. Produkt tej reakcji stał się matrycą do kolejnej reakcji PCR z wykorzystaniem starterów zawierających miejsce rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne PstI oraz EcoRI (startery M-F, M-R). Następnie, oczyszczony produkt PCR (insert) oraz plazmid pUC19 zostały trawione przez enzymy PstI oraz EcoRI. Po czym następowała ligacja insertu do plazmidu. Kolejnym korkiem była transformacja kompetentnych komórek bakteryjnych DH5 α oraz oczyszczanie plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej. Do namnożenia matrycy DNA do transkrypcji *in vitro* M121 wykorzystywano reakcję PCR ze starterami T1_F oraz T2_R (starter T1_F zawierał promotor dla polimerazy RNA T7). Sekwencja matrycy DNA M121 została potwierdzona przez sekwencjonowanie ze starterami M13F oraz M13R (Międzyzakładowa Pracownia Biologii Molekularnej UAM).

2.9. Otrzymanie matrycy do transkrypcji *in vitro* M198, cRNA segmentu 5 oraz kodującego regionu segmentu 5 RNA(+) o sekwencji szczepu A/Vietnam/1203/2004(H5N1)

Matryce DNA stosowane do transkrypcji *in vitro* M198, cRNA segmentu 5 oraz kodującego regionu segmentu 5 RNA(+) uzyskiwano dzięki technice PCR z wykorzystaniem specyficznych starterów (F198 oraz R198 dla M198, For_c5 oraz Rev_c5 dla cRNA segmentu 5, FM5 oraz RM5 dla kodującego regionu segmentu 5 RNA(+)). Startery F198, For_c5, FM5 zawierały promotor dla polimerazy RNA T7. Matryce do reakcji stanowił plazmid pPol1, zawierający sekwencję segmentu 5(+) szczepu A/Vietnam/1203/2004(H5N1).

2.10. Otrzymanie matrycy do transkrypcji *in vitro* segmentu 7 vRNA(-) o sekwencji szczepu A/California/04/2009 (H1N1)

Segment 7 vRNA(-) o sekwencji szczepu A/California/04/2009 (H1N1) stanowił standard w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. W pierwszym etapie badań wklonowano DNA o sekwencji pożądanego szczepu oraz segmentu wirusa grypy do plazmidu, a następnie namnożono matrycę do transkrypcji *in vitro*.

Komórki MDCK zostały wysiane na szalkę 6-dołkową (600 tys./dołek), kolejnego dnia zostały zainfekowane wirusem grypy (A/California/04/2009 (H1N1)), MOI= 0,1. Po 24 godzinach komórki zalano trizolem, a następnie izolowano totalny RNA metodą Chomczyńskiego-Sacchi. Kolejnym krokiem było przeprowadzenie DNazowania oraz kontrola jakości RNA na żelu agarozowym w warunkach denaturujących. Tak przygotowany RNA użyto do reakcji odwrotnej transkrypcji z specyficznym starterem RT, po której inaktywowano enzym. Oczyszczone cDNA użyto, jako matryce w reakcji PCR ze starterami zawierającymi miejsca cięcia enzymów restrykcyjnych (startery KF oraz KR). Następnie produkt PCR oraz plazmid pUC19 podano trawieniu w obecności enzymów PstI oraz EcoRI, ligacji i transformacji do kompetentnych komórek bakteryjnych DH5 α . Kolejnym krokiem było oczyszczanie plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej. Do namnożenia matrycy DNA do transkrypcji *in vitro* segmentu 7 vRNA(-) wykorzystywano reakcję PCR ze starterami PF i PR (starter PF zawierał promotor dla polimerazy RNA T7). Sekwencja matrycy DNA segmentu 7 vRNA(-) szczepu A/California/04/2009 (H1N1) została potwierdzona przez sekwencjonowanie ze starterami M13F, M13R, S (Międzyzakładowa Pracownia Biologii Molekularnej UAM).

2.11. Izolacja totalnego RNA metodą Chomczyńskiego-Sacchi

Totalny RNA izolowano z komórek MDCK zainfekowanych wirusem grypy typu A, szczepem A/California/04/2009 (H1N1) metodą Chomczyńskiego-Sacchi z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego trizolu (TRIzol Reagent) (121, 122).

2.12. Transformacja kompetentnych komórek bakteryjnych DH5 α

Komórki kompetentne DH5 α (50ul) rozmrożono na lodzie, następnie dodano 10 ng pożądanego plazmidu. Całość inkubowano przez 45 minut na lodzie. Po czym zawiesinę umieszczono na 45 sekund w temperaturze 42°C. Następnie komórki ponownie inkubowano na lodzie przez 2 minuty, po czym wytrząsano je w 1 ml

MATERIAŁY I METODY

pożywki płynnej LB (45 minut, 37°C). 150ul komórek bakteryjnych posiewano na podłożu stałym LB z dodatkiem ampicyliny. Dodano także 30ul X-Gal (50 mg/1ml dimetyloformamidu) oraz 15 ul 0,1 M IPTG. Całość inkubowano przez noc w temperaturze 37°C.

Następnie wybrane kolonie bakteryjne namnażano w pożywce płynnej LB przez noc w temperaturze 37°C.

2.13. Oczyszczanie plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej

1,5 ml zawiesiny bakterii wirowano przez 1 minutę przy 10000 rpm. Po czym, usuwano supernatant a osad zawieszano w 100 ul buforu ALM1. Następnie wytrząsano próby (1400 rpm) przez 5 minut. Po lizie komórek bakteryjnych, próby przenoszono na lód i dodawano do nich 200 ul 1% SDS w 0,2 M NaOH. Następnym krokiem w procedurze była 5-minutowa inkubacja i dodanie 150 ul 7,5 M octanu amonu. Po czym następowała 20-minutowa inkubacja na lodzie. W kolejnym etapie próby wirowano przez 15 min przy 11000 rpm. Supernatant przenoszono do nowych probówek, plazmidy w temperaturze pokojowej strącano dwiema objętościami 96% etanolu. Następnie próby wirowano przez 15 min przy 11000 rpm. Supernatant usunięto, a osad suszono na wirówce próżniowej i rozpuszczono w 50 ul roztworu RNAzy A (2,5 ng/ul). Z uzyskanych prób pobierano 2 ul i trawiono enzymami restrykcyjnymi. Produkt reakcji rozdzielano na żelu agarozowym w warunkach denaturujących z markerem mas DNA. Wynik wizualizowano w świetle UV. Wybrano plazmidy zawierające insert i poddano go sekwencjonowaniu (Międzyzakładowa Pracownia Biologii Molekularnej UAM).

2.14. Transkrypcja *in vitro*

Do transkrypcji *in vitro* badanych cząsteczek użyto przygotowane matryce DNA oraz komercyjnie dostępne zestawy do transkrypcji. Następnie otrzymany RNA oczyszczono.

2.15. Znakowanie 5' końca RNA radioaktywnym izotopem ³²P

W pierwszym etapie znakowania 5' końca RNA przeprowadzono reakcję defosforylacji. W tym celu pobrano 100 pmoli RNA, które inkubowano z 2U defosforylasy CIAP w 100 ul buforu do znakowania. Reakcję prowadzono w 37°C przez 45 minut. Następnie RNA oczyszczano i znakowano izotopem ³²P. W tym celu

MATERIAŁY I METODY

wykorzystano cały RNA z poprzedniego etapu, 0,5 ul [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (1mCi), 30 U kinazy polinukleotydowej. Reakcję prowadzono w 10 ul przez 30 minut w temperaturze 37°C.

2.16. Fałdowanie RNA

Badane cząsteczki RNA zawieszono w buforze do fałdowania, następnie inkubowano przez 5 minut w temperaturze 65°C. Po czym powoli schładzano. W celu określenia wpływu kationów na fałdowanie się RNA, zastosowano bufor różniący się stężeniem MgCl_2 oraz $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$. Fałdowanie cząsteczek RNA było analizowane poprzez rozdział w natywnym żelu poliakrylamidowym lub agarozowym (w zależności od długości cząsteczki). Następnie wybrano warunki fałdowania każdej cząsteczki RNA stosowane do dalszych badań. Dla M121, cRNA segmenty 5 oraz rejonu kodującego segmentu 5 RNA(+) stosowano bufor do fałdowania o składzie 50 mM HEPES pH 7, 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 . Dla M198 użyto buforu o składzie 50 mM HEPES pH 7, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 . W przypadku badań indukowanej hydrolizy RNA jonami ołowiu oraz mapowania enzymatycznego zastosowano 10 mM Tris-HCl pH 7, zamiast 50 mM HEPES, pH 7.

2.17. Mapowanie enzymatyczne

RNA z wyznakowanym radioaktywnie 5' końcem zostało poddane procesowi fałdowania. Następnie 20000 cpm RNA na jedną reakcję, poddano trawieniu z zoptymalizowanym stężeniem enzymów: RNazę S1, T1 oraz V1. Hydrolizę RNA indukowaną przez RNazę V1 prowadzono w następujących stężeniach enzymu: $0,5 \times 10^{-3}$ U/ul, 1×10^{-3} U/ul oraz 3×10^{-3} U/ul. Hydrolizę RNA indukowaną przez RNazę T1 wykonano przy użyciu stężeń enzymu: 0,15 U/ul, 0,25 U/ul oraz 0,75U/ul. Hydrolizę RNA indukowaną przez RNazę S1 prowadzono w następujących stężeniach enzymu 0,05 U/ul, 0,3 U/ul, 1U/ul. Wszystkie reakcje zostały wykonane w temperaturze 23° C przez 30 minut.

Wykonano także drabinkę foramidową oraz drabinkę, która powstała po trawieniu badanego RNA przez RNazę T1. Zastosowano także kontrolę w postaci RNA nietrawionego enzymami. Reakcję zatrzymywano przez dodanie EDTA oraz umieszczenie prób na lodzie. Próby rozdzielono na analitycznym, denaturującym żelu poliakrylamidowym, po czym żel suszono, a następnie nakładano ekran odwzorowujący. Ekran skanowano na aparacie Phosphorimager FUJI. Obraz rozdziału analizowano w programie *MultiGuage V 3.0* oraz *Microsoft Excel*.

2.18. Hydroliza RNA indukowana obecnością jonów ołowiu

RNA z wyznakowanym radioaktywnie 5'końcem zostało poddane procesowi fałdowania. Na jedną reakcję używano 20000 cpm RNA. Do badań nad hydrolizą RNA indukowaną jonami ołowiu wykorzystano octan ołowiu (II). Każdą próbę inkubowano z 1 mM $C_4H_6O_6Pb$ (końcowe stężenie), po czym zatrzymywano reakcję poprzez dodawanie 20 mM EDTA po 1, 5, 15, 30, 60 minutach. Zastosowano także kontrolę w postaci RNA nietraktowanego octanem ołowiu (II). Reakcje rozdzielono na analitycznym, denaturującym żelu poliakrylamidowym, po czym żel suszono, a następnie nakładano ekran odwzorowujący. Ekran skanowano na aparacie Phosphorimager FUJI. Obraz rozdziału analizowano w programie *MultiGuage V 3.0* oraz *Microsoft Excel*.

2.19. Mapowanie chemiczne

Każda cząsteczka RNA przed mapowaniem chemicznym została poddana procesowi fałdowania. Następnie, inkubowano RNA z jednym z odczynników modyfikujących: DMS lub CMCT lub ketoksal lub NMIA. Wszystkie odczynniki modyfikujące użyto w zoptymalizowanym stężeniu. Dla cRNA oraz rejonu kodującego segmentu 5 użyto odczynniki w następujących końcowych stężeniach: NMIA- 1mM, DMS – 6 mM, CMCT – 16,5 mM, ketoksal – 6,7 mM. Dla M121 były to stężenia końcowe: NMIA- 4 mM, DMS – 20 mM, CMCT 25 mM, ketoksal – 9 mM. Mapowanie M198 wykonano stosując: 1,6 mM NMIA, 10 mM DMS, 12 mM CMCT oraz 4 mM ketoksal, a do pojedynczej reakcji użyto 1 pM RNA. Mapowanie chemiczne prowadzono w temperaturze 23°C oraz 37°C. Modyfikacje DMS, CMCT, kethoxal oraz NMIA prowadzono odpowiednio przez 15, 20, 30, 40 minut, zarówno w temperaturze 23°C oraz 37°C. Równolegle prowadzono reakcję kontrolną w tych samych warunkach, lecz bez czynnika modyfikującego. W końcowym etapie próby strącono, po czym prowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji.

2.20. Selektywna hydroliza RNA z udziałem rybonukleazy H w obecności oligomeru DNA

Reakcje selektywnej hydrolizy RNA z udziałem rybonukleazy H w obecności oligomeru DNA prowadzono dla segmentu 5 RNA(+). 6 pM RNA zostało poddane procesowi fałdowania. Następnie dodano 3 pM oligomeru DNA, 5 U rybonukleazy H. Reakcję prowadzono w 37°C przez 30 minut, po czym inaktywowano RNaze H przez

inkubacje w 65°C przez 10 minut. Równolegle wykonano reakcję kontrolną bez dodatku oligonukleotydu. W końcowym etapie próby strącono, dzielono materiał, po czym prowadzono oddzielne reakcje odwrotnej transkrypcji z 6 starterami.

2.21. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji użyto odwrotnej transkryptazy SuperScript[®] III oraz specyficznych starterów. Do odczytywania modyfikacji RNA używano starterów znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi. Startery znakowane 6-JOE użyto dla prób traktowanych modyfikującymi odczynnikami, natomiast starter znakowany 5-FAM zastosowano dla reakcji kontrolnych. Do reakcji odwrotnej transkrypcji stosowanej w przygotowaniach prób do reakcji PCR w czasie rzeczywistym stosowano startery nieznakowane barwnikami.

Badany RNA denaturowano w temperaturze 90°C przez 3 minuty, po czym przeprowadzano hybrydyzację startera do RNA. W tym celu stosowano 10-minutową inkubację w temperaturze 55°C. Następnie dodawano 50 U odwrotnej transkryptazy oraz 10 U rekombinowanego inhibitora RNaz. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano w buforze 1x do odwrotnej transkrypcji w temperaturze 55°C przez 50 minut. Następnie wykonywano alkaliczną hydrolizę RNA oraz strącono próby (odczytanie modyfikacji RNA) lub przeprowadzono 10-minutową inaktywację enzymu w temperaturze 75°C (przygotowanie prób do PCR w czasie rzeczywistym), po czym wykorzystano cDNA do dalszych badań.

2.22. Drabinki do analizy modyfikacji RNA

Do analizy produktów wydłużania startera (modyfikacji RNA) stosowano drabinkę powstałą w reakcji PCR. Wykorzystano specyficzne startery znakowane fluorescencyjnie. Dla jednej drabinki stosowano starter znakowany 5-ROX, a dla drugiej 6-TAMRĄ. Jako matrycy użyto 90 ng matrycy DNA badanej cząsteczki RNA. Reakcję przeprowadzono z użyciem kitu do sekwencjonowania, który zawierał zoptymalizowany stosunek stężeń deoksynukleotydów do wybranego dideoksynukleotydu. Następnie produkt reakcji strącono.

2.23. Elektroforeza kapilarna

cDNA powstałe w reakcji wydłużania startera oraz drabinki zostały rozpuszczone w formamidzie, a następnie termicznie denaturowane. Rozdział cząsteczek poprzez

elektroforezę kapilarna wykonano w Centrum Badań DNA lub Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu.

2.24. Analiza wyników uzyskanych poprzez rozdział cząsteczek z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej

Dane uzyskane poprzez rozdział produktów cDNA z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej analizowano używając programu PeakScannerTM Software v1.0 lub ShapeFinder (123) oraz Microsoft Excel. Reaktywność poszczególnych nukleotydów sprowadzono do skali 0-1. Następnie posłużono się zasadą 2-8%. Na wstępie odrzucono piki, które posiadały wysokie tło (około 5%). Po czym odrzucono 2% najwyższych pików, z 8% kolejnych najwyższych pików obliczono średnią. Stosunek wysokości najwyższych pików do średniej określał reaktywność. Za miejsca reaktywne uznawano te, których reaktywność była większa od 0,7. Średnio reaktywne, których reaktywność mieściła się w przedziale 0,5-0,7. Miejsca słabo reaktywne o reaktywności poniżej 0,5. (112).

2.25. Macierze izoenergetyczne

W pierwszym etapie badań z wykorzystaniem macierzy izoenergetycznych przygotowano mikroskopowe płytki aminosilanizowane pokryte roztworem 2% agarozy z dodatkiem 10 mM NaIO₄. Następnie wykorzystano bibliotekę sond Zakładu Genomiki Strukturalnej RNA i Zakładu Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych do nadrukowania na przygotowane płytki mikroskopowe. W przypadku badań cRNA segmentu 5 dodano nowe sondy tak, aby dostępność wszystkich miejsc w RNA została sprawdzona. Drukowanie sond wykonano w Europejskim Centrum Bioinformatyki i Genomiki (ECBiG) stosując drukarkę NanoPrintTM (Arrayit). Sondy drukowano w trzech lub dwóch powtórzeniach w odległości 750 μm. Dodatkowo nadrukowano kontrole negatywne dla analizy hybrydyzacji (UUUUU, monomer U oraz czysty bufor do nadrukowania, kontrole zawierały modyfikacje typu 2'-O-metyloRNA). Nadrukowane sondy inkubowano przez 12 godzin w temperaturze 37°C przy 50% wilgotności. Następnie mikromacierze pokrywano 1 ml buforu do redukcji i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po czym płytki płukano trzykrotnie w wodzie po 15 minutach w temperaturze pokojowej oraz inkubowano przez 1 godzinę w 1% roztworze SDS w 55°C i ponownie 3 krotnie w wodzie. Kolejnym etapem było pozostawienie płytek do wysuszenia.

MATERIAŁY I METODY

Gotowe mikromacierze użyto w eksperymentach z badanymi cząsteczkami RNA. W tym celu RNA z wyznakowanym radioaktywnie 5' końcem (około 200000 cpm) zostało poddane procesowi fałdowania. Następnie RNA w buforze nanoszono na płytkę, którą umieszczano w szczelnie zamkniętej komorze hybrydyzacyjnej, zachowując wysoką wilgotność. Hybrydyzację prowadzono w temperaturze 4°C, 23°C oraz 37°C. Po 18 godzinach wypłukiwano roztwór RNA buforem o składzie identycznym jak bufor użyty do fałdowania RNA. Na osuszone i zabezpieczone folią płytki nanoszono ekran odwzorowujący. Po naświetlaniu ekran skanowano na aparacie Phosphorimager FUJI.

Wyniki hybrydyzacji analizowano w programie *ArrayGuage V 2.1* oraz *Microsoft Excel*. Za intensywne uznano miejsca wiązania, które były słabsze od 1 do 3-krotnie od najsilniejszego miejsca wiązania. Średnio intensywne od 3 do 9-krotnie słabsze, słabe od 9 do 27-krotnie słabsze od najintensywniejszego.

Sprawdzono także alternatywne miejsca wiązania dla każdej sondy, która ulegała hybrydyzacji oraz obliczono energie swobodną takiego wiązania. W tym celu wykorzystano funkcję „*fold RNA bimolecular*” dostępną w programie RNAstructure 5.5. Następnie wyliczono energię swobodną (ΔG°_{37}) uzyskanego dupleksu hybrydyzacyjnego z wykorzystaniem kalkulatora dostępnego na stronie Zakładu Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych, Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (<http://rnachemlab.ibch.poznan.pl/>).

2.26. Hodowla linii komórkowej MDCK oraz MDCK-HA

Do badań z oligonukleotydami antysensowymi wykorzystano dwie linie komórkowe: MDCK oraz MDCK-HA. Linie komórkowe hodowano w szalkach o średnicy 10 cm w medium DMEM zawierającym 2 mM L-glutaminy, 10% inaktywowaną bydlęcą surowicę płodową (FBS), oraz antybiotyki: 100 U/ml penicyliny G i 100 µg/ml streptomycyny. Komórki rosły w środowisku o wilgotności wynoszącej 96% i 5% zawartości CO₂ w temperaturze 37°C. Komórki pasażowano przy użyciu 0,25% trypsyny (z 0,03% EDTA). Do linii komórkowej MDCK-HA, co każdy trzeci pasaż dodawano hygromycyne B, w celu zachowania konstytutywnej ekspresji hemaglutyniny (HA). Linie komórkowe prowadzono do 30 pasażu.

2.27. Infekcja komórek MDCK, MDCK-HA wirusem grypy

Do infekcji komórek MDCK wykorzystano wirusa grypy typu A - szczep A/California/04/2009, z kolei komórki MDCK-HA infekowano jednocyklicznym

MATERIAŁY I METODY

wirusem grypy A/California/04_NYICE_E3/2009. Infekcję przeprowadzano na komórkach o konfluencji 80%, z wykorzystaniem odpowiedniego rozcieńczenia wirusa. W celu wykonania infekcji przemywano komórki 2-krotnie ciepłym PBS-em. Następnie komórki zalewano roztworem wirusa w medium infekcyjnym i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 23°C delikatnie kołysząc. Po 30 minutach obrócono szalkę o 90°. Następnie ściągnano roztwór wirusa i zastępowano go medium postinfekcyjnym. Po czym, komórki inkubowano w temperaturze 33°C w środowisku wykazującym 96% wilgotności i 5% CO₂.

2.28. Namnażanie wirusa grypy typu A (A/California/04/2009 oraz jednocyklicznego wirusa grypy A/California/04_NYICE_E3/2009)

Do namnożenia wirusa grypy A/California/04/2009 oraz jednocyklicznego wirusa grypy A/California/04_NYICE_E3/2009) wykorzystano odpowiednio linie komórkowe MDCK oraz MDCK-HA. W pierwszym etapie wysiano 900 tysięcy komórek na szalki o średnicy 10 cm, następnie namnażano komórki przez 24 godziny. Po tym czasie dokonywano infekcji (MOI = 0,01). Następnie, zainfekowane komórki inkubowano przez 3 dni w temperaturze 33°C. Zebrany roztwór z nad komórek wirowano, zbierając klarowny roztwór zawierający wirusy do probówek. Roztwory z wirusami przechowywano w temperaturze -80°C.

2.29. Test lysinkowy

Do określenia miana wirusa posługiwano się testem lysinkowym (ang. plaque assay). W tym celu wysiewano 600 tysięcy komórek na dołki na szalce 6-dołkowej. Komórki namnażano przez 24 godziny. Następnie przemywano dwukrotnie PBS-em. Wykonano 10-krotne rozcieńczenia wirusa w medium infekcyjnym. Przeprowadzono infekcję komórek (każdym rozcieńczeniem wirusa zainfekowano 2 dołki). Po czy zebrano medium infekcyjne, komórki zalano 0,8% roztworem agarozы w medium do określenia miana wirusa (2x stężonym) w stosunku 1:1. Kolejnym krokiem była 4 dniowa inkubacja w temperaturze 33°C. Po której każdy dołek zlewano 70% etanolem, a następnie zdejmowano warstwę agarozы. Monowarstwę komórek wybarwiano 1% roztworem fioletu krystalicznego. Ostatnim etapem było zliczenie lysinek i określenie miana wirusa korzystając ze wzoru:

$\text{Pfu/ml} = \text{ilość łyseinek} \times \text{rozcieńczenie wirusa} \times \text{ilość roztworu wirusa użyta do infekcji (ml)}$

2.30. Określenie wydajności transfekcji

Komórki MDCK były transfekowane z wykorzystaniem lipofektaminy 2000 oligonukleotydem znakowanym TAMRĄ (5-karboksytetrametylorodamina) na koncu 5', a następnie wysiane na płytce 24 dołkowej po 67 tysięcy na dołek. Transfekcję przeprowadzono dla oligonukleotydu kontrolnego w stężeniach 4 μM , 2 μM , 1 μM , 0,75 μM , 0,5 μM , 0,25 μM oraz 0,1 μM w 3 powtórzeniach. Po 6 godzinach od transfekcji pożywka została zmieniona na medium hodowlane. Ponownie przeprowadzono 6 godziną inkubację, po czym na każdy dołek dodano 300 μl trypsyny 1x stężonej, a następnie 600 μl pożywki hodowlanej, w której zawieszono komórki. Komórki wirowano 3 minuty 1500 rpm, następnie dodano 800 μl dPBS, i ponownie je zawieszono. Wirowanie i płukanie komórek powtórzono. Po ostatnim wirowaniu dodano 500 μl dPBS, a następnie próby w eppendorfach dostarczono do badań na cytometrze przepływowym. Analizę wykonała dr Dorota Gurda z Zakładu Epigenetyki, Pracowni Analiz Struktur Subkomórkowych. Do dalszych doświadczeń wybrano takie stężenie oligomeru, przy którym wydajność transfekcji była najwyższa.

2.31. Określenie potencjału hamowania namnażania wirusa grypy przez oligonukleotydy antysensowe metodą immunofluorescencyjną

I etap: przygotowanie komórek, transfekcja, infekcja

Stopień hamowania namnażania wirusa grypy przez antysensowe oligonukleotydy określono za pomocą komórek MDCK lub MDCK-HA zainfekowanych wirusem grypy. W pierwszym etapie badań wykonano pasaż komórek. Następnie komórki namnażano przez 24 godziny, po czym przeprowadzono transfekcję oligonukleotydów antysensowych do komórek z użyciem lipofektaminy 2000. Transfekcje wykonywano równocześnie z wysianiem komórek na szalkę 96-dołkową (15 tysięcy komórek na dołek) tzw. transfekcja w roztworze. Oligonukleotydy wykorzystywano w stężeniu 4 μM lub 0,75 μM (w zależności od eksperymentu). Następnie, transfekowane komórki inkubowano przez 12 godzin w temperaturze 37°C w obecności 5% CO₂. Po tym czasie, zmieniono pożywkę i inkubację prowadzono przez kolejne 6 godzin. Następnie, wykonano infekcję komórek wybranym szczepem wirusa grypy, w zależności od użytej linii komórkowej (MOI = 0,01 dla A/California/04/2009 lub MOI = 0,001 dla

MATERIAŁY I METODY

jednocyklicznego wirusa A/California/04_NYICE_E3/2009). Jednocześnie prowadzono hodowlę kontrolną (kontrola 1: komórki nietransfekowane oligonukleotydami, infekowane wirusem grypy oraz kontrola 2: komórki poddane działaniu lipofektaminy 2000 oraz infekowane wirusem grypy). Dodatkowo stosowano kontrolę negatywną w postaci oligomeru AGACCUCUAUAGCAGCU (N), który zawiera modyfikacje typu 2'-O-metylo-RNA (94) oraz antysensowy oligonukleotyd Neg 5, komplementarny do rejonu heliakalnego 1262-1272 segmentu 5 RNA(+). Jako kontrolę pozytywną wykorzystano rybawiryneę w stężeniu 40 μ M dodawaną w medium postinfekcyjnym. Kolejnym etapem procedury była inkubacja komórek zainfekowanych wirusem grypy w temperaturze 33°C w obecności 5% CO₂. Dla jednocyklicznego wirusa grypy A/California/04_NYICE_E3/2009) oraz wirusa A/California/04/2009) czas inkubacji wynosił odpowiednio 66 i 24 godziny. W obu przypadkach czas był zgodny z okresem jaki wirus potrzebuje do przeprowadzenia trzech cykli replikacyjnych. Po tym czasie zbierano medium znad komórek, zawierające namnożone wirusy. Medium zamrażano w temperaturze -80°C lub od razu przystępowano do analizy metodą immunofluorescencyjną ze specyficznymi przeciwciałami.

II etap: metoda immunofluorescencyjna

W pierwszej fazie badań wysiano komórki na szalki 96-dołkowe (15 tysięcy na dołek). Następnie namnażano je przez 24 godziny. Po tym czasie, przygotowano dziesięciokrotne seryjne rozcieńczenia medium zawierającego potomne wirusy (zebrane w poprzednim etapie). Dokonywano infekcji komórek przygotowanymi roztworami wirusa, po której namnażano wirusy przez 8-10 lub 20-22 godzin w zależności od użytego szczepu wirusa grypy. Kolejnym etapem było usunięcie medium znad komórek i ich utrwalenie roztworem do utrwalania. Następnie utrwalone jądra komórkowe inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem (przeciwciało anty-NP). Stężenie użytego przeciwciała wynosiło 1 μ g/ml, inkubację prowadzono przez 2 godziny w temperaturze 37°C. Kolejnym etapem w procedurze była inkubacja z drugorzędowym przeciwciałem znakowanym fluorescencyjną izotiocyaniną (FITC). Przeciwciało drugorzędowe było nakierowane na monoklinalne przeciwciało anty-NP. Inkubację wykonano w temperaturze 37°C przez 1 godzinę. Po tym czasie wypłukano niezwiązane przeciwciało i zalano komórki 1x PBS-em. W końcowym etapie, utrwalone jądra komórkowe oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym, wybierano

rozcieńczenie wirusa do dokonania zliczenia wybarwionych, zainfekowanych jąder komórkowych. Określono miano wirusa korzystając ze wzoru:

$$\text{Ffu/ml} = \text{ilość wybarwionych, zainfekowanych jąder komórkowych} \times \text{rozcieńczenie wirusa} \times \text{ilość roztworu wirusa użyta do infekcji (ml)}$$

Następnie uzyskane wyniki porównano z kontrolą.

2.32. Określenie potencjału hamowania namnażania wirusa grypy przez oligonukleotydy antysensowe z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym

I etap: przygotowanie komórek, transfekcja, infekcja

Pierwszy etap wykonano podobnie do eksperymentu mającego na celu określenie potencjału inhibującego oligonukleotydów antysensowych z wykorzystaniem metody immunofluorescencyjnej. Zastosowano dwie zmiany: komórki wysiewano na szalki 6-dółkowe (580 tysięcy na dołek), w końcowym etapie zainfekowane komórki zalewano trizolem, a następnie przystępowano do izolacji totalnego RNA lub zamrażano próby w temperaturze -20°C .

II etap: technika PCR w czasie rzeczywistym

W celu wykonania reakcji PCR w czasie rzeczywistym, w pierwszym etapie wykonano izolację totalnego RNA metodą Chomczyńskiego-Sacchi. Następnie przeprowadzono proces DNazowania $500\ \mu\text{g}$ RNA z użyciem $2\ \text{U}$ DNazy I. Reakcję wykonano w $10\ \mu\text{l}$ buforu do DNazowania w temperaturze 37°C przez 30 minut. Kolejnym etapem było sprawdzenie jakości RNA na żelu agarozowym w warunkach denaturujących. Następnie pobierano $2\ \mu\text{l}$ mieszaniny RNA po DNazowaniu do reakcji odwrotnej transkrypcji ze specyficznym starterem RT. Po reakcji odwrotnej transkrypcji przeprowadzono 10-minutową inaktywację enzymu w temperaturze 75°C . Tak przygotowany cDNA ($1\ \mu\text{l}$) użyto jako matrycy w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Reakcję wykonano ze starterami QF oraz QR, oligonukleotyd Q wykorzystano, jako fluorescencyjną sondę TaqMan. Sondy oraz startery były komplementarne do konserwatywnego rejonu segmentu 7 vRNA. Do przeprowadzenia reakcji wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw do reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Reakcję wykonano w CFX96TM Real-Time System: C1000 TouchTM Thermal Cycler (BioRad). Każdy oligonukleotyd antysensowny testowano zarówno w 3 powtórzeniach biologicznych jak i technicznych. Do wyznaczenia krzywej standardowej użyto 10-

krotnie rozcieńczony segment 7 vRNA, który następnie DNazowano i przepisywano na cDNA. Wszystkie reakcje dotyczące standardu wykonywano równocześnie i w takich samych warunkach jak próby badane (124).

2.33. Określenie cytotoksyczności oligonukleotydów antysensownych

Do określenia cytotoksyczności oligonukleotydów antysensownych wykorzystano test redukcji soli tetrazolowej, który umożliwia pomiar aktywności przemian energetycznych w mitochondriach. W czasie testu dochodzi do redukcji soli tetrazolowej (MTT - substratu rozpuszczalnego w wodzie, o zabarwieniu białym lub żółtym) do nierozpuszczalnego formazanu (o zabarwieniu ciemnoniebieskim). Ilość barwnego zredukowanego MTT jest proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej mitochondriów komórki, a w ściśle określonych warunkach doświadczalnych do liczby aktywnych metabolicznie (żywych) komórek. Oligonukleotydy antysensowe badano w stężeniu od 0,1 do 4 μM na komórkach MDCK. Przygotowanie komórek oraz transfekcję wykonano tak jak w przypadku eksperymentów określania potencjału hamowania namnażania wirusa grypy przez oligonukleotydy antysensowe metodą immunofluorescencyjną. Jako kontrole stosowano komórki nie transfekowane oraz komórki traktowane samą lipofektaminą 2000. Po 18 godzinach od transfekcji (12 godzin inkubacji z antysensowymi oligonukleotydami, 6 godzin inkubacji ze zmienionym medium DMEM) zdjęto pożywkę i dodano 100 μl roztworu MTT w bezbarwnej pożywce DMEM (5mg/ml). Następnie prowadzono inkubację przez 2 godziny w temperaturze 37°C w środowisku o zachowanej 96% wilgotności oraz 5% CO₂. Po tym czasie zdjęto roztwór MTT z nad komórek i dodano 100 μl DMSO. Kryształki formazanu wytrząsano przez 10 minut, chroniąc przed światłem. Po tym czasie dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali 690 oraz 570 nm na czytniku płytek xMarkTM Microplate Spectrophotometr (BioRad). Pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda=570$ nm był dodatkowo zalecony przez producenta w celu korekty wyników o tło, pochodzące, m.in. od pozostałości komórek. Podczas obliczania wyników wartość absorbancji mierzona przy długości fali $\lambda=690$ nm była pomniejszana o wartość absorbancji mierzonej przy długości fali $\lambda=570$ nm.

2.34. Identyfikacja konserwatywnych motywów strukturalnych

Wszystkie pełne sekwencje segmentu 5 (odrzucono te, które miały niezdefiniowane nukleotydy) wirusa grypy zostały pobrane z bazy danych NCBI (ang. *National Center*

for Biotechnology Information) Influenza Virus Resorce (73). Następnie usunięto identyczne sekwencje. Z 2515 sekwencji do analizy w programie RNAz pozostawiono 100 sekwencji wybranych losowo (125, 126). Program analizował całą cząsteczkę dzieląc ją na fragmenty 120 nukleotydowe („window size”) z przeunięciem co 10 nukleotydów („step size”). Tak identyfikowano motywy strukturalne. Następnie region odpowiadający motywom strukturalnym został wycięty z całego zestawienia sekwencji (program *Geneious*) i wprowadzony do programu RNAalifold (74), który przewidział konsensusowe struktury drugorzędowe badanych fragmentów. Następnie określono stopień konserwatywności wygenerowanych modeli strukturalnych w oparciu o całe zestawienie unikatowych sekwencji wirusa grypy typu A. Analizy przeprowadził prof. Walter N. Moss (Iowa State University).

2.35. Określenie stopnia konserwatywności modeli struktury drugorzędowej w typie A wirusa grypy

Wszystkie pełne sekwencje segmentu 5 RNA(+) wirusa grypy zostały pobrane z bazy danych NCBI Influenza Virus Resorce (73). Następnie usunięto identyczne sekwencje oraz te, które miały niezdefiniowane nukleotydy. Wyselekcjonowane sekwencje zestawiono w programie MAFFT stosując algorytm FFT-NS-1 (116). W chwili wykonywania analiz było ich 15533. Konserwatywność struktury drugorzędowej wygenerowanego modelu pod względem możliwości występowania danych par zasad analizowano w programie Excel na podstawie tego zestawienia sekwencji. Analizę bioinformatyczną przeprowadził prof. Walter N. Moss (Iowa State University).

2.36. Przewidywanie struktur drugorzędowych badanych cząsteczek

Modele struktur drugorzędowych uzyskano używając programu RNAstructure 5.5. Reaktywności uzyskane korzystając z techniki SHAPE wprowadzono do programu używając funkcji „*read SHAPE reactivity - pseudo energy constraints*”. Silne modyfikacje uzyskane w skutek użycia metody mapowania chemicznego wprowadzono do programu, korzystając z funkcji „*chemical modification*”. Program stosował parametry „*slope*” oraz „*intercept*”, które wyniosły odpowiednio 1,6 oraz -0,6 kcal/mol (127).

2.37. Określenie prawdopodobieństwa występowania par zasad oraz rejonów jednoniciowych modeli struktur drugorzędowych badanych cząsteczek

Prawdopodobieństwo występowania określonej pary zasad oraz rejonów jednoniciowych modeli struktur drugorzędowych obliczono w programie RNAstructure 5.5, korzystając z funkcji „*partition function RNA*”. W obliczeniach wykorzystano dane pochodzące z mapowań chemicznych oraz techniki SHAPE. Uzyskaną macierz prawdopodobieństwa nałożono na model struktury drugorzędowej, stosując funkcję „*add probability color adnotations*” (128).

BIBLIOGRAFIA

- (1) Takahashi, T., Song, J.S., Suzuki, T., Kawaoka, Y. (2013) Mutations in NA That Induced Low pH-Stability and Enhanced the Replication of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza A Virus at an Early Stage of the Pandemic. *PLoS ONE* 8, e82740.
- (2) Mishra R.P.N., Pranchi P., Rappuoli R., Bagnoli F. (2012) Vaccines and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology* 15, 596-602.
- (3) Hawken, J., Troy, S.B. (2012) Adjuvants and inactivated polio vaccine: A systematic review. *Vaccine* 30, 6971-6979.
- (4) Betakova T.S.D., Gocnik M. (2013) Overview of measles and mumps vaccine: origin, present, and future of vaccine production. *Acta Virologica* 57, 91-96.
- (5) Lavanchy, D. (2012) Viral hepatitis: Global goals for vaccination. *J. Clinical Virology* 55, 296-302.
- (6) Bond, H.,S., Sullivan, S.G., Cowling, B.J. (2016) Regression approaches in the test-negative study design for assessment of influenza vaccine effectiveness. *Epidemiology and Infection* 144, 1601-1611.
- (7) Messiaen, P., Wensing, A.M., Fun, A., Nijhuis, M., Brusselaers, N., Vandekerckhove, L. (2013) Clinical use of HIV integrase inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 8, e52562.
- (8) Shen, Z., Lou, K., Wang, W. (2015) New small-molecule drug design strategies for fighting resistant influenza A. *Acta Pharmaceutica Sinica. B* 5, 419-430.
- (9) Clancy, S. (2008) Genetics of the Influenza Virus. *Nature Education* 1, 88.
- (10) Bouvier, N. M., and Palese, P. (2008) The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26, D49-D53.
- (11) Hengrung, N., Omari, K.E., Martin, I.S., Vreede, F.T., Cusack, S., Rambo R.P., Vonrhein, C., Bricogne, G., Stuart, D.I., Grimes, J.M., Fodor, E. (2015) Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from influenza C virus. *Nature* 5, 114-117.
- (12) Zheng, W., Tao, Y.J. (2013) Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. *FEBS Letters* 587, 1206-1214.
- (13) Liu, C., Hung, H., Lo, S., Chiang, C., Chen, I., Hsu, J.T.A., Hou, M. (2016) Using mutagenesis to explore conserved residues in the RNA-binding groove of influenza A virus nucleoprotein for antiviral drug development. *Scientific Reports* 6, 21662.
- (14) Akarsua, H., Iwatsuki-Horimoto, K., Nodac, T., Kawakami, E., Katsurab, H., Baudina, F., Horimoto, T., Kawaoka, Y. (2011) Structure-based design of NS2 mutants for attenuated influenza A virus vaccines. *Virus Research* 155, 240-248.
- (15) Yamayoshi, S., Watanabe, M., Goto, H., Kawaoka, Y. (2015) Identification of A Novel Viral Protein Expressed from the PB2 Segment of Influenza A Virus. *J. Virol.* 90, 444-56.
- (16) Shtyrya, Y.A., Mochalova, L.V., Bovin, N.V. (2009) Influenza Virus Neuraminidase: Structure and Function. *Acta Naturae. 1*, 26-32.
- (17) Righetto, I., Milani, A., Cattoli, G., Filippini, F. (2014) Comparative structural analysis of haemagglutinin proteins from type A influenza viruses: conserved and variable features. *BMC Bioinformatics* 15, 363-380.
- (18) Zhirnova, O.P., Manykina, A.A., Rossmann, J.S., Klenk, H.D. (2016) Intravirion cohesion of matrix protein M1 with ribonucleocapsid is a prerequisite of influenza virus infectivity. *Virology* 492, 187-196.

BIBLIOGRAFIA

- (19) Hu, Y., Liu, X., Zhang, A., Zhou, H., Liu, Z., Chen, Z., Jin M. (2015) CHD3 facilitates vRNP nuclear export by interacting with NES1 of influenza A virus NS2. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 971–982.
- (20) Chevalier Ch.L., Jamme, F., Leymarie, O., Réfrégiers, M., Delmas, B. (2016) Synchrotron Infrared and Deep UV Fluorescent Microspectroscopy Study of PB1-F2 β -Aggregated Structures in Influenza A Virus-infected Cells. *J. Biol. Chem.* 291, 9060-9072.
- (21) Shi, Y., Wu, Y., Zhang, W., Qi, J., Gao, G.F. (2014) Enabling the ‘host jump’: structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 822-31.
- (22) Gacharaa, G., Symekherb, S., Otienoa, M., Maganab, J., Opotc, B., Bulimo W. (2016) Whole genome characterization of human influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Kenya during the 2009 pandemic. *Infection, Genetics and Evolution* 40, 98–103.
- (23) Fournier, E., Moules, V., Essere, B., Paillart, J.-C., Sirbat, J.-D., Cavalier, A., Rolland, J.-P., Thomas, D., Lina, B., Isel, C., and Marquet, R. (2012) Interaction network linking the human H3N2 influenza A virus genomic RNA segments. *Vaccine* 30, 7359-67.
- (24) Skehel, J.J, Wiley, D.C.. (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 531–569.
- (25) Huang, Q., Sivaramakrishna, R.P., Ludwig, K., Korte, T., Bottcher, C, Herrmann, A. (2003) Early steps of the conformational change of influenza virus hemagglutinin to a fusion active state: stability and energetics of the hemagglutinin. *Biochim. Biophys. Acta* 1614, 3–13.
- (26) Pinto, L.H, Lamb, R.A. (2006) The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J Biol Chem* 281, 8997–9000.
- (27) Boulo, S., Akarsu, H., Ruigrok, R.W., Baudin, F. (2007) Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Research* 124, 12–21.
- (28) Deng T., Brownlee, G.G. (2006) Different de novo initiation strategies are used by influenza virus RNA polymerase on its cRNA and viral RNA promoters during viral RNA replication. *J. Virol.* 80, 2337–2348.
- (29) Plotch, S.J., Bouloy, M., Krug, R.M. (1979) Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 1618–1622.
- (30) Poon, L.L., Pritlove, D.C., Fodor, E., Brownlee, G.G. (1999) Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J. Virol.* 73, 3473–3476.
- (31) Lu, Y., Qian, X.Y., Krug, R.M. (1994) The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* 8, 1817–1828.
- (32) Boulo, S., Akarsu, H., Ruigrok, R.W., Baudin, F. (2007) Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Research* 124, 12-21.
- (33) Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Noda, T., Kiso, M., Maeda, J., Watanabe, S., Muramoto, Y., Fujii, K., Kawaoka, Y. (2006) The Cytoplasmic Tail of the Influenza A Virus M2 Protein Plays a Role in Viral Assembly. *J. Virol.* 80, 5233–5240.
- (34) Chlanda, P., Schraidta, O., Kummerb, S., Richesa, J., Oberwinklerb, H., Prinza, S., Kräusslichb, H., Briggsa J.A.G. (2015) Structural Analysis of the Roles of

BIBLIOGRAFIA

- Influenza A Virus Membrane-Associated Proteins in Assembly and Morphology. *J. Virology* 89, 8957-8966.
- (35) Mathews, D.H., Moss, W.N., and Turner, D.H., Folding and Finding RNA Secondary Structure. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2.
- (36) Westhof, E., Jaeger, L. (1996) RNA tectonics: towards RNA design. *Folding and Design 1*, R78–R88.
- (37) Balvay, L., Ricci, E.P., Decime, D., Ohlmann, T. (2009) Structural and functional diversity of Viral IRESes. *Biochem. Biophys. Acta* 1789, 542-557.
- (38) Soler, M.P.M., Malnou, C.E., Dhumeaux, D., Kean, K.M., Pawlotsky, J.M. (2002) Quasispecies heterogeneity and constraints on the evolution of the 5' noncoding region of hepatitis C virus (HCV): Relationship with HCV resistance to interferon-alpha therapy. *Virology* 298, 160–173.
- (39) Belsham, G.J., (2009) Divergent picornavirus IRES elements. *Virus Research* 139, 183–192.
- (40) Tsukiyama-Kohara, K.I.N., Kohara, M., Nomoto, A. (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol* 66, 1476–1483.
- (41) Friebe, P.L.V., Krieger, N., Bartenschlager, R. (2001) Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J. Virol.* 12047–1205.
- (42) Pestova, T.V., Shatsky, S.P., Fletcher, R.J., Jackson, C.U., Hellen, C.U. (1998) A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev.* 12, 67-83.
- (43) Ochs, K., Zeller, A., Saleh, L., Bassili, G., Song, Y., Sonntag, A., Niepmann, M. (2003) Impaired binding of standard initiation factors mediates poliovirus translation attenuation. *J Virol* 77, 115–122.
- (44) Kieft, J.S. (2008) Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends Biochem. Sci.* 33, 274-283.
- (45) Costantino, D.A., Pflingsten J.S., Rambo R.P., Kieft J.S. (2008) tRNA-mRNA mimicry drives translation initiation from a viral IRES. *Nat. Struct. Mol. Biol* 15, 57-64.
- (46) You S., Stump D.D., Branch A.D., Rice C.M. (2004) A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 78, 1352–1366.
- (47) Asit, K.M., Anuj, K., Upasana, R., Saumitra, D., Gautam, B., Siddhatha, R. (2012) A cyclic peptide mimic of an RNA recognition motif of human La protein is a potent inhibitor of hepatitis C virus. *Antiviral Research* 97, 223-226.
- (48) Liu, Y., Wimmer, E., Paul, A.V. (2009) Cis-acting RNA elements in human and animal plus-strand RNA viruses. *Biochim Biophys Acta* 1789, 495-517.
- (49) Gebhard, L.G., Filomatori, C.V., Gamarnik, A.V. (2011) Functional RNA Elements in the Dengue Virus Genome. *Virus* 3, 1739-1756.
- (50) Clyde, K., Barrera, J., Harris, E. (2008) The capsid-coding region hairpin element (cHP) is a critical determinant of dengue virus and west nile virus RNA synthesis. *Virology* 379, 314–323.
- (51) Le, S., Malim, M.H., Cullen, B.R., Maizel, J. (1990) A highly conserved RNA folding region coincident with the Rev response element of primate immunodeficiency viruses. *Nucl. Acids Res.* 18, 1613-1623.

BIBLIOGRAFIA

- (52) Fernandes, J.D., Jayaraman, B., Frankel, A.D. (2012) The HIV-1 Rev Response Element An RNA scaffold that directs the cooperative assembly of a homooligomeric ribonucleoprotein complex. *RNA Biology* 9, 6-11.
- (53) Salehi-Ashtiani, K., Lupták, A., Litovchick, A., Szostak, J.W. (2006) A genomewide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene. *Science* 313, 1788-1792.
- (54) Thaplyal, P., Ganguly, A., Hammes-Schiffer, S., Bevilacqua, P.C. (2015) Inverse Thio Effects in the Hepatitis Delta Virus Ribozyme Reveal that the Reaction Pathway Is Controlled by Metal Ion Charge Density. *Biochemistry* 54, 2160-2175.
- (55) Smit, M.H., Gultyaev, A.P., Hilge M., Bink, H.H.J., Barends, S., Kraal, B., Pleij, C.W.A. (2002) Structural variation and functional importance of a D-loopT-loop interaction in valine-accepting tRNA-like structures of plant viral RNAs. *Nucl. Acids Res.* 30, 4232–4240.
- (56) Gultyaev, A., Fouchier, R., Olsthoorn, R. (2010) Influenza virus RNA structure: unique and common features. *Rev. Immunol.* 29, 533-556.
- (57) Bae, S.H., Cheong, H.K., Lee, J.H., Cheong, C., Kainosho, M., and Choi, B.S. (2001) Structural features of an influenza virus promoter and their implications for viral RNA synthesis. *Proc. Nat. Acad. Scie.* 98, 10602-10607.
- (58) Cheong, H.K., Cheong, C., Choi, B.S. . (1996) Secondary Structure of the Panhandle RNA of Influenza Virus A Studied by NMR Spectroscopy. *Nucl. Acids Res.* 24, 4197-4201.
- (59) Park, C.J., Bae, S.H. (2003) Solution structure of the influenza A virus cRNA promoter: implications for differential recognition of viral promoter structures by RNA-dependent RNA polymerase. *Nucl. Acids Res.* 31, 2824-2832.
- (60) Rossman, J.S., Lamb, R.A. (2011) Influenza virus assembly and budding. *Virology* 411, 229–236.
- (61) Shih, S.R., and Krug, R.M. (1996) Novel exploitation of a nuclear function by influenza virus: The cellular SF2/ASF splicing factor controls the amount of the essential viral M2 ion channel protein in infected cells. *EMBO Journal* 15, 5415-5427.
- (62) Moss, W.N., Dela-Moss, L.I., Kierzek, E., Kierzek, R., Priore, S.F., and Turner, D.H. (2012) The 3' Splice Site of Influenza A Segment 7 mRNA Can Exist in Two Conformations: A Pseudoknot and a Hairpin. *PLoS ONE* 7, e38323.
- (63) Gultyaev, A.P., and Olsthoorn, R.C.L. (2010) A family of non-classical pseudoknots in influenza A and B viruses. *RNA Biology* 7, 125-129.
- (64) Jiang, T., Kennedy, S.D., Moss, W.N., Kierzek, E., Turner, D.H., (2014) Secondary Structure of a Conserved Domain in an Intron of Influenza A M1 mRNA. *Biochemistry* 53, 5236–5248.
- (65) Ilyinskii, P.O., Schmidt, T., Lukashov, D., Meriin, A.B., Thodis, G., Frishman, D., and Shneider, A.M. (2009) Importance of mRNA Secondary Structural Elements for the Expression of Influenza Virus Genes. *Omicron-a Journal of Integrative Biol.* 13, 421-430.
- (66) Moss, W.N., Priore, S.F., and Turner, D.H. (2011) Identification of potential conserved RNA secondary structure throughout influenza A coding regions. *RNA* 17, 991-1011.
- (67) Priore, S.F., Kierzek, E., Kierzek, R., Baman, J., Moss, W.N., Dela-Moss, L.I., and Turner, D.H. (2013) Secondary Structure of a Conserved Domain in the Intron of Influenza A NS1 mRNA. *PLoS ONE* 8, e70615.

BIBLIOGRAFIA

- (68) Lenartowicz, E., Keszy, J., Ruskowska, A., Soszynska-Jozwiak, M., Michalak, P., Moss, W.N., Turner, D.H., Kierzek, R., Kierzek, E. (2016) Self-Folding of Naked Segment 8 Genomic RNA of Influenza A Virus. *PLoS ONE* 11, e0148281.
- (69) Gultyaev, A.P., Tsyganov-Bodounov, A., Spronken, M., van der Kooij, S., Fouchier, R.A., Olsthoorn, R.C. (2014) RNA structural constraints in the evolution of the influenza A virus genome NP segment. *RNA Biology* 11, 942-52.
- (70) Jarczak, D., Kofr, M., Beger, C., Manns, M.P., Kruger, M. (2005) Harpin ribozymes in combination with siRNAs against highly conserved hepatitis C virus sequence inhibit RNA replication and protein translation from hepatitis C virus subgenomic replicons. *FEBS J* 272, 5910-5922.
- (71) Biswas, N., Wang, T., Ding, M., Tumer, A., Chen, Y., Wang, Q., Gupta, P. (2012) ADAR1 is a novel multi targeted anti-HIV-1 cellular protein. *Virology* 422, 265-77.
- (72) Lenartowicz, E., Nogales, A., Kierzek, E., Kierzek, R., Martínez-Sobrido L., Turner D.H. (2016) Antisense Oligonucleotides Targeting Influenza A Segment 8 Genomic RNA Inhibit Viral Replication. *Nucleic Acid Therapeutics*
- (73) Bao, Y., Bolotov, P., Dernovoy, D., Kiryutin, B., Zaslavsky, L., Tatusova, T., Ostell, J., and Lipman, D. (2008) The influenza virus resource at the national center for biotechnology information. *J. Virol.* 82, 596-601.
- (74) Bernhart, S.H., Hofacker, I.L., Will, S., Gruber, A.R., and Stadler, P.F. (2008) RNAalifold: improved consensus structure prediction for RNA alignments. *BMC Bioinformatics* 9, 474.
- (75) Nixon P.L., Theimer C.A., Giedroc D.P., (1999) Thermodynamics of stabilization of RNA pseudoknots by cobalt(III) hexaammine. *Biopolymers* 50, 443-458.
- (76) Gonzalez, R.L., Tinoco, I. (1999) Solution structure and thermodynamics of a divalent metal ion binding site in an RNA pseudoknot. *J. Mol. Biol.* 289, 1267-1282.
- (77) Reuter, J.S., Mathews, D.H. (2010) RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics* 11, 111-129.
- (78) Mathews, D.H., Disney, M.D., Childs, J.L., Schroeder, S.J., Zuker, M., and Turner, D.H. (2004) Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101, 7287-7292.
- (79) Kierzek, E., Kierzek, R., Moss, W.N., Christensen, S.M., Eickbush, T.H., and Turner, D.H., (2008) Isoenergetic penta- and hexanucleotide microarray probing and chemical mapping provide a secondary structure model for an RNA element orchestrating R2 retrotransposon protein function. *Nucl. Acids Res.* 36, 1770-1782.
- (80) Kierzek, E., Christensen, S.M., Eickbush, T.H., Kierzek, R., Turner, D.H., and Moss, W.N. (2009) Secondary structures for 5' regions of R2 retrotransposon RNAs reveal a novel conserved pseudoknot and regions that evolve under different constraints. *J. Mol. Biol.* 390, 428-442.
- (81) Pasternak, A., Kierzek, E., Pasternak, K., Turner, D.H., and Kierzek, R. (2007) A chemical synthesis of LNA-2,6-diaminopurine riboside, and the influence of 2'-O-methyl-2,6-diaminopurine and LNA-2,6-diaminopurine ribosides on the thermodynamic properties of 2'-O-methyl RNA/RNA heteroduplexes. *Nucl. Acids Res.* 35, 4055-4063.

BIBLIOGRAFIA

- (82) Pasternak, A., Kierzek, E., Pasternak, K., Fratzczak, A., Turner, D.H., and Kierzek, R. (2008) The thermodynamics of 3'-terminal pyrene and guanosine for the design of isoenergetic 2'-O-methyl-RNA-LNA chimeric oligonucleotide probes of RNA structure. *Biochemistry* 47, 1249-1258.
- (83) Kierzek, E., Ciesielska, A., Pasternak, K., Mathews, D.H., Turner, D.H., and Kierzek, R. (2005) The influence of locked nucleic acid residues on the thermodynamic properties of 2'-O-methyl RNA/RNA heteroduplexes. *Nucl. Acids Res.* 33, 5082-5093.
- (84) Kierzek, E., Fratzczak, A., Pasternak, A., Turner, D.H., and Kierzek, R. (2007) Isoenergetic RNA microarrays, a new method to study the structure and interactions of RNA. *International Proceedings Division*, 25-30.
- (85) Kierzek, E. (2009) Binding of Short Oligonucleotides to RNA: Studies of the Binding of Common RNA Structural Motifs to Isoenergetic Microarrays. *Biochemistry* 48, 11344-11356.
- (86) Fratzczak, A., Kierzek, R., and Kierzek, E. (2011) Isoenergetic Microarrays To Study the Structure and Interactions of DsrA and OxyS RNAs in Two- and Three-Component Complexes. *Biochemistry* 50, 7647-7665.
- (87) Kierzek, E., Kierzek, R., Turner, D.H., and Catrina, I. E. (2006) Facilitating RNA structure prediction with microarrays. *Biochemistry* 45, 581-593.
- (88) Liu, Y., Eckard, W., Aniko, V.P., (2009) Cis-acting RNA elements in human and animal plus-strand RNA viruses. *Biochim. Biophys. Acta* 9-10, 495-517.
- (89) Simon, A.E., Gehrke, L., (2009) RNA conformational changes in the life cycles of RNA viruses, viroids, and virus associated RNAs. *Biochim. Biophys. Acta* 9-10, 571-583.
- (90) Mizuta, T., Fujiwara, M., Hatta, T., Abe, T., Miyano-Kurosaki, N., Shigeta, S., Yokota, T., and Takaku, H. (1999) Antisense oligonucleotides directed against the viral RNA polymerase gene enhance survival of mice infected with influenza A. *Nature Biotechnology* 17, 583-587.
- (91) Ge, Q., Pastey, M., Kobasa, D., Puthavathana, P., Lupfer, C., Bestwick, R.K., Iversen, P.L., Chen J, Stein, D.A. (2006) Inhibition of multiple subtypes of influenza A virus in cell cultures with morpholino oligomers. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 50, 3724-33.
- (92) Wu, Y., Zhang, G., Li, Y., Jin, Y., Dale, R., Sun, L.-Q., and Wang, M. (2008) Inhibition of highly pathogenic avian H5N1 influenza virus replication by RNA oligonucleotides targeting NS1 gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 365, 369-374.
- (93) Kamal, M.A., Gieschke, R., Lemenuel-Diot, A., Beauchemin, C.A., Smith P.F., Rayner, C.R., (2015) A drug-disease model describing the effect of oseltamivir neuraminidase inhibition on influenza virus progression. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 59, 5388-95.
- (94) Zhang, T., Wang, T.-C., Zhao, P.-S., Liang, M., Gao, Y.-W., Yang, S.-T., Qin, C., Wang, C.-Y., and Xia, X.-Z. (2011) Antisense oligonucleotides targeting the RNA binding region of the NP gene inhibit replication of highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *International Immunopharmacology* 11, 2057-2061.
- (95) Kumar, B., Khanna, M., Kumar, P., Sood, V., Vyas, R., Banerjea, A.C., (2012) Nucleic Acid-Mediated Cleavage of M1 Gene of Influenza A Virus Is Significantly Augmented by Antisense Molecules Targeted to Hybridize Close to the Cleavage Site. *Molecular Biotechnology* 5, 27-36.

BIBLIOGRAFIA

- (96) Li, W., Yang, X., Jiang, Y., Wang, B., Yang, Y., Jiang, Z., and Li, M. (2011) Inhibition of influenza A virus replication by RNA interference targeted against the PB1 subunit of the RNA polymerase gene. *Archives of Virology* 156, 1979-1987.
- (97) Ge, Q., Filip, L., Bai, A.L., Nguyen, T., Eisen, H.N., and Chen, J., (2004) Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101, 8676-8681.
- (98) Ge, Q., McManus, M.T., Nguyen, T., Shen, C.H., Sharp, P.A., Eisen, H.N., and Chen, J.Z. (2003) RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100, 2718-2723.
- (99) Martelli, F., Salata, C., Calistri, A., Parolin, C., Azzi, A., Palù, G., Giannecchini, S. (2015) Small RNAs targeting the 5'-end of the viral polymerase gene segments specifically interfere with influenza type A virus replication. *J. Biotechnol.* 210, 85–90.
- (100) Zhang, T., Zhao, P.-S., Zhang, W., Liang, M., Gao, Y.-W., Yang, S.-T., Wang, T.-C., Qin, C., Wang, C.-Y., and Xia, X.-Z. (2011) Antisense oligonucleotide inhibits avian influenza virus H5N1 replication by single chain antibody delivery system. *Vaccine* 29, 1558-1564.
- (101) Giannecchini, S., Wise, H.M., Digard, P., Clausi, V., Del Poggetto, E., Vesco, L., Puzelli, S., Donatelli, I., and Azzi, A. (2011) Packaging signals in the 5'-ends of influenza virus PA, PB1, and PB2 genes as potential targets to develop nucleic-acid based antiviral molecules. *Antiviral Res.* 92, 64-72.
- (102) Bai, H., You, Y., Bo, X., Wang, S. (1998) Antisense antivirals: future oligonucleotides-based therapeutics for viral infectious diseases. *Antivir. Chem. Chemother.* 9, 253-62.
- (103) Deryabin, P.G., Galegov, G.A., Konstantinova, I.D., Muzyka, I.S., Miroshnikov, A., L'vov, D.K. (2014) The combination of ribavirin and ozeltamivir effectively inhibits reproduction of influenza A virus resistant to rimantadine (amantadine) in vitro and in vivo. *Dokl. Biochem. Biophys.* 455, 80-83.
- (104) Ozawa, M., Fujii, K., Muramoto, Y., Yamada, S., Yamayoshi, S., Takada, A., Goto, H., Horimoto, T., Kawaoka, Y. (2007) Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication. *J. Virol.* 81, 30-41.
- (105) Gultyaev, A.P., Fouchier, R.A.M., and Olsthoorn, R.C.L. (2010) Influenza Virus RNA Structure: Unique and Common Features. *Inter. Rev. Imm.* 29, 533-556.
- (106) Zhang, T., Wang, T., Zhao, P., Liang, M., Gao, Y., Yang, S., Qi, C. (2011) Antisense oligonucleotides targeting the RNA binding region of the NP gene inhibit replication of highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *Int Immunopharmacol* 11, 2057-61.
- (107) Gabriel, G., Nordmann, A., Stein, D.A., Iversen, P.L., Klenk, H.D. (2008) Morpholino oligomers targeting the PB1 and NP genes enhance the survival of mice infected with highly pathogenic influenza A H7N7 virus. *J. Gen. Virol.* 89, 939-48.
- (108) Abe, T., Suzuki, S., Hatta, T., Takai, K., Yokota, T., Takaku, H. (2008) Specific inhibition of influenza virus RNA polymerase and nucleoprotein gene expression by liposomally encapsulated antisense phosphorothioate oligonucleotides in MDCK cells. *J. Gen. Virol.* 89, 939-48.

BIBLIOGRAFIA

- (109) Brinson, R.G., Szakal, A.L., Marino, J.P. (2011) Structural Characterization of the Viral and cRNA Panhandle Motifs from the Infectious Salmon Anemia Virus. *J. Virol.* 85, 13398–13408.
- (110) Trani, L., Bedini B., Cordioli, P., Muscillo, M., Vignolo, E., Moreno, A., Tollis, M. (2004) Molecular characterization of low pathogenicity H7N3 avian influenza viruses isolated in Italy. *Avian Dis* 48, 376-83.
- (111) Anchlan, D., Ludwig, S., Nymadawa, P., Mendsaikhan, J., Scholtissek, C. (1996) Previous H1N1 influenza A viruses circulating in the Mongolian population. *Arch. Virol.* 141, 1553-69.
- (112) Watts, J. M., Dang, K.K., Gorelick, R.J., Leonard, C.W., Bess, J.W., Swanstrom, R., Burch, C.L., and Weeks, K.M. (2009) Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature* 460, 711-U87.
- (113) Lai, D., Proctor, J.R., Meyer, I.M. (2016) On the importance of cotranscriptional RNA structure formation. *RNA* 19, 1461-1473.
- (114) Enami, K., Sato, T.A., Nakada, S., Enami, M. (1994) Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J. Virol.* 68, 1432–1437.
- (115) Park, Y.W., Wilusz, J., Katze, M.G. (1999) Regulation of eukaryotic protein synthesis: Selective influenza viral mRNA translation is mediated by the cellular RNA-binding protein GRSF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 6694–6699.
- (116) Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucl. Acids Res.* 30, 3059-3066.
- (117) Martinez-Sobrido, L., Cadagan, R., Steel, J., Basler, C.F., Palese, P., Moran, T. M., and Garcia-Sastre, A. (2010) Hemagglutinin-Pseudotyped Green Fluorescent Protein-Expressing Influenza Viruses for the Detection of Influenza Virus Neutralizing Antibodies. *J. Virology* 84, 2157-2163.
- (118) Baker, S.F., Guo, H., Albrecht, R.A., Garcia-Sastre, A., Topham, D.J., Martinez-Sobrido, L. (2013) Protection against Lethal Influenza with a Viral Mimic. *J. Virol.* 87, 8591–605.
- (119) Xia, T., SantaLucia, J., Burkard, M.E., Kierzek, R., Schroeder, S.J., Jiao, X.Q., Cox, C., and Turner, D.H. (1998) Thermodynamic parameters for an expanded nearest-neighbor model for formation of RNA duplexes with Watson-Crick base pairs. *Biochemistry* 37, 14719-14735.
- (120) Kierzek, E., and Kierzek, R. (2003) The thermodynamic stability of RNA duplexes and hairpins containing N-6-alkyladenosines and 2-methylthio-N-6-alkyladenosines. *Nucl. Acids Res.* 31, 4472-4480.
- (121) Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- (122) Chomczynski, P., Sacchi, N. (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 1, 581-585.
- (123) Vasa, S., M., Guex, N., Wilkinson, K.,A., Weeks K.M., Giddings M.G. (2008) ShapeFinder: A software system for high-throughput quantitative analysis of nucleic acid reactivity information resolved by capillary electrophoresis. *RNA* 14, 1979–1990.
- (124) Vestera, D., Lagodaa, A., Hoffmannb, D., Seitz C., Heldtc S, Bettenbrockd, K., Genzelc, Y., Reichl, U. (2010) Real-time RT-qPCR assay for the analysis of human influenza A virus transcription and replication dynamics. *J. Virol. Methods* 168, 63-71.

BIBLIOGRAFIA

- (125) Gruber, A.R., Findeiss, S., Washietl, S., Hofacker, I.L., Stadler, P.F. (2010) RNAz 2.0: improved noncoding RNA detection. *Pac Symp Biocomp* 15, 69–79.
- (126) Gruber, A.R., Neuboeck, R., Hofacker, I.L., Washietl, S. (2007) The RNAz web server: prediction of thermodynamically stable and evolutionarily conserved RNA structures. *Nucl. Acids Res.* 35, W335–W8.
- (127) Deigan, K., E., Mathews, D.H., Weeks, K.M. (2009) Accurate SHAPE-directed RNA structure determination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 97-102.
- (128) Mathews, D.H. (2004) Using an RNA secondary structure partition function to determine confidence in base pairs by free energy minimization *RNA* 10, 1178-1190.