

INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK W POZNANIU

Elżbieta Lenartowicz

**BADANIA STRUKTURY SEGMENTU 8 RNA  
WIRUSA GRYPY NAKIEROWANE NA INHIBICJĘ JEGO  
NAMNAŻANIA**

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

Promotor:

dr hab. Elżbieta Kierzek, prof. IChB PAN

POZNAŃ 2014

*Pani Profesor Elżbiecie Kierzek*  
*serdecznie dziękuję*  
*za opiekę naukową nad moją rozprawą doktorską,*  
*za okazaną pomoc, cierpliwość i wyrozumiałość.*

*Wszystkim Współpracownikom*  
*z Zespołu Genomiki Strukturalnej RNA*  
*oraz byłej Pracowni Chemii RNA*  
*dziękuję za wszelką pomoc i niepowtarzalną atmosferę pracy.*

*Pracę dedykuję mojemu Bogu i Rodzicom,  
dziękując za miłość, wsparcie i to kim dziś jestem.*

<b>CEL PRACY .....</b>	<b>4</b>
<b>STRESZCZENIE .....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>12</b>
<b>I WSTĘP LITERATUROWY.....</b>	<b>15</b>
1. WIRUS GRYPY - WIADOMOŚCI OGÓLNE .....	15
2. BIOLOGIA WIRUSA GRYPY .....	17
2.1. Budowa wirionu wirusa grypy .....	18
2.2. Cykl replikacyjny wirusa grypy .....	20
3. ROLA STRUKTURY RNA W POSZCZEGÓLNYCH ETAPACH NAMNAŻANIA WIRUSA GRYPY .....	24
3.1. Rola struktury RNA w transkrypcji i replikacji .....	24
3.2. Rola struktury RNA w ekspresji białek.....	26
3.3. Rola struktury RNA w translacji.....	29
3.4. Rola struktury RNA w składaniu wirionu potomnego.....	29
4. RNA WIRUSA GRYPY JAKO CEL TERAPEUTYCZNY.....	34
4.1. Oligonukleotydy antysensowe .....	35
4.2. Katalityczne kwasy nukleinowe.....	38
4.3. Małe interferujące RNA (siRNA) .....	40
<b>II WYNIKI I DYSKUSJA.....</b>	<b>42</b>
1. BADANIE STRUKTURY SEGMENTU 8 vRNA WIRUSA GRYPY TYPU A.....	42
1.1. Otrzymywanie vRNA8 .....	42
1.3.1. Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej vRNA8 metodą SHAPE .....	48
1.3.2. Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej vRNA8 siarczanem dimetylu.....	49
1.3.3. Struktura drugorzędowa vRNA8 – CM-vRNA8.....	51
1.3.4. Prawdopodobieństwo występowania par zasad i niesparowań w modelu CM-vRNA .....	55
1.4. Strukturalno-sekwencyjna analiza bioinformatyczna .....	57
1.4.1. Struktura drugorzędowa vRNA8 – CMC-vRNA8 .....	58
1.4.2. Prawdopodobieństwo występowania par zasad i niesparowań w modelu CMC-vRNA .....	59
1.5. Izoenergetyczne mikromacierze RNA .....	62
1.5.1. Mapowanie mikromacierzowe vRNA8.....	63
1.6. Hydroliza vRNA8 z udziałem RNazy H .....	73
1.7. Porównanie struktur drugorzędowych CM-vRNA8 i CMC-vRNA8.....	77
1.8. Indukowanie cięć vRNA8 w obecności rodnika hydroksylowego.....	78
1.9. Fragment 661-814 vRNA, jako substrat dla enzymów z rodziny ADAR .....	82
1.10. Potencjalne oddziaływania trzeciorzędowe w vRNA8 .....	84
1.11. Podsumowanie badań struktury vRNA8 wirusa grypy typu A. ....	86
2. BADANIE STRUKTURY DRUGORZĘDOWEJ MODELOWYCH FRAGMENTÓW vRNA8 .	89
2.1. Badanie struktury drugorzędowej mini-vRNA8 .....	89
2.1.1. Otrzymywanie cząsteczki mini-vRNA8.....	89
2.1.2. Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej mini-vRNA8 metodą SHAPE.....	90
2.1.3. Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej mini-vRNA8 siarczanem dimetylu .....	91
2.1.4. Struktura drugorzędowa mini-vRNA8.....	93
2.1.5. Mapowanie mikromacierzowe mni-vRNA8 .....	97
2.2. Badanie struktury drugorzędowej krótkich fragmentów modelowych vRNA8 .....	103
2.2.1. Otrzymywanie cząsteczki modelowej M1-RNA.....	103
2.2.2. Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej M1-RNA metodą SHAPE .....	104

2.2.3.	Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej M1-RNA siarczanem dimetylu.....	104
2.2.4.	Struktura drugorzędowa M1-RNA.....	105
2.2.5.	Otrzymywanie modelowych cząsteczek M2-RNA i M3-RNA .....	108
2.2.6.	Ograniczona hydroliza M2-RNA w obecności jonów ołowiu (II) .....	108
2.2.7.	Mapowanie mikromacierzowe M2-RNA.....	109
2.2.9.	Struktura drugorzędowa M2-RNA.....	111
2.2.10.	Ograniczona hydroliza M3-RNA w obecności jonów ołowiu (II) .....	112
2.2.11.	Mapowanie mikromacierzowe M3-RNA.....	112
2.2.12.	Struktura drugorzędowa M3-RNA.....	114
2.2.13.	Podsumowanie badań struktury drugorzędowej modelowych fragmetnów vRNA8 .....	115
3.	WYKORZYSTANIE BADAŃ STRUKTURALNYCH SEGMENTU 8 vRNA WIRUSA GRYPY W PROJEKTOWANIU OLIGONUKLEOTYDÓW ANTYSSENSOWYCH.....	116
3.1.	Projektowanie oligonukleotydów antysensowych .....	116
3.2.	Badania na liniach komórkowych MDCK .....	124
3.3.	Oligonukleotydy antysensowe – podsumowanie .....	130
<b>III PODSUMOWANIE .....</b>		<b>133</b>
<b>IV MATERIAŁY I METODY .....</b>		<b>138</b>
1.	MATERIAŁY .....	138
1.1.	Enzymy .....	138
1.2.	Gotowe zestawy do badań biochemicznych.....	138
1.3.	Izotop promieniotwórczy .....	138
1.4.	Odczynniki.....	138
1.5.	Oligonukleotydy .....	139
1.6.	Plazmidy .....	146
1.7.	Roztwory, bufor i pożywki .....	146
1.8.	Wzorce długości kwasów nukleinowych .....	148
2.	METODY .....	148
2.1	Synteza oligonukleotydów .....	148
2.2.	Odblokowywanie i oczyszczanie oligodeoksyrybonukleotydów oraz modyfikowanych oligonukleotydów.....	149
2.3.	Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) .....	149
2.4.	Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych .....	149
2.5.	Elucja kwasów nukleinowych z żeli poliakrylamidowych .....	150
2.6.	Strącanie kwasów nukleinowych .....	150
2.7.	Spektrometria mas .....	150
2.8.	Obliczanie stężeń kwasów nukleinowych.....	151
2.9.	Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach agarozowych .....	151
2.10.	Ekstrakcja fenol-chloroform .....	152
2.11.	Transformacja komórek bakteryjnych .....	152
2.12.	Oczyszczanie plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej.....	152
2.13.	Otrzymywanie matrycy do transkrypcji <i>in vitro</i> vRNA8.....	154
2.14.	Otrzymywanie matrycy do transkrypcji <i>in vitro</i> mini-vRNA8 .....	154
2.15.	Otrzymywanie matrycy do transkrypcji <i>in vitro</i> M1-RNA .....	158
2.16.	Transkrypcja <i>in vitro</i> cząsteczek RNA.....	160
2.17.	Znakowanie RNA izotopem <sup>32</sup> P.....	161
2.18.	Faldowanie RNA .....	162
2.19.	Preparatyka mikromacierzy izoenergetycznych.....	162
2.19.1.	Przygotowanie płytek do wydruku mikromacierzy.....	162
2.19.2.	Przygotowanie sond do drukowania mikromacierzy izoenergetycznej.....	163
2.19.3.	Drukowanie sond mikromacierzy .....	163
2.20.	Hybrydyzacja RNA do izoenergetycznych mikromacierzy .....	163

2.21.	Analiza komputerowa wyników mikromacierzowych.....	164
2.22.	Regeneracja mikromacierzy.....	164
2.23.	Mapowanie chemiczne RNA.....	164
2.23.1.	Metoda SHAPE (ang. selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension).....	164
2.23.2.	Modyfikacja chemiczna RNA z zastosowaniem siarczanu dimetylu (DMS).....	165
2.23.3.	Indukowanie cięć RNA w obecności jonów ołowiu (II).....	165
2.23.4.	Indukowanie cięć RNA w obecności rodnika hydroksylowego.....	165
2.24.	Hydroliza RNA z udziałem RNazy H.....	166
2.25.	Reakcja wydłużania starterów.....	166
2.26.	Analiza produktów reakcji wydłużania starterów.....	167
2.27.	Analiza produktów reakcji po separacji w żelach poliakrylamidowych.....	167
2.28.	Przewidywanie struktury drugorzędowej RNA.....	168
2.29.	Testy oligonukleotydów antysensowych <i>in vitro</i> na liniach komórkowych MDCK.....	168

## **V BIBLIOGRAFIA..... 170**

## **VI DODATEK ..... 180**

## **SPIS RYSUNKÓW I TABEL ..... 221**

SPIS RYSUNKÓW.....	221
SPIS TABEL.....	223

## CEL PRACY

Wirus grypy typu A corocznie wywołuje epidemie, a sporadycznie pandemie. Szacuje się, że z powodu grypy lub jej powikłań każdego roku umiera 250 000 do 500 000 osób. W profilaktyce choroby stosuje się szczepionki, jednakże, w związku z wysoką zmiennością antygenową wirusa, wymagają one ciągłego uaktualniania. W terapii grypy dostępnych jest jedynie kilka leków, które nakierowane są na oddziaływanie z białkiem powierzchniowym – neuraminidazą (oseltamiwir i zanamiwir) lub białkiem M2 stanowiącym kanał jonowy w otoczce wirusa (amantadyna i rymantadyna). W wyniku mutacji i reasortacji materiału genetycznego wirusa dochodzi do powstawania szczepów opornych na wymienione leki.

Materiał genetyczny wirusa grypy stanowi jednoniciowa, ujemnie spolaryzowana cząsteczka RNA (vRNA), która podzielona jest na 8 segmentów. Każdy segment koduje przynajmniej jedno, istotne w cyklu replikacyjnym wirusa, białko. Pojedynczy segment vRNA, wraz z oplatającym go białkiem NP i kompleksem wirusowej polimerazy, stanowi niezależną jednostkę transkrypcyjną i replikacyjną. Niewiele wiadomo o strukturach drugorzędowych cząsteczek RNA, które występują w cyklu replikacyjnym wirusa grypy. Zaproponowano jedynie strukturę niewielkich fragmentów, takich jak *panhandle* w vRNA i kilka motywów strukturalnych w mRNA. Jednocześnie sugeruje się, że struktura drugorzędowa odgrywa istotną rolę na wielu etapach powstawania potomnej cząstki wirusa.

Głównym celem niniejszej pracy było określenie struktury drugorzędowej segmentu 8 vRNA wirusa grypy (vRNA8). Uzyskane informacje o strukturze wykorzystano podczas projektowania oligonukleotydów antysensowych, które potencjalnie mogłyby hamować cykl replikacyjny wirusa grypy. Jako obiekt badań wybrano segment 8 vRNA szczepu A/VietNam/1203/2004 (H5N1). Szczegółowe cele badań były następujące:

1. Wykorzystanie mapowań chemicznych metodą SHAPE oraz z zastosowaniem siarczanu dimetylu w badaniach struktury drugorzędowej cząsteczki vRNA8.
2. Wykorzystanie metody mapowania mikromacierzowego z wykorzystaniem mikromacierzy izoenergetycznych RNA do weryfikacji struktury drugorzędowej i dostępnych miejsc jednoniciowych w vRNA8.

3. Przeprowadzenie analizy bioinformatycznej nakierowanej na poszukiwanie konserwatywnych motywów strukturalnych w vRNA segmentu 8. Motywy takie mogłyby stanowić uniwersalny cel terapeutyczny dla oligonukleotydów antysensowych.
4. zaproponowanie modelu struktury drugorzędowej vRNA8 na podstawie danych eksperymentalnych i bioinformatycznych.
5. zaprojektowanie i analiza struktury drugorzędowej modelowych fragmentów vRNA8 w celu udokładnienia struktury drugorzędowej pełnej długości cząsteczki.
6. Wyznaczenie rejonów w vRNA8, które pod względem dostępności w strukturze lub umiejscowienia w danym motywie strukturalnym stanowiłyby dobry cel dla oligonukleotydów antysensowych. Jak do tej pory, próby inhibicji wirusa grypy z zastosowaniem oligonukleotydów antysensowych nie były oparte na znajomości struktury drugorzędowej cząsteczek RNA wirusa grypy.



## STRESZCZENIE

Grypa corocznie wywołuje epidemie i sporadycznie – pandemie. Światowa Organizacja Zdrowia podaje, że każdego roku na grypę choruje 5-15% populacji ludzkiej, w tym u 3-5 milionów ludzi obserwuje się ciężki przebieg choroby, natomiast 250-500 tysięcy umiera z powodu infekcji lub powikłań pogrypowych. Czynnikiem etiologicznym wywołującym chorobę jest wirus grypy należący do rodziny *Orthomyxoviridae*, rodzaju *Influenzavirus*. Wyróżnić można trzy typy wirusa – A, B, C. Dodatkowo, typ A dzieli się na podtypy zgodnie z odmianą glikoprotein powierzchniowych (hemaglutyniny - H i neuraminidazy – N) występujących w otoczce wirusa. Opisano 18 wariantów H i 9 wariantów N, a kombinacja tych dwóch glikoprotein stanowi nazwę podtypu, np. H1N1, H5N1, czy H7N2.

Genom wirusa stanowi jednoniciowa ujemnie spolaryzowana cząsteczka RNA (vRNA) podzielona na 8 segmentów, która łącznie koduje 11 białek niezbędnych w cyklu replikacyjnym wirusa. Genomowe RNA oddziałuje z nukleoproteiną i trzema podjednostkami polimerazy tworząc kompleks rybonukleoproteinowy (vRNP, ang. *ribonucleoprotein complex*). Kompleks vRNP pojedynczego segmentu stanowi niezależną jednostkę replikacyjną i transkrypcyjną.

Informacje o strukturze drugorzędowej vRNA są ograniczone i dotyczą głównie końców 5' i 3' cząsteczki vRNA. Fragmenty te zbudowane są z odpowiednio 13 i 12 nukleotydów, które charakteryzują się wysoką zachowawczością sekwencyjną, zarówno wśród szczepów, jak i typów wirusa. Dodatkowo, wykazują one częściową, wzajemną komplementarność, w wyniku czego możliwe jest powstanie zamkniętej formy vRNA. Terminalne rejony odgrywają również istotną funkcję podczas cyklu replikacyjnego wirusa. Są one rozpoznawane przez wirusową polimerazę i stanowią swoisty dla niej promotor. Ponadto, różne struktury drugorzędowe tego regionu, powstające w kolejnych etapach namnażania wirusa, mogą brać udział w regulacji procesów transkrypcji i replikacji. Pomimo braku informacji o strukturze drugorzędowej cząsteczek vRNA postuluje się, że zawarte w niej motywy strukturalne są istotne podczas selektywnego pakowania vRNP do potomnego wirionu.

Obiektem badań przedstawionych w niniejszej pracy było genomowe RNA segmentu 8 wirusa grypy szczepu A/VietNam/1203/2004 (H5N1), które w dalszej

części określano skrótem vRNA8. Częsteczka ta, o długości 875 nukleotydów, koduje dwa białka, białko niestrukturalne (NS1, ang. *nonstructural protein*) oraz białko eksportu jądrowego (NEP, ang. *nuclear export protein*), które powstaje w wyniku alternatywnego składania mRNA NS1. Z uwagi na to, że vRNP pojedynczego segmentu tworzy niezależną jednostkę transkrypcyjną i replikacyjną, jak również z tego powodu, że vRNA odgrywa istotną rolę w procesie tworzenia potomnego wirionu, może ona stanowić interesujący cel terapeutyczny.

Badania rozpoczęto od mapowań chemicznych vRNA8 metodą SHAPE oraz z zastosowaniem siarczanu dimetylu (DMS, ang. *dimethyl sulfate*). Po wprowadzaniu uzyskanych wyników do programu *RNAstructure 5.3* wygenerowano strukturę drugorzędową nazwaną CM-vRNA8. Wirusowe RNA było wysoce ustrukturalizowane i zbudowane z czterech domen, z których domenę I stanowiły częściowo sparowane końce 3' i 5' tworzące motyw strukturalny *panhandle* opisany wcześniej w literaturze.

W drugim etapie badań wykonano porównanie strukturalno-sekwencyjne, w którym wykorzystano 8146 unikatowych sekwencji vRNA8 wirusa grypy typu A znajdujących się w bazie danych *NCBI*. Analizy bioinformatyczne wykazały obecność konserwatywnych par zasad w sześciu rejonach vRNA8: 261-270/279-288, 312-317/322-327, 632-636/645-649, 696-701/775-780, 704-713/767-758 oraz 736-740/744-748. Na podstawie uzyskanych wyników bioinformatycznych i eksperymentalnych został wygenerowany model struktury drugorzędowej CMC-vRNA8. Struktura drugorzędowa uległa przemodelowaniu w dwóch rejonach, w których wystąpiły zachowawcze fragmenty dwuniciowe (domena III, rejon 206-374 oraz domena IV, rejon 718-752).

W badaniach struktury drugorzędowej vRNA8 zastosowano również metodę hybrydyzacji RNA do sond oligonukleotydowych mikromacierzy izoenergetycznych. Wykorzystano 444 sondy komplementarne, krok po kroku, do badanego RNA. Sondami z biblioteki izoenergetycznej są 2'-O-metylowane pentamery i heksamery z modyfikacjami typu LNA oraz 2,6-diaminopurynorybozydem. Modyfikacje rybozy oraz reszty adenozyliny zaprojektowano tak, aby energia swobodna dupleksów hybrydyzacyjnych tworzonych z docelowym RNA była bardziej korzystna i wyrównana (izoenergetyczna). Idea mapowania mikromacierzowego opiera się na obserwacji, że pofałdowane, badane RNA może związać się z sondą oligonukleotydową tylko w rejonie, który nie jest uwikłany w strukturę drugorzędową. Za pomocą

modyfikowanych sond można określić dostępne rejony jednoniciowe w RNA, a więc uzyskać informacje o jego strukturze i jednocześnie miejscach silnie wiążących oligonukleotydy. Wyniki uzyskane tym sposobem wykazują dużą zgodność z modelem struktury drugorzędowej CMC-vRNA8, co potwierdza prawidłowość jego wymodelowania.

W celu weryfikacji modelu struktury drugorzędowej CMC-vRNA8 przeprowadzono także analizy bioinformatyczne. Przy pomocy programu *RNAstructure* oszacowano prawdopodobieństwo występowania określonych par zasad oraz niesparowanych nukleotydów. Największy stopień prawdopodobieństwa obserwowano w domenie IV. Wprowadzenie ograniczeń w postaci zachowawczych par zasad z analizy sekwencyjno-strukturalnej spowodowało także zwiększenie prawdopodobieństwa poszczególnych par zasad i niesparowanych nukleotydów w domenie III. Na podstawie analizy 8146 unikatowych sekwencji vRNA8 pochodzących z bazy danych przeprowadzono kolejną analizę bioinformatyczną weryfikującą strukturę CMC-vRNA8. Uzyskano wysoki procent występowania par zasad zaproponowanych w CMC-vRNA8 (średnio 87,4%) wśród wszystkich sekwencji vRNA segmentu 8 wirusa grypy typu A. Było ono wyższe o 0,4% w porównaniu z CM-vRNA8.

Cząsteczkę vRNA8 poddano również ograniczonym cięciom w obecności rodnika hydroksylowego. Metoda ta wносиła informację o trzeciorzędowym pofałdowaniu vRNA8. Analiza wykazała, że w vRNA8 dla wolnego rodnika dostępna była większość nukleotydów w regionach: 254-389, 405-461, 532-539, 630-647 oraz 750-820. Natomiast niedostępna była większość nukleotydów w regionach: 150-200, 217-235, 398-404, 526-531, 547-600 i 699-715.

W modelu struktury vRNA8 w rejonie 661-814 występował motyw strukturalny typu spinki do włosów. Wykazano, że struktury takie mogą być wydajnym substratem dla enzymów z rodziny ADAR, które katalizują deaminację hydrolityczną adenozy, w wyniku której powstaje inozyna. Analiza bioinformatyczna sekwencji tego rejonu wykazała, że 31 adenozy z udziałem ADAR może ulegać deaminacji do inozyny.

W zaproponowanej strukturze CMC-vRNA8 występowały rejony jednoniciowe nie wykazujące reaktywności podczas mapowania chemicznego. Analiza tych rejonów wykazała sześć regionów potencjalnie zaangażowanych w oddziaływanie trzeciorzędowe: 227-231/409-405 lub 226-231/533-528, 258-260/341-339, 426-430/852-848 lub 400-404/431-428,426 oraz 450-456/859-853.

W celu udokładnienia uzyskanej struktury drugorzędowej vRNA8 zaprojektowano 4 krótsze, modelowe cząsteczki: mini-vRNA8, M1-RNA, M2-RNA i M3-RNA. Cząsteczka mini-vRNA8 zbudowana z 376 nukleotydów i zawierała 182 nukleotydy z końca 5' vRNA8 oraz 188 z końca 3'. Postuluje się, że w rejonach do 150-200 nukleotydów w obu terminalnych regionach vRNA mogą występować sygnały pakowania cząsteczki do wirionu potomnego. M1-RNA (fragment domeny III, rejon 204-376) oraz M2-RNA (fragment domeny IV, rejon 694-782) zawierały motywy helikalne zbudowane z zachowawczych par zasad. Natomiast cząsteczka M3-RNA stanowiła fragment domeny IV obejmujący rejon 503-561. W modelu CMC-vRNA8 rejon ten tworzył strukturę typu spinki do włosów i zawierał miejsca wiązania sond mikromacierzowych. Dodatkowo, w regionie tym znaleziono sekwencję komplementarną do vRNA czterech innych segmentów.

Modelowe cząsteczki RNA poddano mapowaniu chemicznemu, jak również określono miejsca dostępne dla wiązania oligonukleotydów z użyciem mikromacierzy izoenergetycznych. W wygenerowanej strukturze drugorzędowej mini-vRNA8 zaobserwowano identyczne lub podobne motywy strukturalne do tych występujących w pełnej długości vRNA8. Zaproponowana struktura drugorzędowa modelowych cząsteczek (M1-RNA, M2-RNA, M3-RNA) potwierdziła duże prawdopodobieństwo odpowiednich motywów strukturalnych w vRNA pełnego segmentu 8.

Dzięki obecności tych samych elementów struktury drugorzędowej domen vRNA8 na 5' i 3' końcu, cząsteczka mini-vRNA8 mogłaby stanowić trzon wydajnego, nowego DI-RNA (ang. *Defecting Interfering RNA*). Wykazano, że zmutowane cząsteczki vRNA z delecją lub insercją w środkowej części sekwencji mają zdolność do replikacji i włączania do potomnych wirionów. DI-RNA stworzone na bazie mini-vRNA8 mogłoby służyć do wprowadzania genów reporterowych do komórki podczas badań związanych z wirusem grypy. Jednakże jej funkcjonalność należałoby potwierdzić w testach na liniach komórkowych. Wskazywałoby to na istotną rolę elementów struktury drugorzędowej zachowanych w mini-vRNA8.

Sugeruje się, że, tak jak w przypadku innych wirusów, struktura drugorzędowa vRNA ma istotne znaczenie podczas cyklu replikacyjnego, a jej ważne elementy strukturalne muszą być zachowane mimo ewolucyjnej zmienności wirusa grypy. W związku z tym, zaprojektowano 14 oligonukleotydów antysensowych (ASO) kierując się zaproponowaną strukturą drugorzędową vRNA8 [szczep

A/VietNam/1203/2004 (H5N1)], mapowaniem mikromacierzowym oraz regionami komplementarnymi pomiędzy vRNA poszczególnych segmentów.

Mikromacierze izoenergetyczne dostarczając informacji na temat rejonów jednoniciowych w cząsteczce, tym samym wskazały również dostępne miejsca dla wiązania oligonukleotydów antysensowych. Miejsca te dodatkowo były potwierdzone poprzez hydrolizę RNA z użyciem RNazy H. Informacja ta była istotna podczas projektowania oligonukleotydów antysensowych, jako potencjalnych inhibitorów cyklu replikacyjnego wirusa grypy. Jako miejsca wiązania sond oligonukleotydowych (środek wiązania w sekwencji vRNA8) określono następujące nukleotydy: 17, 68, 69, 117, 141, 142, 163, 169-171, 250, 253, 254, 275, 389, 390, 405, 407-412, 436, 534, 535, 537, 538, 575-577, 728-730 oraz 854.

W vRNA8 wykazano obecność rejonów komplementarnych do vRNA pozostałych siedmiu segmentów wirusa grypy, korzystając z programu *BLAST*. Wykazano, że rejon 513-539 posiada fragmenty komplementarne do vRNA czterech innych segmentów (segmentu 1, 3, 4 oraz 5). Występowały również trzy rejony (267-286, 572-589, 791-813) komplementarne do vRNA trzech segmentów (odpowiednio: segmentu 3, 5, 6, segmentu 3, 4, 5 oraz segmentu 3, 4, 6). Natomiast aż 11 fragmentów posiadało wspólną część komplementarną do dwóch innych segmentów: 30-51 (vRNA1 i vRNA7); 84-96 (vRNA1 i vRNA5); 163-176 (vRNA5 i vRNA7); 176-192, 306-318, 640-653 oraz 689-714 (vRNA4 i vRNA7); 220-231 (vRNA3 i vRNA5); 330-344, 623-634 (vRNA3 i vRNA7) oraz 770-785 (vRNA4 i vRNA6). Przypuszcza się, że regiony te mogą być odpowiedzialne za oddziaływania pomiędzy segmentami. Z tego powodu podczas projektowania ASO szczególną uwagę zwracano również na te rejony wirusowego RNA.

Aktywność zaprojektowanych oligonukleotydów antysensowych badano na linii komórkowej MDCK infekowanej wirusem grypy szczepu A/California/04/2009 (H1N1). Wykorzystywany w badaniach wirus w 2009 roku wywołał pandemię. Szczep ten wybrano ze względu na możliwość przeprowadzenia badań z wykorzystaniem naturalnego wirusa w laboratorium prof. Luisa Martinez-Sobrido (Wydział Mikrobiologii i Immunologii, Uniwersytet w Rochester, USA). Dodatkową zaletą jest model myszy do badań nad tym wirusem istniejący w tym samym laboratorium. Wszystkie ASO, z wyjątkiem oligomeru ASO 276-8C, które składały się z 2'-O-metylowanych oligonukleotydów wykazywały znaczącą inhibicję cyklu replikacyjnego wirusa w komórkach MDCK. Szczególnie wysoką aktywność wykazał

oligonukleotyd antysensowy 168-8U, który zmniejszał namnażanie wirusa do poziomu 3%. Zaobserwowano również, że oligomer G528-8U promował namnażanie wirusa w komórkach MDCK, zwiększając ilość wirusa do poziomu 189% w stosunku do kontroli. Zjawisko to wymaga jednak dodatkowych badań, w celu jego wyjaśnienia. Efekt wywoływany przez G528-8U mógłby być wykorzystany w wydajnym namnażaniu szczepów laboratoryjnych przy produkcji szczepionek i w celach naukowych.

Uzyskane wyniki inhibicji cyklu replikacyjnego wirusa wskazują na znaczenie funkcjonalne struktury drugorzędowej vRNA8. Zastosowana strategia, której punktem wyjścia jest model struktury drugorzędowej, może być podstawą projektowania efektywnych inhibitorowych oligonukleotydów nakierowanych na RNA wirusa grypy.

## ABSTRACT

Influenza is highly contagious disease, which occurs annually as epidemic and occasionally as pandemic. Influenza occurs globally with an annual attack rate estimated at 5%–10% in adults and 20%–30% in children. Illnesses can result in hospitalization and death mainly among high-risk groups (the very young, elderly or chronically ill). Worldwide, these annual epidemics are estimated to result in about 3 to 5 million cases of severe illness, and about 250 000 to 500 000 deaths.

Influenza is caused by virus that is a member of the *Orthomyxoviridae* family. Three types of the influenza virus can be distinguished: A, B and C. Additionally, the influenza A virus (IAV) is divided into subtypes based on two virus surface proteins (hemagglutinin – H, and neuraminidase – N). There are 18 different hemagglutinin and 9 different neuraminidase subtypes. The combination of these proteins forms the name of the subtypes e.g. H1N1, H5N1, H7N2.

The genome of influenza A virus consists of a negative-sense, single stranded viral RNA (vRNA) divided into 8 segments. It encodes 11 proteins, which are crucial in the viral life cycle. The vRNA together with nucleoprotein and three polymerase subunits forms ribonucleoprotein complex (vRNP). The single vRNP is the separate replication and transcription machinery.

The knowledge about secondary structure of vRNA is limited and concerns mainly the 5' and 3' ends. The termini consist of 13 and 12 nucleotides and they are highly conserved among the virus types and strains. Additionally, the 5' and 3' ends show partial complementarity which makes vRNA circular. The terminal regions of vRNA play important role in viral life cycle. They are recognized by viral polymerase and form its specific promoter. Moreover different secondary structures of these regions at a different stages of viral life cycle can take part in regulation of RNA replication and transcription. It is suggested that the secondary structure of vRNA plays significant role during selective viral packing. Due to the fact that vRNP is independent unit during transcription and replication of RNA and that the vRNA plays important role in packing of progeny virus, the vRNA can be interesting therapeutic target.

The aim of the study was to examine secondary structure of segment 8 vRNA (vRNA8) of Influenza A virus A/VietNam/1023/2004 (H5N1). Moreover, it was

intended to design the potential antisense oligonucleotides for virus inhibition. The molecule is 875 nucleotides long and encodes two proteins (nonstructural protein - NS1 and nuclear export signal - NEP). The proteins are produced as a result of alternative splicing of segment 8 mRNA.

The vRNA8 was chemically mapped using SHAPE method and dimethyl sulfate reagent. Additionally, the structure/sequence comparison was made. There were used 8146 unique sequences of vRNA8 from Influenza database in NCBI. Bioinformatic analysis revealed the presence of 6 regions in vRNA8 with conserved base pairs: 261-270/279-288, 312-317/322-327, 632-636/645-649, 696-701/775-780, 704-713/767-758 and 736-740/744-748. The model CMC-vRNA8 was generated after introduction of the consensus base pairs into RNAstructure 5.3 software together with chemical mapping data. The model called CMC-vRNA8 was highly structured and characterized by 4 domains. The domain I consists of partially complementary 5' and 3' ends, and was described previously in literature as *panhandle* motif.

Moreover, the isoenergetic microarrays mapping was used to study the secondary structure of vRNA8. The results are in agreement with CMC-vRNA8 secondary structure model and make it more accurate.

In order to verify the accuracy of the CMC-vRNA8 model, the bioinformatic analysis was made. Using RNAstructure5.3 software the probability of base pairing and the presence of single stranded fragments was calculated. The highest probability showed domain IV. The second bioinformatic analysis used to verify the CMC-vRNA8 model was analyzing the possible occurrence of base pairs proposed in the studied model among the entire segment 8 vRNA IAV. In this way the highest average percentage of canonical base pairs (87,4%) was obtained.

The hydroxyl radical cleavage of vRNA8 was made as well. The analysis showed that most of the nucleotides in regions: 254-389; 405-461; 532-539; 630-647; 750-820 were solvent accessible. Whereas most of the nucleotides in regions: 150-200; 217-235; 398-404; 526-531; 547-600; 699-715 were solvent inaccessible.

In the secondary structure of vRNA8 there was observed long hairpin structure (661-814). It is known that such structure could be an efficient substrate for ADAR enzymes. Bioinformatic analysis showed that 31 adenosine could be converted to inosine by ADAR enzymes.



Tertiary interactions were proposed to exist in CMC-vRNA8 model. There were six probable regions involved in such interactions: 227-231/409-405 or 226-231/533-528, 258-260/341-339, 426-430/852-848 or 400-404/431-428,426 and 450-456/859-853.

In order to refine the secondary structure of vRNA8, four model molecules (mini-RNA8; M1-RNA, M2-RNA and M3-RNA) were designed. The secondary structure of the model molecules and its accessibility for binding with oligonucleotides were studied using chemical mapping and isoenergetic microarrays. The mini-vRNA8 demonstrated the same or similar secondary structure motifs as was observed in entire vRNA8. The examined secondary structure of M1-RNA, M2-RNA and M3-RNA indicated that the adequate motifs in CMC-vRNA8 model were highly probable.

It was assumed that the secondary structure of vRNA played significant role during viral life cycle and the crucial elements should be preserved despite the evolution of the virus. Therefore it was decided to use the structural data of vRNA8 [strain A/VietNam/1203/2004 (H5N1)], microarray mapping and complementary regions between segments vRNA, in order to design antisense oligonucleotides (ASO).

Fourteen antisense oligonucleotides were designed to target A/California/04/2009 (H1N1) vRNA8 which caused pandemic in 2009. The strain was chosen due to the opportunity to do the research in MDCK cell line with natural virus in Luis Martinez-Sobrido laboratory (Department of Microbiology & Immunology, University of Rochester, USA). All, except one (ASO 276-8C), of the antisense oligonucleotides that consisted of 2'-O-methyl-RNA inhibit viral life cycle in MDCK cells. The viral multiplication decreased below 50% compared to control in the presence of oligonucleotides. Oligonucleotide 168-8U inhibited viral life cycle to 3%. The results of viral life cycle inhibition experiments indicate the functionality of the secondary structure of vRNA8. Applied strategy with particular consideration to secondary structure of viral RNA could give rise for design of efficient oligonucleotide inhibitors targeting the influenza virus RNA.

# I WSTĘP LITERATUROWY

## 1. Wirus grypy - wiadomości ogólne

Grypa, jako zakaźna choroba atakująca układ oddechowy, znana jest od czasów starożytnych. Jeden z pierwszych opisów epidemii grypy przedstawił Hipokrates w 412 roku p.n.e. (1). Wirus, jako czynnik etiologiczny wywołujący grypę, po raz pierwszy opisał Richard Shope w 1931 roku. Wyizolował on cząstki wirusa grypy z zainfekowanych płuc świni (2). Następnie, korzystając z metody Shope'a, w 1933 roku naukowcy z National Institute for Medical Research w Londynie opisali szczep wirusa wyizolowany z tkanek ludzkich (3).

Wirus grypy powoduje coroczne epidemie i sporadycznie pandemie. Światowa Organizacja Zdrowia podaje, że każdego roku na grypę choruje 5-15% populacji ludzkiej, w tym u 3-5 milionów ludzi obserwuje się ciężki przebieg choroby. Natomiast 250-500 tysięcy chorych umiera z powodu infekcji lub powikłań pogrypowych (4). W XX wieku odnotowano trzy groźne pandemie wywołane wirusami grypy typu A. W latach 1918-1919 była to grypa „hiszpanka”, której epicentrum znajdowało się w USA, a następnie rozprzestrzeniła się ona na cały świat. Szacuje się, że wirusem zainfekowanych było nawet 500 milionów ludzi, a około 50 milionów zmarło z powodu grypy lub powikłań pogrypowych. Była to najbardziej śmiertelna pandemia, w wyniku której umierali głównie młodzi ludzie. Grypę „hiszpankę” wywołał wirus grypy typu A podtyp H1N1 (5-7). Kolejną pandemią była grypa „azjatycka” w 1957 roku, wywołana przez podtyp wirusa H2N2. W jej wyniku zmarło w samych Stanach Zjednoczonych około 70 tysięcy osób. Niedługo później zaczął się rozprzestrzeniać kolejny groźny podtyp wirusa H3N2. Była to grypa „Hong Kong”, która spowodowała śmierć 34 tysięcy ludzi w USA. Obie te pandemie miały swoje źródło w południowej Azji (5, 7). Niektóre źródła wyróżniają jeszcze czwartą pandemię, która wystąpiła w 1977 roku, grypa „rosyjska”. Wywołał ją wirus grypy typu A podtyp H1N1 (5).

Jako pandemię XXI wieku, Światowa Organizacja Zdrowia ogłosiła grypę wywołaną przez krążącego od 2009 roku wirusa grypy typu A podtyp H1N1. Szacuje się, że wirus zainfekował około 42-86 milionów ludzi na całym świecie (7-9). Ciągłe obawy naukowców budzi również krążący w środowisku wirus grypy typu A podtyp

H5N1. Jest on wysoce patogenny, jednak nie nabył on, jak do tej pory, zdolności do transmisji pomiędzy ludźmi (7, 8, 10).

Gwałtowne rozprzestrzenianie się wirusa i wywołanie pandemii związane jest z obecnością na powierzchni wirionu dwóch białek – hemaglutyniny (HA) oraz neuraminidazy (NA), których nie rozpoznaje system immunologiczny człowieka. Opisano 18 różnych odmian serologicznych HA (16 pochodzenia ptasiego i dwa wyizolowane od nietoperza) oraz 9 NA. Naturalnym nosicielem wirusa grypy jest dzikie ptactwo. Podejrzewa się, że u tych zwierząt mogą występować wszystkie możliwe kombinacje opisanych białek powierzchniowych. Do tej pory zaobserwowano, że tylko trzy, spośród wszystkich kombinacji (H1N1, H2N2 oraz H3N2), posiada możliwość rozprzestrzeniania się pomiędzy ludźmi. Związane jest to z obecnością odpowiednich receptorów na powierzchni ludzkich komórek (5, 9, 11).

Zmienność wirusa zachodzi według dwóch zasadniczych mechanizmów. Pierwszym jest przesunięcie genetyczne (ang. *antigenetic drift*). Związane jest to ze stopniowym nagromadzeniem się mutacji punktowych głównie w genie kodującym hemaglutynina. Mechanizm ten jest dobrze opisany wśród ludzkich wirusów grypy i jest przyczyną corocznej zmienności wirusa. Skutkuje to koniecznością przystosowania nowej szczepionki. Drugim sposobem zmienności, który wykorzystuje wirus grypy jest skok antygenowy (ang. *antigenetic shift*). Jest on groźniejszy, gdyż wynikiem jest nagła zmiana antygenowa na powierzchni wirionu, co w konsekwencji może skutkować wybuchem pandemii. Skok antygenowy następuje na skutek przenoszenia się wirusa pomiędzy różnymi gatunkami. W międzygatunkowym przemieszczaniu się wirusa grypy typu A biorą udział wszy oraz świnie. Świnia stanowi naczynie mieszające. Jest ona podatna na infekcję zarówno wirusem pochodzenia ludzkiego, jak i ptasiego. Gdy dojedzie do jednoczesnej infekcji dwoma szczepami wirusa, może nastąpić reasortacja 8 niezależnych segmentów RNA (genom wirusa grypy typu A złożony jest z 8 segmentów RNA). W wyniku wymieszania się segmentów pochodzących od różnych szczepów istnieje możliwość pojawienia się 256 różnych genotypów wirusa grypy. Skok antygenowy stanowi więc istotny mechanizm różnorodności genetycznej wirusów grypy (5, 11, 12).

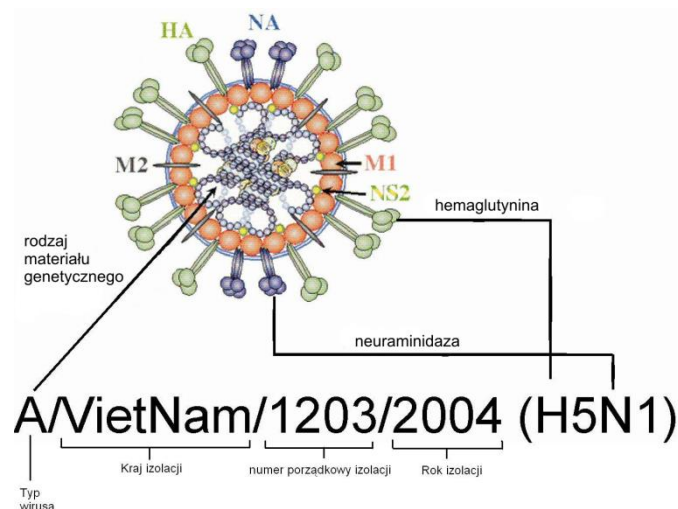
## 2. Biologia wirusa grypy

Wirus grypy należy do rodziny *Orthomyxoviridae*, rodzaju *Influenzavirus*. Ze względu na różnice antygenów powierzchniowych wyróżnić można 3 typy wirusa: A, B, C. Wirus grypy typu A wykazuje najwyższą patogenność i to on jest przyczyną występujących pandemii. Wśród wirusów grypy typu A wyróżnia się ponadto podtypy w zależności od odmiany hemaglutyniny i neuraminidazy występującej na powierzchni otoczki. Opisano 18 rodzajów hemaglutyniny (H1-H18) oraz 9 odmian neuraminidazy (N1-N9). Połączenie dowolnych wariantów białek powierzchniowych tworzy podtyp wirusa, np. H1N1, H5N1, H3N2 (5, 13).

Aby ułatwić nazewnictwo poszczególnych szczepów wirusa grypy, Światowa Organizacja Zdrowia ustanowiła standardową nomenklaturę. Zawiera ona:

- typ wirusa,
- gatunek, z którego wirus został wyizolowany (pomija się w przypadku izolacji wirusa z tkanek ludzkich),
- kraj izolacji,
- numer porządkowy izolacji,
- rok izolacji,
- podtyp wirusa (13).

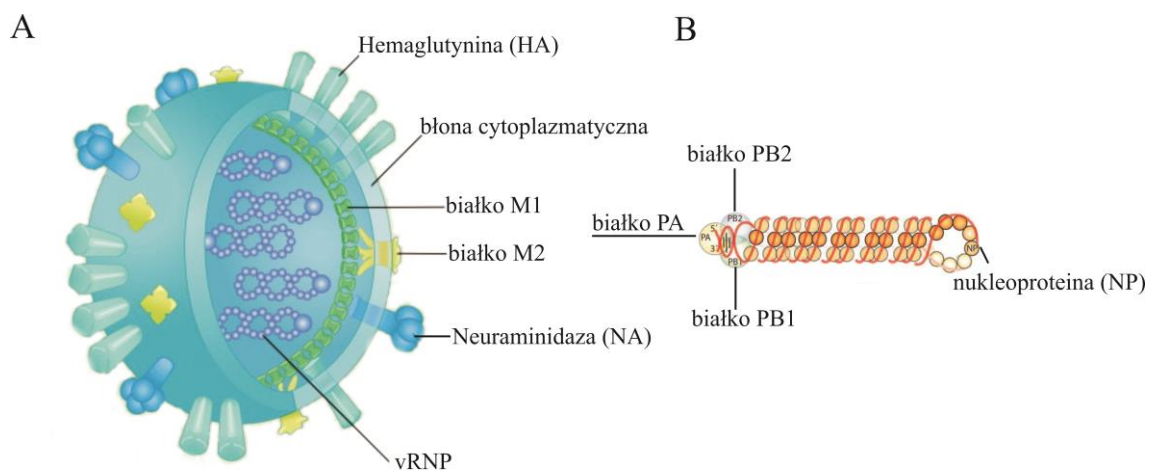
Przykładowo, w przedstawionej pracy badania dotyczyły RNA wirusa A/VietNam/1203/2004 (H5N1). Jest to wirus grypy typu A, podtyp H5N1, który został wyizolowany z tkanek ludzkich w 2004 roku i opisany numerem porządkowym 1203 (Rys. 1).



**Rysunek 1.** Schematyczne przedstawienie standardowej nomenklatury stosowanej w opisie wirusa grypy typu A.

## 2.1. Budowa wirionu wirusa grypy

Wirus grypy należy do grupy wirusów RNA. Materiał genetyczny stanowi jednoniciowa ujemnie spolaryzowana nić RNA, która jest podzielona na 8 segmentów kodujących łącznie 11 białek (Tab. 1) (13, 14). Segment 2, 7 oraz 8 kodują po dwa białka. Każdy fragment genomowego wirusowego RNA (vRNA) opłaszczony jest przez nukleoproteinę (NP) tworząc helikalną strukturę, do której przyłączone są trzy podjednostki polimerazy (PB1, PB2 oraz PA). Powstają wirusowe kompleksy rybonukleoproteinowe (vRNP, ang. *ribonucleoprotein complex*), które łącznie stanowią rdzeń wirusa (15-17). Z cząsteczkami vRNP oddziałuje białko eksportu jądrowego (NEP, ang. *nuclear export protein*) oraz główne białko strukturalne M1. Białko M1 tworzy wewnętrzną warstwę otoczki wirusowej. Zewnętrzną część stanowi dwuwarstwa lipidowa pochodząca z błony komórkowej gospodarza. Zanurzone są w niej glikoproteiny powierzchniowe (hemaglutynina i neuraminidaza) oraz białko M2 stanowiące kanał jonowy (13, 14). Tak zbudowany wirion przyjmuje najczęściej kształt sferyczny o średnicy około 100 nm. Spotyka się również cząstki wirusa w formie filamentów, które mogą osiągać długość nawet do 20  $\mu\text{m}$  (Rys. 2) (18, 19).



**Rysunek 2.** Schematyczne przedstawienie budowy wirusa grypy typu A. A) budowa wirionu; B) budowa vRNP, gdzie czerwona linia oznacza dowolne vRNA, NP – nukleoproteinę, PA, PB1 oraz PB2 – podjednostki wirusowej polimerazy.

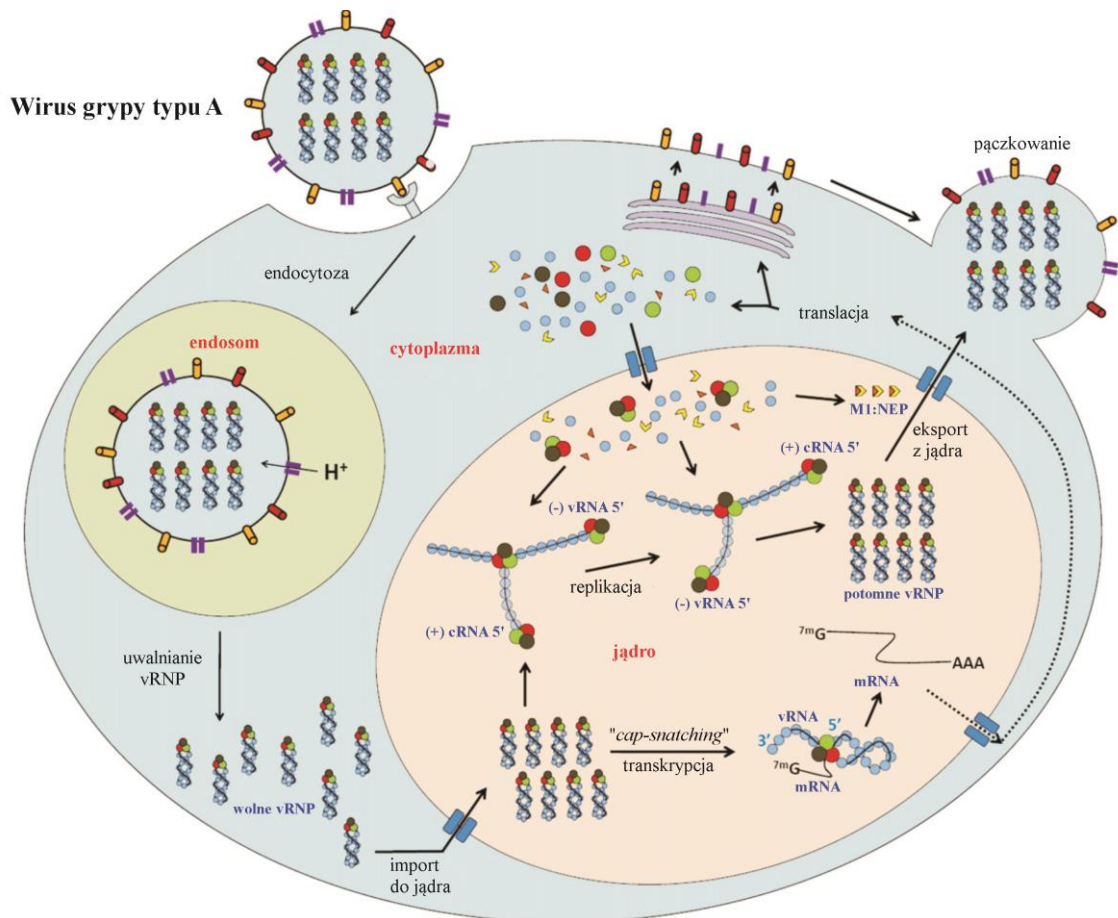
**Tabela 1.** Zestawienie danych dotyczących vRNA oraz białek wirusa grypy typu A, na przykładzie szczepu A/PuertoRico/8/1934 (H1N1) (13).

Segment	vRNA (nt)	Białko	Liczba aminokwasów	Funkcja (aktywność)
1	2341	PB2	759	podjednostka wirusowej polimerazy; wiązanie kap
2	2341	PB1	757	katalityczna podjednostka wirusowej polimerazy RNA; wydłużanie RNA; aktywność endonukleazowa
		PB1-F2	87	aktywność proapoptyczna
3	2233	PA	716	podjednostka wirusowej polimerazy RNA; aktywność proteazowa
4	1778	Hemaglutynina (HA)	550	glikoproteina powierzchniowa; główny antygen; rozpoznanie receptora na powierzchni komórki; fuzja membranowa; inicjacja pączkowania
5	1565	Nukleoproteina (NP)	498	Białko wiążące genomowe (vRNA) i antygenomowe RNA (cRNA); regulacja importu jądrowego
6	1413	Neuraminidaza (NA)	454	glikoproteina powierzchniowa; inicjacja pączkowania; kataliza reakcji odcinania kwasu sialowego
7	1027	M1	252	białko strukturalne, oddziaływanie z vRNP; wpływ na morfologię wirionu; udział w eksporcie jądrowym
		M2	97	kanał jonowy; rola w fuzji membranowej i uwolnieniu vRNP
8	890	NS1	230	inhibitor: komórkowej poliadenylacji, aktywności kinazy PKR oraz splicingu mRNA; aktywator kinazy PI-3; antagonist interfeonu
		NS2(NEP)	121	biało eksportu jądrowego

## 2.2. Cykl replikacyjny wirusa grypy

W cyklu życiowym wirusa grypy można wyróżnić 5 następujących etapów:

1. Adsorpcja i penetracja wirusa do komórki gospodarza,
2. Import vRNP do jądra komórkowego,
3. Replikacja i transkrypcja vRNP,
4. Eksport potomnych vRNP z jądra komórkowego,
5. Składanie i uwalnianie potomnych wirionów (Rys.3).



**Rysunek 3.** Cykl replikacyjny wirusa grypy. Adsorpcja i penetracja wirusa do komórki gospodarza, uwolnienie vRNP do cytoplazmy i import do jądra komórkowego na drodze klasycznego transportu jądrowego, transkrypcja i replikacja wirusowego RNA w jądrze komórkowym, eksport potomnych vRNP do cytoplazmy, transport do części apikalnej komórki gospodarza, gdzie następuje składanie potomnego wirionu, pączkowanie potomnych wirionów (20).

**Adsorpcja wirusa** do powierzchni komórki gospodarza jest możliwa dzięki obecności odpowiednich receptorów rozpoznawanych przez wirusowe białko hemaglutyninę. Receptory na powierzchni komórki, rozpoznawane przez wirus grypy, zbudowane są z N-, O-glikoprotein lub glikolipidów, których końcówką stanowi

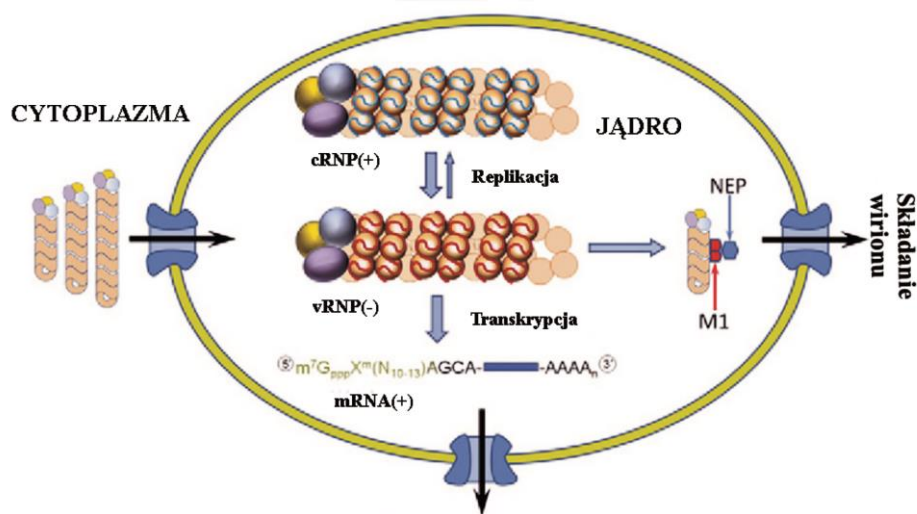
cząsteczka kwasu N-acetyloneuraminowego (kwasu sialowego). Reszta kwasu sialowego przyłączona jest najczęściej wiązaniem  $\alpha$ -2,3 lub  $\alpha$ -2,6 do galaktozy. Konformacja oraz rodzaj wiązania jest istotne podczas przyłączania się cząstki wirusa. Jest to również czynnik różnicujący pomiędzy wirusami pochodzenia ptasiego oraz ludzkiego. Wirus ptasi większe powinowactwo wykazuje do receptora z którym kwas sialowy połączony jest wiązaniem  $\alpha$ -2,3. Natomiast wirus ludzki wiąże się silniej z kwasem N-acetyloneuraminowym dołączonym do reszty galaktozy wiązaniem  $\alpha$ -2,6. Wyjątkiem jest świnia, u której wirus może rozpoznawać oba wiązania z podobnym powinowactwem. Tłumaczy to możliwość jednoczesnej infekcji dwoma różnymi podtypami wirusa i wystąpienia skoku antygenowego (12, 14, 20-22). Aktywacja receptorów sialowych zapoczątkowuje endocytozę wirusa. Kwaśne środowisko wewnątrz endosomu prowadzi do zmian konformacyjnych hemaglutyniny i fuzji błony endosomalnej z otoczką wirusa. Dodatkowo, za pomocą kanału jonowego obecnego w dwuwarstwie lipidowej wirusa (biało M2), do wnętrza wirionu transportowane są protony. W wyniku obniżenia pH następuje odłączenie vRNP od białka strukturalnego M1 i uwolnienie wirusowych kompleksów rybonukleoproteinowych do cytoplazmy (8, 12, 13, 20).

**Import vRNP do jądra komórkowego** jest kolejnym istotnym etapem cyklu replikacyjnego wirusa. W wyniku odłączenia vRNP od białka M1, na powierzchni nukleoproteiny uwidoczniiony zostaje sygnał lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *nuclear localization signal*). Pozwala on na przeniesienie vRNP do wnętrza jądra poprzez pory jądrowe na drodze klasycznego transportu jądrowego (23).

**Replikacja i transkrypcja vRNP** zachodzi w jądrze komórkowym (24). Pojedyncze vRNP każdego segmentu stanowi niezależną jednostkę transkrypcyjną i replikacyjną (25) (Rys. 4). Ponieważ genom wirusa grypy zbudowany jest z cząsteczki RNA o ujemnej polaryzacji, w pierwszym etapie syntetyzowane są cząsteczki RNA o polaryzacji dodatniej: cRNA (ang. *complementary RNA*) oraz mRNA. Oba procesy są regulowane przez wirusową polimerazę RNA zależną od RNA (RdRp ang. *RNA-dependent RNA polymerase*), która zbudowana jest z trzech podjednostek (PB1, PB2, PA). Dodatkowo, niezbędnym elementem, do poprawnego zajścia tych procesów, jest nukleoproteina, która oddziałuje zarówno z vRNA, jak i cRNA (8, 17). Oligomery białka NP wraz z vRNA lub cRNA tworzą strukturę podwójnej helisy. Nukleoproteina posiada domenę „głowy”, „ciała” oraz domenę „ogona”. Pomiędzy domeną „głowy” i „ciała” tworzy się rowek, w którym zlokalizowane są reszty aminokwasów



zasadowych. Sugeruje się, że dodatni ładunek bruzdy może być odpowiedzialny za oddziaływanie z fragmentem 20-32 nukleotydów vRNA lub cRNA (15, 17). Bruzdy te ułożone są po zewnętrznej stronie helisy, co powoduje ekspozycję związanego RNA do roztworu. Niektóre badania wskazują, że białko NP może oddziaływać jedynie z 12 nukleotydami (26). Postuluje się, że w vRNP występują długie rejony RNA wolne od białka, które tworzą globalną strukturę drugorzędową i trzeciorzędową. Fragmenty te mogą być odpowiedzialne za oddziaływania RNA – RNA pomiędzy segmentami (15, 17, 26).



**Rysunek 4.** Schematyczne przedstawienie cyklu replikacji i transkrypcji. Częsteczka vRNA wirusa grypy stanowi matrycę zarówno dla wirusowego mRNA, jak i dla cRNA, które jest formą pośrednią podczas replikacji vRNA (26).

Jako produkt pośredni do replikacji vRNA służy w pełni do niego komplementarna cząsteczka cRNA. Replikacja genomowego RNA wirusa nie wymaga startera. Uważa się, że polimeraza wykorzystuje częściowo komplementarne 3' i 5' końce wirusowego RNA, które mogą tworzyć motyw *corkscrew* (patrz rozdział 3.1) (14).

Podczas transkrypcji oprócz wirusowej polimerazy wykorzystywanych jest szereg białek komórkowych (8). Dojrzałe wirusowe mRNA zawiera na końcu 5' czapkę (kap), natomiast na końcu 3' – ogon poli(A). Wykazano, że sekwencją wzmacniającą powstawanie ogona poli(A) w cząsteczce mRNA jest trakt reszt urydyny występujący w vRNA. Nie zaobserwowano natomiast kapu pochodzenia wirusowego. Sugeruje się, że wirusowa polimeraza odcina czapkę z komórkowych mRNA gospodarza i przenosi ją na mRNA wirusowe. Proces ten, nazwany kradzieżą kapu

(ang. *cap snatching*), w dalszym ciągu nie jest dokładnie poznany. Zsyntetyzowane wirusowe mRNA jest następnie transportowane do cytoplazmy i tam ulega translacji wykorzystując maszynę translacyjną gospodarza (13, 25). Wirus grypy koduje 11 białek, przy czym vRNA segmentów 2, 7 i 8 kodują po dwa białka (Tab. 1). Częsteczką vRNA segmentu 2 zawiera sekwencję podjednostki polimerazy PB1 oraz białka PB1-F2. Białko PB1-F2 w różnych szczepach posiada różne długości i jest ono skróconą formą PB1 zarówno z końca C jak również końca N. Przykładem może być białko PB1-F2 występujące w podtypie H1N1 z 2009 roku, które stanowi fragment białka PB1 z końca C, o długości 11 aminokwasów (27). Natomiast białka M2 oraz NEP kodowane odpowiednio przez vRNA segmentu 7 i 8 powstają w wyniku alternatywnego składania mRNA NS1 i M1. Do tego celu wirus wykorzystuje białka komórkowe, z którymi oddziałuje wirusowe białko NS1 (13, 14).

**Eksport potomnych cząsteczek vRNP z jądra komórkowego do cytoplazmy** to kolejny etap podczas namnażania się wirusa w komórkach gospodarza. W jądrze komórkowym oprócz polimerazy i nukleoproteiny akumuluje się również białko NEP oraz główne białko strukturalne M1. Białko NEP zawiera dwa sygnały eksportu jądrowego (NES, ang. *nuclear export signal*). Oba białka M1 i NEP przyłączają się do nowo zsyntetyzowanych cząsteczek vRNP. Utworzony kompleks rozpoznawany jest przez komórkowe eksportyny, co umożliwia jego transport do cytoplazmy przez pory jądrowe (22, 28).

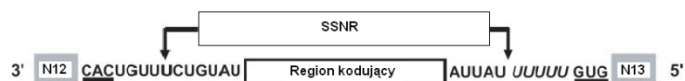
**Składanie i uwalnianie potomnych wirionów** jest ostatnim punktem w cyklu replikacyjnym wirusa. Wszystkie komponenty wirionu (vRNP, białko strukturalne M1, białka powierzchniowe HA i NA oraz M2) są transportowane wzdłuż mikrotubul do miejsca składania cząstki potomnej. Znajduje się ono w apikalnej części spolaryzowanej komórki nabłonka. Białka powierzchniowe zostają wbudowane w błonę komórkową gospodarza. Białko M1 natomiast oddziałuje z wewnętrzną stroną dwuwarstwy lipidowej oraz hemaglutyniną i neuraminidazą. Badania sugerują, że wprowadzenie potomnych vRNP do wirionu zachodzi w sposób selektywny. Postuluje się, że w procesie tym biorą udział oddziaływanie vRNA-vRNA, w wyniku których tworzy się makromolekuła złożona ze wszystkich 8 vRNP. Powstały multimeryczny kompleks poprzez oddziaływania z białkami M1 zostaje włączony do potomnego wirionu. Zakończenie pączkowania wirusa następuje poprzez odcięcie cząstki potomnej od błony komórkowej. Proces ten inicjowany jest przez neuraminidazę. Po uwolnieniu

wirus potomny może wnikać do kolejnych komórek, jednakże jego infekcyjność zależna jest od obecności wszystkich 8 segmentów (8, 19, 22, 29).

### 3. Rola struktury RNA w poszczególnych etapach namnażania wirusa grypy

#### 3.1. Rola struktury RNA w transkrypcji i replikacji

Wszystkie segmenty vRNA wirusa grypy wykazują podobną organizację (Rys. 5). Pojedyncze vRNA zawiera centralnie położoną ramkę odczytu (ORF ang. *Open Reading Frame*) o orientacji antysensowej. ORF z obu stron otaczają rejony niekodujące (NCR ang. *Non Coding Region*) o długości 19-58 nukleotydów (30). W rejonach tych na końcach 3' i 5' znajduje się odpowiednio 12 i 13 nukleotydów, które wykazują konserwatywność sekwencji zarówno wśród segmentów, jak i wśród wszystkich typów wirusa (A, B, C) (31). Dodatkowo, do rejonów zachowawczych przylegają trójki nukleotydów, które są charakterystyczne dla danego segmentu i wykazują konserwatywność w różnych szczepach (32). Częściowo, wzajemnie komplementarne końce 3' i 5' vRNA rozpoznawane są przez wirusową polimerazę i służą jako promotor do transkrypcji i replikacji vRNA. Pozostałe rejony vRNA, nie obejmujące rejonów terminalnych, oddziałują z nukleoproteiną tworząc helikalną strukturę z częściowo wyeksponowanymi fragmentami RNA (16, 26).



**Rysunek 5.** Schemat budowy segmentu 8 vRNA. N12, N13 – szereg konserwatywnych 12- i 13-nukleotydowych fragmentów, odpowiednio na 3' i 5' końcu. SSNR (*segment – specific noncoding region*) - sekwencje specyficzne dla segmentu, zlokalizowane w regionie niekodującym. Podkreślono komplementarne trójki nukleotydów charakterystyczne dla poszczególnych segmentów (32).

Wykazano, że wzajemnie komplementarne końce 3' i 5' tworzą dynamiczne struktury drugorzędowe, które mogą odgrywać istotną rolę w regulacji replikacji i transkrypcji (33). Pierwszą strukturę drugorzędową terminalnych fragmentów vRNA

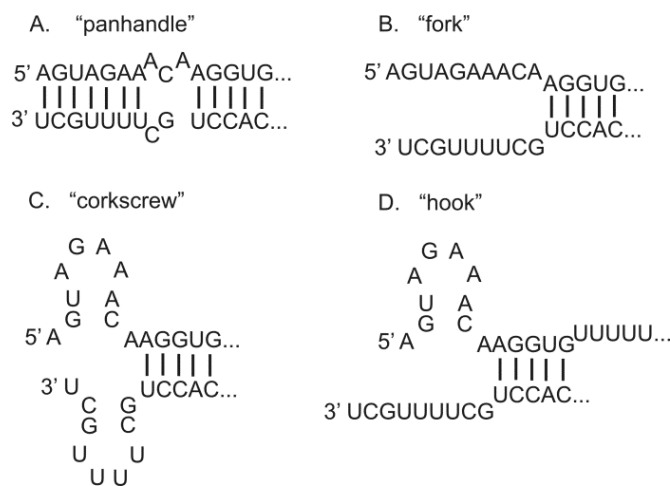
uzyskano metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, ang. *nuclear magnetic resonance*). Zaproponowano motyw *panhandle* (Rys. 6A), który można zaobserwować w cząsteczkach vRNA wszystkich segmentów. Przypomina on podwójną helisę typu A, w której występują pary GU oraz wewnętrzne wybrzuszenia. Uważa się, że struktura *panhandle* determinuje cyrkularną formę vRNA (34). Ponadto wykazano, że wprowadzenie mutacji zwiększających stabilność termodynamiczną motywu *panhandle* na końcu 3' powodowało zwiększenie powinowactwa polimerazy wirusowej do tego regionu. Odwrotny efekt wywoływały mutacje stabilizujące wprowadzone na końcu 5' (35). Inne mutacje punktowe w terminalnych rejonach vRNA wykazały, że struktura *panhandle* nie jest konieczna podczas inicjacji transkrypcji. W związku z tym, zaproponowano strukturę *fork*, która stanowi częściowo rozpleciony motyw *panhandle* (Rys. 6B). Mutacje w rejonie konserwatywnym w motywie *fork* prowadzą do zahamowania transkrypcji, natomiast wprowadzenie dodatkowych substytucji kompensacyjnych, nie przywraca pełnej aktywności promotora (33, 36).

Kolejnym modelem struktury drugorzędowej terminalnych fragmentów vRNA, zaproponowanym przez inną grupę badawczą, jest motyw *corkscrew* (Rys. 6C). Postuluje się, że taka konformacja może powstawać po związaniu się do vRNA kompleksu polimerazy. Motyw ten obejmuje dwie struktury typu spinka do włosów oraz jedną niesparowaną resztę adenozyiny w pozycji 10 z końca 5'. Wprowadzanie różnych kombinacji mutacji w pozycji 10 zarówno z 5', jak i 3' końca miały istotny wpływ na obniżenie transkrypcji wirusowych RNA. Mutacje te nie miały wpływu na replikację vRNA. Sugeruje to inny sposób regulacji tego procesu, który w dalszym ciągu nie jest do końca poznany. Przypuszcza się, że replikacja może zachodzić przy udziale polimerazy RdRp nie związanej z vRNP (model *cis-trans*) (37, 38).

Czwartą możliwą konformacją końców 5' i 3' vRNA jest motyw *hook*, który obejmuje strukturę spinki do włosów uformowaną na końcu 5'. Fragment ten wydaje się konieczny podczas procesu poliadenylacji powstającego wirusowego mRNA (39). Przypuszcza się, że struktura spinki na końcu 5' może wpływać na stabilność wiązania polimerazy RdRp do vRNA podczas syntezy mRNA. Dodatkowo może tworzyć zawadę przestrzenną i wpływać na powstanie ogona poli(A), dla którego matrycą jest ciąg 5-8 reszt urydyny (33, 39, 40).

Przypuszcza się, że motyw *panhandle* obecny w vRNA może ulegać zmianom konformacyjnym na różnych etapach cyklu replikacyjnego wirusa. Przełączanie formy

zamkniętej do otwartej może być kontrolowane przez antagonistycznie działające białko NP oraz polimerazy RdRp. Nukleoproteina rozplata strukturę, natomiast kompleks polimerazy stabilizuje ją (33).



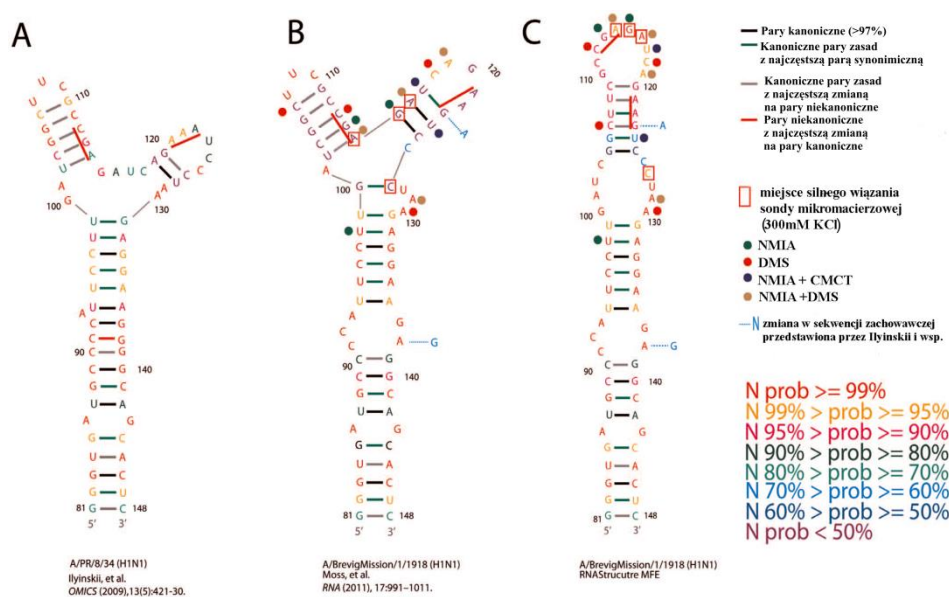
**Rysunek 6.** Motywy strukturalne tworzone przez 3' i 5' końce segmentów vRNA wirusa . A – motyw *panhandle*, B – motyw *fork*, C- motyw *corkscrew*, D – motyw *hook*. (31).

### 3.2. Rola struktury RNA w ekspresji białek

Segmenty 7 i 8 wirusa grypy typu A kodują po dwa białka, odpowiednio: M1 i M2 oraz NS1 i NEP. Białka M2 oraz NEP powstają w wyniku alternatywnego składowania odpowiednio mRNA M1 oraz mRNA NS1 (13, 41). Stosunek ilości mRNA M1 do mRNA M2 oraz mRNA NS1 do mRNA NEP w komórce jest ściśle regulowany (42, 43).

Analiza bioinformatyczna wykazała, że w mRNA segmentu 8 występują 3 rejony zawierające konserwatywne struktury drugorzędowe (21-180; 181-300; 371-690) (44). Struktury te znajdują się w rejonach w których występują miejsca alternatywnego składowania mRNA NS1 (miejsce 5' splicingowe po nukleotydzie 30, oraz 3' miejsce splicingowe po nukleotydzie 487). Sugeruje się zatem, że mogą one brać również udział w regulacji ekspresji białek NS1 i NEP. W rejonie 81-148 przewidziana została struktura zawierająca pętlę wieloramienną (Rys. 7A i B) (44, 45). Mutacje wprowadzone w regionie 102-123 powodowały obniżenie ekspresji NS1(45). Badania strukturalne *in vitro* fragmentu 81-148, który składał się z zachowawczych nukleotydów, wskazują, że rejon ten może przyjmować strukturę spinki do włosów (Rys. 7C). Wprowadzane mutacje znajdowały się w rejonie konserwatywnych par

zasad, co mogło zaburzać strukturę drugorzędową tego regionu. Jednakże nie można wykluczyć, że naturalne mutacje w pozycjach 108, 120 oraz 123 mogą reorganizować strukturę i sprzyjać występowaniu pętli wieloramiennej. Możliwa jest również równowaga pomiędzy obiema konformacjami w komórce. Funkcja tej struktury nie jest znana, ale jej położenie poniżej 5' miejsca splicingowego może wiązać się z funkcją wzmacniacza lub inhibitora alternatywnego składania mRNA NS1 (46, 47).

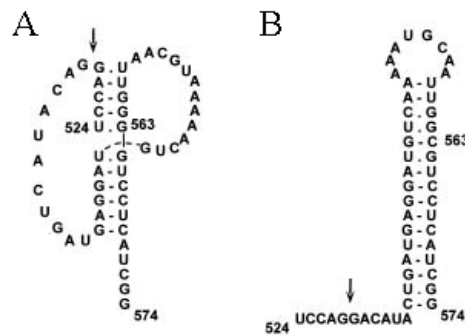


**Rysunek 7.** Motywy strukturalne fragmentu 81-148 mRNA segmentu 8. A) model zaproponowany przez Ilynski i wsp. (45), sekwencja pochodzi ze szczepu A/PR/8/34 (H1N1); B) model wygenerowany przez program *RNAalifold* (44); C) model wygenerowany przez program *RNAstructure* z zastosowaniem danych eksperymentalnych (46). Model B i C zawierają sekwencję zachowawczą wyselekcjonowaną na podstawie analiz bioinformatycznych (46).

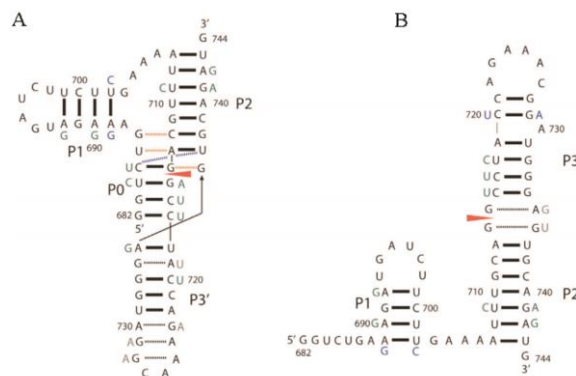
Konserwatywną strukturę drugorzędową, która może tworzyć motyw strukturalny typu spinki, odnaleziono w regionie obejmującym 3' miejsce splicingowe (Rys. 8) (44, 48). Dodatkowo, zaproponowano alternatywną konformację tego rejonu w postaci pseudowęzła. Przypuszcza się, że w niektórych szczepach może istnieć równowaga pomiędzy oboma motywami (48, 49).

Obecność stabilnych struktur drugorzędowym w mRNA NS1 skłoniła naukowców do poszukiwania podobnych rejonów w mRNA segmentu 7, które również podlega alternatywnemu składaniu. Analiza bioinformatyczna wykazała obecność dwóch wysoce stabilnych i konserwatywnych struktur. W rejonie poniżej 3' miejsca

splicingowego, stwierdzono możliwość występowania dwóch alternatywnych motywów strukturalnych. Rejon ten może przyjmować strukturę typu spinki do włosów lub tworzyć pseudowęzeł (Rys. 9) (44). Badania strukturalne wykazały obecność obu możliwych motywów w tym regionie. Położnie prawdopodobnych, wysoce konserwatywnych struktur drugorzędowych może sugerować ich związek z regulacją splicingu mRNA M1. Sugeruje się, że struktura spinkowa może być bardziej dostępna w mRNA M1 niż pseudowęzeł. Przypuszcza się, że zmiana konformacji motywu spinki na pseudowęzeł może stanowić czynnik regulacyjny podczas splicingu mRNA M1 (50).



**Rysunek 8.** Motywy strukturalne obejmujące rejon 3' miejsca splicingowego mRNA segmentu 8. Strzałka wskazuje miejsce splicingowe. A) model pseudowęzła, B) model spinki (33).

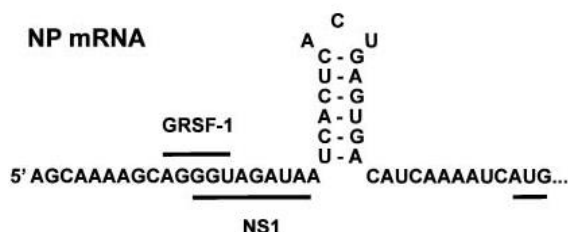


**Rysunek 9.** Motywy strukturalne obejmujące rejon 3' miejsca splicingowego mRNA segmentu 7. Strzałka wskazuje miejsce splicingowe. A) model pseudowęzła, B) model spinki (51).

### 3.3. Rola struktury RNA w translacji

Namnażanie się wirusa w komórce gospodarza powoduje zahamowanie translacji komórkowego mRNA na korzyść mRNA wirusowego. W mechanizmie molekularnym tego procesu uczestniczą zarówno białka wirusowe, jak również białka gospodarza (52, 53). Przypuszcza się, że ważną rolę odgrywać może rejon 5' nieulegający translacji (5' UTR, ang. *untranslated region*) mRNA (54-56). Wykazano, że sekwencja 5'-GGUAGUA-3' obecna w mRNA M1 i NS1 oraz 5'-AGGGU-3' w mRNA NP i mRNA NS1 mogą wiązać odpowiednio wirusowe białko NS1 oraz komórkowy czynnik translacyjny GRSF-1 (ang. *G-rich RNA sequence binding factor 1*). Oddziaływanie tych białek z cząsteczkami mRNA może stymulować proces translacji (57).

Dodatkowo, poniżej sekwencji 5'-GGUAGUA-3' w mRNA NP zaproponowana została stabilna struktura typu spinki do włosów (Rys. 10). Przypuszcza się, że może być ona zaangażowana w regulację translacji wirusowych mRNA. Jednakże delecja całej struktury typu spinki nie skutkowała zmniejszeniem wiązania się czynnika GRSF-1. Ponadto sugeruje się, że wirusowy 5' UTR mRNA NP. nie posiada stabilnej struktury drugorzędowej. W konsekwencji jednoniciowe fragmenty w tym rejonie mogłyby stanowić potencjalne miejsca wiązania istotnych białek (57, 58).



**Rysunek 10.** Struktura spinki RNA znajdująca się na 5' końcu mRNA NP. Podkreślone zostały rejony odpowiedzialne za wiązanie czynnika GRSF-1, białka NS1 oraz kodon start (33).

### 3.4. Rola struktury RNA w składaniu wirionu potomnego

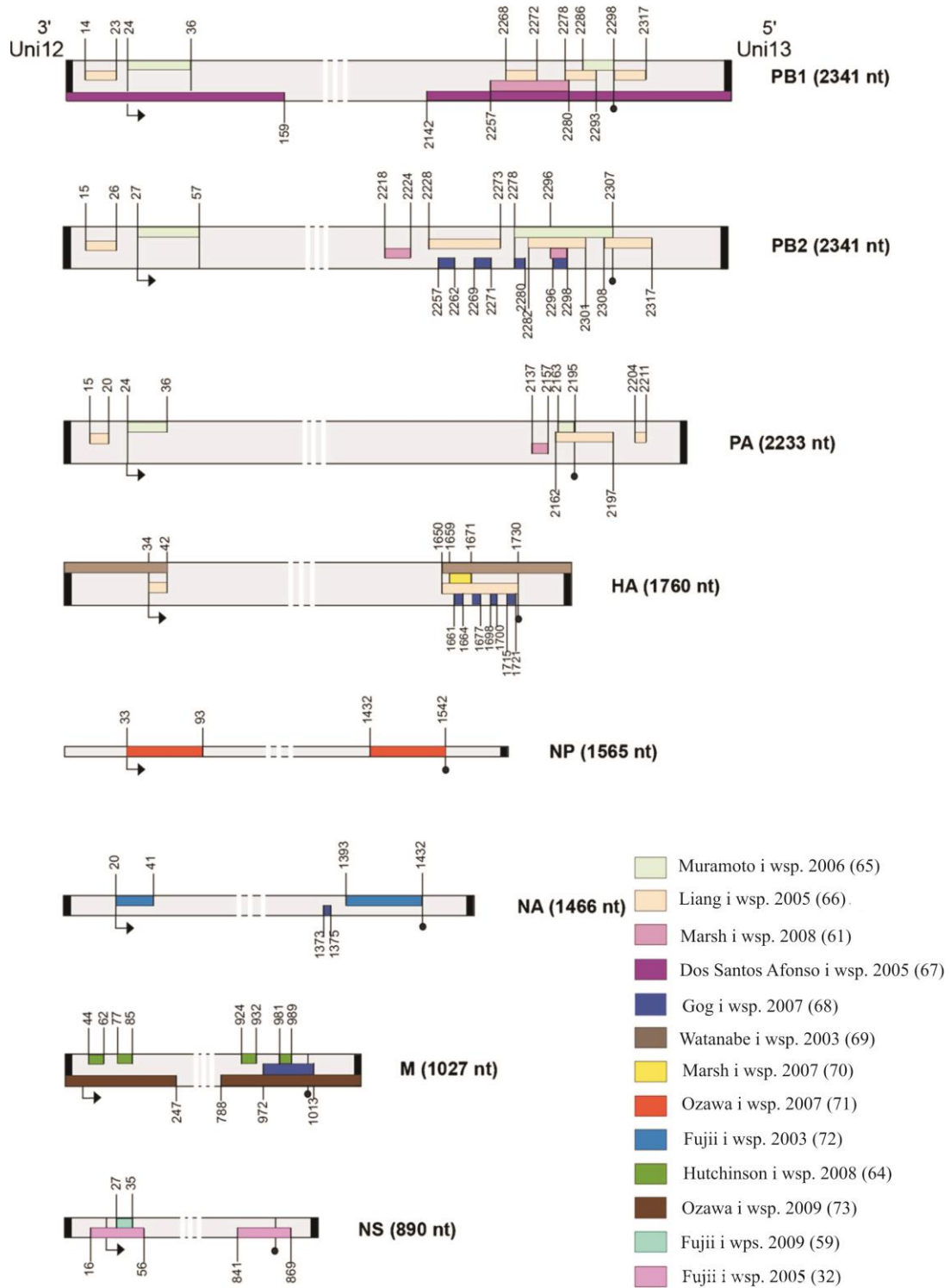
Efektywne składanie wirionu to krytyczny etap cyklu replikacyjnego wirusa grypy. Pomimo, iż genom podzielony na segmenty przynosi ewolucyjne korzyści, to niewątpliwie stanowi on problem podczas pakowania wszystkich vRNP do potomnego wirionu. W związku z tym, że każdy segment koduje co najmniej jedno białko istotne w procesie namnażania, do nowopowstałego wirionu musi być włączona jedna kopia



każdego vRNP. Wirusy, które posiadają zaburzoną liczbę segmentów nie są zdolne do infekowania kolejnych komórek (30, 59).

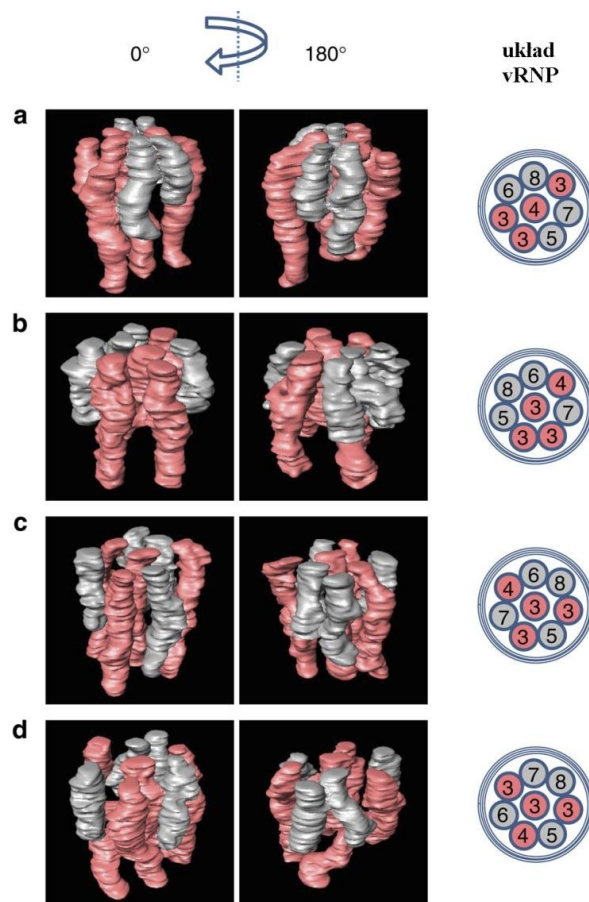
Powstały dwa modele pakowania vRNP do potomnych wirionów. Model przypadkowego pakowania zakłada, że wszystkie segmenty posiadają jeden wspólny sygnał włączania vRNP do wirionu (60, 61). Według wyliczeń matematycznych system taki dawałby tylko 0,24% szansy na uzyskanie kompletnego, złożonego ze wszystkich ośmiu segmentów wirionu (62). Wynik taki nie odzwierciedla zdolności potomnych wirionów do infekcji w warunkach *in vitro* na poziomie 1-10% (63, 64).

Liczne badania sugerują występowanie specyficznego modelu pakowania vRNP do potomnych cząstek wirusa. Pierwsze przesłanki przemawiające za tym modelem pojawiły się, gdy opisano wadliwe interferujące RNA (DI-RNA, ang. *Defecting Interfering RNA*). Były to skrócone formy vRNA poszczególnych segmentów, które posiadały delecję środkowej części regionu kodującego zachowując rejony terminalne. DI RNA miały zdolność do replikacji i włączania do cząstek potomnych wirusa i współzawodniczyły one z cząsteczkami o pełnej długości. Sugeruje to obecność sygnałów pakowania w terminalnych końcach vRNA (60). Wykazano również, że długość segmentu jest jednym z warunków współzawodnictwa pomiędzy segmentami w procesie pakowania, a jednocześnie zaobserwowano, że krótsze vRNP ulegają wydajniejszej transkrypcji. Wykazano ponadto, że podczas włączania vRNP do nowopowstałego wirionu istniało współzawodnictwo między zmodyfikowanymi segmentami, które posiadały tą samą długość oraz niezmienione rejony terminalne. Oznacza to, że region kodujący spełnia również istotną rolę podczas pakowania (35). Zaproponowano kilka rejonów vRNA, które mogą mieć istotne znaczenie podczas pakowania vRNP do wirionu. Na rysunku 11 zilustrowano potencjalne rejony biorące udział w procesie składania potomnego wirionu zasugerowane przez różne grupy badawcze. Specyficzne sekwencje, które były istotne w procesie składania cząstki wirusa znaleziono zarówno na końcach 5' i 3' oraz w środkowej części rejonu kodującego. Delecje i mutacje punktowe wysoce konserwatywnych kodonów w wyznaczonych rejonach wykazały, że sygnał pakowania jest nieciągły, a jego siła maleje wraz z odległością od terminalnych końców. Dodatkowo zauważono, że mutacja prawdopodobnego sygnału pakowania jednego segmentu powoduje zaburzenia w budowywania innych segmentów (32, 59, 61, 64-73).

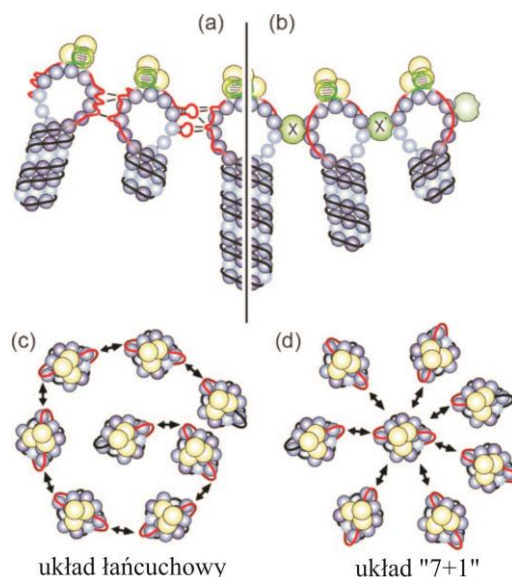


**Rysunek 11.** Rejony kodujące i niekodujące vRNA istotne w procesie pakowania wirusa grypy typu A. Schematyczny model przedstawia vRNA w orientacji 3'→5'. Konserwatywne końce 12 i 13 nukleotydowe odpowiednio z końca 3' i 5' zaznaczono na czarno. Strzałka wskazuje miejsce inicjacji translacji, natomiast czarna kropka – kodon stop. Sekwencje istotne w procesie pakowania zaznaczono zgodnie z ich referencjami (30).

Kolejnych dowodów przemawiających na korzyść specyficznego modelu pakowania dostarczyły wyniki uzyskane za pomocą mikroskopii elektronowej i tomografii. Udało się uzyskać obraz makromolekuły, która zbudowana jest ze wszystkich 8 segmentów wirusa (Rys. 12). Zakłada się dwa możliwe ułożenia vRNP w molekułe: łańcuchowy (ang. *daisy chain*) lub 7+1 (ang. *master segment*) (Rys. 13) (29, 60, 74). Sugeruje się również, że 4 segmenty (segmenty kodujące PB1, PA, NP i M) mogą mieć większe znaczenie w stosunku do pozostałych. Poprzez wzajemne oddziaływania mogą one tworzyć zorganizowaną strukturę, do której następnie włączają kolejne vRNP tworząc model 7+1 (75). Dodatkowo, za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, ang. *fluorescent in situ hybridization*) zaobserwowano, że powstawanie makromolekuły zbudowanej ze wszystkich segmentów zachodzi podczas transportu vRNP do apikalnej części komórki, gdzie następnie dochodzi do składania wirionu i jego pączkowania (76-78).



**Rysunek 12.** Trójwymiarowy model ułożenia ośmiu vRNP w różnych wirionach (a-d). Schematy przedstawione w prawej kolumnie przedstawiają możliwe ułożenie 8 segmentów w molekułe. Numeracja 3-8 oznacza malejącą długość segmentu, przy czym 3 oznaczono trzy pierwsze najdłuższe segmenty. Najdłuższe segmenty łącznie z 4 zaznaczono na różowo (74).



**Rysunek 13.** Model selektywnego pakowania vRNP do wirionu. Sugeruje się, że selektywne pakowanie związane jest z tworzeniem się kompleksowej molekule złożonej ze wszystkich 8 segmentów. Formowanie się molekule inicjowane jest przez specyficzne oddziaływanie sygnałów pakowania pomiędzy segmentami: a) bezpośrednie oddziaływanie RNA-RNA z możliwością zaangażowania struktury drugorzędowej, b) pośrednie z udziałem niezidentyfikowanych jak dotąd białek. Schematy c) i d) przedstawiają możliwe ułożenie i zależności segmentów względem siebie, c) układ łańcuchowy (ang. *daisy chain*), d) układ „7+1” (ang. *master segment*) (60).

Pomimo wzrastających dowodów sprzyjających modelowi specyficznego pakowania vRNP do wirionu, mechanizmy tego procesu wciąż pozostają nieznanne. Selektywne włączanie segmentów do wirionu wymaga co najmniej siedmiu wewnętrznych oddziaływań pomiędzy vRNP. Interakcje te mogłyby być inicjowane przez białka wiążące RNA. Jednakże do tej pory nie zidentyfikowano ani komórkowych, ani wirusowych białek, które potwierdzałyby takie hipotezy (30). Sugeruje się więc, że istotne znaczenie mają oddziaływania RNA-RNA. Wykazano, że vRNA poszczególnych segmentów w warunkach *in vitro* może tworzyć heterodimery. Delecje rejonów wyznaczonych jako istotnych podczas składania wirionu oraz zastosowanie oligonukleotydów antysensowych oddziałujących z tym regionem, wykazywały obniżenie powstawania heterodimerów (29, 30, 79). Nie wykazano jednak, zachowanego schematu oddziaływań vRNA-vRNA pomiędzy szczepami, co miałyby istotne znaczenie i wyjaśniałyby możliwość występowania reasortacji segmentów (61, 79). Przypuszcza się, że bardziej niż specyficzne sekwencje, ważną rolę może odgrywać

struktura drugorzędowa RNA. Natomiast nukleoproteina, która wiąże vRNA może dodatkowo ułatwiać oddziaływania vRNA-vRNA (30, 59).

#### **4. RNA wirusa grypy jako cel terapeutyczny**

Wirus grypy podlega gwałtownej ewolucji. Wysoki poziom mutacji i różnorodność gospodarzy (ptaki, ssaki łącznie z człowiekiem) prowadzi do powstawania nowych wirulentnych szczepów. Stanowi to wyzwanie zarówno w profilaktyce, jak również w terapii grypy. W profilaktyce grypy stosuje się szczepionki zawierające atenuowane cząstki wirusa typu A i B. Konieczne jest coroczne aktualizowanie jej składu pod względem antygenów powierzchniowych (HA i NA) krążących szczepów (5, 80). Ze względu na dużą zmienność wirusa, planowanie składu szczepionki przysparza spory problem. Powstają modele bioinformatyczne, które starają się przewidzieć zmiany w antygenach powierzchniowych (81).

Obecnie terapia grypy opiera się głównie na inhibicji białek wirusa grypy. Lekami dopuszczonymi do użytku są amantadyna i rymantadyna. Związki te są pochodnymi adamantanu i stanowią inhibitor kanału jonowego znajdującego się w otocze wirusa i zbudowanego z białka M2. Amantadyna oddziałując z białkiem M2 stanowi sferyczną blokadę kanału jonowego. Natomiast rymantadyna wiążąc się do białka zapobiega zmianom konformacyjnym transmembranowej domeny białka M2 utrzymując ją w stanie zamkniętym. Kolejnymi związkami stosowanymi w leczeniu grypy są inhibitory neuraminidazy. NA warunkuje uwolnienie potomnych cząstek wirusa poprzez reakcję odcięcia kwasu sialowego. Oseltamiwir (nazwa handlowa - Tamiflu) oraz zanamiwir (nazwa handlowa - Relenza) stanowią analogi kwasu sialowego, które oddziałując z neuraminidazą blokują tym samym jej działanie (5, 82). W wyniku ewolucji wirusa, większość krążących szczepów nabyło oporność na amantadynę i rymantadynę (83). Obecnie więc jedynie oseltamiwir i zanamiwir stanowią środki zapobiegawcze przed ewentualną pandemią. Jednakże coraz częściej pojawiają się szczepy odporne również na oseltamiwir. Krążący w Stanach Zjednoczonych szczep wirusa grypy H1N1 nabył całkowitą oporność na ten lek (5). Kilka szczepów opornych na Tamiflu zaobserwowano także w warunkach laboratoryjnych (84).

Wysoki poziom mutacji i powstawanie nowych szczepów wirusa może skutkować rozwojem oporności przeciwko wszystkim stosowanym obecnie inhibitorom i szczepionkom. Istnieje potrzeba poszukiwania nowych efektywnych sposobów terapii

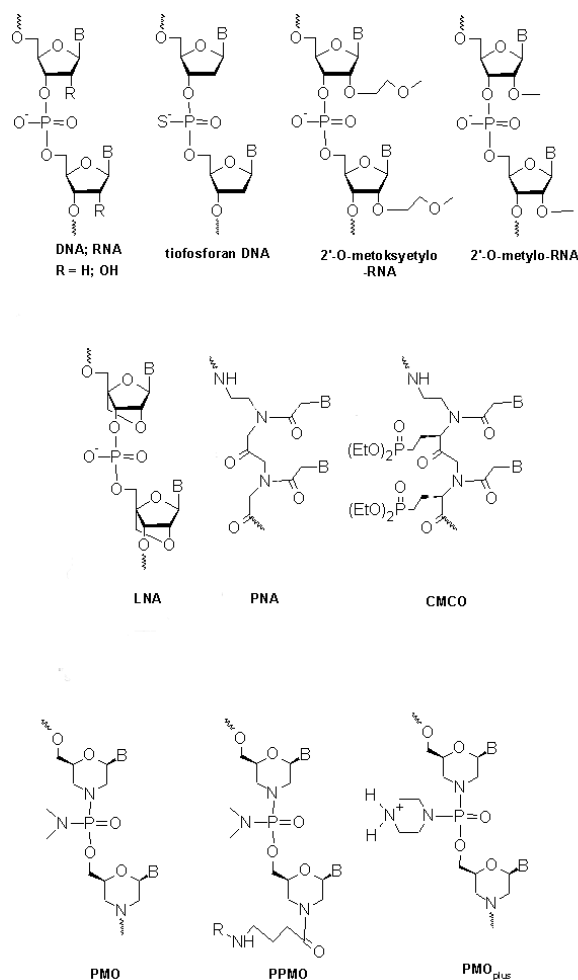
o szerokim spektrum działania (80). Jednym z celów terapeutycznych wielu grup badawczych są cząsteczki RNA wirusa grypy powstające na różnych etapach cyklu replikacyjnego.

#### 4.1. Oligonukleotydy antysensowe

Technologia wykorzystania oligonukleotydów antysensowych, jako potencjalnych inhibitorów cyklu replikacyjnego wirusa po raz pierwszy została opisana przez Zamecnik i Stephenson w 1978 roku (85). Oligonukleotydy antysensowe (ASO, ang. *antisense oligonucleotides*) składają się najczęściej z 15-20 nukleotydów i są komplementarne do docelowego RNA. Możemy wyróżnić dwa główne mechanizmy działania ASO. W pierwszym sposobie ASO projektuje się tak, aby aktywowały RNazę H, która hydrolizuje RNA w heterodupleksie RNA-DNA. Drugi mechanizm zakłada, że komplementarne oligonukleotydy tworzą zawadę przestrzenną zaburzając procesy translacji lub replikacji RNA (86-88).

Oligonukleotydy posiadają kilka zalet w porównaniu z innymi potencjalnymi terapeutykami: mogą być wszechstronnie wykorzystywane, odnoszą się bezpośrednio do sekwencji docelowej są proste w projektowaniu, wykazują wysoką specyficzność (88). Cechy te spowodowały, że cieszą się one dużym zainteresowaniem wśród naukowców. Dodatkowo, powstało wiele analogów oligonukleotydów. Modyfikacje – zasady, części cukrowej lub wiązania fosfodiesterowego, służą zwiększeniu zdolności hybrydyzacji ASO do docelowego RNA, a jednocześnie zwiększają jego stabilność w komórce chroniąc przed nukleazami. Oligomery pierwszej generacji zawierały pochodne tiofosforanowe (PS, ang. *phosphorothioate*). Powodowało to zwiększenie odporności na degradację przez komórkowe nukleazy. Hybrydując do docelowego RNA oligonukleotydy antysensowe aktywowały RNazę H, co skutkowało hydrolizą powstałego heterodupleksu. W kolejnych latach od opracowania PS powstały następne oligomery antysensowe zawierające modyfikowane nukleotydy, które były jeszcze bardziej stabilne w komórce, tworzyły trwalsze dupleksy, czy też łatwiej przenikały przez błonę cytoplazmatyczną. Większość ASO drugiej (pochodne nukleotydów 2'-O-metoksyetylowe, 2'-O-metylowe) i trzeciej (pochodne nukleotydów LNA, PNA i PMO) generacji tworzą blokadę przestrzenną inhibując proces translacji czy replikacji. Liczne badania sugerują, że oligonukleotydy antysensowe mogą być wykorzystane w efektywnej strategii przeciwwirusowej. Innymi często wykorzystywanymi ASO są

oligonukleotydy typu gapmer, które mogą aktywować RNazę H. Gapmery zbudowane są z fragmentu DNA, który na końcach 5' i 3' posiada dodatkowe nukleotydy, pochodne 2'-O-metylo-RNA i LNA (89). Na rysunku 14 przedstawiono budowę chemiczną poszczególnych typów modyfikowanych oligonukleotydów



**Rysunek 14.** Budowa chemiczna modyfikowanych oligonukleotydów stosowanych, jako potencjalne terapeutyki. LNA – Usztywnione Kwasy Nukleinowe (ang. *Locked Nucleic Acid*), PNA – Peptydowe Kwasy Nukleinowe (ang. *Peptide Nucleic Acid*), CMCO- oligomer zawierający szkielet PNA z dodatkowymi modyfikacjami w postaci estru fosforowego, PMO – oligomer morfolinofosforanodiamidowy (ang. *Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers*), PPMO – oligomer PMO z dołączonym peptydem bogatym w arginyne.

Próby poszukiwania oligonukleotydów antysensowych nakierowanych na RNA wirusa grypy podjęło kilka grup badawczych. Większość zespołów projektowała oligonukleotydy komplementarne do rejonów wirusowego mRNA zawierających konserwatywny kodon AUG (inicjacja translacji) (90-94). Powstały również ASO hybrydujące do konserwatywnych końców 3' i 5' vRNA (93-95). Giannecchini

i współpracownicy zaproponowali również ASO, które były komplementarne do potencjalnych miejsc sygnału pakowania. Znajdowały się one w rejonach terminalnych 5' vRNA kodujących podjednostki (PB1, PB2, PA) wirusowej polimerazy (96, 97). Część zaproponowanych oligomerów wykazywała wpływ na poziom namnażania się wirusa w liniach komórkowych. Oligomery, które wykazywały inhibicję *in vitro* testowano *in vivo* w modelu kurzym (98) lub mysim, który bardziej odpowiada klinicznym modelom związanym z ssakami (99). Wykazano, że niektóre zastosowane ASO zwiększały przeżywalność mysz w stosunku do mysz kontrolnych (93, 99, 100). Interesującym wydaje się być połączenie terapii z wykorzystaniem oligonukleotydów z zastosowaniem środków przeciwzapalnych. Sugeruje się, że podczas infekcji wirusem grypy H5N1, główną przyczyną zmian patologicznych, a nawet śmierci, jest powstający stan zapalny. Zastosowanie *in vivo* połączenia ASO z celekoksybem powodowało wyższą przeżywalność mysz (około 86% przeżywalności) w stosunku do mysz traktowanych tylko ASO lub tylko celekoksybem (99). Zestawienie badanych oligomerów i rejon na który były nacelowane przedstawiono w tabeli 2.

**Tabela 2.** Zestawienie ASO zaproponowanych w literaturze, nacelowanych na wirusowe RNA.

<b>Rejon docelowy dla ASO*</b>	<b>Rodzaj ASO (ilość efektywnych)**</b>	<b>Referencje</b>
Kodon inicjacji translacji AUG w mRNA NP, PB1, PB2, PA	PS-DNA (3)	Hatta T. i wsp. 1997 (90)
Kodon inicjacji translacji AUG mRNA PB2 i PA	PS-DNA (3)	Abe T. i wsp. 2001 (91)
Kodon inicjacji translacji AUG mRNA PB1 oraz 3' koniec vRNA5	PMO (6)	Ge Q. i wsp. 2006 (92)
mRNA NS1 3' UTR, 5' UTR, rejon terminacji translacji	2'-OMe-RNA (3)	Wu i wsp. 2008 (98)
mRNA HA	ASO (1)	Wong J.P. i wsp. 2007 (101)
Kodon inicjacji translacji AUG mRNA PB1 i NP oraz 3' koniec vRNA5	PMO (3)	Gabriel G. i wsp. 2008 (93)
Konserwatywny koniec 5' vRNA	PS-DNA (1)	Duan M i wsp. 2008 (95)



Kodon inicjacji translacji AUG mRNA PB1	PMO (2)	Lupfer C. i wsp. 2008 (94)
22-nukleotydyowy koniec 3' vRNA5		
Sygnal pakowania na końcu vRNA1	PS-DNA (1)	Giannecchini S. i wsp. 2009 (96)
5' koniec vRNA2 i vRNA3 komplementarny do 3'UTR mRNA PB1 i PA	PS-DNA (2)	Giannecchini S. i wsp. 2011 (97)
5' i 3'UTR, kodon inicjacji translacji AUG oraz rejon kodującym mRNA PB2	2'-O-metylo-RNA z dołączonym na końcu 3' butanolem (4) Lub 2'-O-metylo-RNA +celekoksyb	Jin Y. i wsp. 2011 (99)
Konserwatywne sekwencje mRNA NP.	PS-DNA (1)	Zhang T. i wsp. 2011 (100)

\* mRNA NP, PB1, PB2, PA, HA, M1 – cząsteczki mRNA kodujące odpowiednio białka NP, PB1, PB2, PA, HA, M1; vRNA1, vRNA2, vRNA3, vRNA5 – vRNA segmentów odpowiednio 1, 2, 3, 5.

\*\* PS-DNA oligomer DNA zawierający modyfikację w postaci tiofosforanu; PMO oligomery morfolinowe,

## 4.2. Katalityczne kwasy nukleinowe

Innym podejściem ukierunkowanej terapii antywirusowej jest wykorzystanie katalitycznych kwasów nukleinowych (DNazymy i RNazymy). RNazymy (rybozymy) to cząsteczki RNA, które posiadają zdolność do katalizowania reakcji chemicznych bez udziału białek. Rybozymy składają się z katalitycznej domeny, do której z obu stron przylegają fragmenty komplementarne do docelowego RNA. Wiążą się one z substratem tworząc kanoniczne pary zasad Watson-Crick, co umożliwia przebieg reakcji transestryfikacji i rozpad wiązania fosfodiesterowego w docelowym RNA. Następnie RNazym może oddysocjować od powstałego produktu i związać się z kolejną cząsteczką RNA. Ze względu na niewielkie rozmiary, wysoką specyficzność i efektywność katalityczną stały się obiektem zainteresowania wielu naukowców. Pozytywne wyniki wielu badań skłaniały do ulepszenia tego molekularnego narzędzia. Z tego powodu RNazymy poddawano różnym modyfikacjom mającym na celu: zwiększenie odporności na nukleazy, zwiększenie aktywności w fizjologicznych stężeniach jonów magnezu oraz poprawę dostępności dla docelowego RNA.

Do najpopularniejszych stosowanych rybozymów należą: rybozym typu „głowy młotka” (ang. *hammerhead ribozyme*), rybozym typu „spinki” (ang. *hairpin ribozyme*) oraz rybozym wirusa zapalenia wątroby typu D (HDV, ang. *hepatitis delta virus ribozymes*) (102, 103).

DNazy (deoksyrybozomy) to kolejna grupa katalitycznych kwasów nukleinowych, która powstała na drodze selekcji *in vitro* przypadkowych fragmentów DNA. Wyselekcjonowano dwa warianty deoksyrybozymów „10-23” oraz „8-17”, które przecinają docelowe RNA w różnych miejscach. Zasadnicza budowa i mechanizm działania przypomina ten, który wykorzystują rybozomy. DNazym „10-23” przecina wiązanie fosfodiesterowe pomiędzy dowolną puryną i pirymidyną. Natomiast wariant „8-17” katalizuje rozpad wiązania internukleotydowego pomiędzy adenozyną i guanozyną. Dodatkowo wymaga on obecności pary rG-dT w kompleksie substratnym zaraz za miejscem cięcia. Powoduje to, że wariant ten jest mniej popularny wśród badaczy. Obecnie powstały kolejne rodzaje deoksyrybozymów, które mogą rozpoznawać i przecinać prawie wszystkie możliwe miejsca w dowolnym docelowym RNA. Dodatkowo, aby zwiększyć stabilność DNazymów stosuje się nukleotydy typu 2'-O-metylo-RNA lub LNA we fragmentach odpowiedzialnych za rozpoznanie substratu. Szczególnie ważne jest to w przypadku długich cząsteczek RNA, które mogą mieć złożoną strukturę drugorzędową (102-104).

Wykazano, że rybozomy mogą być wykorzystane jako cząsteczki inhibujące namnażanie wirusa grypy zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Zaprojektowano RNazy typu *hammerhead* i *hairpin* specyficznie wiążące się do vRNA segmentu 5. W badaniach *in vitro*, w optymalnych warunkach, zaobserwowano cięcie docelowej cząsteczki. Najefektywniejsze rybozomy testowano na liniach komórkowych, co potwierdziło uzyskany wynik. Dodatkowo analizy jakościowe pokazały minimalną wyższą aktywność rybozomy typu *hammerhead* od *hairpin*. Uzyskane wyniki sugerują możliwość wykorzystania RNazymów w inhibicji namnażania wirusa grypy (105). Inną docelową cząsteczką w terapii antywirusowej może stanowić mRNA, dla którego również powstały warianty rybozymów. Zaprojektowano RNazym specyficzny dla mRNA PB1, który w testach komórkowych wykazywał hamowanie namnażania wirusa nawet do 93,5% (106). Interesującym podejściem wydają się być, zaprojektowane na konserwatywne rejony mRNA, rybozomy HDV. Posiadały one dodatkowo dołączoną cząsteczkę SOFA (ang. *specific on/off adapter*), która miała na celu zwiększenie specyficzności miejsca cięcia docelowego RNA jednocześnie

redukując miejsca niespecyficzne. 11 spośród 45 zaprojektowanych rybozymów (nakierowane na mRNA PB1, PB2, PA, NP, M, NS) wykazywało obniżenie ekspresji docelowego mRNA podczas testów na liniach komórkowych. Przykładowo rybozym SOFA-HDV-Rz-NP-804 zmniejszał ilość docelowego mRNA o 38%. Dodatkowo, połączenie dwóch rybozymów SOFA-HDV nakierowanych na mRNA NP i NS wykazywało obniżenie miana wirusa nawet do 1000 razy u niektórych myszy (107).

Uwagę naukowców skupiły również DNazymy „10-23”, które są bardziej stabilne w komórce, a także tańsze i prostsze w syntezie w stosunku do rybozymów. Badania ukierunkowane były zarówno na mRNA wirusa grypy (108), jak również na konserwatywne rejony vRNA (109). Obie grupy deoksyrybozymów wykazały inhibicję namnażanie wirusa w liniach komórkowych w granicach 22-58%.

Sprawdzono również połączone działanie rybozymów i deoksyrybozymów, które specyficznie wiązały się do RNA kodującego M1 i przecinały cząsteczkę w różnych miejscach. Najlepszy efekt uzyskano dla DNazymu 132 oraz RNazymu 163 (132 oraz 163 stanowią miejsce cięcia zymu). Wykazano, że synergistyczne działanie obu katalizatorów było bardziej efektywne. Zwiększenie efektywności rybozymu uzyskano również stosując oligonukleotydy antysensowe nakierowane na rejony przyległe, po obu stronach sekwencji rozpoznawanej przez Rnazym. Powodowało to obniżenie ekspresji M1 do poziomu niewiele poniżej 50% (103).

### 4.3. Małe interferujące RNA (siRNA)

Zastosowanie małych interferujących RNA (siRNA ang. *small interfering RNA*) w ostatnich latach stało się szeroko stosowaną technologią w wyciszaniu genów. RNAi jest naturalnym mechanizmem wykształconym w celu ochrony organizmu przed wirusami i transpozonomi. Kiedy do komórki dostanie się długie dwuniciowe RNA, zostaje ono rozpoznane przez endonukleazę *Dicer* i jest cięte na krótkie 20-23 dwuniciowe fragmenty zwane małymi interferującymi RNA (siRNA). Następnie siRNA rozpoznawane są przez kompleks wyciszający indukowany RNA (RISC, ang. *RNA-induced silencing complex*), który rozplata dupleks. Nić antysensowa, która pozostaje związana z kompleksem służy do poszukiwania i degradowania komplementarnych mRNA. Wykazano, że syntetyczne siRNA zastosowane w liniach komórkowych mogą symulować naturalne cząsteczki i prowadzić do degradacji docelowych mRNA lub blokować proces translacji (110, 111).

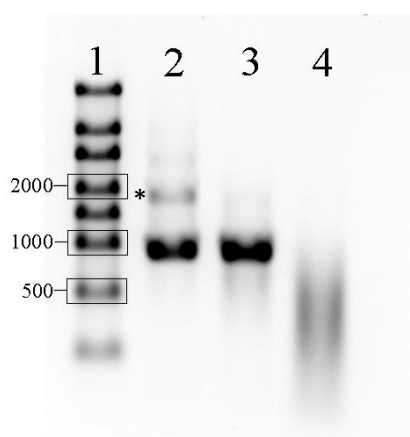
Technologia ta zainteresowała również naukowców zajmujących się wirusem grypy. Zaprojektowano siRNA nacelowane na mRNA genów: NP, PA, PB1, PB2, M i NS, które testowano na liniach komórkowych (112). Cząsteczki siRNA które działały najefektywniej poddano również testom w modelach mysich. Te same siRNA anty-NP i anty-PA inhibowały namnażanie wirusa 4 różnych szczepów (A/PuertoRico/8/34 (H1N1), A/HongKong/156/97 (H5N1), A/Netherlands/219/03 (H7N7), oraz A/Avian/HongKong/1073/99 (H9N2)) (113, 114). Dla porównania, nie udało się zaprojektować siRNA o tak szerokim spektrum działania dla najbardziej zmiennych mRNA HA i NA. W cząsteczkach tych nie znaleziono ciągu 21 konserwatywnych nukleotydów, które mogłyby oddziaływać z mRNA HA i NA wszystkich badanych szczepów. Podkreśla to również szybkie nabywanie oporności wirusa przeciw obecnie stosowanym lekom, które są nacelowane na białko neuraminidazę (115).

## II WYNIKI I DYSKUSJA

### 1. Badanie struktury segmentu 8 vRNA wirusa grypy typu A

#### 1.1. Otrzymywanie vRNA8

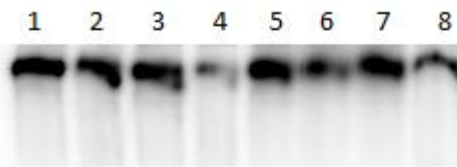
Plazmid pPol1 zawierający sekwencję cDNA 8 segmentu wirusa grypy szczepu A/VietNam/1203/2004 (H5N1) otrzymano z laboratorium profesora Beak Kim (Wydział Mikrobiologii i Immunologii Uniwersytetu w Rochester, USA). Plazmid ten zawierał sekwencję odpowiadającą mRNA wirusa grypy. Chcąc otrzymać vRNA segmentu 8 (vRNA8) zaprojektowano odpowiednie startery dodając równocześnie brakujące sekwencje niekodujące NCR (ang. *Non-Coding Region*). Starter vRNA8 Rev zawierał dodatkowy 12 nukleotydowy fragment o sekwencji komplementarnej do 3'-NCR. Starter vRNA8 For zawierał sekwencję 13 nukleotydową, która stanowiła 5'-NCR. Dodatkowo, oligonukleotyd ten zawierał promotor polimerazy RNA T7 (Tab. 14 MATERIAŁY I METODY). W reakcji PCR otrzymano matrycę DNA, która w dalszych etapach była stosowana do transkrypcji *in vitro* (MATERIAŁY I METODY) 875 nukleotydowej cząsteczki genomowego RNA segmentu 8 (vRNA8). Homogenność uzyskanego RNA sprawdzano na 0,8% żelu agarozowym, a przykładowy wynik przedstawiono na rysunku 15.



**Rysunek 1.** Rozdział vRNA8 w 0,8% żelu agarozowym. 1 - marker wielkości RNA; 2 - vRNA8 bezpośrednio po transkrypcji, \* na wysokości 2000 widoczny prążek odpowiadający cząsteczce homodimeru vRNA8; 3 - vRNA8 poddane fałdowaniu: 5min 65°C, bufor FB1; 4 - vRNA8 poddane fałdowaniu 5 min 95°C, bufor FB1.

## 1.2. Fałdowanie vRNA8

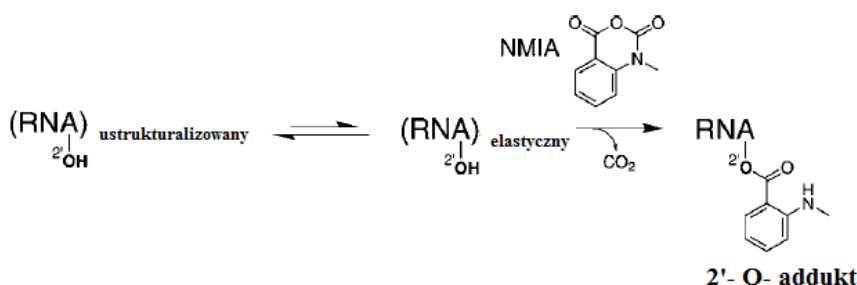
W pierwszym etapie ustalono odpowiednie warunki buforowe, w których badana cząsteczka RNA fałdowała się. Do tego celu użyto buforów z różnym stężeniem chlorku sodu lub chlorku potasu w buforze HEPES lub w buforze kokodylanu sodu w obecności 5 mM chlorku magnezu. Cząsteczkę inkubowano przez 5 min w temperaturze 65°C, a następnie powoli schładzano przez około 30 min. Ocenę fałdowania odbywała się w 6% żelu poliakrylamidowym, w warunkach natywnych. Zaobserwowano, że niezależnie od warunków, cząsteczka migruje jako jeden główny prążek (Rys. 16). Do dalszych badań wybrano bufor w składzie 300 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub> (bufor FB1). Ponieważ cząsteczka RNA miała tendencję do tworzenia homodimeru co uwidaczniało się na żelach agarozowych (Rys. 15), postanowiono dobrać najlepsze warunki temperaturowe zwijania vRNA8 do jednej, natywnej struktury. Optymalną temperaturą było 65°C. Po 5 minutach inkubacji w wybranej temperaturze, roztwór RNA wolno schładzano do temperatury pokojowej, a następnie наносzono na 0,8% żel agarozowy. Cząsteczka ogrzewana w buforze do temperatury 95°C ulegała degradacji, natomiast w temperaturze 65°C tworzyła jeden zwarty prążek nie tworząc homodimeru (Rys. 15). Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły ustalić podstawowe warunki fałdowania opisane szczegółowo w MATERIAŁACH I METODACH.



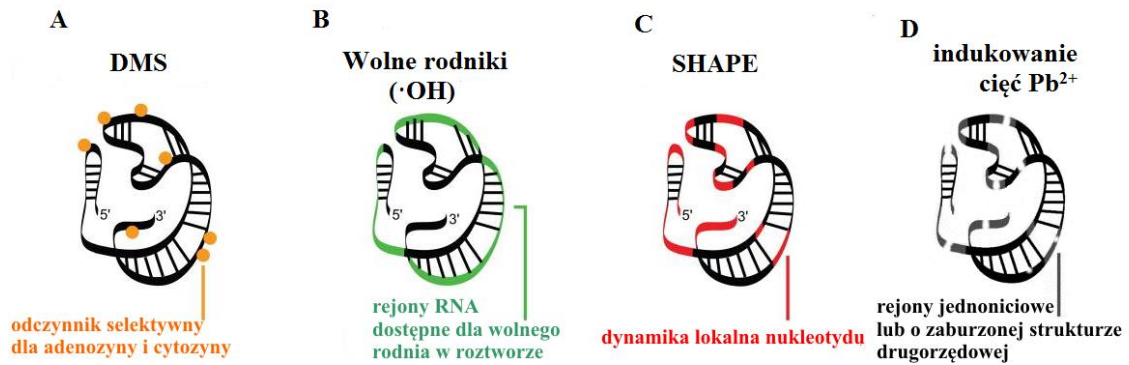
**Rysunek 2.** Rozdział elektroforetyczny vRNA8 w 6% żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych. Rozdział poprzedzony był fałdowaniem w różnych buforach: (1) – 300 mM NaCl, 50 mM kakodylan sodu pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>; (2) – 1 M NaCl, 50 mM kakodylan sodu pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>; (3) – 300 mM KCl, 50 mM kakodylan sodu pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>; (4) – 1 M KCl, 50 mM kakodylan sodu pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>; (5) – 300 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>; (6) – 1 M NaCl, 50 mM HEPES pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>; (7) – 300 mM KCl, 50 mM HEPES pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>; (8) – 1 M KCl, 50 mM HEPES pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

### 1.3. Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej vRNA8

Jedną z głównych metod badania struktury drugorzędowej RNA zastosowanej w poniższej pracy była technika SHAPE (ang. *Selective 2'-Hydroxyl Acylation and Primer Extension*). Metodę tą opracowano w grupie Kevina Weeks'a i z powodzeniem wykorzystano do określenia struktury drugorzędowej całego genomowego RNA wirusa HIV-1 (116-118). Jako czynnik modyfikujący stosuje się małe elektrofilowe cząsteczki, które selektywnie reagują z dostępną grupą 2'-hydroksylową rybozy w szkielecie RNA. W poniższych badaniach jako czynnik modyfikujący zastosowano NMIA (ang. *N-methylisatoic anhydride*). W wyniku reakcji powstaje nukleotyd z dołączonym 2'-O-adduktem (Rys. 17). Wydajność reakcji zależy od dostępności grupy 2'-hydroksylowej oraz labilności rybozy, co z kolei uzależnione jest w dużej mierze od struktury drugorzędowej RNA. W uproszczeniu, modyfikacji ulegają preferencyjnie fragmenty jednoniciowe, natomiast modyfikacja rejonów dwuniciowych jest utrudniona. Resztę nukleotydową, która uległa modyfikacji przez NMIA, odczytuje się w reakcji wydłużania startera (ang. *primer extension*) z zastosowaniem odwrotnej transkryptazy. Zatrzymuje się ona na zmodyfikowanym przez NMIA nukleotydzie. (Rys. 18).



**Rysunek 3.** Schemat selektywnej modyfikacji grupy 2'-hydroksylowej za pomocą NMIA w metodzie SHAPE.

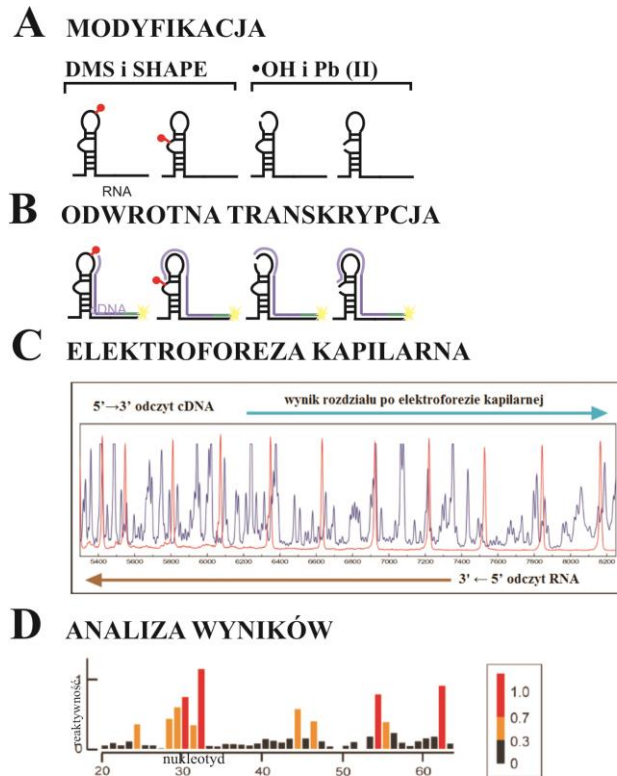


**Rysunek 4.** Schematyczne przedstawienie metod mapowania chemicznego, wykorzystane w poniższej pracy. A – selektywna modyfikacja niesparowanych reszt adeniny i cytozyny, oraz uwikłanych w niekanoniczne oddziaływania lub znajdujących się w otoczeniu niekanonicznych par zasad; B – informacja na temat rejonów RNA dostępnych dla wolnego rodnika w roztworze; C – informacja na temat lokalnej dynamiki poszczególnych nukleotydów, D – informacja na temat rejonów jednoniciowych oraz rejonów o zaburzonej strukturze drugorzędowej.

Drugą podstawową metodą, którą wykorzystano w badaniu struktur drugorzędowych RNA, była modyfikacja z zastosowaniem siarczanu dimetylu (DMS, ang. *dimethyl sulfate*) (Rys. 18). Technikę tą do badania struktury drugorzędowej RNA wprowadzono w roku 1980. DMS modyfikuje selektywnie azot N1 reszty adeniny oraz azot N3 reszty cytozyny, w wyniku czego podczas reakcji odwrotnej transkrypcji następuje zatrzymanie pracy enzymu i powstanie niepełnej długości produktu. Siarczan dimetylu modyfikuje również resztę guanozyny w pozycji N7. Modyfikacji tej nie można jednak wykryć z zastosowaniem reakcji odwrotnej transkrypcji. Jedynym sposobem zidentyfikowania jest wywołanie cięcia RNA z zastosowaniem borowodoru sodu i aniliny (119). W przedstawionych badaniach zastosowano odczyt modyfikacji RNA z zastosowaniem reakcji odwrotnej transkrypcji.

Każdorazowo przed przystąpieniem do reakcji modyfikacji wykonywano fałdowanie badanego RNA. Następnie, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale MATERIAŁY I METODY prowadzono reakcję modyfikacji RNA i kolejne etapy, które umożliwiały odczyt zmodyfikowanych reszt nukleotydowych. Schematyczne postępowanie przedstawiono na rysunku 19.



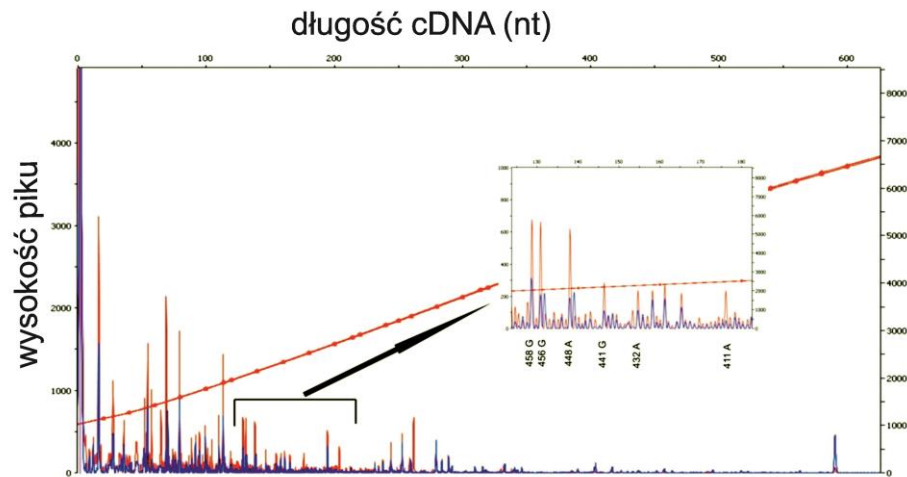


**Rysunek 5.** Schematyczne przedstawienie poszczególnych etapów mapowania chemicznego. A – modyfikacja RNA w wybranych warunkach; B – reakcja odwrotnej transkrypcji, kolorem fioletowym oznaczono powstające cDNA, gwiazdka oznacza przyłączoną na końcu 5' startera fluoresceinę, umożliwiającą odczyt fragmentów podczas elektroforezy kapilarnej; C – przykładowy wynik elektroforezy kapilarnej. Niebieskim kolorem oznaczono rozdzielanie przykładowej mieszaniny cDNA, kolorem czerwonym marker długości; D – wykres przedstawiający reaktywność poszczególnych nukleotydów.

Stężenie odczynnika modyfikującego (NMIA) dobrano eksperymentalnie tak, aby modyfikacja pojawiała się średnio co 300 nukleotydów. Optymalne stężenie NMIA w próbie wynosiło 4 mM. Próbkę po reakcji odwrotnej transkrypcji poddawano hydrolizie zasadowej z zastosowaniem 1 M NaOH w celu pozbycia się matrycowego RNA. Tak przygotowaną próbkę po zobojętnieniu i strąceniu, rozpuszczano w wodzie i przekazywano do Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej Wydziału Biologii na Uniwersytecie Adama Mickiewicza w Poznaniu. W pracowni tej wykonywana była elektroforeza kapilarna przygotowanych fragmentów cDNA wraz z dodatkiem wzorca, który umożliwiał analizę długości rozdzielonych fragmentów. Dodatkowo, dla każdego startera wykonano reakcję odwrotnej transkrypcji z zastosowaniem dideoksynukleotydów (ddGTP i ddATP) w celu identyfikacji miejsc modyfikacji. Uzyskane wyniki z elektroforezy kapilarnej analizowano przy pomocy programu *Peak Scanner v 1.0*, a dalsze przetwarzanie danych następowało w programie

*Microsoft Excel*. W analizie fragmentów posłużono się metodą „2-8%”, opracowaną w zespole Kevina Weeks’a (120, 121). Metoda ta pozwala na normalizację uzyskanych wyników oraz transformację wszystkich wyników do jednej skali. Zasada „2-8%” zakłada odrzucenie z analizy 2% najwyższych pików, co sprawia, że wyliczone reaktywności poszczególnych nukleotydów mieszczą się w granicach od 0 do ~2. Reakcję modyfikacji RNA i następującej po niej odwrotnej transkrypcji wykonano w trzech powtórzeniach, a następnie obliczono średnią reaktywność dla każdego nukleotydu.

W reakcji odwrotnej transkrypcji dla vRNA8 wykorzystano 6 starterów znakowanych na końcu 5’ fluoresceiną (Tab. 18 MATERIAŁY I METODY). Długość odczytu dla pojedynczego startera zależała od jego lokalizacji, jak również struktury drugorzędowej RNA. Najdłuższy odczyt uzyskano dla startera St2 (komplementarny do vRNA8 w rejonie 719-740), było to 460 nukleotydów, zaś najkrótszy dla startera St6 (komplementarny do vRNA8 w rejonie 142-163) – 120 nukleotydów. Warto zauważyć, że starter St6 był komplementarny do rejonu najbliższej końca 5’ vRNA8. Średni odczyt wahał się między 120 a 310 nukleotydów w zależności od docelowego dla startera rejonu w vRNA8. Startery St1 oraz St2 dodatkowo zawierały w swojej sekwencji zmodyfikowane nukleotydy z serii LNA. Modyfikacja ta służyła zwiększeniu stabilności termodynamicznej wiązania się startera do cząsteczki RNA. Wynikiem tego była lepsza wydajność odwrotnej transkrypcji z udziałem zmodyfikowanego startera w stosunku do startera DNA. Na rysunku 20 przedstawiono przykładowy wynik rozdziału uzyskany w reakcji wydłużania startera St3.



**Rysunek 6.** Przykładowy wynik elektroforezy kapilarnej dla startera St3. Kolorem czerwonym oznaczono reakcję modyfikacji, kolorem niebieskim oznaczono próbę kontrolną.

### 1.3.1. Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej vRNA8 metodą SHAPE

Wyniki z mapowania chemicznego z zastosowaniem metody SHAPE dostarczyły informacji na temat 73,4% nukleotydów RNA segmentu 8 wirusa grypy. Warto jednak zauważyć, że 8% nukleotydów vRNA8, na temat których nie udało się otrzymać informacji, pochodziła z końca 3' cząsteczki vRNA8. Fragment ten stanowił miejsce, do którego przyłączał się starter St1. Wykorzystana metoda rozdziału fragmentów cDNA z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej uniemożliwiała analizę około 50 pierwszych nukleotydów znajdujących się za starterem (łącznie z miejscem hybrydyzacji startera nie odczytano rejonu 807-875).

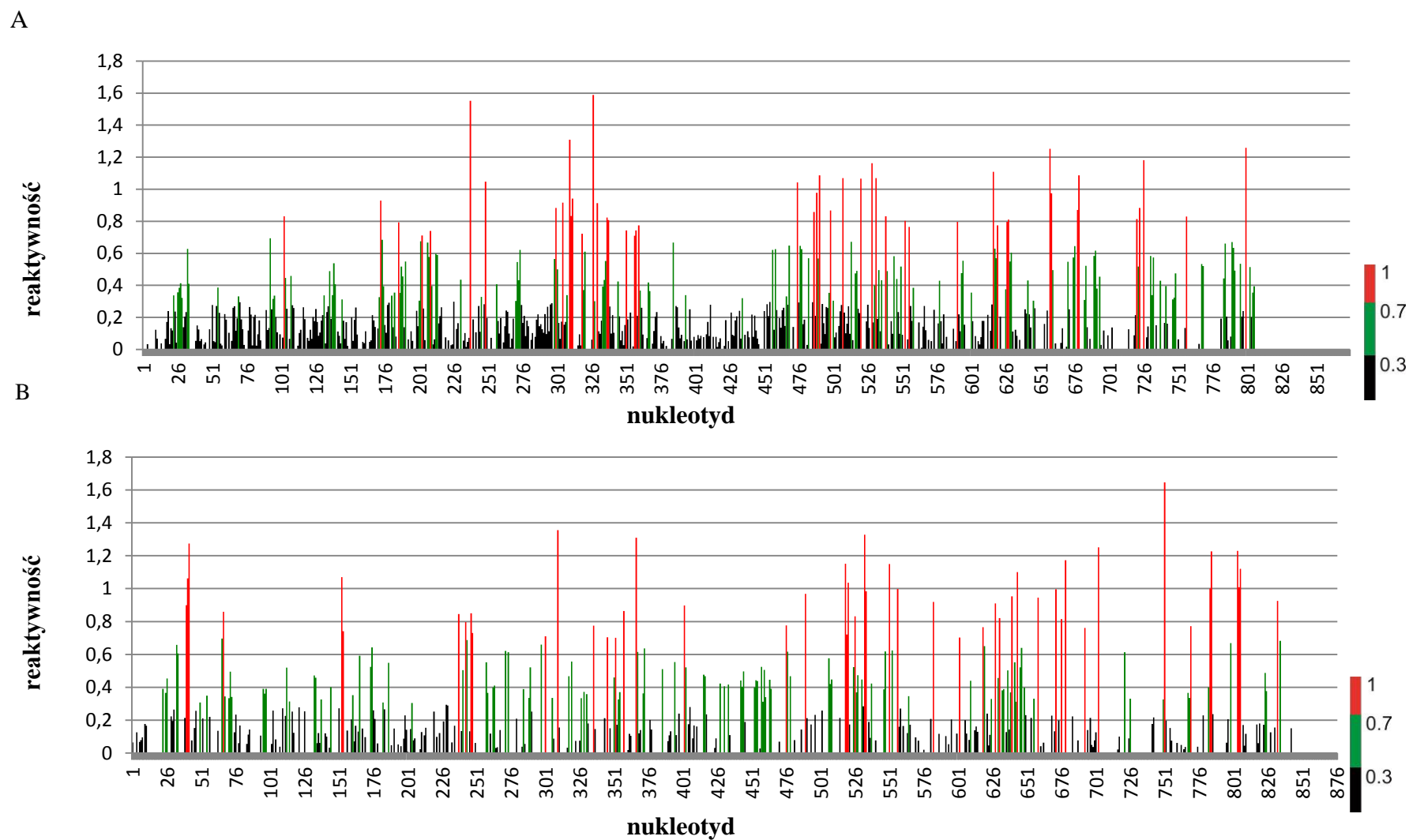
Reaktywność poszczególnego nukleotydu przedstawiono jako stosunek wysokości pików, odpowiadającego zmodyfikowanemu nukleotydowi, do średniej wyliczonej z 8% najwyższych pików. Zastosowano normalizację wyników do skali 0 – 1. Przyjęto, że nukleotydy o reaktywności między 0,3 a 0,7 wykazują średnią reaktywność, a powyżej 0,7 wysoką reaktywność.

Zastosowanie metody SHAPE wskazało 47 nukleotydów o wysokiej reaktywności i 121 o reaktywności średniej. W całej cząsteczce występują rejony bardziej i mniej reaktywne (Rys. 21). Rozkład reaktywnych nukleotydów jest nierównomierny i zaobserwować można ich skupienie wokół najwyższych reaktywności przypominając swoim kształtem krzywą Gaussa. Najmniej reaktywnymi

rejonami są obszary pomiędzy 1 i 90 nukleotydem oraz pomiędzy 370 – 455. W rejonach tych występują pojedyncze nukleotydy o średniej reaktywności SHAPE. Najbardziej reaktywne były regiony 170 – 362 oraz 455 – 560. We fragmencie 170 – 362 wystąpiło 20 nukleotydów o wysokiej reaktywności SHAPE, a 34 o reaktywności średniej. Stanowiło to 32% wszystkich reaktywnych nukleotydów powyżej 0,3. W rejonie 455 – 560 zaobserwowano 12 nukleotydów o wysokiej reaktywności i 31 o średniej. W skali całej cząsteczki vRNA8 stanowiło to 19,6% nukleotydów o reaktywności powyżej 0,3.

### **1.3.2. Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej vRNA8 siarczanem dimetylu**

Modyfikacja siarczanem dimetylu dostarczyła informacji na temat ustrukturalizowania reszt adenozyiny i cytozyny w cząsteczce vRNA8. Modyfikacji uległo 159 zasad, z czego 49 zasad wykazywało wysoką reaktywność, natomiast 110 – średnią (Rys. 21). W przypadku modyfikacji DMS, w przeciwieństwie do modyfikacji NMIA, rozkład reaktywnych zasad był bardziej równomierny, obejmując jednocześnie rejony dostępne dla NMIA. Jednocześnie zaobserwowano 3 obszary, w których ilość zmodyfikowanych zasad była większa: 238 – 248, 519 – 538, 619 – 649.



**Rysunek 21.** Reaktywność nukleotydów w vRNA8, A – reaktywności nukleotydów w metodzie SHAPE, B – reaktywności nukleotydów w obecności siarczany dimetylu. Wysoka reaktywność  $>0,7$ ; średnia reaktywność  $0,3-0,7$ ; brak reaktywności  $0-0,3$

### 1.3.3. Struktura drugorzędowa vRNA8 – CM-vRNA8

Zebrane dane z mapowania cząsteczki vRNA8 posłużyły do zaproponowania jej struktury drugorzędowej z wykorzystaniem programu *RNAstructure 5.3* (122). Oprogramowanie to wykorzystuje parametry termodynamiczne modelu najbliższego sąsiedztwa, generując strukturę drugorzędową o najniższej energii swobodnej (123). Zaletą tego programu była możliwość wprowadzenia wyników z mapowań chemicznych korzystając z odpowiednich modułów proponowanych przez autorów. Reaktywności pochodzące z mapowania metodą SHAPE wprowadzono do programu korzystając z funkcji: „*read SHAPE reactivity- pseudo energy constraints*”. Moduł ten pozwalał na wprowadzenie znormalizowanych wyników, a następnie program przeliczał je na energię swobodną według zadanych parametrów. Optymalnymi parametrami dla długich cząsteczek i zastosowanymi dla vRNA8 był: „*slope*” równy 2,6 oraz „*intercept*” -0,8 kcal/mol (124).

Rezultaty uzyskane podczas modyfikacji siarczanem dimetylu wprowadzono do programu *RNAstructure 5.3* korzystając z funkcji „*chemical modification*”. Funkcja ta uwzględnia specyfikę modyfikacji odczynnikami chemicznymi typu DMS, CMCT, ketoksal. Zakłada ona, że modyfikacja zasady następuje w nukleotydach znajdujących się w rejonach jednoniciowych. Dodatkowo, uwzględnia możliwość modyfikacji zasad w kanonicznych parach A-U i G-C, gdy pary te zamykają pętle, oraz niekanonicznej parze G-U w dowolnym miejscu w strukturze.

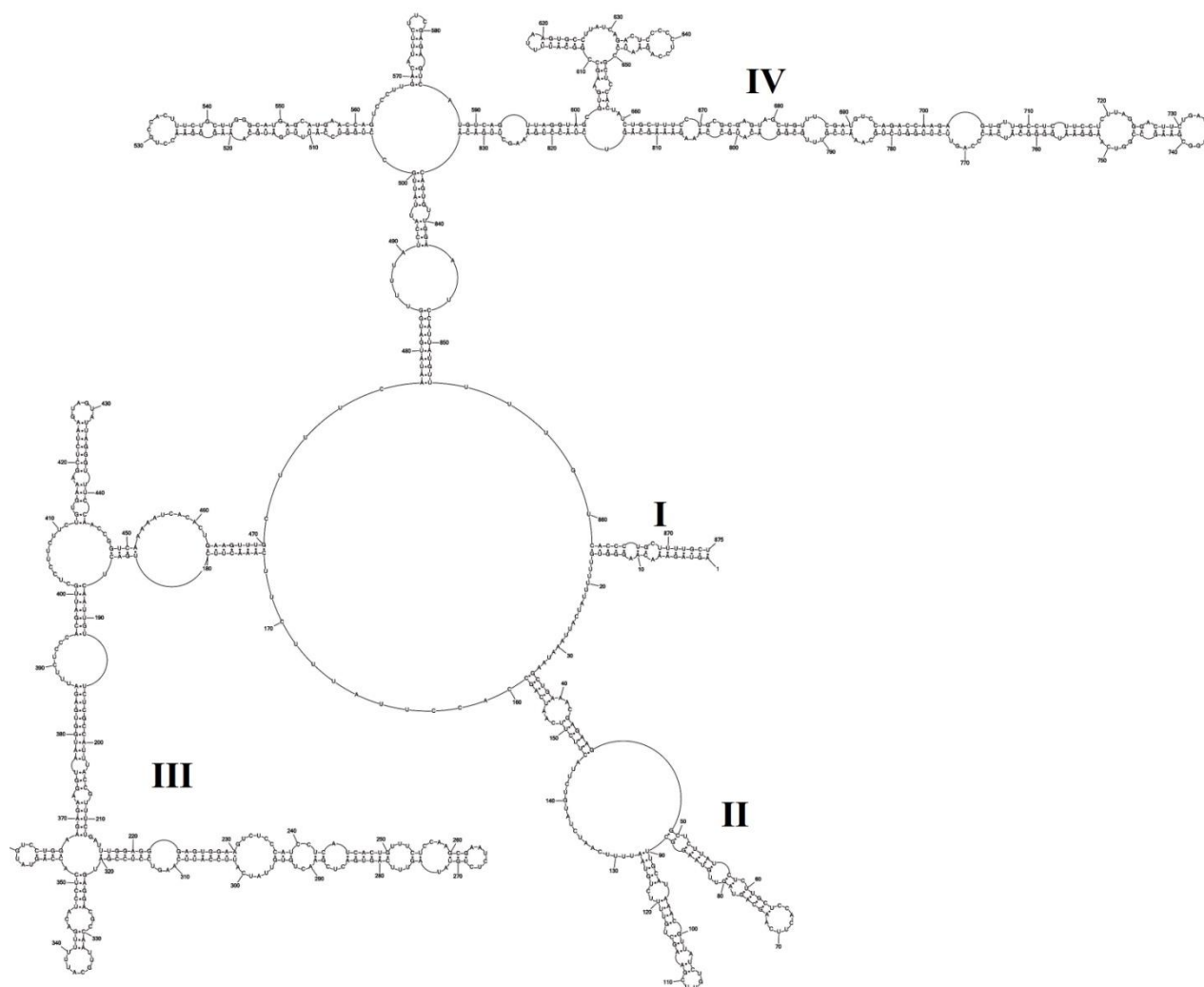
W pierwszej kolejności wygenerowano strukturę drugorzędową vRNA8, która nie posiadała żadnych ograniczeń w postaci modyfikacji chemicznych. W ten sposób uzyskano 22 modele, których energia swobodna różniła się maksymalnie o 10% od najkorzystniejszej energii. Najniższa energia swobodna wynosiła -245,2 kcal/mol. Model ten był wysoce ustrukturalizowany. Zawierał sparowane końce 3' i 5' i posiadał 4 wyraźne domeny (Rys. 22).

W następnym etapie do programu *RNAstructure 5.3* wprowadzono wszystkie wyniki uzyskane techniką SHAPE, natomiast z wyników mapowania DMS wykorzystywano tylko te reszty adeniny i cytozyny, które wykazywały wysoką reaktywność. Na podstawie wprowadzonych danych program wygenerował 18 modeli struktury drugorzędowej o korzystnej energii swobodnej, w których maksymalna różnica  $\Delta G^{\circ}_{37}$  wynosiła 10%. Struktura pierwsza posiadała najkorzystniejszą energię

swobodną wynoszącą -380,7 kcal/mol (Rys.23). W dalszej części do opisu tej struktury posłużył skrót CM-vRNA8 (ang. *chemical mapping –vRNA8*).

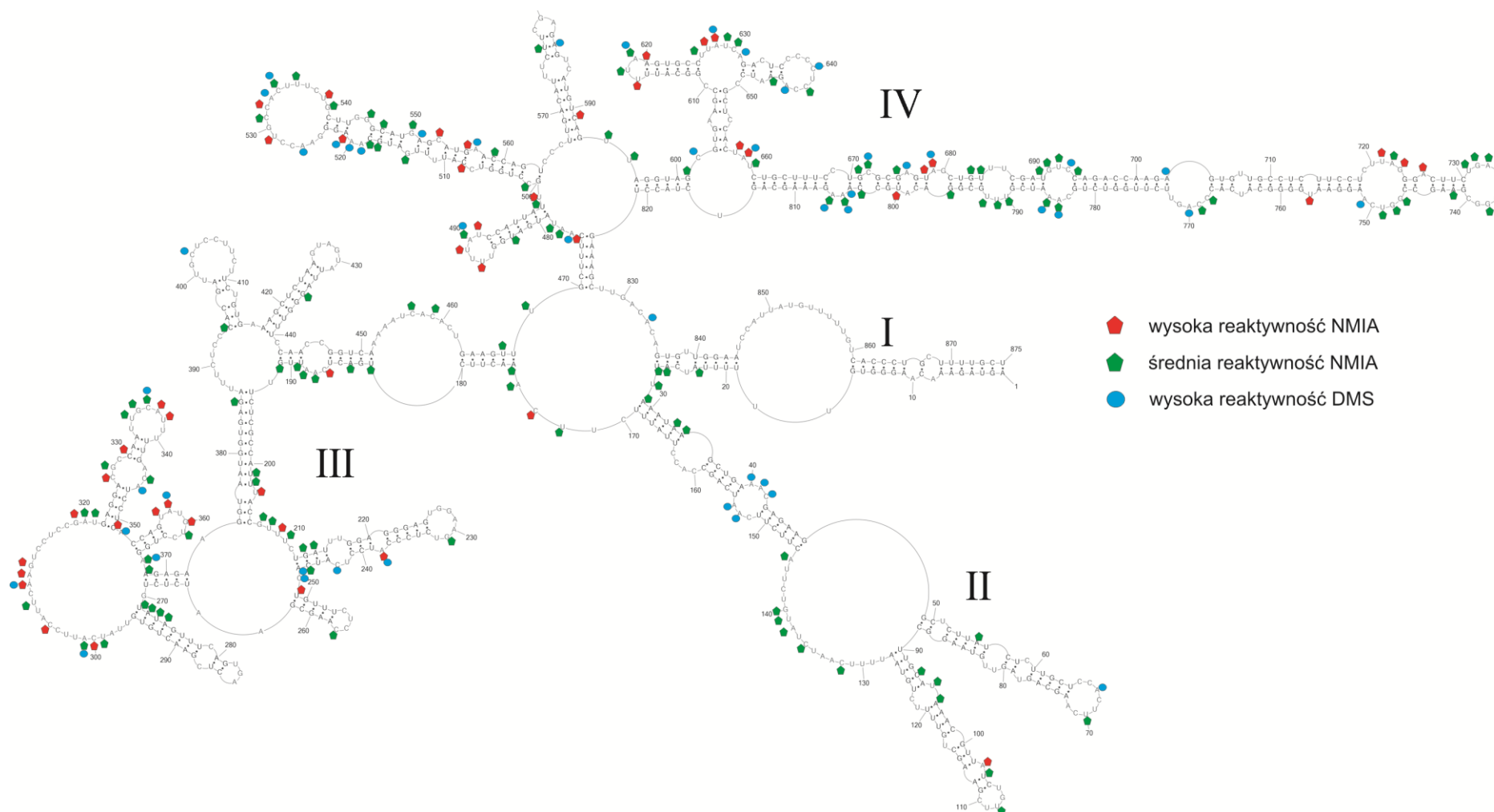
Wygenerowana struktura drugorzędowa miała charakter domenowy. Dla ułatwienia omawiania cząsteczki poszczególne domeny ponumerowano zaczynając od sparowanych końców 3' i 5' (domena I) i poruszając się zgodnie ze wskazówkami zegara przyznano nazwy kolejnym domenom, co zilustrowano na rysunku 23. W skład domeny I wchodziły rejony 1-27 oraz 836-975, domena II rejon 28-169, domena III rejon 170-468, oraz domena IV rejon 469-835.

Uzyskany model struktury drugorzędowej, CM-vRNA8, był wysoce ustrukturalizowany. Zawierał 15 struktur typu spinka do włosów, liczne wybrzuszenia jedno i dwustronne, jak również pętle wieloramienne. Na model struktury drugorzędowej naniesiono wyniki z mapowań chemicznych. Można zauważyć, że domeny wykazywały różną reaktywność względem odczynników mapujących. Najmniejsza ilość zmodyfikowanych nukleotydów znajdowała się w domenie I. Wynikało to z obecności w tym rejonie miejsca wiązania startera 1 (St1). W związku z tym uniemożliwione było odczytanie ewentualnych modyfikacji w rejonie 807-875. Niewielką reaktywnością, zarówno w metodzie SHAPE jak i z zastosowaniem siarczanu dimetylu, cechowała się domena II. W domenie tej tylko 8% nukleotydów wykazywało reaktywność SHAPE powyżej 0,3, natomiast z DMS reagowało 39% reszt adeniny i cytozyny. Najbardziej reaktywnym fragmentem była domena IV, w której aż 51% nukleotydów wykazywało reaktywność SHAPE powyżej 0,3, a z DMS reagowało 39% zasad



**Rysunek 22.** Struktura drugorzędowa vRNA8 wygenerowana przez program *RNAstructure* 5.3 bez dodatkowych ograniczeń. Energia swobodna przedstawionej struktury wynosi -245,2 kcal/mol.



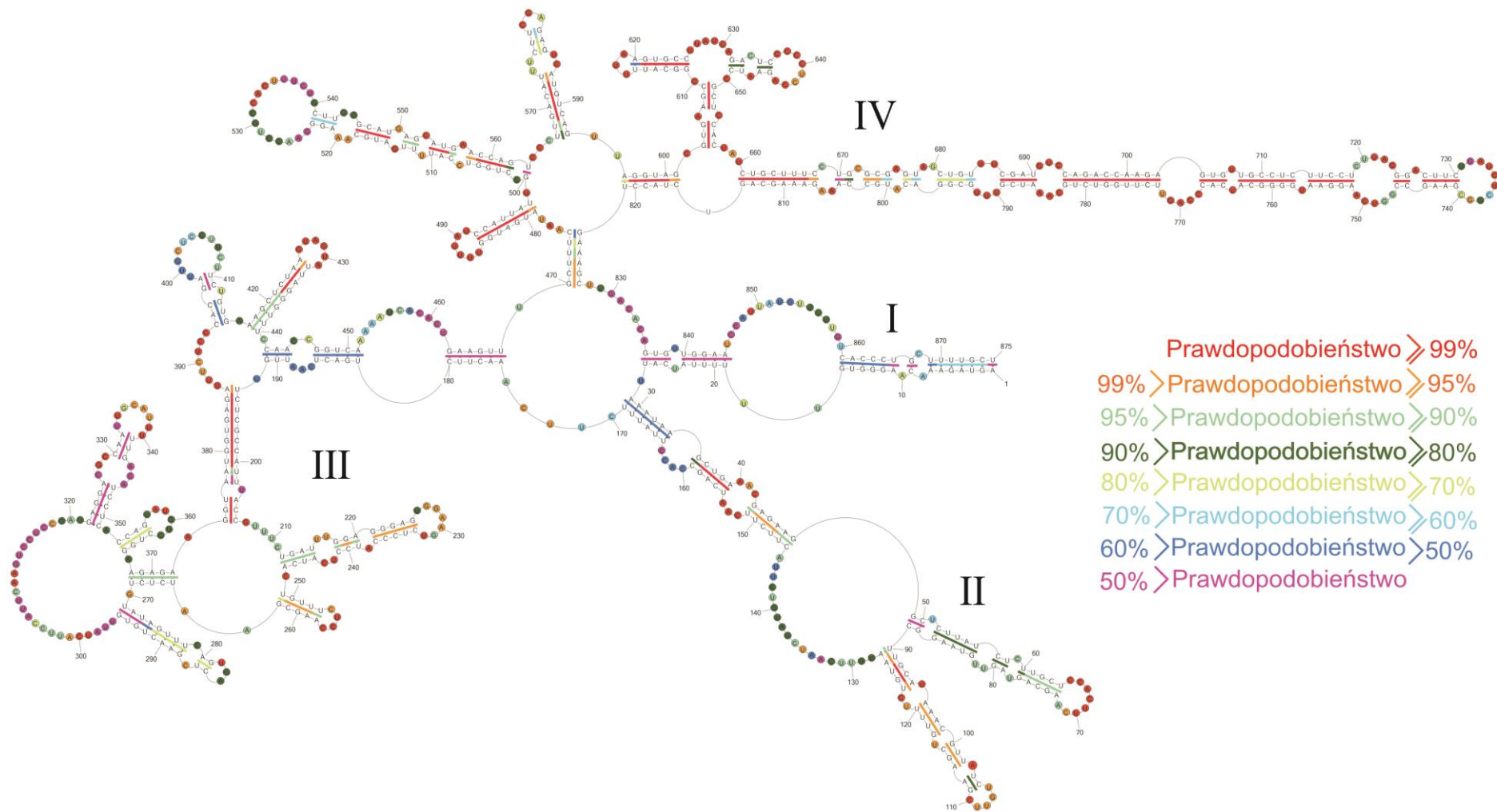


**Rysunek 23.** CM-vRNA8. Struktura drugorzędowa vRNA8 wygenerowana w programie *RNAstructure 5.3*. Jako ograniczenia wykorzystano wyniki mapowania techniką SHAPE i modyfikacje odczynnikiem DMS. Energia swobodna przedstawionej struktury wynosi  $-380,7$  kcal/mol. Rejon 807-875 nie został zanalizowany metodą SHAPE, natomiast rejon 836-875 w mapowaniu DMS.

#### 1.3.4. Prawdopodobieństwo występowania par zasad i niesparowań w modelu CM-vRNA

Prawdopodobieństwo występowania określonej pary zasad lub niesparowanego nukleotydu w strukturze CM-vRNA8 obliczono w programie *RNAstructure 5.3* korzystając z funkcji „*particion funcion RNA*”. Algorytm oblicza z jakie jest prawdopodobieństwo występowania określonej pary zasad lub określonych niesparowań analizowanej struktury drugorzędowej w stosunku do wszystkich struktur suboptymalnych wygenerowanych przez program. Bardziej prawdopodobne pary zasad są z większym prawdopodobieństwem poprawienie przewidziane przez program. Jest to więc cenna informacja pozwalająca ocenić model struktury drugorzędowej.

W obliczeniach wykorzystano dane o strukturze drugorzędowej uzyskane metodą SHAPE oraz z modyfikacji siarczanem dimetylu. Wprowadzono je podobnie, jak opisano powyżej, ale w module: „*particion funcion RNA*”. Uzyskana została macierz prawdopodobieństwa, którą następnie wizualizowano na strukturze CM-vRNA8 stosując funkcję: „*add probability color annotations*” (125). Wyniki przedstawiono na rysunku 24 zaznaczając kolorami wysokość prawdopodobieństwa struktury, a więc występowania poszczególnych par zasad i rejonów jednoniciowych. Uzyskane wyniki wskazały, że struktura drugorzędowa domeny IV cechuje się najwyższym prawdopodobieństwem. Większość par zasad i jednoniciowych nukleotydów znajdujących się w tym rejonie posiadała prawdopodobieństwo powyżej 99%. Jedyne pojedyncze nukleotydy wykazały niższe prawdopodobieństwo. Strukturę drugorzędową domeny III charakteryzowało zróżnicowane prawdopodobieństwo. W domenie tej znajdowało się 36 nukleotydów, które z prawdopodobieństwem mniejszym niż 50% tworzyły określone pary zasad i jednocześnie 22 nukleotydy, które z podobnym, niskim prawdopodobieństwem znajdowały się w rejonach jednoniciowych.



**Rysunek 24.** CM-vRNA8. Prawdopodobieństwo występowania par zasad i rejonów jednoniciowych oszacowane w programie *RNAstructure*.

#### 1.4. Strukturalno-sekwencyjna analiza bioinformatyczna

Wirus grypy, jak każdy wirus RNA, cechuje się dużą zmiennością genomową która prowadzi do powstawania nowych szczepów i podtypów. W momencie przeprowadzania analiz bioinformatycznych istniało 14967 sekwencji segmentu 8 różnych szczepów wirusa grypy zdeponowanych w bazie danych *NCBI* (ang. *Influenza Virus Database National Center for Biotechnology Information*) (w momencie pisania pracy było ich już około 25584). Analiza sekwencji segmentu 8 vRNA wirusa grypy wykonana została w kilku celach.

Pierwsza sekwencyjno-strukturalna analiza bioinformatyczna, miała na celu znalezienie konserwatywnych motywów strukturalnych. W początkowym etapie wybrano kilkanaście zestawów sekwencji vRNA segmentu 8 wirusa grypy. Pojedynczy zestaw zawierał sześć różnych sekwencji vRNA8 oraz sekwencję vRNA 8 segmentu badanego szczepu [A/VietnNam/1203/2004 (H5N1)]. Tak przygotowane dane analizowano w programie *RNAz*, w którym poszukiwano struktur potencjalnie konserwatywnych. Program analizował całą cząsteczkę dzieląc ją na fragmenty 120 nukleotydowe („*window size*”) z przesunięciem co 10 nukleotydów („*step size*”). W ten sposób wyselekcjonowano dwa regiony: 210-380 oraz 600-850, w których mogły występować konserwatywne struktury RNA. Następnie, przeanalizowano wszystkie, pełnej długości sekwencje segmentu 8 dostępne w bazie danych *NCBI*. Z dalszej analizy wykluczono sekwencje powtarzające się oraz sekwencje zawierające niezidentyfikowane nukleotydy. W bazie danych zdeponowane są sekwencje antygenomowe (cRNA lub mRNA, nie „+”). W drugim etapie przekształcano więc je do sekwencji genomowych (vRNA, nie „-”). W rezultacie z 14967 początkowych sekwencji pozostało 8146. Wyselekcjonowane sekwencje zestawiono w programie *MAFFT* stosując algorytm *FFT-NS-I*. Przyporządkowanie sporządzono odnosząc się do sekwencji badanego szczepu jako sekwencji wzorcowej. W uzyskanym zestawieniu usunięto wszystkie przerwy tak, aby zachować numerację nukleotydów vRNA badanego szczepu. Następnie spośród całego zestawienia sekwencji wycięto te regiony, które zawierały potencjalnie konserwatywne struktury (używając program *Geneious*). Do kolejnego etapu wybrano tylko sekwencje unikatowe. Z powodu ograniczeń ilości wprowadzanych danych do programu *RNAalifold* losowo wybierano zestawy 300 sekwencji. Czynność taką powtórzono kilkakrotnie. Program *RNAalifold* łączy filogenetyczną analizę zmienności sekwencji z metodą przewidywania struktury

drugorzędowej opartej na zasadach termodynamiki. Zaletą tego programu jest możliwość zastosowania algorytmu do fałdowania cząsteczki jednocześnie dla całego zestawienia sekwencji. Dodatkowym atutem jest fakt, że jeżeli poszczególne sekwencje nie wykazują możliwości wspólnego fałdowania, wówczas program nie wygeneruje także możliwych par zasad. Analiza wskazała możliwe, konserwatywne motywy strukturalne dla rejonów 210-380 oraz 600-850 vRNA segmentu 8.

Druga analiza bioinformatyczna wykorzystywała zestawienie wszystkich pełnych sekwencji segmentu 8 vRNA (przygotowane jak opisano powyżej). Sekwencje zawierały więc 3' i 5' końce oraz nie miały niezidentyfikowanych nukleotydów. W programie *RNAfold* przewidziano struktury drugorzędowe dla wszystkich wyselekcjonowanych sekwencji. Otrzymane struktury drugorzędowe (8146) zestawiono w programie *Microsoft Excel* w postaci *dot brackets* wraz z sekwencjami. Obliczono procent występowania poszczególnych par zasad, przyjmując że częstość parowania powyżej 50% identyfikuje zachowawczą parę zasad. Analiza wykazała, że w sześciu regionach vRNA8 występują konserwatywne pary zasad: 261-270/279-288, 312-317/322-327, 632-636/645-649, 696-701/775-780, 704-713/767-758 oraz 736-740/744-748. Rejony te znajdują się w domenie III i IV. Można zauważyć że przeprowadzone obliczenia zawęziły znalezione pierwszą metodą dwa rejony z potencjalnymi konserwatywnymi motywami i nie są z nimi sprzeczne.

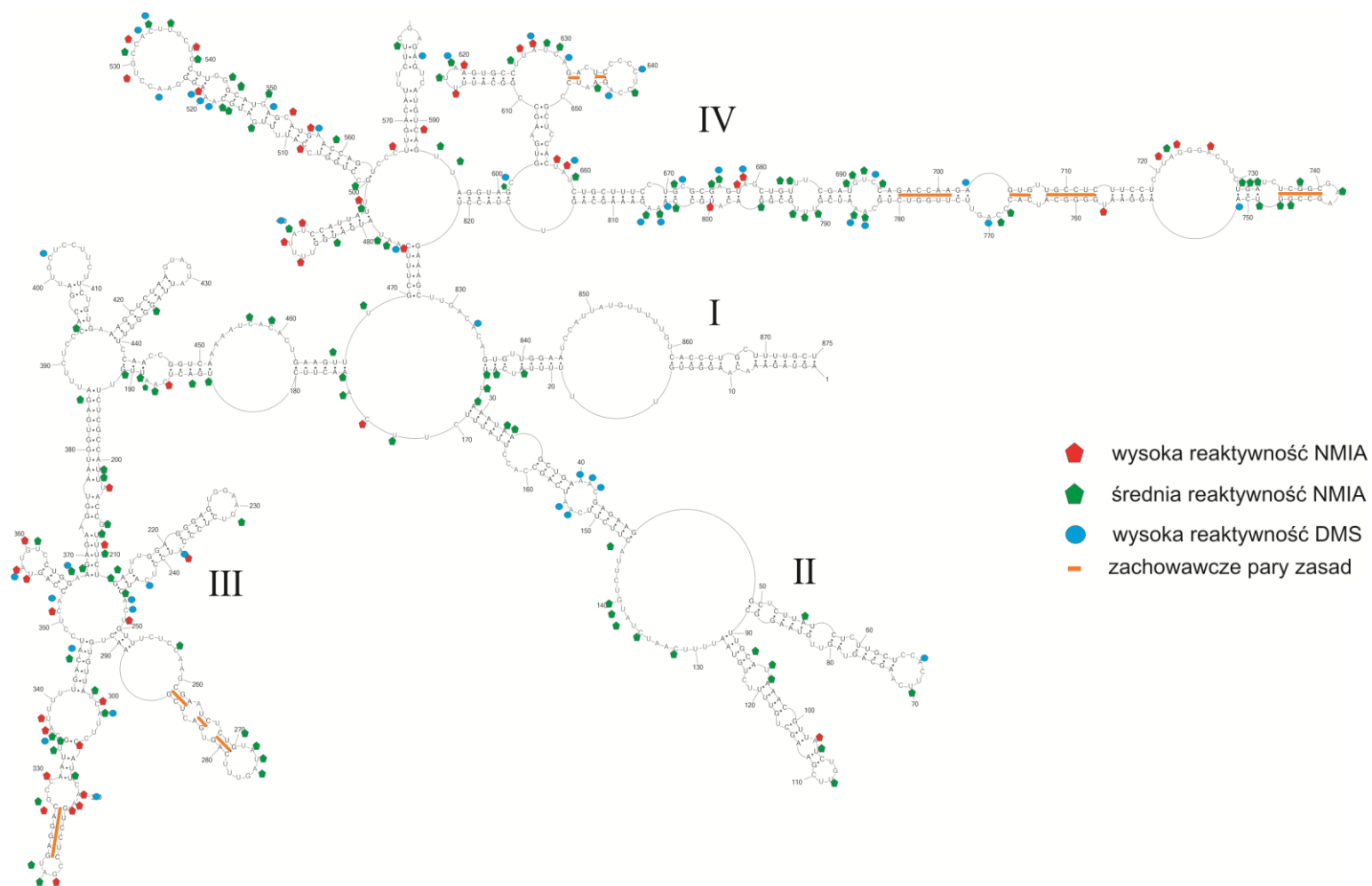
#### **1.4.1. Struktura drugorzędowa vRNA8 – CMC-vRNA8**

Uzyskane wyniki z analizy bioinformatycznej wraz z danymi eksperymentalnymi wprowadzono do programu *RNAstructure 5.3* w celu wygenerowania struktury drugorzędowej. Dane eksperymentalne wprowadzono tak, jak opisano powyżej przy generowaniu struktury CM-vRNA8. Natomiast wyniki z analizy sekwencyjno-strukturalnej wprowadzono do programu korzystając z modułu: „*base pair*” wprowadzając pary zasad w rejonach: 261-270/277-288, 312-317/322-327, 632-636/645-649, 696-713/758-780 oraz 736-740/744-748. Funkcja powodowała wymuszenie w przewidywanej strukturze określonych par zasad. W tym przypadku program wygenerował 11 modeli struktury drugorzędowej, których energia swobodna różniła się maksymalnie o 10% od najbardziej korzystnej. Omawianą w dalszej części strukturę, o najniższej energii swobodnej -373,7 kcal/mol, nazwano CMC-vRNA8 (ang. *chemical mapping and consensus base pair – vRNA8*) (Rys. 25).

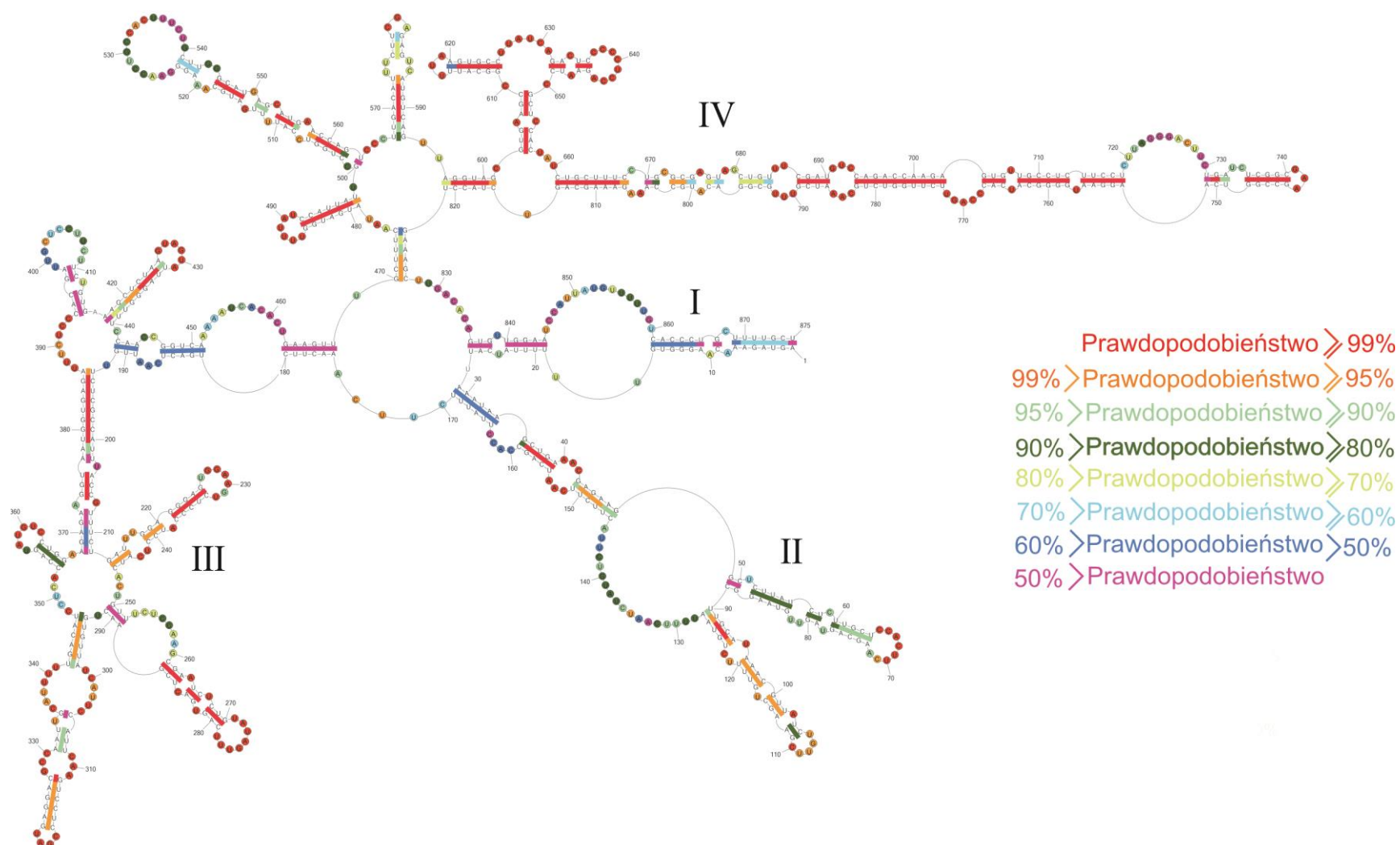
Struktura CMC-vRNA8 również charakteryzowała się występowaniem 4 domen strukturalnych, które ponumerowano zgodnie z modelem CM-vRNA8. Struktura CMC-vRNA8 różni się w kilku rejonach od CM-vRNA8. Istotne zmiany zaobserwowano w domenie III i IV, w których występowały zachowawcze pary zasad. W domenie III przemodelowaniu uległ rejon 206-374, natomiast w domenie IV – rejon 718-752. Należy podkreślić że oba modele struktury vRNA8: CM i CMC są zgodne z wynikami mapowań chemicznych.

### **1.4.2. Prawdopodobieństwo występowania par zasad i niesparowań w modelu CMC-vRNA**

W przypadku struktury CMC-vRNA8 również wykonano analizę prawdopodobieństwa występowania poszczególnych par zasad i rejonów jednoniciowych (Rys. 26). Prawdopodobieństwo struktury w rejonie 206-374 zwiększyło się po wprowadzeniu dodatkowych ograniczeń. Większość nukleotydów posiadało prawdopodobieństwo powyżej 95%. Prawdopodobieństwo struktury w rejonie 718-752 w CMCvRNA8 dla części nukleotydów zmniejszyło się. Szczególnie nukleotydy 723-725 oraz 729-730, których prawdopodobieństwo w strukturze CM-vRNA8 wynosiło powyżej 99% w CMC-vRNA8 spadło poniżej 50%.



**Rysunek 25.** CMC-vRNA8. Struktura drugorzędowa vRNA8 wygenerowana w programie *RNAstructure 5.3*. Jako ograniczenia wykorzystano wyniki mapowania techniką SHAPE, modyfikacji odczynnikiem DMS oraz wprowadzono zachowawcze pary zasad. Energia swobodna przedstawionej cząsteczki wynosi  $-373,7$  kcal/mol. Rejon 807-875 nie został zanalizowany metodą SHAPE, natomiast rejon 836-875 w mapowaniu DMS.



**Rysunek 26.** CMC-vRNA8. Prawdopodobieństwo występowania par zasad i rejonów jednociowych oszacowane w programie *RNAstructure*.



### 1.5. Izoenergetyczne mikromacierze RNA

Izoenergetyczne mikromacierze RNA opracowano w grupie badawczej, w której prowadzono badania. Po raz pierwszy były one wykorzystane do badania struktury 5' końcowego fragmentu retrotranspozonowego RNA z *Bombyx mori*. Metoda ta zakłada, że do sondy oligonukleotydowej na mikromacierzy zwiążą się tylko jednoniciowe i komplementarne fragmenty badanej cząsteczki RNA. Rejony dwuniciowe nie mogą oddziaływać z sondą oligonukleotydową, ponieważ są już zaangażowane w oddziaływania wodorowe. W wyniku mapowania mikromacierzowego otrzymujemy informację na temat jednoniciowych dostępnych do hybrydyzacji fragmentów badanego RNA (126, 127).

Jako sondy mikromacierzowe wykorzystuje się krótkie, 5-7 nukleotydowe, zmodyfikowane oligonukleotydy. Wszystkie sondy to 2'-O-metylo-RNA, które w niektórych pozycjach posiadają nukleotydy typu LNA. Udowodniono, że nukleotydy z serii LNA znacznie wzmacniają trwałość termodynamiczną dupleksu pomiędzy sondą a RNA (dupleksu hybrydyzacyjnego). Ponadto, zamiast adenozyiny w niektóre pozycje wprowadzono 2,6-diaminopurynorybozyd, który z resztą urydyny może tworzyć trzy wiązania wodorowe. Wynikiem tego jest zwiększenie trwałości termodynamicznej dupleksu. Dodatkowo, do wybranych sond, szczególnie tych bogatych w reszty urydyny, na końcu 3' dołączono resztę guanozyiny typu LNA. Poprzez niekanoniczne oddziaływanie wzmacnia ona trwałość dupleksu. Wykazano, że trwałość dupleksu hybrydyzacyjnego większa niż -6 kcal/mol pozwala wykryć dupleks badane RNA-sonda. W wyniku obecności modyfikowanych nukleotydów w sondzie, wszystkie dupleksy hybrydyzacyjne miały podobną wartość energii swobodnej (pomiędzy -8 a -10 kcal/mol). Rezultatem była możliwość identyfikacji fragmentów jednoniciowych niezależnie od sekwencji (128, 129).

Zaletą sond pentanukleotydowych oprócz ich wysokiej selektywności, była możliwość przygotowania pełnej 1024 oligonukleotydowej biblioteki zawierającej wszystkie możliwe kombinacje. Jednakże dla 169 pentamerów nie udało się uzyskać energii swobodnej dupleksu korzystniejszej od -6 kcal/mol, co było niezbędne dla możliwości detekcji takiego dupleksu. W związku z tym nie zostały one zsyntetyzowane i nie są dostępne w bibliotece sond mikromacierzy izoenergetycznych znajdującej się w naszym Zespole. W bibliotece znajduje się 855 pentamerów, ilość ta

pozwała na tworzenie uniwersalnych mikromacierzy do badania dowolnego RNA i takie mikromacierze były wykorzystane w poniższej pracy.

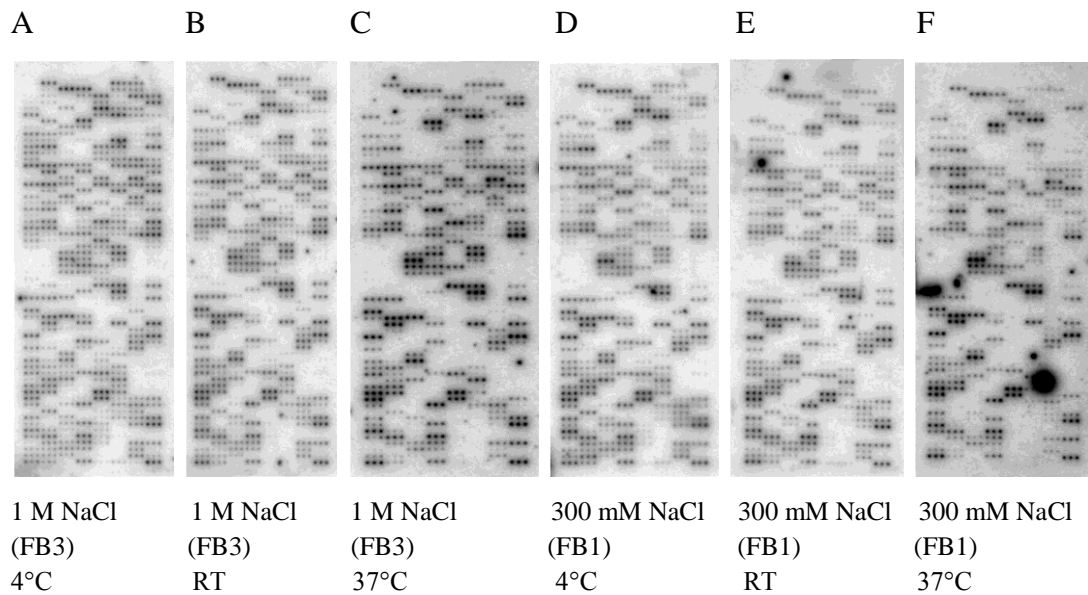
### 1.5.1. Mapowanie mikromacierzowe vRNA8

W pierwszym etapie pracy ustalono sekwencje pentanukleotydów komplementarnych do vRNA8, z przesunięciem o jedną resztę nukleotydową („krok po kroku”) i wybrano modyfikowane sondy z biblioteki izoenergetycznej zsyntetyzowanej w Zespole. Do wyszukiwania posłużono się programami do tego celu napisanymi, przeszukującymi posiadaną bibliotekę sond. Stwierdzono, że istnieją 533 pentamery komplementarne do vRNA8, z których 444 pentamery były dostępne w bibliotece sond mikromacierzowych. Brakujące pentamery przypadały na rejony RNA bogate w reszty adenozyiny oraz urydyny i ze względu na przewidzianą, niekorzystną energię swobodną dupletu hybrydyzacyjnego nie zostały zsyntetyzowane. 191 sond posiadało więcej niż jedno komplementarne miejsce wiązania. Jako miejsce wiązania definiuje się numer nukleotydu badanego RNA licząc od 5’ końca cząsteczki, który oddziałuje ze środkowym nukleotydem sondy mikromacierzowej. 126 sond miało dwa komplementarne miejsca wiązania, 43 - 3 miejsca wiązania, 11 - 4 miejsca wiązania; 8 - 5 miejsc wiązania, 2 - 6 miejsc wiązania, natomiast sonda 129 posiadała aż 7 miejsc komplementarnych do vRNA8 (120, 168, 209, 252, 388, 536, 574). Sumarycznie, dla 741 miejsc w vRNA8 użyto 533 sondy biblioteki izoenergetycznej, co stanowi 85% całej cząsteczki.

Zsyntetyzowano również 10 sond mikromacierzowych o długości 7 nukleotydów, które podobnie jak sondy pentamerowe zawierały nukleotydy z serii LNA, 2,6-diaminopurynorybozyd oraz dodatkowo dołączoną na końcu 3’ cząsteczkę pirenu. Heksanukleotydy były komplementarne do miejsc w cząsteczce vRNA bogatych w reszty adenozyiny i urydyny, dla których nie posiadano pentamerowych sond. Zastosowane modyfikacje posłużyły do zwiększenia trwałości termodynamicznej kompleksu hybrydyzacyjnego. Dodatkową funkcję stabilizacyjną spełniał dołączony na 3’ końcu pseudonukleotyd pirenowy. Interkaluje on z ostatnią parą zasad utworzonego kompleksu hybrydyzacyjnego, co dodatkowo zwiększa jego stabilność o około 2,5 kcal/mol (130). Zastosowanie dodatkowych sond heksanukleotydowych umożliwiło przeanalizowanie całej cząsteczki vRNA8 z użyciem izoenergetycznych mikromacierzy RNA.

Przed przystąpieniem do mapowania mikromacierzowego cząsteczkę vRNA8 znakowano radioaktywnie na końcu 5' i oczyszczano na 8% żelu poliakrylamidowym. Wyznakowana cząsteczka vRNA8 była poddawana fałdowaniu w buforach hybrydacyjnych podobnie, jak przed mapowaniem chemicznym. W mapowaniu mikromacierzowym wykorzystano 4 bufory różniące się stężeniem soli oraz rodzajem kationu jednowartościowego. Badane RNA rozpuszczano w buforze FB1 (300 mM NaCl, MgCl<sub>2</sub>, 50 mM HEPES pH 7.5), FB3 (1 M NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM HEPES pH 7.5); FB4 (300 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM HEPES pH 7.5) oraz FB5 (1 M KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM HEPES pH 7.5). Tak przygotowane RNA наносono na mikromacierz izoenergetyczną i inkubowano w komorze inkubacyjnej w odpowiedniej temperaturze (4°C, temperaturze pokojowej lub w 37°C) przez 18 godzin zachowując 100% wilgotności powietrza. Następnie odmywano niezwiązane RNA przez 5 minut w buforze hybrydacyjnym o tej samej temperaturze w której prowadzono hybrydację. Mikromacierz suszono wirując przez 2 minuty przy 2000 rpm. Wynik hybrydacji wizualizowano za pomocą ekranów odwzorowujących i skanera materiałów radioaktywnych i fluorescencyjnych FLA-5000 (Rys. 27). Analizę ilościową uzyskanych wyników prowadzono w programie *ImageQuant 5.2*, a następnie w programie *Microsoft Excel* obliczano siłę wiązania sondy mikromacierzowej do vRNA8. Przyjęto, że silne wiązanie wykazują sondy, których intensywność jest większa od 1/3 (33,33%) najintensywniejszego miejsca wiązania sondy mikromacierzowej; średnie powyżej 1/9 (11,11%) oraz słabe powyżej 1/27 (3,70%). Hybrydacje we wszystkich warunkach wykonywano trzykrotnie, a uzyskane wyniki uśredniono (Tab. 22 DODATEK).

Największy wpływ na wiązanie się cząsteczki vRNA8 do sond mikromacierzowych miała temperatura. Najwięcej wiązań obserwowano w temperaturze 4°C. Wraz ze wzrostem temperatury zauważalne było zmniejszenie się liczby powstałych dupleksów hybrydacyjnych. Istotny wpływ na siłę wiązania, a czasami też na miejsce wiązania, miał rodzaj zastosowanego kationu oraz jego stężenie. Wraz ze wzrostem stężenia jednowartościowych jonów siła wiązania zwiększała się. Jednocześnie zauważalne były większe różnice pomiędzy siłą wiązania sond oligonukleotydowych dla buforów zawierających Na<sup>+</sup> lub K<sup>+</sup>.



**Rysunek 27.** Przykładowe wyniki hybrydyzacji vRNA8 w różnych buforach i temperaturach.

Cząsteczka vRNA8 składa się z 875 nukleotydów. Tak długa cząsteczka okazała się skomplikowanym obiektem badawczym przy użyciu mikromacierzy ze względu na wysoką ilość miejsc alternatywnego wiązania, szczególnie w 4°C. Wyższa temperatura ograniczała wiązania do słabych miejsc, zwiększając specyficzność. W związku z tym stwierdzono, że najwięcej informacji dostarczy interpretacja miejsc wiązania sond mikromacierzowych w temperaturze 37°C w buforze FB1. Pod uwagę brano tylko silne i średnie miejsca tworzenia się dupleksów hybrydyzacyjnych.

W buforze FB1 w temperaturze 37°C vRNA8 oddziaływało z 23 sondami mikromacierzowymi (Tab. 3, Rys. 28). Analizując miejsca wiązania sond należy brać pod uwagę ewentualne inne komplementarne rejony dla danej sondy. Możemy więc mówić o jednoznacznym miejscu wiązania, definiując je jako jedyne miejsce w RNA możliwe do związania danej sondy mikromacierzowej, oraz o prawdopodobnym miejscu wiązania, określając je jako jedno z możliwych miejsc wiązania danej sondy do RNA. Biorąc wówczas pod uwagę prawdopodobieństwo występowania alternatywnych miejsc wiązania, którymi mogą być zarówno miejsca w pełni komplementarne, jak i nie w pełni komplementarne lecz tworzące stabilne termodynamicznie dupleksy z niesparowaniami.

Analiza wykazała, że 6 sond posiadało jedno miejsce wiązania i były to sondy: 141, 142, 163, 261, 405 oraz 535. Następne 6 sond posiadało dwa komplementarne miejsca wiązania, natomiast pozostałe od 3 do 7 komplementarnych miejsc. Fragmenty

z kilkoma z rzędu, prawdopodobnymi miejscami wiązania sond wskazują na dużą możliwość dostępności danego rejonu vRNA8. Takimi rejonami były: 58-60, 106-108, 121-123, 147-150, 169-171, 178-180, 267-269, 407-412, 575-577, 728-730. Miejsca te w większości znajdują się w rejonach jednoniciowych struktury CMC-vRNA8. Wyjątek stanowią 147-150 oraz 178-180, które w tej strukturze znajdują się w rejonie dwuniciowym.

Dla wszystkich sond wykonano analizę alternatywnych miejsc wiązania, czyli poszukiwanie rejonów, w których pomiędzy sondą a vRNA8 mogą tworzyć się stabilne duplekty hybrydazyjne z niesparowaniami. Pierwszej kolejności wykorzystywano funkcję „*bimolecular binding mode*” dostępną w programie *RNAstructure*, dzięki której określono wszystkie alternatywne miejsca wiązania dla danej sondy oraz obliczono energię swobodną takiego wiązania. Funkcja ta traktuje sondę mikromacierzową jako oligomer RNA, a w obliczaniu energii swobodnej bierze również pod uwagę wpływ wolnych końców dłuższej cząsteczki RNA. Następnie wyliczono energię swobodną ( $\Delta G^{\circ}_{37}$ ) uzyskanego dupletu hybrydazyjnego z wykorzystaniem kalkulatora dostępnego na stronie Zakładu Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych, Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (<http://rnachemlab.ibch.poznan.pl/>). Kalkulator ten oblicza energię swobodną uwzględniając zastosowane modyfikacje w sondach mikromacierzowych. Tym sposobem wytypowano najbardziej prawdopodobne miejsca wiązania: 17, 52, 58-60, 68, 69, 80, 106-108, 117, 121-123, 141, 142, 163, 169-171, 192, 250, 253, 254, 267, 268, 275, 389, 390, 405, 407-412, 436, 534, 535, 537, 538, 575-577, 684, 719, 728-730 oraz 854. Tylko miejsca 142 oraz 163 były jednoznaczne, a więc dana sonda komplementarna nie ma alternatywnego miejsca wiązania. Wyróżnić można również 4 sondy, które miały jedynie dwa miejsca komplementarne i brak przewidzianych niesparowań. Były to sondy komplementarne do 68 i/lub 534, 535 i/lub 68, 80 i/lub 275 oraz 13 i/lub 436. Wymienione powyżej miejsca prawdopodobnego wiązania były zgodne z zaproponowaną strukturą CMC-vRNA8 oraz z danymi z mapowań chemicznych. Wyjątek stanowiło miejsce wiązania 13 oraz 436, oba te miejsca znajdowały się we fragmencie heliakalnym.

W związku z trudnościami interpretacyjnymi niektórych miejsc wiązania sond mikromacierzowych postanowiono przyjrzeć się również rejonom niedostępnym dla hybrydazyjacji (Rys. 29). W cząsteczce występowały długie regiony, w których nie obserwowano oddziaływania vRNA8-sonda.

**Tabela 3.** Wynik hybrydyzacji vRNA8 do mikromacierzy izoenergetycznych.

Komplementarne miejsca wiązania w vRNA8	Nazwa sondy	Sekwencja sondy	Siła wiązania sondy do vRNA8: >33,33% silne wiązanie; 11,11% - 33,33% średnie wiązania. W warunkach: bufor FB1, 37°C.	Przewidziane $\Delta G^{\circ}_{37^{\circ}\text{C}}$ (kcal/mol) dla komplementarnego wiązania RNA-RNA obliczonego w programie RNAstructure; w nawiasie przewidziane $\Delta G^{\circ}_{37^{\circ}\text{C}}$ (kcal/mol) dla wiązania modyfikowana sonda-RNA	Nukleotydy parujący się z dodatkowym 3'-G	Alternatywne miejsca wiązania Podkreślono miejsca wiązania najbardziej prawdopodobne	Miejsce wiązania dla vRNA8. Najbardziej prawdopodobne komplementarne miejsca wiązania w strukturze CMC podkreślono i pogrubiono.
149 (170, 408, 576, 774)	33	<b>DDGDDG</b>	100%	-4,4 (-11,37) 149; -4,2 (-11,37) 408; -2,7 (-9,24) 774; -2,3 (-9,24) 170; -2,3 (-9,24) 576	149 C; 170 U; 408 C; 576 U; 774 G	-4,5 (-9,34) <b>179</b> 5pz; -4,5 (-9,34) <b>729</b> 5pz; -4,1 (-6,0) <b>69/70</b> 4pz	149 ( <b>170</b> , <b>408</b> , <b>576</b> , 774)
69 (147, 178, 728)	524	<b>GDDGUG</b>	72,46%	-7,6 (-11,17) 69; -5,4 (-9,23) 728; -5,4 (-10,03) 147; -5,3 (-10,03) 178	69 C; 147 U; 178 A; 728 G	-4,4 (-9,45) <b>534/535</b> 6pz	<b>69</b> (147, 178, <b>728</b> )
150 (171, 409, 577, 714)	521	<b>GDDGDG</b>	62,89%	-6,9 (-11,76) 714; -5,9 (-9,74) 171; -5,9 (-9,74) 150; -5,9 (-9,74) 577; -5,4 (-9,74) 409	150 U; 171 U; 409 U; 577 U; 714 C	-4,2 (-8,53) <b>52</b> 5pz; -4,2 (-8,53) <b>59</b> 5pz; -4,1 (-5,47) <b>69/70</b> 4pz	150 ( <b>171</b> , <b>409</b> , <b>577</b> , 714)

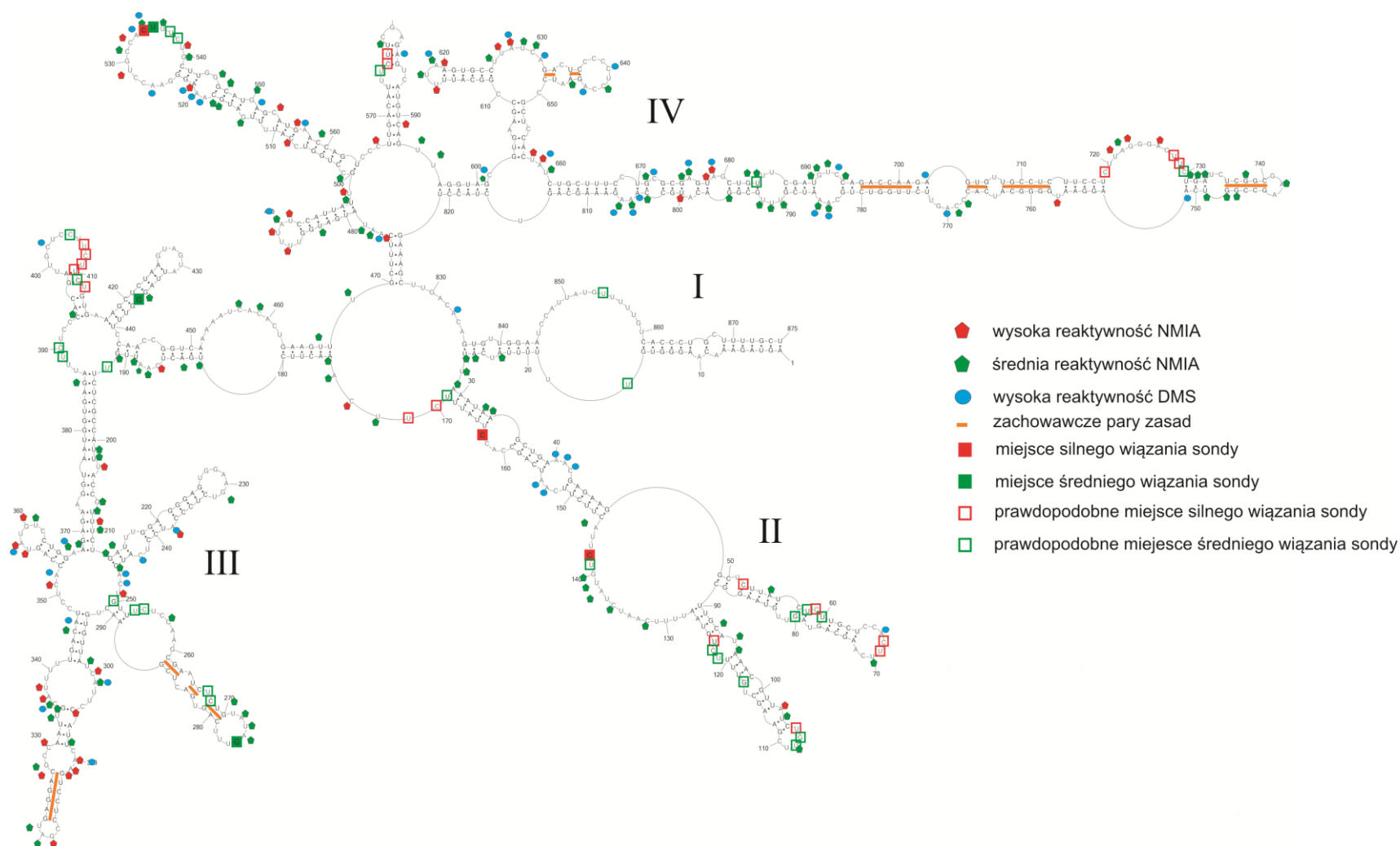
148 (179, 407, 410, 729)	131	<b>DGDDGG</b>	49,75%	-6,4 (-12,19) 407; -5,2 (-9,61) 179; -5,2 (-9,61) 729; -5,1 (-9,61) 410; -4,6 (-9,61) 148	148 A; 179 A; 407 C; 410 U; 729 A	-4,7 (-10,08) <b>536/537</b> 6pz; -4,6 (-4,77) <b>69/70</b> 4pz; -4,5 (-4,77) <b>171/172</b> 4pz; -4,5 (-4,77) <b>577/578</b> 4pz	148 (179, <b>407</b> , <b>410</b> , <b>729</b> )
142	34	<b>DDGDCC</b>	49,02%	-5,4 (-9,58) 142	142 U		<b>142</b>
52 (59, 713, 719)	35	<b>DDGDGG</b>	48,31%	-7,0 (-12,96) 719; -6,5 (-12,96) 713; -5,1 (-10,03) 59; -5,0 (-10,03) 52	52 G; 59 U; 713 C; 719 C	-4,6 (-10,03) <b>267/268</b> 5pz; -4,2 (-8,52) <b>729</b> 5pz; -4,2 (-8,52) <b>179</b> 5pz; -4,1 (-10,55) <b>148/149</b> 6pz	<b>52</b> ( <b>59</b> , 713, <b>719</b> )
106 (123, 269, 412)	73	<b>DCDGDG</b>	47,62%	-7,1 (-11,96) 269; -5,4 (-9,83) 123; -5,4 (-9,83) 412; -4,6 (-9,83) 106	106 A; 123 U; 269 C; 412 U	-4,1 (-5,96) <b>538/539</b> 4pz; -4,1 (-5,96) <b>180/181</b> 4pz; -4,1 (-5,96) <b>730/731</b> 4pz; -4,1 (-5,96) <b>211/212</b> 4pz	<b>106</b> ( <b>123</b> , 269, <b>412</b> )
163	44	<b>DDGGUG</b>	44,64%	-7,0 (-12,07) 163	163 C		<b>163</b>
68 (534)	47	<b>DDGUGG</b>	44,44%	-6,3 (-12,37) 534; -6,2 (-12,37) 68	68 C; 534 C		<b>68</b> ( <b>534</b> )
107 (117, 250, 683)	19	<b>DDCDGG</b>	26,60%	-4,4 (-9,15) 250; -4,4 (-9,15) 107; -4,2 (-9,15) 683; -4,2 (-9,15) 117	107 U; 117 G; 250 A; 683 G	-4,3 (-5,62) <b>412/413</b> 4pz; -4,2 (-5,62) <b>269/270</b> 4pz; -4,2 (-5,62) <b>123/124</b> 4pz	<b>107</b> ( <b>117</b> , <b>250</b> , 683)
194 (254, 390)	545	<b>GDDGDD</b>	26,60%	-5,7 (-9,5) 194; -5,0 (-9,5) 390; -5,0 (-9,5) 254	194 G; 254 U; 390 U	-4,8 (-9,8) <b>148/149</b> 6pz; -4,6 (-8,29) <b>729</b> 5pz; -4,6 (-8,29) <b>179</b> 5pz; -4,6 (-9,8) <b>407/408</b> 6pz; -4,3(-6,39) <b>57/58</b> 4pz; -4,3 (-6,39) <b>266/267</b> 4pz	194 ( <b>254</b> , <b>390</b> )

58 (267)	137	DGDGDG	23,92%	-5,4 (-10,71) 267; -4,8 (-10,71) 58	58 A; 267 A	-5,1 (-10,38) <b>536/537</b> 6pz; -5,0 (-6,39) <b>194/195</b> 4pz; -4,8 (-8,3) <b>719</b> 5pz; -4,3 (-7,89) <b>390/391</b> 4pz; -4,4 (-6,39) <b>254/255</b> 4bp	<b>58 (267)</b>
17 (118, 251, 684, 854)	5	DDDCDG	23,87%	-4,2 (-10,49) 251; -3,9 (-10,49) 684; -3,9 (-10,49) 118, -1,8 (-8,47) 17; -1,8 (-8,47) 854	17 G; 118 C; 251 C; 684 C; 854 A	-3,5 (-8,46) <b>107</b> 5pz	<b>17 (118, 251, 684, 854)</b>
121 (169, 210, 253, 389, 537, 575)	129	DGDDDG	23,04%	-5,0 (-11,13) 537; -2,9 (-9,00) 121; -2,7 (-9,00) 210; -2,1 (-9,00) 253; -2,1 (-9,00) 169; -2,1 (-9,00) 389; -2,1 (-9,00) 575	121 U; 169 A; 210 A; 253 G; 389 A; 537 C; 575 A		<b>121 (169, 210, 253, 389, 537, 575)</b>
80 (275)	29	DDCUAG	22,42%	-2,9 (-7,89) 80, -2,3 (-7,89) 275	80 G; 275 A		<b>80 (275)</b>
141	133	DGDGCDG	20,70%	-4,6 (-9,83) 141	141 A	-4,3 (-9,50) <b>250/251</b> 6pz; -4,0 (-9,50) <b>117/118</b> 6pz; -4,0 (-9,50) <b>683/684</b> 6pz	<b>141</b>
60 (775)	265	CDDGDG	19,65%	-6,0 (-11,62) 60; -5,2 (-9,49) 775	60 C; 775 U	-4,0 (-9,10) <b>719</b> 5pz	<b>60 (775)</b>
13 (436)	88	ACCCUG	19,05%	-7,6 (-10,18) 13; -7,1 (-10,18) 436	13 A; 436 U		13 ( <b>436</b> )

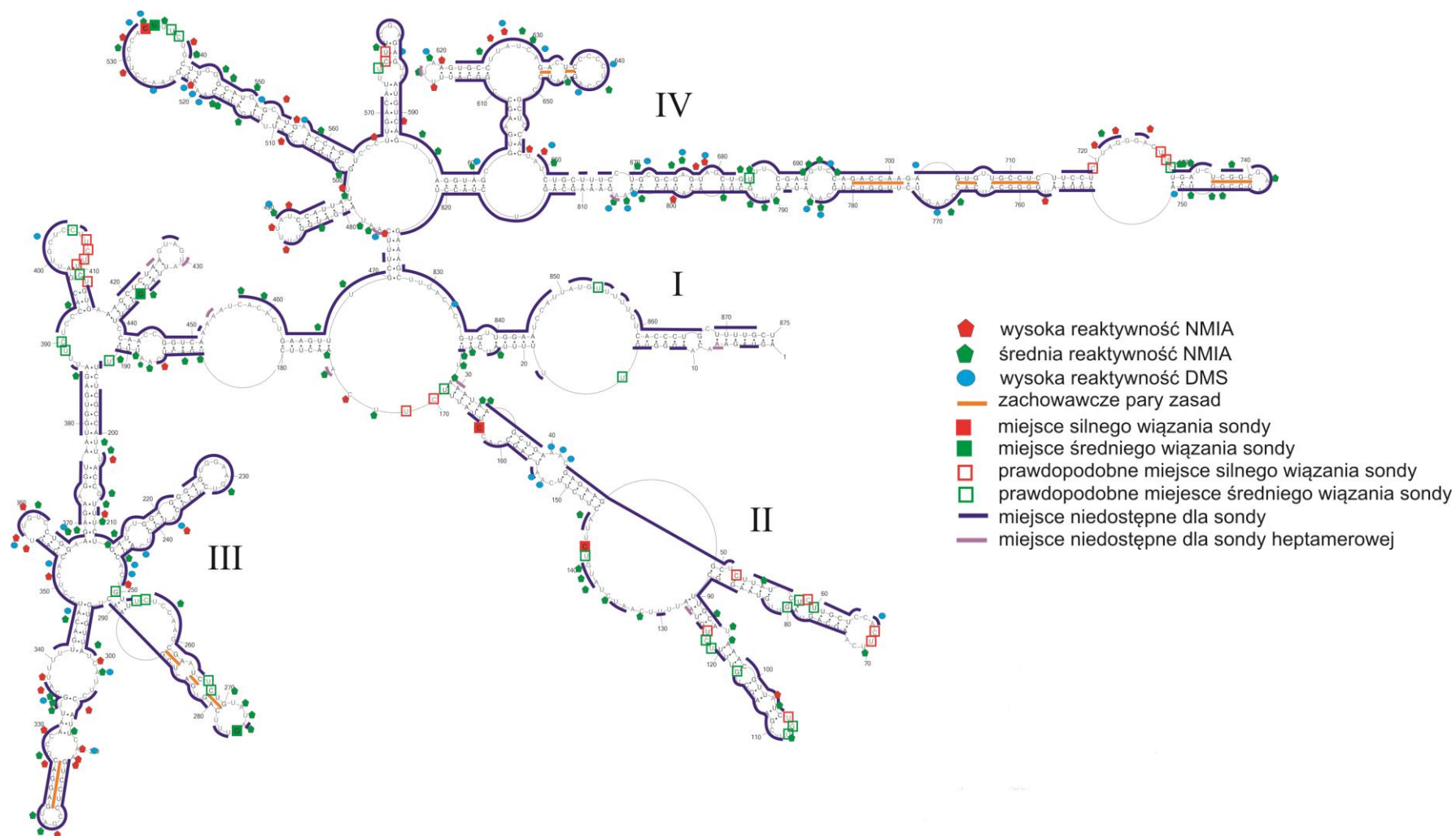


122 (180, 211, 411, 538, 730)	289	CDGDDG	16,16%	-7,1 (-11,09) 180; -7,1 (-11,09) 730; -6,2 (-11,09) 411; -5,0 (-9,07) 211; -4,5 (-9,07) 122; -4,3 (-9,07) 538	122 U; 180 C; 211 U; 411 C; 538 U; 730 C	-4,0 (-8,29) <b>148</b> 5pz	<b><u>122</u></b> (180, 211, <b><u>411</u></b> , <b><u>538</u></b> , <b><u>730</u></b> )
405	41	DDGGDG	13,02%	-6,5 (-12,72) 405	405 C	-4,0 (-8,47) <b>729</b> 5pz; -4,0 (-8,47) <b>179</b> 5pz	<b><u>405</u></b>
535	12	DDDGUG	12,55%	-4,0 (-10,48) 535	535 C	-3,7 (-8,45) <b>68</b> 4pz	<b><u>535</u></b>
268	291	CDGDGG	12,39%	-6,7 (-9,86) 268	268 U	-6,8 (-10,33) <b>179/180</b> 6pz; -6,8 (-10,33) <b>729/730</b> 6pz; -5,9 (-10,33) <b>410/411</b> 6pz; -4,7 (-7,08) <b>211</b> 5pz; -4,2 (-7,08) <b>122</b> 5pz; -4,1 (-5,56) <b>58/59</b> 4pz; -4,0 (-5,96) <b>538</b> 5pz; -3,7 (-7,53) <b>148</b> 5pz; -3,6 (-5,1) <b>163/164</b> 4pz	<b><u>268</u></b>
108 (192)	517	GDDCDG	11,26%	-7,4 (-10,64) 108; -5,2 (-8,51) 192	108 C; 192 U	-4,6 (-8,92) <b>250/251</b> 6pz; -4,3 (-8,92) <b>683/684</b> 6pz, -4,3 (-8,92) <b>117/118</b> 6pz	<b><u>108</u></b> ( <b><u>192</u></b> )

Czerwonym kolorem oznaczono reszty nukleotydowe typu LNA, czarnym 2'-O-metylowane, a niebieskim dodatkową resztę guanozyny w serii LNA. Literą D oznaczono 2,6-diaminopurynobozyd.



**Rysunek 28.** Wynik hybrydyzacji vRNA8 do mikromacierzy izoenergetycznych przedstawiony na modelu struktury CMC-vRNA8.



**Rysunek 29.** Miejsca niedostępne w cząsteczce vRNA8 dla wiązania się sond mikromacierzowych przedstawione na modelu CMC-vRNA8. Kolorem granatowym oznaczono miejsca niedostępne dla standardowych pentamerowych sond mikromacierzowych, kolorem jasnofioletowym oznaczono miejsca niedostępne dla sond heptamerowych.

### 1.6. Hydroliza vRNA8 z udziałem RNazy H

W celu potwierdzenia lub wykluczenia prawdopodobnych miejsc wiązania sond mikromacierzowych przeprowadzono hydrolizę RNA w obecności rybonukleazy H (RNaza H) z wybranymi oligomerami DNA. RNaza H posiada aktywność endonukleazową i hydrolizuje RNA w heterodupleksie RNA/DNA. Nie hydrolizuje natomiast homodupleksów DNA/DNA, RNA/RNA oraz fragmentów jednoniciowego RNA. W wyniku reakcji powstaje produkt z grupą fosforanową na 5' końcu i grupą hydroksylową na końcu 3'. Reakcja ta jest zależna od obecności dwuwartościowych jonów magnezu oraz wystąpienia co najmniej czterech par zasad w heterodupleksie (131-134).

Zsyntetyzowano i oczyszczono 15 oligomerów DNA (4 heksamery i 11 nanomerów), które następnie inkubowano z badanym RNA oraz rybonukleazą H (Tab. 21 MATERIAŁY I METODY). Heksamery odpowiadały sekwencji sond mikromacierzowych, natomiast nanomery zaprojektowane były w rejonach, w których prawdopodobne miejsca wiązania miała więcej niż jedna sonda mikromacierzowa. Wyjątek stanowił oligomer 229, który był komplementarny do pętli spinki. Struktura ta nie wykazywała wiązania sond mikromacierzowych. W pierwszym etapie cząsteczkę vRNA8 poddawano fałdowaniu według standardowej procedury w buforze FB1. Następnie dodawano odpowiedni oligonukleotyd DNA w stosunku 1:2 (RNA:DNA) oraz rybonukleazę H. W celu zidentyfikowania miejsc cięć przeprowadzono odwrotną transkrypcję, a uzyskane fragmenty rozdzielano z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej. Analizę wyników przeprowadzono w programie *Peak Scanner* i *Microsoft Excel* (szczegółowo opisane w rozdziale MATERIAŁY I METODY). Wyniki zestawiono w tabeli 4.

**Tabela 4.** Wynik hydrolizy vRNA8 z zastosowaniem rybonukleazy H.

komplementarne miejsce wiązania oligonukleotydu	Przewidziana $\Delta G^{\circ}_{37^{\circ}\text{C}}$ dupleksu DNA/RNA [kcal/mol] <sup>a</sup>	Przewidziana $\Delta G^{\circ}_{37^{\circ}\text{C}}$ dupleksu RNA/RNA [kcal/mol] <sup>b</sup>	$\Delta G^{\circ}_{37^{\circ}\text{C}}$ dupleksu RNA/RNA [kcal/mol]; (miejsce alternatywnego wiązania); ilość komplementarnych nukleotydów	miejsce cięcia Rnazaą H, w nawiasie podano intensywność cięcia: m-mocne cięcie; s-słabe cięcie
DNA 6-mer				
68 (534)	-3,44	-6,3 (534) -6,2 (68)	-	70 (m) 535 (m)
194 (254, 390)	-2,20	-5,7 (194) -5,0 (390) -5,0 (254)	-4,8 (148/149) 6pz -4,6 (729) 5pz -4,6 (179) 5pz 4,6 (407/408) 6pz -4,3 (57/58) 4pz -4,3 266/267 4pz	248-254 (m) 388 (s) 392 (m) 407 (m) 410 (m)
17 (118, 251, 684, 854)	-1,47	-4,2 (251) -3,9 (684) -3,9 (118) -1,8 (17) -1,8 (854)	-3,5 (107) 5pz	18-19 (s) 117 (m) 249 (m)
108 (192)	-2,63	-7,4 (108) -5,2 (192)	-4,6 (250/251) 6pz -4,3 (683/684) 6pz -4,3 (117/118) 6pz	249-250 (m)
DNA 9-mer				
143	-6,43	-10,6	-6,1 (61/62) 6pz -6,1 (781/782) 6pz -5,9 (707) 6pz -5,5 (488) 6pz -5,4 (91) 5pz -5,4 (816/817) 6pz	143-145 (m)
163	-7,1	-12	-7,3 (818) 6pz -7,3 (534) 7pz -7,0 (626) 7pz -6,5 (67/68) 6pz -6,3 (197/198) 4pz -6,3 (352) 5pz -6,0 (766/767) 4pz	165-166 (m)

170	-3,83	-8,7	-8,1 (575) 9pz -7,5 (150) 7pz -6,3 (408/409) 6pz -5,0 (714) 5pz -4,8 (70) 5pz -4,5 (253) 8pz	172 (m) 251 (m) 253 (m) 149 (s) 73 (s)
229	-9,95	-14,9	-8,0 (366/367) 6pz	230-232 (m)
275	-4,39	-9,5	-6,2 (485/486) 8pz -5,8 (438) 6pz -5,2 (685) 5pz -4,9 (209) 5pz -4,9 (79/80) 6pz	brak cięć
408	-5,72	-12,4	-10 (149) 7pz -7,2 (170) 7pz -7,2 (576) 7pz -6,9 (713) 7pz	411-415 (m)
436	-7,25	-10,2	-7,9 (13) 5pz -7,5 (722/723) 6pz -7,0 (759) 5pz -6,3 (221/222) 4pz -6,2 (522/523) 4pz	438 (s); 221-223 (s) 522-523 (s) 724 (s)
535	-6,36	-12,3	-8,5 (657) 8pz -7,6 (664/665) 8pz -7,5 (68) 7pz -6,7 (472) 6pz	535-536 (m)
576	-4,43	-9,9	-8,0 (169/170) 8pz -6,8 (149/150) 6pz -6,5 (408/409) 6pz -5,3 (714) 5pz	578 (s) 172 (s)
721	-8,78	-14,8	-7,8 425 6pz	brak cięć
729	-7,65	-12,6	-10,3 (179/180) 8pz -6,9 (410/411) 6pz -6,6 (211) 7pz	730 (s) 182 (s)

a)  $\Delta G^{\circ}_{37^{\circ}\text{C}}$  dupletu RNA/DNA liczona była za pomocą kalkulatora dostępnego na stronie <http://ozone3.chem.wayne.edu/>, przewidziana wartość energii swobodnej w 300 mM chlorku sodu.

b)  $\Delta G^{\circ}_{37^{\circ}\text{C}}$  dupletu RNA/RNA przewidziana była z zastosowaniem programu *RNAstructure*.

Silne cięcia RNazą H zaobserwowano po nukleotydach 70, 117, 143-145, 166-165, 172, 230-232, 248-254, 392, 407, 410-415 oraz 535-536. Miejsca te dobrze korespondują z wynikami uzyskanymi z mapowania mikromacierzowego, co może potwierdzać ich dostępność do hybrydyzacji dla sond mikromacierzowych. Wyjątek

stanowi rejon 230-232, w którym w żadnych warunkach nie zaobserwowano tworzenia się dupleksu hybrydizacyjnego na mikromacierzy izoenergetycznej. Warto w tym miejscu zwrócić uwagę na sposób przeprowadzenia eksperymentu. Długie 9-nukleotydowe oligomery były testowane w zestawach po 2 lub 3 różne oligomery i inkubowane razem z docelowym RNA. Kombinacje oligonukleotydów były tak dobrane, aby nie posiadały one takich samych alternatywnych miejsc wiązania. W ten sposób oligomery D229, D275 oraz D535 były testowane jednocześnie. Przypuszcza się, że rejon 225-231 może oddziaływać trzeciorzędowo z rejonem 528-533. Związanie długiego 9-meru D535, mogło zaburzyć oddziaływania trzeciorzędowe, co w konsekwencji umożliwiło wiązanie oligomeru D229 do jego miejsca docelowego.

Zaobserwowano również kilka miejsc słabej hydrolizy RNA przez rybonukleazę H, która następowała po nukleotydach: 18-19, 73, 149, 182, 221-222, 388, 438, 522-523, 578, 724 oraz 730. Miejsce cięcia 18-19, 73, 578, 724 oraz 388 potwierdzają obecność rejonów dostępnych do hybrydizacji. Słabe cięcie występowało również po nukleotydzie 149. Był to rejon alternatywnego wiązania się oligonukleotydu D170. Związanie się oligonukleotydu do w pełni komplementarnego miejsca wiązania mogło zaburzyć strukturę drugorzędową RNA umożliwiając przyłączenie się oligonukleotydu również w miejscu alternatywnego wiązania 150. Cięcia po nukleotydach 182 oraz 522-523 występują w rejonach reaktywnych podczas mapowania chemicznego. Może sugerować to mniej stabilną strukturę drugorzędową tego fragmentu, co tłumaczyłoby jakąkolwiek dostępność dla hybrydizacji oligomerów. Słabo dostępne dla długich oligomerów DNA okazały się miejsca w rejonie cięcia 221/222, 438 oraz 724. Dwa pierwsze miejsca znajdują się w rejonie dwuniciowym, trzecie w rejonie jednoniciowym. W każdym przypadku występują w tym rejonie motyw GGG, co może wzmacniać oddziaływanie RNA-oligomer. Miejsce cięcia 438 było w pełni komplementarne dla wiązania się oligonukleotydu DNA, natomiast pozostałe to miejsca alternatywne dla tej cząsteczki. Wszystkie te rejony nie wykazują reaktywności podczas mapowania chemicznego. Dodatkowo, nie zaobserwowano cięcia RNazą H w obecności oligonukleotydu 275. Miejsce 275 wykazywało wiązanie się sondy mikromacierzowej ze średnią intensywnością. Jednakże wiązanie sondy wystąpiło wyłącznie w jednych warunkach hybrydizacyjnych (bufor FB1, 37°C), może to wynikać z długości sondy oligonukleotydowej oraz zastosowanych modyfikowanych nukleotydów, co w danych warunkach umożliwiło powstanie dupleksu hybrydizacyjnego. Miejsce to znajduje się w pętli struktury spinkowej. Trudności

z hybrydującą mogą być również związane z konformacją przestrzenną tego rejonu.

### 1.7. Porównanie struktur drugorzędowych CM-vRNA8 i CMC-vRNA8

Struktury CM-vRNA8 i CMC-vRNA8 można porównać analizując szczegółowo miejsca modyfikacji chemicznej ich motywów strukturalnych. W rejonie 206-374 ogólny rozkład modyfikacji dobrze odzwierciedlał obie przewidziane struktury. Jednak fragment 206-210 w strukturze CM-vRNA8 był jednoniciowy, co bardziej odpowiadało wynikom eksperymentalnym. Natomiast nukleotydy 271-274 w strukturze CMC-vRNA8 występowały we fragmencie pętli struktury typu spinka do włosów, co lepiej odzwierciedlało wyniki modyfikacji, niż w strukturze CM-vRNA8. Fragment ten w CM-vRNA tworzył helisę z rejonem 292-295. Natomiast rozkład modyfikacji nukleotydów występujących w rejonie 718-752 bardziej odpowiadał modelowi struktury CM-vRNA8.

Wykonano również analizę bioinformatyczną, która miała na celu weryfikację zaproponowanej struktury vRNA8 pod względem możliwości występowania zachowawczych par zasad. W pierwszym etapie skorzystano z wcześniej wykonanego zestawienia wszystkich pełnych sekwencji vRNA segmentu 8 w programie *MAFFT* (opisane w rozdziale 1.4). Dane zostały przeniesione do programu *Microsoft Excel*, w którym sekwencji wzorcowej (badane vRNA8) przypisano jej strukturę drugorzędową (CM-vRNA8 lub CMC-vRNA8) przy pomocy opisu „dot brackets”. Z użyciem kolejnego skryptu obliczono możliwości tworzenia się zaproponowanych, w analizowanym modelu, par zasad we wszystkich sekwencjach vRNA8 wirusa grypy typu A dostępnych w bazie danych. Wynik obliczeń zanalizowano w programie *Microsoft Excel* przedstawiając ilość par kanonicznych i niekanonicznych występujących w określonym miejscu w badanym modelu (tab. 23 i 24 DODATEK). Dodatkowo, obliczono jaki procent wszystkich możliwych par stanowią pary kanoniczne. Im wyższy procent stanowią pary kanoniczne, tym większe prawdopodobieństwo, że określona para zasad jest zachowana w strukturze drugorzędowej vRNA8. Jednocześnie zmiany kompensacyjne (np. C-G na A-U) mogą świadczyć o dążeniu ewolucyjnym do zachowania struktury drugorzędowej. Średni procent występowania kanonicznych par zasad dla struktury CMC-vRNA8 (87,4%) był nieznacznie wyższy od struktury CM-vRNA8 (87%). Analizując rejon vRNA8 (206-



374 oraz 718-752), które uległy przemodelowaniu po wprowadzeniu zachowawczych par zasad, procentowa ilość możliwych par kanonicznych wzrasta i wynosi 90,8% dla CMC-vRNA8 w porównaniu z 88% dla CM-vRNA8. Można zauważyć też dużą zgodność wyników uzyskanych podczas szacowania prawdopodobieństwa występowania określonej pary zasad lub niesparowań z obliczeniami możliwości tworzenia się kanonicznych par zasad w określonym rejonie. Motywy strukturalne, które wykazywały wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia wśród suboptymalnych struktur, w dużej mierze pokrywają się z rejonami w których występuje wysokie prawdopodobieństwo zachowania kanonicznej pary zasad we wszystkich vRNA8 wirusa grypy.

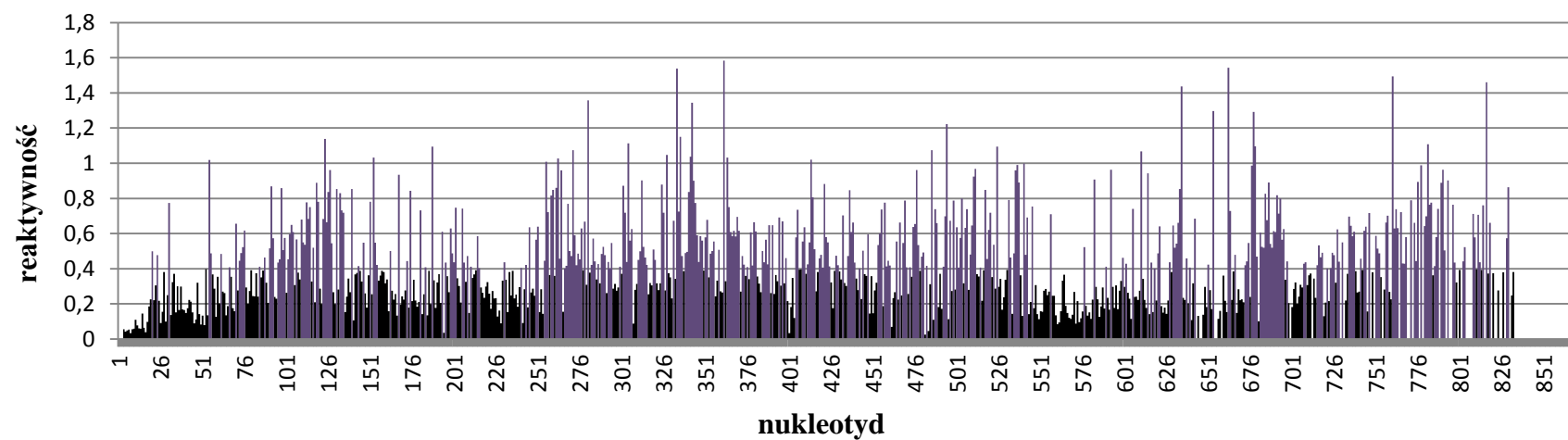
### **1.8. Indukowanie cięć vRNA8 w obecności rodnika hydroksylowego**

Cząsteczkę vRNA8 poddano ograniczonym cięciom rodnikiem hydroksylowym. Metoda ta umożliwia analizę rejonów RNA dostępnych w roztworze. Rodnik hydroksylowy powstaje w wyniku reakcji  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Do mieszaniny reakcyjnej dodaje się EDTA w celu wychwycenia jonów  $\text{Fe}^{2+}$ , tak aby nie mogły one związać się do cząsteczki RNA. Dzięki temu rodnik hydroksylowy generowany jest tylko zewnętrznie w stosunku do struktury trzeciorzędowej badanego RNA i umożliwia cięcie szkieletu RNA jedynie w miejscach dostępnych dla wolnego rodnika w roztworze (Rys. 18). Dodatkowo, do reakcji dodaje się askorbinian sodu, który działa antyoksydacyjnie chroniąc RNA przed nadmiernym cięciem wolnymi rodnikami (116, 135, 136).

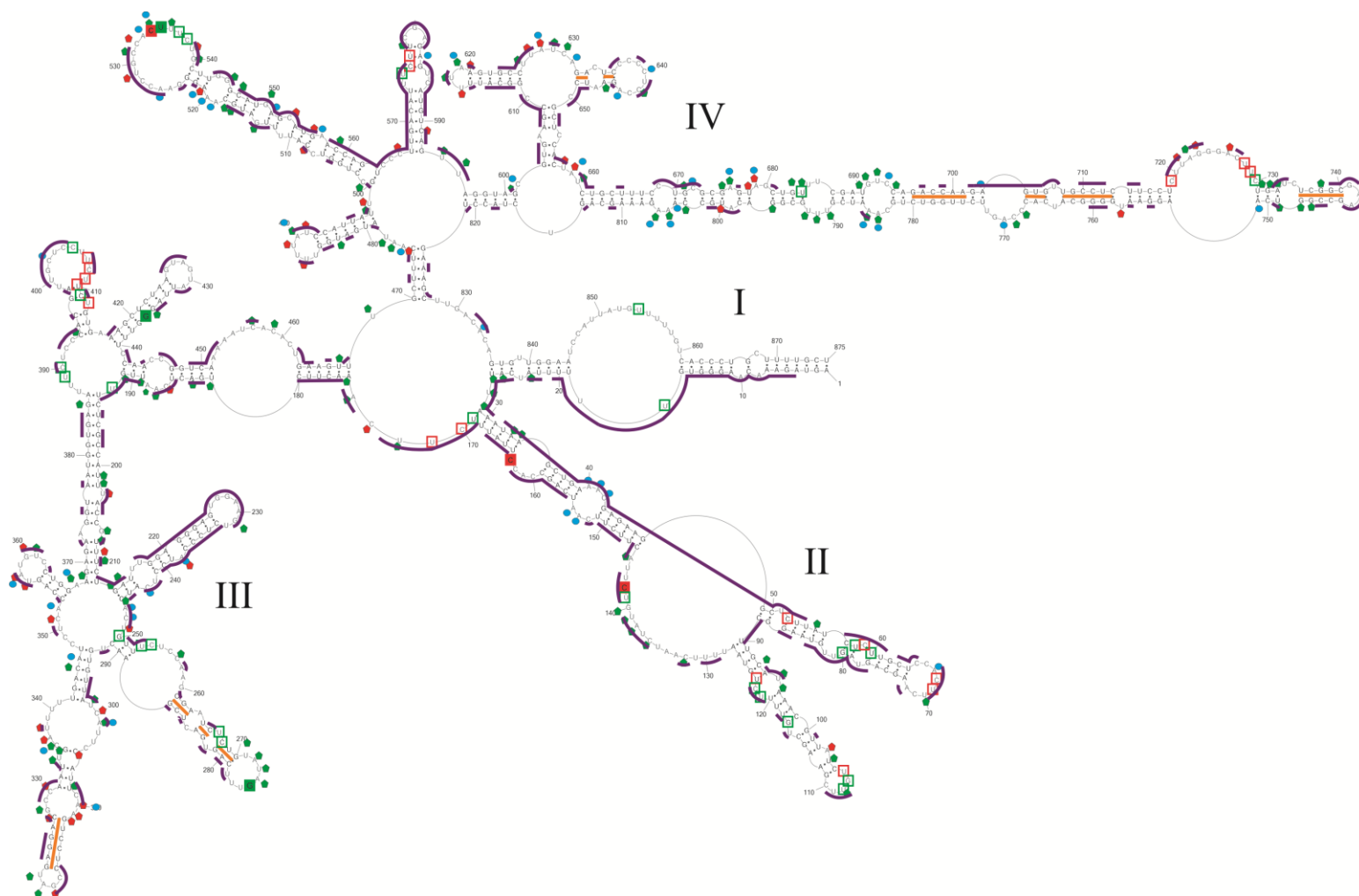
Reakcję poprzedzano fałdowaniem vRNA8, a następnie przeprowadzano reakcję modyfikacji (MATERIAŁY I METODY). Jako pierwszy dodawano związek kompleksowy żelaza, następnie nadtlenek wodoru i jako ostatni askorbinian sodu. Reakcję całkowicie wygaszano poprzez dodanie 75% glicerolu i odstawienie próbek na lód, a następnie strącano je w etanolu. Dalsze etapy postępowania były analogiczne, jak opisano w metodzie SHAPE (Rys. 19).

Dzięki zastosowaniu tej metody uzyskano informację na temat trzeciorzędowego pofałdowania ponad 90% cząsteczki vRNA8. Dla 4,8% nukleotydów nie udało się uzyskać takiej informacji, gdyż znajdowały się one na końcu 3' cząsteczki, w rejonie 834-875 (fragment do której komplementarny był starter St1 oraz rejon tuż za nim). Przyjęto, że nukleotydy o reaktywności poniżej 0,4 są niedostępne w RNA dla cięcia wolnymi rodnikami (420 nukleotydów). Natomiast powyżej tej wartości, nukleotydy

występują na zewnątrz cząsteczki i są dostępne do reakcji z rodnikami (373 nukleotydów) (Rys. 30). Analiza wykazała, że dostępne w roztworze dla wolnego rodnika była większość nukleotydów w rejonach: 254-389, 405-461, 532-539, 630-647 oraz 750-820. Natomiast z wolnym rodnikiem nie reagowała większość nukleotydów w regionach: 150-200, 217-235, 398-404, 526-531, 547-600 oraz 699-715 (Rys. 31). Szczególną uwagę zwraca rejon 217-235, który nie ulegał mapowaniom chemicznym, nie wykazywał hybrydyzacji do sond mikromacierzowych oraz nie ulegał cięciom w obecności rybonukleazy H. Przypuszcza się, że rejon ten jest zaangażowany w oddziaływania trzeciorzędowe.



**Rysunek 30.** Reaktywność nukleotydów w vRNA8 w obecności wolnego rodnika. Kolorem fioletowym oznaczono nukleotydy o reaktywności powyżej 0,4; natomiast czarnym poniżej 0,4.



**Rysunek 31.** Wynik hydrolizy vRNA8 w obecności rodnika hydroksylowego przedstawiony na modelu struktury CMC-vRNA8. Fioletowymi liniami zaznaczono rejony niedostępne w roztworze.

## 1.9. Fragment 661-814 vRNA, jako substrat dla enzymów z rodziny ADAR

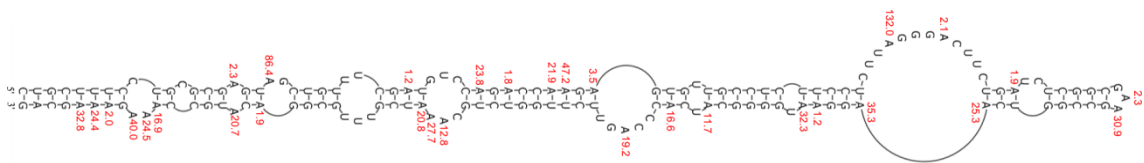
Enzymy z rodziny ADAR (ang. *Adenosine Deaminase Acting on RNA*) biorą udział w edytowaniu RNA. Substratem dla nich są wszystkie dwuniciowe RNA (dsRNA) o długości powyżej 20 par zasad. Katalizują one deaminację hydrolytyczną adenozyne (A), w wyniku której powstaje inozyna (I). W procesie alternatywnego składania i translacji, inozyna rozpoznawana jest jako guanozyna, co powoduje zmianę informacji genetycznej. Początkowo przypuszczano, że jest to główna funkcja tych enzymów. Jednakże konwersja A→I zachodzi najczęściej w rejonach niekodujących. Dodatkowo, zaobserwowano oddziaływanie enzymów ADAR z białkami szlaku biogenezy miRNA/siRNA. Sugeruje się więc udział tych enzymów w regulacji ekspresji białek. W komórkach kręgowców zidentyfikowano 3 geny kodujące enzymy z rodziny ADAR – *ADAR1*, *ADAR2* oraz *ADAR3*. Dwa pierwsze ulegają ekspresji we wszystkich tkankach, natomiast *ADAR3* głównie w komórkach układu nerwowego. Dodatkowo, ekspresja genu *ADAR1* może być indukowana poprzez interferon (INF). Wnioskuje się zatem udział tego enzymu w odpowiedzi komórkowej na stres spowodowany np. infekcją wirusową (137).

Konwersję A→I w wirusowych RNA zaobserwowano po raz pierwszy w genomowym RNA wirusa odry (MV, ang. *Measles Virus*) (138), a następnie również w innych wirusowych RNA. Zauważono, że edytowanie wirusowych RNA dotyczy głównie wirusów, których genom stanowi jednoniciowe RNA o orientacji antysensowej lub ambisensowej (139). Opracowano metodę „3DI-PCR” do wykrywania sekwencji edytowanych przez enzym ADAR. W metodzie tej stosuje się randomowe startery w celu amplifikacji rejonów DNA bogatych w pary G-C. Metoda ta pozwoliła wykazać występowanie substytucji A→I w RNA MV (140). Dużym zaskoczeniem okazały się badania wskazujące, że enzymy ADAR mogą mieć zarówno działanie prowirusowe, jak i antywirusowe. Działanie prowirusowe zaobserwowano przykładowo podczas cyklu replikacyjnego wirusa odry. Sugeruje się, że może to być spowodowane antagonistycznym działaniem ADAR1 do kinazy PKR. Innym prawdopodobnym mechanizmem jest zahamowanie zwiększonej ekspresji INF indukowanej obecnością MV w komórce (141). Antywirusową aktywność ADAR zaobserwowano między innymi podczas infekcji wirusem grypy oraz wirusem zapalenia wątroby typu C. RNA zawierające inozynę stymulują limfocyty T oraz makrofagi do wydzielania czynników

zapalnych, w tym czynnika martwicy nowotworu -  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$  ang. *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) oraz interferon  $\gamma$ . Ponadto wykazano, że ADAR1 może oddziaływać z białkami z rodziny czynników jądrowych 90 (NF90 ang. *nuclear factor*). Postuluje się, że NF90 aktywują ekspresję białek antywirusowych oraz aktywują interferon  $\beta$  (142).

Przeprowadzone zostały badania potwierdzające edytowanie RNA wirusa grypy. Substytucję A→I zaobserwowano zarówno w genomowym RNA (vRNA), jak również w antygenomowym RNA (cRNA) segmentów 4 (kodujący HA) (140) oraz 7 (kodujący białka M) (143). Oznacza to, że ADAR1, może hamować cykl replikacyjny wirusa poprzez zmiany zarówno w vRNA, jak i cRNA.

W zaproponowanym modelu struktury drugorzędowej CM-vRNA8 w rejonie 661-814 występuje struktura typu spinki do włosów. Wykazano, że podobne motywy strukturalne typu spinki do włosów mogą stanowić wydajny substrat dla enzymów ADAR, a deaminacja adenozyne może zachodzić w sposób selektywny (137). Sekwencję tworzącą motyw strukturalny spinki poddano analizie w programie *Inosine Predict* (<http://bioserver.hci.utah.edu:8080/Bass/InosinePredict>), który przewiduje procent substytucji A→I w oparciu o zasady najbliższego sąsiedztwa (144). Wykazano, że 31 adenozyne może ulegać konwersji do inozyny. Częstość edytowania powyżej 20% posiadało 16 adenozyne (Rys. 32). Przypuszcza się więc, że rejon ten może oddziaływać z enzymami z rodziny ADAR w szczególności z ADAR1, który bierze udział w odpowiedzi antywirusowej komórki.

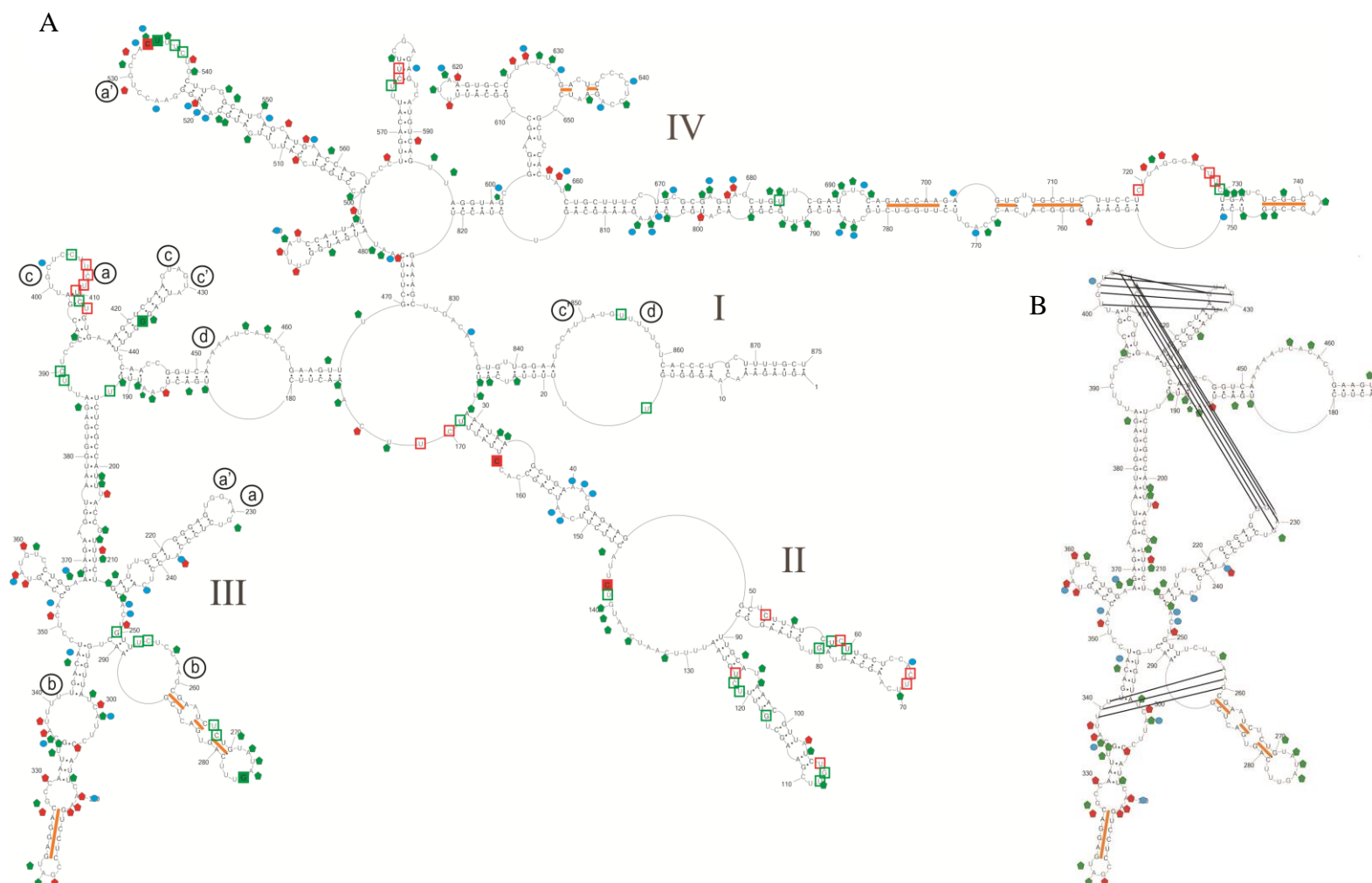


**Rysunek 32.** Fragment 661-814 modelu CMC-vRNA8 z zaznaczonymi resztami adenozyne, które mogą ulegać deaminacji do inozyny z udziałem enzymów ADAR.

### 1.10. Potencjalne oddziaływania trzeciorzędowe w vRNA8

W modelu struktury drugorzędowej CMC-vRNA8 występują jednoniciowe rejony RNA, które nie ulegały modyfikacjom chemicznym. W związku z tym podjęto analizę poszukiwania w tych regionach możliwych oddziaływań trzeciorzędowych. W ten sposób wyróżniono rejony, które mogą być zaangażowane w tworzenie się par zasad. Regiony te znajdują się w strukturach typu spinka do włosów, w wyrzუსzeniach lub rejonach jednoniciowych w pętlach wieloramiennych. Potencjalne pary zasad mogą tworzyć: 227-231/409-405 lub 226-231/533-528, 258-260/341-339, 426-430/852-848 lub 400-404/431-428, 426 oraz 450-456/859-853 (Rys. 33 Tab. 5).

Dane eksperymentalne uzyskane podczas hydrolizy RNA indukowanej obecnością wolnego rodnika wykazują, że rejony 226-231, 400-404, 407-408, 426-428, 522-531 są niedostępne w roztworze. Wynik taki sugeruje możliwość zaangażowania tych regionów w oddziaływania trzeciorzędowe. Rejony 848-852 oraz 853-859 znajdowały się we fragmencie vRNA8 bezpośrednio za rejonem hybrydyzacji startera St1, co uniemożliwiało ich analizę. Dodatkowych informacji dostarczyła również hydroliza RNA w użyciu RNazy H. Analiza ta, wskazuje na większe prawdopodobieństwo występowania interakcji lub silniejsze oddziaływania w rejonie 226-231/533-528 niż 227-231/409-405. Region 409-405 wykazywał hybrydyzację do sond oligonukleotydowych oraz ulegał silnej hydrolizie w obecności komplementarnego oligomeru DNA z udziałem RNazy H. Dodatkowo, podczas jednego z eksperymentów zastosowano mieszaninę oligomerów D229, D275, D525 (MATERIAŁY I METODY). Związanie się oligomeru D525 do pętli struktury typu spinki do włosów, mogło spowodować zaburzenie oddziaływań 226-231/533-528, w wyniku czego oligomer D229 mógł związać się do komplementarnej sekwencji w pętli 226-231.



**Rysunek.33.** Prawdopodobne oddziaływania trzeciorzędowe w vRNA8. A) model struktury CMC-vRNA8 z zaznaczonymi rejonami, które mogą być zaangażowane w oddziaływania trzeciorzędowe. Regiony oznaczono literami zgodnie z tabelą 5. B) prawdopodobne oddziaływania trzeciorzędowe w domenie III CMC-vRNA8.



**Tabela 5.** Prawdopodobne oddziaływania trzeciorzędowej w vRNA8.

	Rejon zaangażowany w oddziaływania trzeciorzędowe (5'→3'/3'→5')	Sekwencja fragment 1 (5'→3')	Sekwencja fragmentu 2 (5'→3')	Procent możliwych kanonicznych par zasad dla prawdopodobnych oddziaływań trzeciorzędowych w vRNA8 (%) *
(a)	227-231/409-405	GGAAG	CUUCU	88,68
(a')	226-231/533-528	UGGAAG	CUGCCA	88,70
(b)	258-260/341-339	AAG	UUU	99,93
(c)	400-404/ 431-428,426	UGCUC	G-AGUA	84,69
(c')	426-430/852-848	GUAGU	AUUAU	95,70
(d)	450-456/859-853	CAAAAAU	GUUUUUG	93,64

\* Procent możliwych kanonicznych par zasad obliczano na podstawie wszystkich sekwencji vRNA8 wirusa grypy typu A dostępnych w bazie danych *NCBI*.

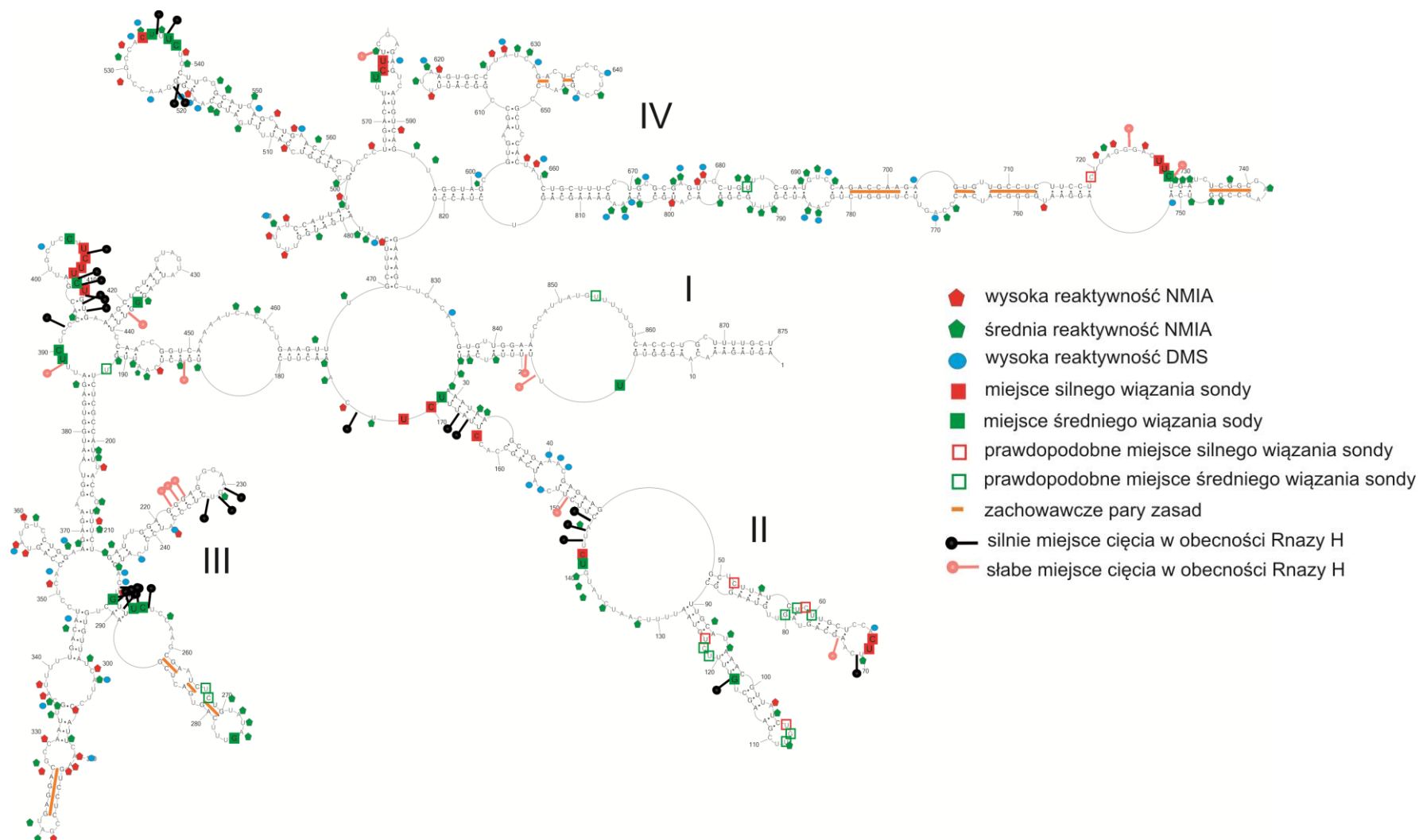
### 1.11. Podsumowanie badań struktury vRNA8 wirusa grypy typu A.

Podsumowując, otrzymana została cząsteczka segmentu 8 genomowego RNA (vRNA8) wirusa grypy szczepu A/VietNam/1203/2004. Przeprowadzone analizy struktury drugorzędowej metodą SHAPE oraz z zastosowaniem modyfikacji siarczanem dimetylu umożliwiły wygenerowanie w programie *RNAstructure 5.3* modelu CM-vRNA8. Badania bioinformatyczne, które miały na celu poszukiwanie zachowawczych par zasad, wykazały istnienie takich par w sześciu rejonach vRNA8. Wprowadzenie tych danych do programu *RNAstructure 5.3* wraz z danymi z mapowań chemicznych doprowadziło do powstania modelu CMC-vRNA8. Oba modele struktury drugorzędowej vRNA8, jak się spodziewano, posiadały sparowane końce 5' i 3' (Domena I). Motyw ten jest charakterystyczny dla wszystkich segmentów RNA wirusa grypy i został wcześniej opisany w literaturze jako motyw *panhandle*. Sugeruje się, że struktura ta jest rozpoznawana przez kompleks wirusowej polimerazy. Dodatkowo, zmiany konformacyjne tego elementu podczas cyklu replikacyjnego mogą stanowić czynnik regulujący pomiędzy transkrypcją i replikacją wirusowego RNA (33, 34).

Zaproponowane modele CM-vRNA8 oraz CMC-vRNA8 wykazywały różnice w domenie III i IV. Zmiany spowodowane były wprowadzeniem zachowawczych par zasad podczas generowania struktury drugorzędowej. Mapowanie mikromacierzowe oraz analizy bioinformatyczne (prawdopodobieństwo występowania par zasad i rejonów jednoniciowych oszacowane w programie *RNAstructure* oraz prawdopodobieństwo występowania kanonicznych par zasad we wszystkich sekwencjach vRNA8 wirusa grypy dostępnych w bazie danych) wykazują większe prawdopodobieństwo występowania modelu CMC-vRNA8. Miejsca wiązania sond mikromacierzowych dodatkowo potwierdzono hydrolizą RNA z udziałem RNazy H w obecności odpowiednich komplementarnych oligonukleotydów DNA. Połączone wyniki wszystkich eksperymentów dotyczących struktury drugorzędowej vRNA8 przedstawiono na proponowanym modelu CMC-vRNA8 (Rys. 34).

W strukturze drugorzędowej vRNA8 zaobserwowano możliwość powstawania długiej struktury spinki do włosów (661-814). Dane literaturowe wskazują, że struktury tego typu są wydajnym substratem enzymów z rodziny ADAR (137). Przeprowadzona analiza bioinformatyczna wykazała, że 31 adenozyń może ulegać deaminacji w reakcji z enzymami ADAR. Fakt ten wydaje się być godny zainteresowania i przeprowadzenia dalszych badań *in vitro*, w których potwierdzona zostałaby możliwość oddziaływania zaproponowanej struktury spinkowej z enzymem ADAR. Wiedza na ten temat dostarczałaby kolejnych danych o funkcjonalności struktury vRNA wirusa grypy.

W modelu CMC-vRNA8 występowały rejon jednoniciowe nie potwierdzone mapowaniami chemicznymi. W związku z tym przeprowadzono analizę poszukującą rejonów, które mogłyby brać udział w oddziaływaniach trzeciorzędowych. Wyznaczono sześć potencjalnych oddziaływań trzeciorzędowych. Prawdopodobieństwo występowania zaproponowanych interakcji dodatkowo potwierdzają wyniki hydrolizy RNA RNazą H oraz w obecności wolnego rodnika. Wyznaczone rejon w większości nie ulegały cięciom w reakcji z rodnikiem hydroksylowym.



**Rysunek 34.** Połączone wyniki wszystkich eksperymentów dotyczących struktury drugorzędowej vRNA8 przedstawione na modelu CMC-vRNA8.

## 2. Badanie struktury drugorzędowej modelowych fragmentów vRNA8

### 2.1. Badanie struktury drugorzędowej mini-vRNA8

Cząsteczka mini-vRNA8 to modelowy fragment vRNA8 o długości 376 nukleotydów. Zawiera ona 182 nukleotydy z końca 5' vRNA8 oraz 188 nukleotydów z końca 3'. Dodatkowo, fragmenty te łączy sekwencja rozpoznawana przez endonukleazę *Bam*HI, która była niezbędna w procesie klonowania cząsteczki mini-vRNA8. Przy projektowaniu kierowano się głównie danymi literaturowymi oraz przewidzianą dla nich strukturą drugorzędową *in silico*. Postuluje się, że sygnał pakowania vRNA do wirionu znajduje się w rejonach około 150-200 nukleotydowych od końca 5' i 3' vRNA. Celem badania struktury drugorzędowej tego modelu było sprawdzenie, czy w tak okrojonej cząsteczce występują zachowawcze elementy strukturalne. Mogłyby one brać udział w pakowaniu vRNA do wirionu. Jednocześnie mini-vRNA8, jeśli zawierałaby wszystkie elementy niezbędne dla działania polimerazy wirusowej oraz dla pakowania vRNA umożliwiając w dalszej kolejności wydajną ekspresję białek mógłby stanowić nowe wadliwe, interferujące RNA (DI RNA, ang. *Defecting Interfering RNA*) w badaniach komórkowych, służąc jako wektor do wprowadzania genów markerowych (32, 35, 59). Poznanie struktury drugorzędowej mini-vRNA8 pozwoliło również na udokładnienie struktury vRNA8.

#### 2.1.1. Otrzymywanie cząsteczki mini-vRNA8

Cząsteczka matrycowa, którą wykorzystywano w reakcji transkrypcji *in vitro* do uzyskania mini-vRNA8, powstała w VI etapach (MATERIAŁY I METODY). W etapie pierwszym wykonano dwie reakcje PCR, w której matrycą był plazmid pPol1 zawierający sekwencję mRNA segmentu 8. Zaprojektowano odpowiednie startery, startery St1-mini i St2-mini (Tab. 15 MATERIAŁY I METODY) służyły do namnożenia cząsteczki DNA1 odpowiadającej 182 nukleotydów z końca 5' vRNA8. Natomiast St3-mini i St4-mini (Tab. 15 MATERIAŁY I METODY) zostały zastosowane do powielenia fragmentu DNA2 odpowiadającego 188 nukleotydów z końca 3' vRNA8. Startery zawierały dodatkowo sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne. Starter St1-mini zawierał miejsce restrykcyjne dla *Eco*RI,

St2-mini i St3-mini zawierały sekwencję rozpoznawaną przez endonukleazę *BamHI*, natomiast St4-mini – *PstI*. W kolejnym etapie cząsteczki DNA1 i DNA2 zostały poddane reakcji trawienia endonukleazą *BamHI* w celu uzyskania lepkich końców 3' dla cząsteczki DNA1 oraz 5' dla cząsteczki DNA2. W ten sposób przygotowane cząsteczki były wykorzystane do reakcji ligacji z udziałem ligazy DNA T4. W wyniku reakcji ligacji uzyskano cząsteczkę DNA o długości 392 nukleotydów. Produkt ten wykorzystano w kolejnej reakcji PCR w celu powielenia uzyskanej matrycy. DNA oczyszczono i w kolejnym etapie poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi *EcoRI* i *PstI*. Jednocześnie tymi samymi endonukleazami przecięto plazmid pUC19. Uzyskanie lepkich końców zarówno we fragmencie DNA, jak i w liniowej postaci plazmidu, umożliwiło wydajne wklonowanie cząsteczki. Plazmid z insertem namnożono w bakteriach *Escherichia coli* szczepu DH5 $\alpha$ . Oczyszczony plazmid zawierający insert poddano reakcji sekwencjonowania w celu sprawdzenia poprawności sekwencji odpowiadającej mini-vRNA8. Uzyskany plazmid posłużył w reakcji PCR z wykorzystaniem starterów vRNA8 For i vRNA8 Rev (Tab. 14 MATERIAŁY I METODY) do namnożenia matrycy niezbędnej w transkrypcji mini-vRNA8. Uzyskana w ten sposób cząsteczka RNA była oczyszczana na 10% żelu poliakrylamidowym, co umożliwiała również sprawdzenie jej homogenności.

### **2.1.2. Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej mini-vRNA8 metodą SHAPE**

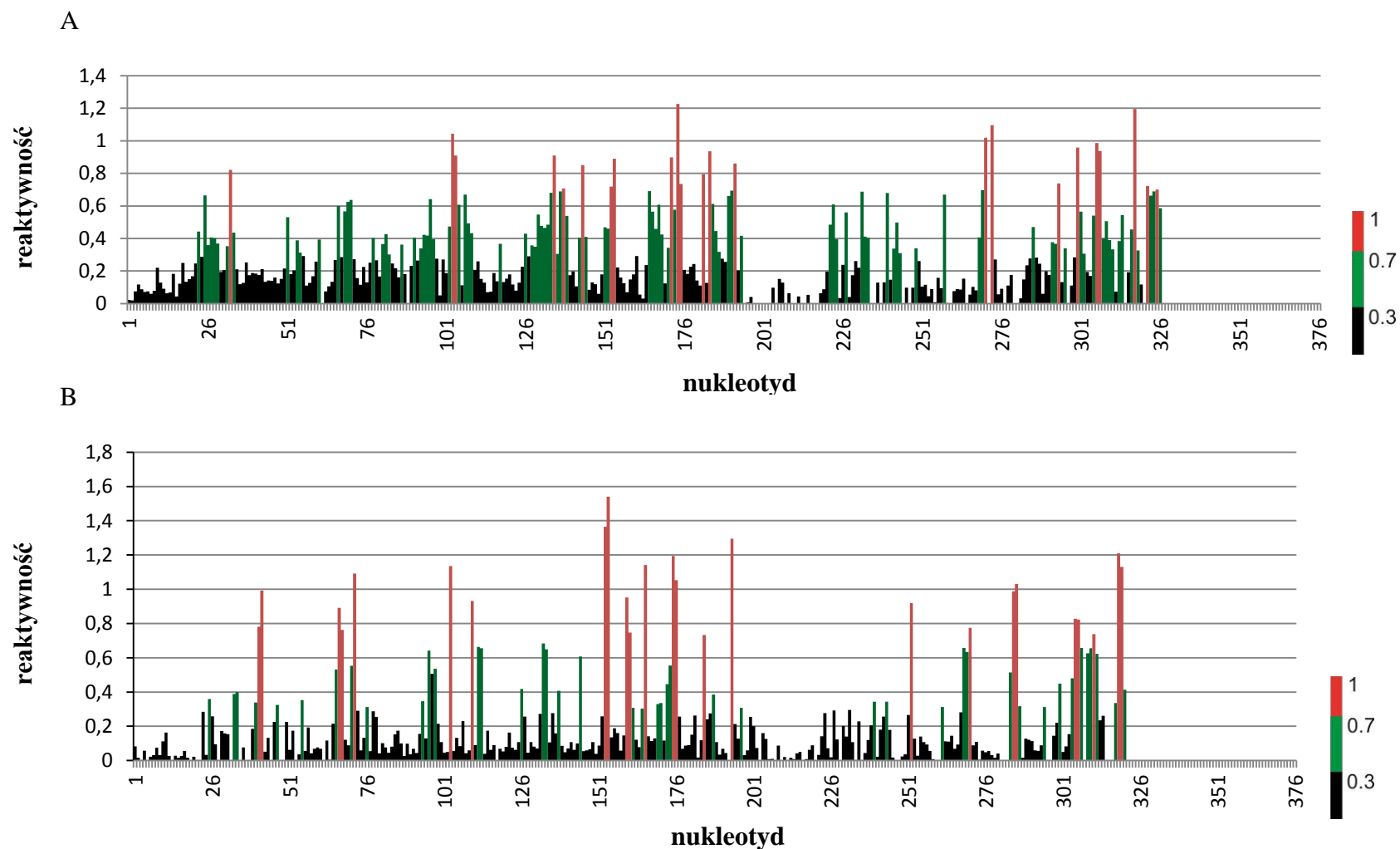
Cząsteczkę mini-vRNA8 poddawano fałdowaniu i modyfikacji odczynnikami NMIA w takich samych warunkach, jakie stosowano przy pełnej długości cząsteczki vRNA8. Stężenie NMIA w próbie wynosiło 4 mM. W reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystano 3 startery: St1, St2 i St6 posiadające na końcu 5' fluoresceinę (Tab. 18 MATERIAŁY I METODY). Umożliwiło to odczyt modyfikacji w całej cząsteczce mini-vRNA8.

W wyniku mapowania metodą SHAPE udało się uzyskać informację na temat 78% cząsteczki. Warto dodać, że 13% nukleotydów, o których nie uzyskano informacji, znajdowała się na końcu 3' cząsteczki. Podobnie jak w przypadku vRNA8 było to miejsce wiązania się startera St1. Wykorzystywana metoda w tym przypadku uniemożliwiła odczyt 50 pierwszych nukleotydów wraz z miejscem hybrydyzacji startera (326-376). Rozkład reaktywnych nukleotydów był bardziej równomierny niż

w przypadku cząsteczki vRNA8. Jednakże zauważalne są dwa rejony, które głównie skupiały nukleotydy o wysokiej reaktywności: 126-194, 292-326. Reaktywność SHAPE powyżej 0,3 posiadało 117 nukleotydów, w tym wysoką reaktywność wykazało 23 nukleotydy, zaś średnią – 94 (Rys. 35).

### **2.1.3. Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej mini-vRNA8 siarczanem dimetylu**

Cząsteczkę mini-vRNA8 poddano również modyfikacji z zastosowaniem DMS. Stężenie tego odczynnika było takie same, jak przy pełnej długości cząsteczce i wynosiło 30 mM w próbie. W cząsteczce mini-vRNA8 modyfikacji uległo 62 zasady, w tym 25 wykazywało wysoką reaktywność, natomiast 37 średnią. Rozkład reaktywnych zasad wobec DMS pokrywał się z rozkładem reaktywności nukleotydów modyfikowanych NMIA. Najwięcej modyfikowanych zasad również występowało w rejonach 126-194 oraz 292-326 (Rys. 35).



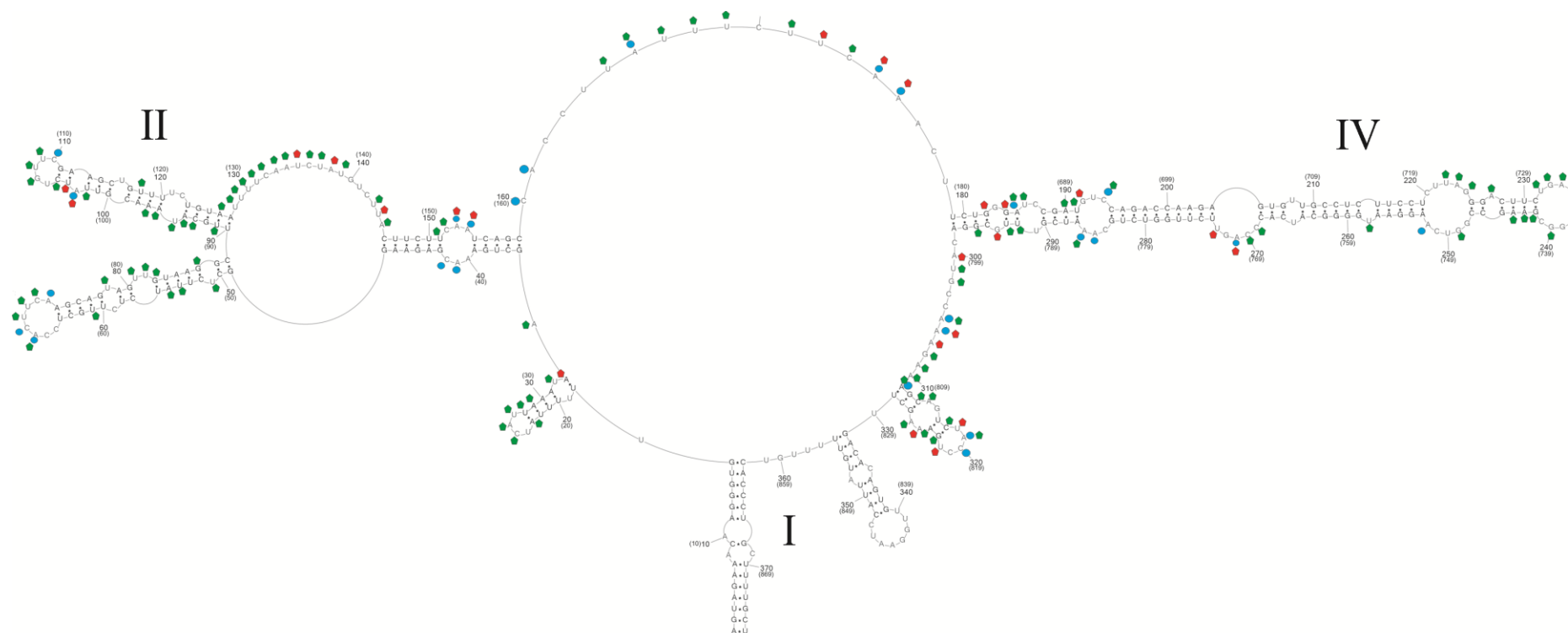
**Rysunek 35.** Reaktywność nukleotydów w mini-vRNA8, A – reaktywności nukleotydów w metodzie SHAPE, B – reaktywności nukleotydów w obecności siarczanu dimetylu. Wysoka reaktywność  $>0,7$ ; średnia reaktywność  $0,3-0,7$ ; brak reaktywności  $0-0,3$

#### 2.1.4. Struktura drugorzędowa mini-vRNA8

Podobnie jak w przypadku vRNA8, do przewidywania struktury drugorzędowej mini-vRNA8 wykorzystano program *RNAstructure 5.3*. Ograniczenia w postaci danych eksperymentalnych zostały wprowadzone tak, jak to opisano wcześniej dla vRNA8. Program wygenerował 15 modeli struktury drugorzędowej mini-vRNA8, których energia swobodna różniła się maksymalnie o 10% od najbardziej korzystnej energii. Strukturę o najniższej energii swobodnej, która wynosiła -169,3 kcal/mol nazwano CM-mini-vRNA8. Uzyskana struktura drugorzędowa zawierała 6 motywów strukturalnych typu spinka do włosów, liczne wybrzuszenia jedno- i dwustronne oraz dwie pętle wieloramienne (Rys. 36).

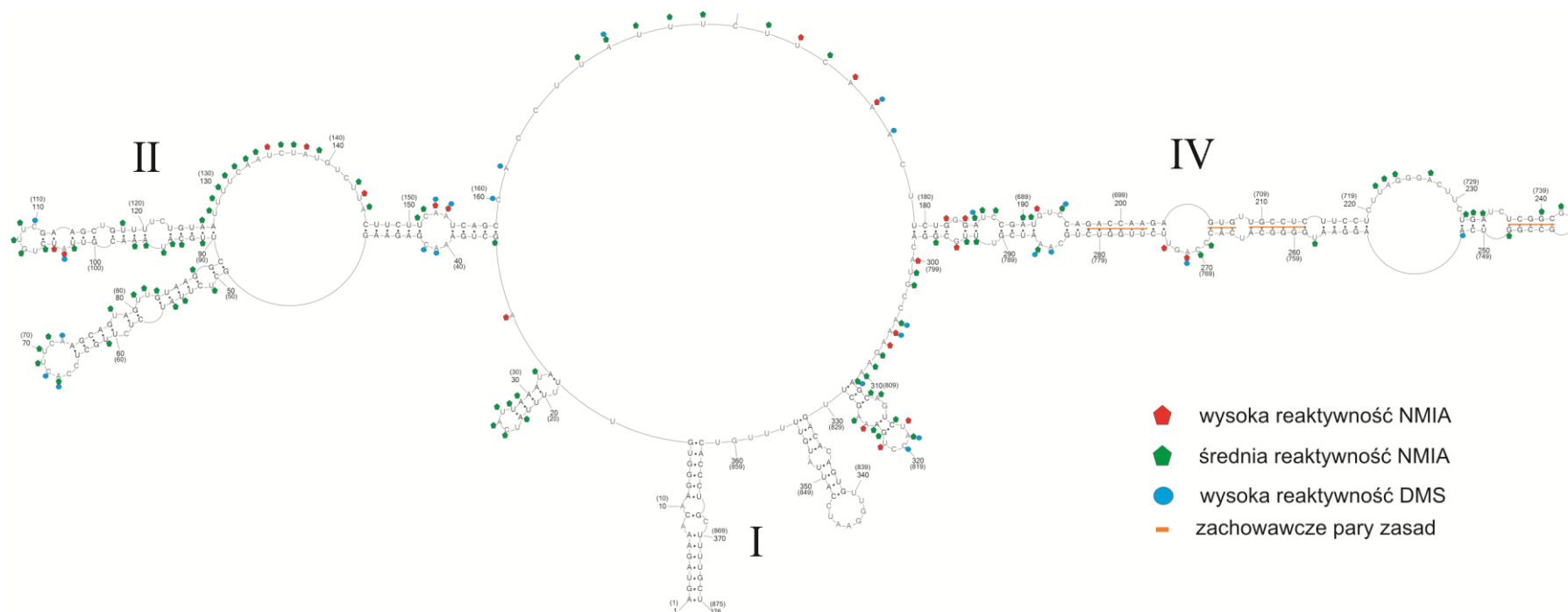
Struktura CM-mini-vRNA8 zawierała 3 motywy strukturalne, które częściowo stanowiły fragmenty domeny I, domeny II oraz domeny IV CM-vRNA8. Domenie I odpowiadał rejon komplementarnych końców 3' i 5', czyli fragment 1-16 oraz 362-376. Fragmentowi domeny II odpowiadał rejon 35-159, natomiast fragment domeny IV tworzyły nukleotydy z rejonu 188-290. Warto zauważyć, że w przypadku mini-vRNA8 rozkład mapowań jest bardziej równomierny, a modyfikacji uległa większość nukleotydów znajdujących się w rejonach jednoniciowych.





**Rysunek 36.** CM-mini-vRNA8. Struktura drugorzędowa mini-vRNA8 wygenerowana w programie *RNAstructure 5.3*. Jako ograniczenia wykorzystano wyniki mapowania techniką SHAPE i modyfikacje odczynnikiem DMS. Energia swobodna przedstawionej struktury wynosi  $-169,3$  kcal/mol. Rejon 362-376 nie został zanalizowany. Liczbami rzymskimi oznaczono domeny odpowiadające domenom struktury drugorzędowej vRNA8.

Cząsteczka mini-vRNA8 zawierała rejon domeny IV, w której w vRNA8, występowały zachowawcze pary zasad (687-789). W związku z dużym podobieństwem wyników mapowań i przewidywanych struktur dla rejonów analogicznych do vRNA8 postanowiono wykorzystać wyniki badań bioinformatycznych uzyskanych dla tego fragmentu wraz z wynikami eksperymentalnymi. Wszystkie ograniczenia z mapowań chemicznych mini-vRNA8 wprowadzono analogicznie jak dla vRNA8. Program wygenerował 12 różnych modeli struktury drugorzędowej. Strukturę o najniższej energii swobodnej (-169,2 kcal/mol) (Rys. 37) nazwano CMC-mini-vRNA8. Tak jak się spodziewano zmiany nastąpiły tylko we fragmencie, który odpowiadał domenie IV vRNA8. Po wprowadzeniu zachowawczych par zasad (197-204/274-281, 205-207/266-268, 209-214/259-264, 237-241/245-249) struktura tego rejonu zmieniła się i była taka, jak w modelu struktury CMC-vRNA8. Przemodelowaniu uległ region 220-252. Rozkład modyfikowanych nukleotydów jest zgodny z oboma modelami struktury drugorzędowej. W modelu CMC-vRNA8 nukleotydy 232-234, które wykazywały średnią reaktywność SHAPE, znajdowały się w rejonie helikalnym, natomiast te same nukleotydy w modelu CM-mini-vRNA9 występowały w rejonie jednoniciowym. Odwrotna sytuacja nastąpiła dla nukleotydów 242-244, które również wykazywały średnią reaktywność SHAPE. W modelu CM-mini-vRNA8 nie tworzyły par zasad, natomiast w modelu CMC-vRNA8 znajdowały się we fragmencie dwuniciowym.



**Rysunek 37.** CMC-mini-vRNA8. Struktura drugorzędowa mini-vRNA8 wygenerowana w programie *RNAstructure 5.3*. Jako ograniczenia wykorzystano wyniki mapowania techniką SHAPE, modyfikacji odczynnikiem DMS oraz wprowadzono zachowawcze pary zasad. Energia swobodna przedstawionej struktury wynosi 169,2 kcal/mol. Rejon 362-376 nie został zanalizowany. Liczbami rzymskimi oznaczono domeny odpowiadające domenom struktury drugorzędowej vRNA8.

### 2.1.5. Mapowanie mikromacierzowe mini-vRNA8

Z doświadczeń z cząsteczką vRNA8 postanowiono, że hybrydyzacja mini-vRNA8 do mikromacierzy izoenergetycznych zostanie przeprowadzona w temperaturze 37°C w buforze FB1. Z cząsteczką oddziaływało 25 sond mikromacierzowych w tym 11 sond miało jedno komplementarne miejsce wiązania, 7 sond - 2 miejsca wiązania, 6 sond - 3 miejsca wiązania, a jedna sonda posiadała 4 miejsca wiązania (Tab. 6, Rys. 38). Prawdopodobne miejsca wiązania tych sond to: 17, 52, 58-61, 66, 68, 106, 107, 117, 121-123, 141-143, 149, 163, 169-171, 179, 181, 220, 221, 230-231, 237, 348, 369, 374 oraz 375. W tym jednoznaczne miejsca wiązania wystąpiły w pozycjach: 58, 68, 142, 163 oraz 348. Wszystkie te sondy wiążą się również do cząsteczki vRNA8 z relatywnie różną siłą (Tab. 6). W cząsteczce mini-vRNA8 występują także fragmenty, w których prawdopodobne miejsca wiązania wykazuje kilka sond kolejno obok siebie. Są to rejony: 58-63, 121-123, 141-143, 148-150, 169-171 oraz 179-181.

Zaobserwowano, że sondy mikromacierzowe, które wiązały się do mini-vRNA8, oddziaływały również z cząsteczką vRNA8. W rejonie, który odpowiada domenie II vRNA8 (35-159), 14 sond mikromacierzowych hybrydyzowało do mini-vRNA8 w tych samych pozycjach. Pojawiły się również dwa niezaobserwowane wcześniej prawdopodobne miejsca wiązania 66 i 143. Rejon 183-293 mini-vRNA (fragment domeny IV vRNA8) oddziaływał z 5 sondami mikromacierzowymi. Trzy prawdopodobne miejsca wiązania w adekwatnych pozycjach zanotowano również w cząsteczce vRNA8 (719; 729 oraz 730). Prawdopodobne miejsca wiązania, których nie zaobserwowano w cząsteczce vRNA8, wystąpiły w pozycji 369, 374 oraz 375. Miejsca te znajdują się w rejonie domeny I vRNA8. Uzyskane wyniki są zgodne z zaproponowaną strukturą drugorzędową CMC-mini-vRNA8.

**Tabela 6.** Wynik hybrydyzacji mini-vRNA8 do mikromacierzy izoenergetycznych.

Komplementarne miejsca wiązania w vRNA8	Komplementarne miejsca wiązania w mini-vRNA8	Nazwa sondy	Sekwencja sondy	Siła wiązania sondy do mini-vRNA8: >33,33% silne wiązanie; 11,11% - 33,33% średnie wiązania. W warunkach: bufor FB1, 37°C.	Różnica w wiązaniu pomiędzy mini-vRNA8 i vRNA8 czerowna strzałka – silne wiązanie.; zielona strzałka-średnie wiązanie	Różnica w sile wiązania sondy. M- silne wiązanie, Ś- średnie wiązanie	Przewidziane $\Delta G^{\circ}_{37^{\circ}\text{C}}$ (kcal/mol) dla komplementarnego wiązania RNA-RNA obliczonego w programie RNAstructure; w nawiasie przewidziane $\Delta G^{\circ}_{37^{\circ}\text{C}}$ (kcal/mol) dla wiązania modyfikowana sonda-RNA	Alternatywne miejsca wiązania Podkreślono miejsca wiązania najbardziej prawdopodobne dla mini-vRNA8	Miejsce wiązania dla mini-vRNA8. Najbardziej prawdopodobne komplementarne miejsca wiązania w strukturze CMC-mini-vRNA8 podkreślono i pogrubiono.
53 (143, 720)	53 (143, 221)	777	UDDGDG	100,00%	↑	Nowe wiązanie	-5,3 (-10,91) 221; -4,5 (-10,91) 53; -2,9 (-8,78) 143	-4,5 (-10,91) <b>59/60</b> 6pz	53 ( <b>143</b> , <b>221</b> )
52 (59, 713, 719)	52 (59, 214, 220)	35	DDGDGG	89,29%			-7,0 (-12,96) 220; -6,5 (-12,96) 214; -5,1 (-10,03) 59; -5,0 (-10,03) 52	-4,2 (-8,52) <b>230</b> 5pz; -4,2 (-8,52) <b>179</b> 5pz; -4,1 (-10,55) <b>148/149</b> 6pz	<b>52</b> ( <b>59</b> , 214, <b>220</b> )
68	68	47	DDGUGG	78,74%			-6,2 (-12,37) 68		<b>68</b>
60 (775)	60 (276)	265	CDDGDG	59,17%	↑	Ś do M	-6,0 (-11,62) 60; -5,2 (-9,49) 276	-4,0 (-9,10) <b>220</b> 5pz	<b>60</b> (276)
148 (729)	148 (230, 179)	131	DGDDGG	48,78%			-5,2 (-9,61) 179; -5, 2 (-9,61) 230; -4,6 (-9,61) 148	-4,5 (-4,77) <b>171/172</b> 4pz	148 ( <b>230</b> , <b>179</b> )

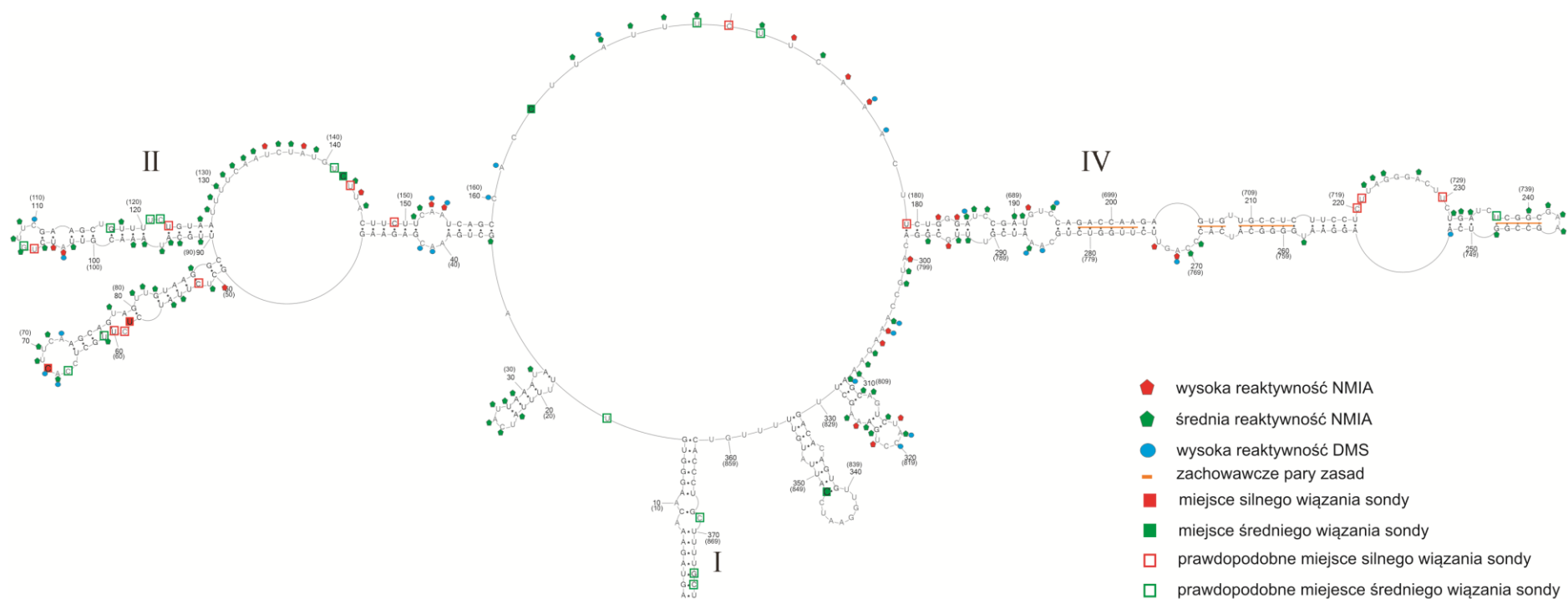
149 (170, 774)	149 (170, 275)	33	DDGDDG	43,86%			-4,4 (-11,37) 149; -2,7 (-9,24) 275; -2,3 (-9,24) 170	-4,5 (-9,34) <b>179</b> 5pz; -4,5 (-9,34) <b>230</b> 5pz; -4,1 (-6,0) <b>69/70</b> 4pz	<b>149 (170, 275)</b>
58	58	137	DGDGDG	38,91%	↑	Ś do M	-4,8 (-10,71) 58		<b>58</b>
106 (123)	106 (123)	73	DCDGDG	38,61%			-5,4 (-9,83) 123; -4,6 (-9,83) 106	-4,1 (-5,96) <b>180/181</b> 4pz; -4,1 (-5,96) <b>231/232</b> 4pz	<b>106 (123)</b>
66	66	745	GUGGDG	32,05%	↑	nowe wiązanie	-9,4 (-12,52) 66	-5,0 (-7,27) <b>348</b> 5pz	<b>66</b>
847	348	233	DUGGDG	30,12%	↑	nowe wiązanie	-4,7 (-10,46) 348		<b>348</b>
121 (169)	121 (169)	129	DGDDDG	28,09%			-2,9 (-9,00) 121; -2,1 (-9,00) 169		<b>121 (169)</b>
736	237	393	CGDGDG	27,62%	↑	nowe wiązanie	-6,8 (-10,24) 237	-5,7 (-12,37) <b>59/60</b> 6pz; -4,4 (-9,10) <b>220</b> 5pz; -4,3 (-6,17) <b>52</b> 5pz	<b>237</b>
62 (873)	62 (374)	145	DGCDDG	21,14%	↑	nowe wiązanie	-6,2 (-11,89) 62; -4,5 (-9,87) 374		62 ( <b>374</b> )
17 (118, 854)	17 (118, 355)	5	DDDCDG	19,88%			-3,9 (-10,49) 118; -1,8 (-8,47) 17; -1,8 (-8,47) 355	-3,5 (-8,46) <b>107</b> 5pz	<b>17 (118, 355)</b>
61 (91)	61 (91)	579	GCDDGG	19,05%	↑	nowe wiązanie	-7,5 (-9,87) 91; -7,1 (-9,87) 61		<b>61 (91)</b>

868	369	37	DDGCDG	18,25%	↑	nowe wiązanie	-6,4 (-12,42) 369	-4,2 (-9,11) <b>62</b> 4pz; -4,2 (-6,76) 374/ <b>375</b> 4pz; -3,9 (-7,59) <b>117/118</b> 6pz; -3,5 (-7,69) <b>107</b> 4pz; -3,2 (-5,39) <b>123/124</b> 4pz	<b>369</b>
63 (874)	63 (375)	549	GDCDGG	15,55%	↑	nowe wiązanie	-7,2 (-10,44) 63; -6,2 (-10,44) 375	-7,4 (-10,17) <b>107/108</b> 6pz	63 ( <b>375</b> )
141	141	133	DGDCDG	15,43%			-4,6 (-9,83) 141	-4,0 (-9,50) <b>117/118</b> 6pz	<b>141</b>
122 (730)	122 (231, 180)	289	CDGDDG	15,08%			-7,1 (-11,09) 180; -7,1 (-11,09) 231; -4,5 (-9,07) 122	-4,0 (-8,29) <b>148</b> 5pz	<b>122 (231, 180)</b>
716	217	161	DGGDDG	15,06%	↑	nowe wiązanie	-6,4 (-12,19) 217	-4,1 (-9,78) <b>148/149</b> 6pz; -4,1 (-7,48) <b>230</b> 5pz	217
107 (117)	107 (117)	19	DDCDGG	14,29%			-4,4 (-9,15) 107; -4,2 (-9,15) 117	-4,2 (-5,62) <b>123/124</b> 4pz	<b>107 (117)</b>
142	142	34	DDGDGG	14,12%		M do Ś	-5,4 (-9,58) 142		<b>142</b>
163	163	44	DDGGUG	12,64%		M do Ś	-7,0 (-12,07) 163		<b>163</b>
405		41	DDGGDG	54,05%	↑	Ś do M		-4,0 (-8,47) <b>230/231</b> 5pz; -4,0 (-8,47) <b>179</b> 5pz	

	181	329	CCDGDG	11,33%			-7,6 (-10,27) 181	-4,5 (-5,96) <u>231</u> /232 4pz; -3,8 (-7,46) <u>122</u> 5pz; -3,8 (-5,96) 105/ <u>106</u> 4pz	181
Komplementarne miejsca wiązania w vRNA8	Komplementarne miejsca wiązania w mini-vRNA8	Nazwa sondy	Sekwencja sondy	Siła wiązania sondy do mini-vRNA8: >33,33% silne wiązanie; 11,11% - 33,33% średnie wiązania. W warunkach: bufor FB1, 37°C.	Różnica w wiązaniu pomiędzy mini-vRNA8 i vRNA8 czerwona strzałka – silne wiązanie.; zielona strzałka-średnie wiązanie	Różnica w sile wiązania sondy. M- silne wiązanie, Ś- średnie wiązanie	Możliwe komplementarne miejsca wiązania w vRNA8, które nie wiąże się z mini-RNA.	Miejsca alternatywne w mini-vRNA8. Podkreślone i pogrubione miejsca wiązania najbardziej prawdopodobne w strukturze mini-vRNA8.	Miejsce wiązania dla mini-vRNA8. Najbardziej prawdopodobne komplementarne miejsca wiązania w strukturze CMC-mini-vRNA8 podkreślono i pogrubiono.
535		12	DDDUG	brak wiązania	↓		535		
80 (275)	80	29	DDCUAG	brak wiązania	↓		275		
13 (436)	13	88	ACCCUG	brak wiązania	↓		436		
108 (192)	108	517	GDDCDG	brak wiązania	↓		192		
69 (147, 178, 728)	69 (147, 178, 229)	524	GDDGUG	brak wiązania	↓		534/535		
194 (254, 390)		545	GDGDDG	brak wiązania	↓		390		
268		291	CDGDG	brak wiązania	↓		268		

Czerwonym kolorem oznaczono reszty nukleotydowe typu LNA, czarnym 2'-O-metylowane, a niebieskim dodatkową resztę guanozyny w serii LNA. Literą D oznaczono 2,6-diaminopurynybazy.





**Rysunek 38.** Wynik hybrydyzacji mini-vRNA8 do mikromacierzy izoenergetycznych przedstawiony na modelu struktury CMC-mini-vRNA8. Liczbami rzymskimi oznaczono domeny odpowiadające domenom struktury drugorzędowej vRNA8.

## 2.2. Badanie struktury drugorzędowej krótkich fragmentów modelowych vRNA8

W celu dalszego udokładnienia struktury drugorzędowej vRNA8 zaprojektowano cztery krótsze cząsteczki modelowe: M1-RNA, M2-RNA, M3-RNA, M4-RNA.

Cząsteczka M1-RNA była 173 nukleotydowym fragmentem domeny III. Sekwencja M1-RNA była zgodna z sekwencją rejonu 204-376 vRNA8, który w modelu struktury CMC-vRNA8 tworzył 4 motywy typu spinka do włosów. Dodatkowo, w trzonach dwóch struktur spinkowych występowały zachowawcze pary zasad.

Cząsteczka M2-RNA stanowiła 88 nukleotydowy fragment domeny IV i odpowiadała rejonowi 694-782 vRNA8. We fragmencie tym, vRNA8 wykazano obecność zachowawczych par zasad.

Kolejna cząsteczka nazwana M3-RNA wywodziła się z domeny IV, rejonu 503-561. Cząsteczka M3-RNA o długości 58 nukleotydów została zaprojektowana ze względu na dwa pewne miejsca wiązania się sond mikromacierzowych w odpowiadającym jej motywie strukturalnym w vRNA8, jak również ze względu na istniejące w niej sekwencje komplementarne do vRNA czterech innych segmentów wirusa grypy (segmentu 1, 3, 4 oraz 5) (patrz rozdział II 3.1).

### 2.2.1. Otrzymywanie cząsteczki modelowej M1-RNA

Cząsteczki matrycowe dla M1-RNA powstały w pięciu etapach. W pierwszym etapie wykonano reakcję PCR, w której matrycą były dwa częściowo komplementarne, syntetyczne DNA: M1-1 i M1-2 (Tab. 16 MATERIAŁY I METODY). Produkt po oczyszczeniu służył jako matryca w kolejnej reakcji PCR. Startery użyte w tej reakcji zawierały miejsca restrykcyjne rozpoznawane przez *EcoRI* (M1-st1) oraz *PstI* (M1-st2). Wbudowane miejsca rozpoznawane przez endonukleazy umożliwiały w dalszych etapach wklonowanie insertu do plazmidu. Dodatkowo starter M1-st1 posiadał sekwencję rozpoznawaną przez polimerazę RNA T7. W wyniku tej reakcji uzyskano fragment o długości 210 nukleotydów. Oczyszczony produkt poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi. Jednocześnie tymi samymi enzymami przecięto plazmid pUC19. Przecięcie cząsteczek enzymami *EcoRI* oraz *PstI* umożliwiało uzyskanie lepkich końców i wpływało na efektywniejszą ligację fragmentów do plazmidu. Reakcję ligacji prowadzono w obecności ligazy DNA T4. Plazmid

zawierający insert namnażano w bakteriach *Escherichia coli* szczepu DH5 $\alpha$ . Następnie plazmid oczyszczano i wykonywano reakcję sekwencjonowania w celu sprawdzenia poprawności sekwencji. Tak przygotowane plazmidy z zawierającą sekwencją cząsteczki M1 wykorzystywano w reakcji PCR w celu powielenia matryc służących w reakcji transkrypcji *in vitro* dla uzyskania cząsteczki M1-RNA. W reakcji PCR wykorzystano starter UT7-F zawierający sekwencję rozpoznawaną przez polimerazę RNA T7 oraz starter M1-R (Tab. 16 MATERIAŁY I METODY).

W transkrypcji *in vitro* RNA wykorzystywano DNA matrycowe uzyskane w reakcji PCR. Otrzymaną cząsteczkę M1-RNA oczyszczano na 10% żelu poliakrylamidowym, co umożliwiło także sprawdzenie jej homogenności.

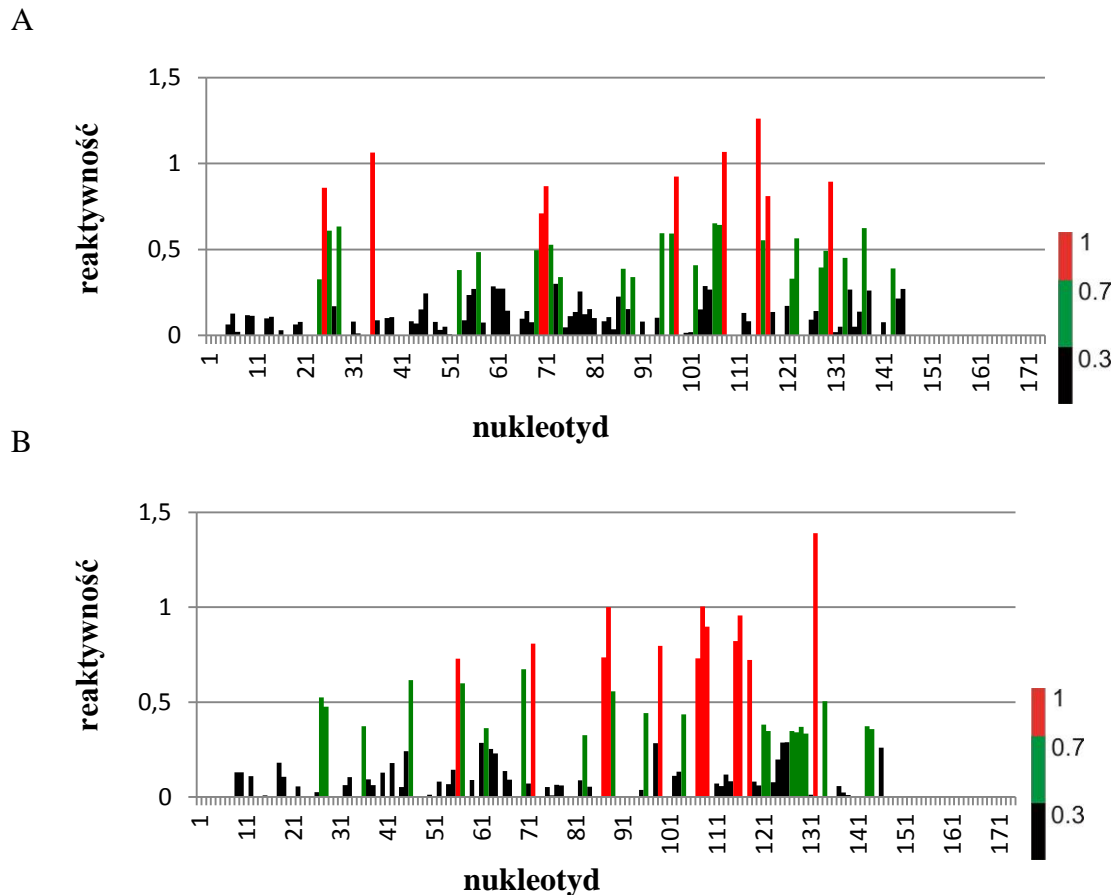
### **2.2.2. Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej M1-RNA metodą SHAPE**

Cząsteczkę M1-RNA poddawano fałdowaniu i modyfikacji według standardowych procedur wykorzystanych dla innych cząsteczek RNA w tej pracy. W tym przypadku zwiększeniu uległo stężenie NMIA, które wyniosło 8 mM w próbie. Reakcje odwrotnej transkrypcji prowadzono w obecności startera M1-S. Starter zawierał dodatkowe reszty nukleotydowe typu LNA. Modyfikacja startera służyła przede wszystkim zwiększeniu stabilności wiązania się jego do cząsteczki RNA, co pozwoliło też na skrócenie długości startera. Miał on 11 nukleotydów długości. Wynikiem tego było wydłużenie rejonu, dla którego można było obliczyć reaktywność poszczególnych nukleotydów. Wraz z rejonem komplementarnym do skróconego startera w wyniku ograniczeń metody nie zanalizowano jedynie 27 nukleotydów z końca 3' cząsteczki M1-RNA. Reaktywność SHAPE powyżej 0,3 wykazały 32 nukleotydy, w tym 9 – wysoką, a 21 – średnią. Z NMIA reagowały również nukleotydy, które w cząsteczce vRNA8 nie były reaktywne, były to nukleotydy 24 – 27, co odpowiada nukleotydom 227-230 vRNA8. Rozkład pozostałych reaktywności nukleotydów był zbliżony do tego uzyskanego dla vRNA8 (Rys. 39).

### **2.2.3. Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej M1-RNA siarczanem dimetylu**

Cząsteczkę M1-RNA poddano również modyfikacji z zastosowaniem siarczanu dimetylu. Użyte warunki fałdowania RNA i stężenie DMS, było takie, jak dla pozostałych badanych cząsteczek RNA. W reakcji odwrotnej transkrypcji użyto

starter M1-S. W rezultacie podobnie jak w przypadku metody SHAPE, nie zanalizowano 27 nukleotydów z końca 3' cząsteczki RNA. Modyfikacji uległo 32 zasady, w tym 9 reagowało silnie i 21 średnio. Najbardziej reaktywne zasady znajdowały się w rejonie 98-117 (Rys. 39).



**Rysunek 39.** Reaktywność nukleotydów w M1-RNA, A – reaktywności nukleotydów w metodzie SHAPE, B – reaktywności nukleotydów w obecności siarczanu dimetylu. Wysoka reaktywność >0,7; średnia reaktywność 0,3-0,7; brak reaktywności 0-0,3

#### 2.2.4. Struktura drugorzędowa M1-RNA

Uzyskane wyniki z mapowań chemicznych posłużyły do zaproponowania struktury drugorzędowej M1-RNA na podstawie modelowania w programie *RNAstructure 5.3*. Dane eksperymentalne wprowadzano w ten sam sposób, jak opisano wcześniej dla cząsteczki vRNA8. Program wygenerował 11 modeli struktury drugorzędowej, które różniły się energią swobodną maksymalnie o 10% od energii najkorzystniejszej. Na rysunku 40 przedstawiono strukturę drugorzędową dwóch modeli

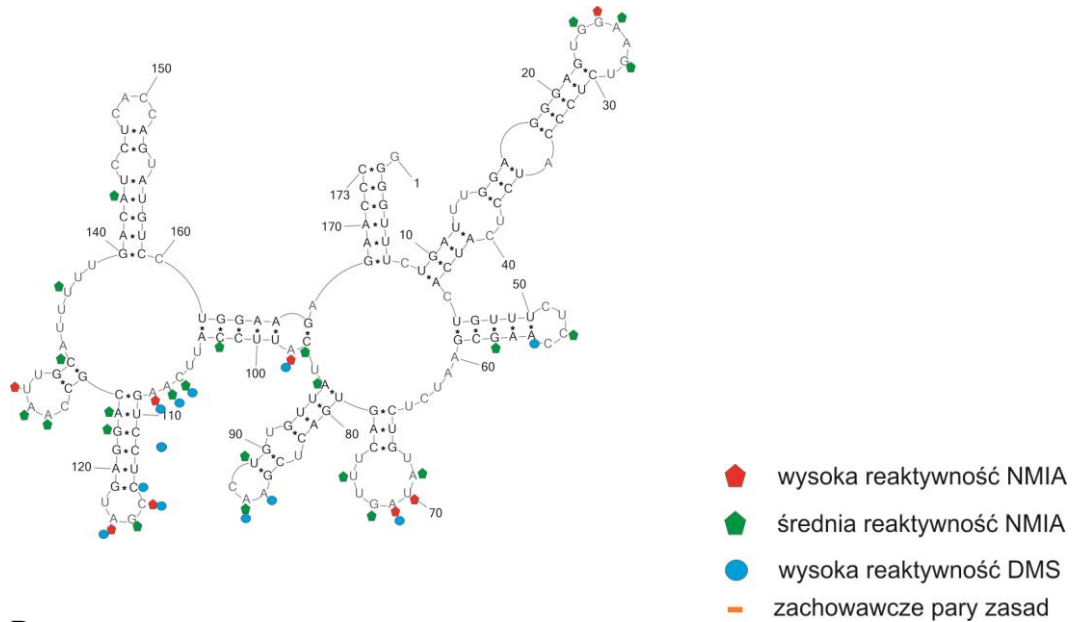
o najkorzystniejszej energii swobodnej. Wynosiła ona odpowiednio -75,5 kcal/mol oraz -74,5 kcal/mol. Struktura drugorzędowa M1-RNA o najkorzystniejszej energii swobodnej posiadała dwa wybrzuszenia wieloramienne, wokół których było rozłożonych 7 elementów typu spinki. Drugi model struktury drugorzędowej M1-RNA składał się z jednego wybrzuszenia wieloramiennego wokół którego występowało 5 motywów spinkowych do włosów. Warto zwrócić uwagę, że model ten swoją budową przypominał fragment domeny III struktury CMC-vRNA8.

W związku z tym, że w domenie III vRNA8 wykazano obecność zachowawczych par zasad, postanowiono je wprowadzić do *RNAstructure 5.3* podczas modelowania struktury drugorzędowej cząsteczki M1-RNA. Ograniczenia uzyskane metodą bioinformatyczną wprowadzono wraz z wynikami eksperymentalnymi w podobny sposób, jak przy pełnej długości cząsteczki vRNA8. Program wygenerował 5 modeli struktur drugorzędowych różniących się maksymalnie o 10% od najbardziej korzystnej energii swobodnej, z czego 4 modele struktury drugorzędowej spośród wygenerowanych były takie same, jak w przypadku modeli struktur drugorzędowych wygenerowanych bez wprowadzania do programu konserwatywnych par zasad. W tym model o najkorzystniejszej energii (-74,5 kcal/mol) był taki sam jak druga w kolejności struktura wygenerowana bez zachowawczych par zasad i przypominał swoją strukturą domenę III CMC-vRNA8 (Rys. 40 B).

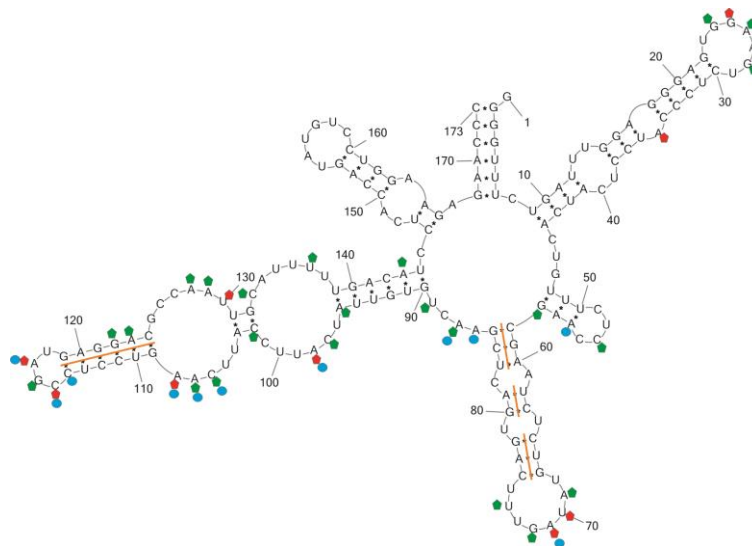
Główną uwagę skupiono na strukturze, która występuje również w domenie III modelu CMC-vRNA8, a więc strukturze B na rysunku 40. Rozkład mapowań w tej strukturze jest podobny do tego, jaki uzyskano dla domeny III. Wyjątek stanowią dwie struktury typu spinka do włosów. Fragment 150-163, który w CMC-vRNA8 (353-366) wykazywał reaktywność, w M1-RNA znajdował się w rejonie, w którym nie można było zanalizować ewentualnych modyfikacji (rejon hybrydyzacji startera). Natomiast nukleotydy 10-43 były reaktywne, podczas gdy w modelu CMC-vRNA8 (213-246) wykazywały słabą reaktywność. Szczególnie nukleotydy w pętli terminalnej tej struktury spinkowej (nukleotydy 23-29) w modelu M1-RNA reagowały zarówno z NMIA, jak i z DMS (średnie reaktywności DMS nie zaznaczone na schemacie). Pojawienie się dodatkowych reszt nukleotydowych reaktywnych podczas mapowania chemicznego może wiązać się z długością cząsteczki. Krótki izolowany fragment M1-RNA prawdopodobnie jest bardziej dostępny dla reagentów, niż długa 875 nukleotydowa vRNA8, w którym istotną rolę mogą odgrywać również trzeciorzędowe oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe.

W modelu CMC-vRNA8 zaproponowano możliwość oddziaływania rejonu 226-231 (w M1-RNA jest to rejon 23-29) z fragmentem 405-409 lub 528-533 (rejonny nie wchodzące w skład cząsteczki M1-RNA). Fakt wystąpienia reaktywności w rejonie 23-29 cząsteczki M1-RNA może potwierdzać występowanie oddziaływań trzeciorzędowych w pełnej długości cząsteczce.

A



B



**Rysunek 40.** Modelowe struktury M1-RNA wygenerowane w programie *RNAstructure 5.3* z zastosowaniem danych eksperymentalnych uzyskanych metodą SHAPE i z zastosowanie odczynnika DMS. Energia swobodna wygenerowanych cząsteczek wynosi: A) -75,5 kcal/mol, B) -74,5 kcal/mol. Model B powstaje również, jako najbardziej korzystny, po wprowadzeniu do programu *RNAstructure* ograniczeń w postaci zachowawczych par zasad.

### 2.2.5. Otrzymywanie modelowych cząsteczek M2-RNA i M3-RNA

Do reakcji transkrypcji *in vitro* cząsteczek M2-RNA oraz M3-RNA posłużyły syntetyczne matryce DNA odpowiednio M2-st1 oraz M3-st1 (Tab. 17 MATERIAŁY I METODY). Fragmenty te zawierały dodatkowo sekwencję rozpoznawaną przez polimerazę RNA T7 oraz dodatkowe 3 reszty guanozyny w celu zwiększenia wydajności syntezy RNA. W związku z tym, że polimeraza RNA T7 rozpoznaje fragmenty dwuniciowego DNA, reakcję transkrypcji poprzedzała hybrydyzacja do cząsteczek uniwersalnego startera StT7 (Tab. 17 MATERIAŁY I METODY). Starter zawierał sekwencję komplementarną do sekwencji promotora polimerazy RNA T7. Hybrydyzację wykonywano w stosunku molowym 1:1 (M2-st1:StT7, M3-st1:StT7), a następnie wykonywano reakcję transkrypcji zgodnie protokołem dostarczonym przez producenta. Uzyskane M2-RNA oraz M3-RNA oczyszczano na 10% żelu poliakrylamidowym, co pozwalało również na sprawdzenie homogenności uzyskanego RNA.

### 2.2.6. Ograniczona hydroliza M2-RNA w obecności jonów ołowiu (II)

Cząsteczkę M2-RNA poddano hydrolizie indukowanej obecnością jonów ołowiu (II). Metoda ta jest bardzo czuła i dostarcza informacji dotyczących struktury drugorzędowej cząsteczek RNA. Wykazano, że jony  $Pb^{2+}$  indukują cięcia w regionach jednoniciowych RNA, w obrębie wybrzuszeń, pętli, a także w rejonach dwuniciowych o zaburzonej strukturze. Intensywność cięć wiązań znajdujących się przy wybrzuszeniu jednonukleotydowym jest zależna od nukleotydów sąsiadujących, szczególnie duże znaczenie ma nukleotyd po stronie 5' od wybrzuszenia. Zauważono, że w przypadku gdy na końcu 5' wybrzuszenia znajduje się G, wówczas nie obserwuje się cięcia indukowanego jonami ołowiu. W przypadku większych wybrzuszeń zależność od sekwencji jest mniejsza. Cięcia w pętlach terminalnych są tym silniejsze im większa jest pętla. Wiązania fosfodiesterowe w czteronukleotydowych stabilnych pętlach, takich jak: UUCG, CUUG, GCAA, nie są przecinane (145-147).

W pierwszej kolejności RNA znakowano radioaktywnie na końcu 5'. Oczyszczoną cząsteczkę poddawano fałdowaniu w buforze FB2, w takich samych warunkach jak cząsteczkę vRNA8. W buforze do fałdowania wykorzystywano bufor zawierający Tris-HCl ze względu na kolejny etap, czyli identyfikację miejsc cięcia RNA. Produkty reakcji były rozdzielane w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach

denaturujących. W przypadku buforu HEPES utrudniał on migrację fragmentów RNA w żelu. Stężenie jonów  $Pb^{2+}$  dobrano eksperymentalnie, a optymalne stężenie wynosiło 1 mM  $Pb^{2+}$  w próbie. Otrzymany wzór cięć analizowano w programie *MultiGuage V 3.0*, porównując go z reakcją kontrolną. Wydajność hydrolizy obliczano ze stosunku intensywności poszczególnego prążka do prążka o najwyższej intensywności. Założono, że wysoka intensywność cięcia jest wtedy, gdy intensywność danego prążka wynosi powyżej 70% najintensywniejszego prążka, średnia 50-70% oraz słaba 30-50%.

W cząsteczce M2-RNA 35 wiązań fosfodiesterowych ulegało hydrolizie w obecności  $Pb^{2+}$  powyżej intensywności cięcia 30%. W tym silnym cięciu RNA ulegało po nukleotydach: 26, 27, 34, 75 oraz 77. Widoczne były 3 rejony cząsteczki M2-RNA, które ulegały silniejszym cięciom indukowanym obecnością  $Pb^{2+}$ : 25-29, 34-44 oraz 75-79.

#### **2.2.7. Mapowanie mikromacierzowe M2-RNA**

Hybrydyzację cząsteczki M2-RNA do mikromacierzy izoenergetycznych przeprowadzono w standardowych warunkach, w temperaturze 37°C i buforze FB1. Analiza wykazała 4 miejsca wiązania sond mikromacierzowych (Tab. 7). Trzy sondy o wysokiej intensywności wiązania były komplementarne do miejsc 26, 36 oraz 43. Jednoznaczne miejsce wiązania 37 posiadało średnią intensywność hybrydyzacji. Miejsca te odpowiadały analogicznym nukleotydom, które oddziaływały z sondami mikromacierzowymi w cząsteczce vRNA8.



**Tabela 7.** Wynik hybrydyzacji M2-RNA do mikromacierzy izoenergetycznych.

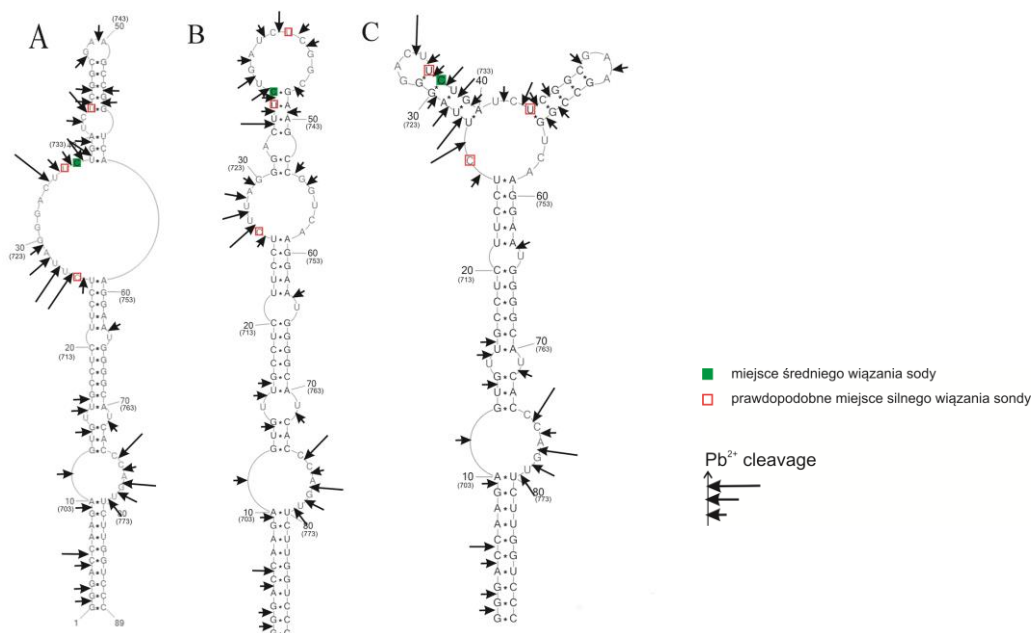
Komplementarne miejsca wiązania w M2-RNA	Nazwa sondy	Sekwencja sondy	Siła wiązania sondy do M2-RNA >33% silne wiązanie; 11% - 33% średnie wiązania. W warunkach: bufor FB1, 37°C.	Przewidziane $\Delta G^{\circ}_{37^{\circ}\text{C}}$ (kcal/mol) dla komplementarnego wiązania RNA-RNA obliczonego w programie RNAstructure.	Alternatywne miejsca wiązania Podkreślono miejsca wiązania najbardziej prawdopodobne dla M2-RNA	Miejsce wiązania dla M2-RNA. Najbardziej prawdopodobne komplementarne miejsca wiązania w strukturze M2-RNA podkreślono i pogrubiono.	
20 (26)	35	<b>DDGDGG</b>	100%	-7,0 (26); -6,5 (20)	-4,2 ( <b>36</b> )	<b>26</b> , 20	
82	265	<b>CDDGDG</b>	76,34%	-5,2 (82)	-4,0 ( <b>26</b> ); -3,8 (20)	82	M do Ś
21	521	<b>GDDGDG</b>	56,50%	-6,9 (21)	-4,3 ( <b>26</b> ); -3,6 ( <b>35/36</b> )	21	
36	131	<b>DGDDGG</b>	50,76%	-5,2 (36)	-3,4 (21)	<b>36</b>	
43	393	<b>CGDGDG</b>	48,31%	-6,8 (43)	-4,9 (82); -4,4 ( <b>26</b> ); -4,2 (20)	<b>43</b>	Nowe wiązanie
23	161	<b>DGGDDG</b>	33,22%	-6,4 (23)	-4,1 ( <b>36</b> )	23	Nowe wiązanie
81	33	<b>DDGDDG</b>	22,22%	-2,7 (81)	-4,5 ( <b>36</b> )	81	Ś do M
37	289	<b>CDGDDG</b>	12,14%	-7,1 (37)		<b>37</b>	

Czerwonym kolorem oznaczono reszty nukleotydowe typu LNA, czarnym 2'-O-metylowane, a niebieskim dodatkową resztę guanozyny w serii LNA. Literą D oznaczono 2,6-diaminopurynorybozyd.

### 2.2.9. Struktura drugorzędowa M2-RNA

Strukturę drugorzędową modelowej cząsteczki M2-RNA wygenerowano w programie *RNAstructure 5.3*. Przeanalizowano 3 modele struktury drugorzędowej tego fragmentu (Rys. 41). Model A wygenerowano stosując analogiczne ograniczenia, jak dla modelu struktury CMC-vRNA8. Wygenerowana struktura typu spinki do włosów posiadała trójnukleotydomową pętlę terminalną, a w jej trzonie występowało jedno niesparowanie U-U oraz cztery wybrzuszenia jednostronne (1, 2, 5 oraz 12 nukleotydomowe). Kolejne dwa modele powstały bez wprowadzania ograniczeń. Program wygenerował dwie najbardziej stabilne termodynamicznie struktury, przy założeniu, że maksymalna różnica energii swobodnej wynosiła 10% od najniższej wartości tej energii (Rys. 41 B, C). Model B to struktura typu spinki do włosów, której apikalną pętlę tworzyło 10 nukleotydomów, a w trzonie znajdowały się dwa wybrzuszenia dwustronne oraz trzy jednostronne. Natomiast model C charakteryzował się pętlą wieloramienną z dwoma strukturami typu spinka oraz fragmentem helikalnym. Rejon dwuniciowy rozdzielony był przez jedno niesparowanie U-U oraz dwa wybrzuszenia jednostronne. We wszystkich modelach motyw strukturalny regionu 1-25/59-89 powtarzał się. Powstałe modele posiadały energię swobodną równą odpowiednio: (A) -46,5 kcal/mol, (B) -44,4 kcal/mol oraz (C) -44,2 kcal/mol. Najkorzystniejszą energię swobodną posiadał więc model A, którego struktura drugorzędowa odpowiadała fragmentowi domeny IV CMC-vRNA8. Model B natomiast przypominał swoją strukturą drugorzędową fragment domeny IV CM-vRNA8. Na uzyskane struktury drugorzędowe naniesiono wzór cięć RNA indukowanych w obecności jonów ołowiu (II) oraz wyniki wiązania sond mikromacierzowych (Tab. 7). Silne i średnie miejsca cięć występowały głównie w rejonach jednoniciowych z wyjątkiem kilku przypadków. We wszystkich modelach średnia częstość hydrolizy obserwowana była po 5 nukleotydomie z końca 5'. Sugerować to może zaburzoną strukturę w tym rejonie. W modelu A średnie cięć występowało także po 38 adenozylinie, miejsce to znajdowało się za parą zamykającą 12-nukleotydomowe wybrzuszenie. W modelu B silnie cięć zaobserwowano po 34 cytozynie, która tworząc parę z guanozyną zamyka jednostronne wybrzuszenie. Mniej zgodny wzór cięć indukowanych ołowiem przedstawia model C. Hydroliza RNA w obecności Pb(II) wystąpiła w trzonie spinki 27-42. Rozkład sygnałów sond mikromacierzowych najbardziej zgodny był z modelem A. W strukturze tej jednoznaczne miejsce wiązania 37 wystąpiło w rejonie jednoniciowym, w pozostałych modelach natomiast znajduje się ono w rejonie dwuniciowym. Uzyskane wyniki

sugerują możliwość wystąpienia struktury drugorzędowej A lub B z niewielką przewagą na korzyść modelu A.



**Rysunek 41.** Modele struktury drugorzędowej M2-RNA. Profil hydrolizy RNA w obecności jonów ołowiu (II) oraz wynik hybrydyzacji M2-RNA do mikromacierzy izoenergetycznej. Energia swobodna poszczególnych cząsteczek wynosiła: (A) -46,5 kcal/mol, (B) -44,4 kcal/mol, (C) -44,2 kcal/mol.

### 2.2.10. Ograniczona hydroliza M3-RNA w obecności jonów ołowiu (II)

Cząsteczkę M3-RNA poddano hydrolizie w obecności jonów  $Pb^{2+}$ . Warunki eksperymentu były takie same, jak w przypadku M2-RNA. M3-RNA wykazywało większą podatność na hydrolizę niż M2-RNA. Cięcia o intensywności wyższej niż 30% maksymalnego sygnału zaobserwowano w 41 miejscach cząsteczki. Analiza wykazała najsilniejszą intensywność hydrolizy (powyżej 70%) po nukleotydach: 9-11, 16, 26, 32 oraz 36.

### 2.2.11. Mapowanie mikromacierzowe M3-RNA

Hybrydyzację cząsteczki M3-RNA do mikromacierzy izoenergetycznej prowadzono w buforze FB1 w temperaturze 37°C. Cząsteczka oddziaływała z 6 sondami mikromacierzowymi (Tab. 8). Prawdopodobne miejsca wiązania wyznaczono w pozycjach: 28, 31, 32, 35, 38 oraz 39. Sondy mikromacierzowe, które były komplementarne w miejscach 32 i 35 M3-RNA, oddziaływały również z odpowiednimi nukleotydami w vRNA8 (534, 537).

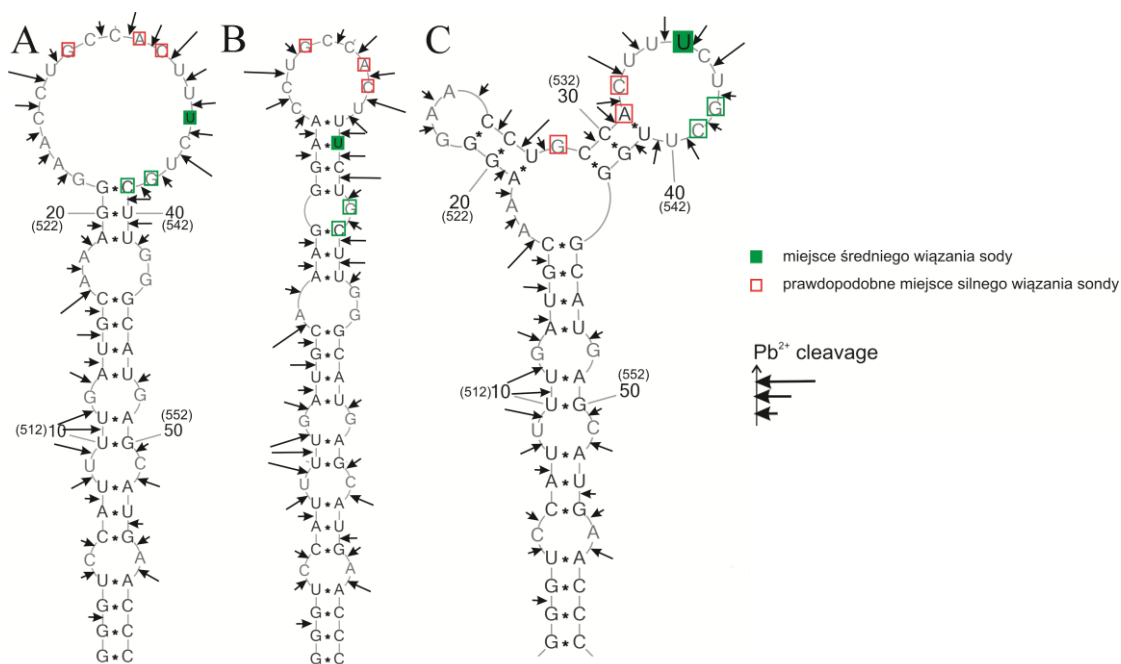
**Tabela 8.** Wynik hybrydyzacji M3-RNA do mikromacierzy izoenergetycznych.

Komplementarne miejsce wiązania w M3-RNA	Nazwa sondy	Sekwencja sondy	Siła wiązania sondy do M3-RNA >33% silne wiązanie; 11% - 33% średnie wiązania. W warunkach: bufor FB1, 37°C.	Przewidziane $\Delta G^{\circ}_{37^{\circ}\text{C}}$ (kcal/mol) dla komplementarnego wiązania RNA-RNA obliczonego w programie RNAstructure.	Alternatywne miejsca wiązania Podkreślono miejsca wiązania najbardziej prawdopodobne dla M3-RNA	Miejsce wiązania dla M3-RNA. Najbardziej prawdopodobne komplementarne miejsca wiązania w strukturze M3-RNA podkreślono i pogrubiono.	
32	47	DDGUGG	100%	-6,3 (32)	-3,5 ( <b>38/39</b> )	<b>32</b>	
28	659	GGCGGG	84,75%	-12,3 (28)	-6,7 ( <b>38</b> )	<b>28</b>	Nowe wiązanie
31	187	DGUGGG	49,50%	-6,6 (31)	-3,4 ( <b>38</b> )	<b>31</b>	Nowe wiązanie
38	147	AGCDGG	24,57%	-6,7 (38)	-8,3 ( <b>28</b> )	<b>38</b>	Nowe wiązanie
39	37	DDGCDG	22,12%	-6,8 (39)	-4,8 ( <b>28/29</b> )	<b>39</b>	Nowe wiązanie
35	129	DGDDD	19,05%	-5,0 (35)		<b>35</b>	

Czerwonym kolorem oznaczono reszty nukleotydowe typu LNA, czarnym 2'-O-metylowane, a niebieskim dodatkową resztę guanozyny w serii LNA. Literą D oznaczono 2,6-diaminopurynorybozyd.

### 2.2.12. Struktura drugorzędowa M3-RNA

Strukturę drugorzędową cząsteczki M3-RNA wygenerowano w programie *RNAstructure 5.3*. Rozważono 3 modele struktury drugorzędowej tego fragmentu (Rys. 42). Podobnie, jak w przypadku cząsteczki M2-RNA, wygenerowano strukturę drugorzędową M3-RNA korzystając z wyników uzyskanych dla vRNA8 (mapowanie chemiczne) - struktura A na rysunek 42. Model ten tworzył strukturę typu spinka do włosów. Posiadała ona dużą 17-nukleotydową pętlę terminalną, a w jej trzonie znajdowały się 4 dwustronne wybrzuszenia. Dodatkowo zaproponowano dwa modele struktury drugorzędowej (modele B i C) tego fragmentu wygenerowane w programie do przewidywania struktur drugorzędowych bez wprowadzania dodatkowych ograniczeń. Model B również tworzył strukturę typu spinki, ale jego apikalna pętla składała się z 9 nukleotydów, w trzonie natomiast występowało jedno jednostronne wybrzuszenie oraz cztery dwustronne. Kolejny model C posiadał pętlę wieloramienną z dwoma strukturami typu spinka oraz helikalnym fragmentem. Rejon dwuniciowy rozdzielony był przez 3 niesparowania dwustronne. Ponadto, struktura drugorzędowa fragmentu 1-16/44-59, częściowo sparowanego, we wszystkich zaproponowanych modelach jest taka sama. Modele te posiadały energię swobodną w wysokości: (A) -18,2 kcal/mol, (B) -14,8 kcal/mol oraz (C) -13 kcal/mol. Najkorzystniejszą energię swobodną posiadał model A i odpowiadał on strukturze typu spinka do włosów w modelu CMC-vRNA8 (503-561). Na uzyskane modele naniesiono wzór cięcia indukowanego jonami ołowiu (II) oraz wyniki wiązania się sond mikromacierzowych. Uzyskane dane eksperymentalne najlepiej korelują z modelem A struktury drugorzędowej M3-RNA, który jednocześnie był najkorzystniejszy energetycznie. W modelu tym wszystkie miejsca wiązania sond mikromacierzowych znajdują się w pętli terminalnej podczas gdy modelu B jednoznaczne miejsce wiązania 35 występuje w rejonie dwuniciowym. Również wzór cięć indukowanych w obecności Pb(II) wykazywał najlepszą zgodność z modelem A. Różnice w hydrolizie cząsteczki M3-RNA zauważalne są w regionie 17-43, w którym wszystkie średnie i mocne miejsca cięcia znajdują się w rejonach jednoniciowych.



**Rysunek 42.** Modele struktury drugorzędowej M3-RNA. Profil hydrolizy RNA w obecności jonów ołowiu (II) oraz wynik hybrydyzacji M2-RNA do mikromacierzy izoenergetycznej. Energia swobodna poszczególnych cząsteczek wynosiła: A) -18,2 kcal/mol; B) -14,8 kcal/mol; C) -13 kcal/mol.

### 2.2.13. Podsumowanie badań struktury drugorzędowej modelowych fragmmentów vRNA8

W celu udokładnienia struktury drugorzędowej vRNA8 zaprojektowano cztery cząsteczki modelowe (mini-vRNA8, M1-RNA, M2-RNA, M3-RNA). Mini-vRNA8 zbudowane było z 182 nukleotydów z końca 5' vRNA8 i 188 z końca 3' vRNA8. Ze względu na długość cząsteczki mini-vRNA8 (376 nukleotydów), stanowiła ona łatwiejszy obiekt badawczy, w porównaniu z pełnej długości cząsteczką vRNA8. Uzyskane wyniki mapowań chemicznych oraz mikromacierzowych potwierdziły możliwość występowania odpowiednich elementów strukturalnych w vRNA8. Model struktury CMC-mini-vRNA8 również charakteryzował się występowaniem motywu *panhandle* oraz motywów strukturalnych wchodzących w skład domeny II i IV CMC-vRNA8.

W wyniku mapowań chemicznych i mikromacierzowych zaproponowano struktury drugorzędowe cząsteczek M1-RNA, M2-RNA i M3-RNA. Uzyskane dane pozwalają postulować istnienie podobnych motywów strukturalnych w modelu CMC-vRNA8 (domena III i IV).

Wiedza na temat struktury drugorzędowej modelowych cząsteczek vRNA8 pozwoliła wykazać, że zaproponowana struktura drugorzędowa vRNA8 jest wysoce prawdopodobna.

Dodatkowo, mini-vRNA8, jako skrócona forma vRNA8, mogłoby stanowić trzon wydajnego nowego DI RNA. Dane literaturowe donoszą, że vRNA segmentu 1 pozbawione środkowej części ORF może wydajnie replikować i wbudowywać się do potomnego wirionu. Wykazano, że rejon minimum 150 nukleotydów z końca 5' niezbędny jest podczas pakowania vRNA1. Krótsze cząsteczki nie ulegały wbudowywaniu do potomnego wirionu. Natomiast 25 nukleotydów z końca 3' było wystarczające, aby vRNA1 zostało wprowadzone do nowopowstałego wirionu (148, 149). Postuluje się również, że struktura drugorzędowa spełnia istotną rolę podczas pakowania vRNP do potomnych wirionów (30, 59), jakkolwiek nie zaproponowano odpowiedzialnych za ten proces motywów strukturalnych. Elementy strukturalne vRNA8 zachowane w mini-vRNA8 mogą pełnić istotną funkcję w cyklu replikacyjnym wirusa. Potwierdzenie użyteczności mini-vRNA8, jako wydajnego DI RNA należałoby potwierdzić w badaniach na liniach komórkowych.

### **3. Wykorzystanie badań strukturalnych segmentu 8 vRNA wirusa grypy w projektowaniu oligonukleotydów antysensowych**

#### **3.1. Projektowanie oligonukleotydów antysensowych**

Wybierając miejsca, z którymi miały oddziaływać oligonukleotydy antysensowe, kierowano się następującymi zasadami:

- 1) Obecnością miejsc wiązania sond oligonukleotydowych mikromacierzy izoenergetycznej,
- 2) Obecnością rejonów jednoniciowych dobrze potwierdzonych w mapowaniach chemicznych
- 3) Obecnością w cząsteczce vRNA8 rejonów komplementarnych do vRNA innych segmentów.

Dane literaturowe wskazują, że podczas składanie potomnego wirusa istotną rolę odgrywają oddziaływania vRNA-vRNA. Sugeruje się, że biorą one udział w trakcie tworzenia się makromolekuły złożonej z 8 vRNP. W związku z tym, że potomny wirus

do nabycia infekcyjności potrzebuje wszystkich 8 segmentów, blokowanie miejsc oddziaływania może stanowić interesujący cel hamujący cykl replikacyjny wirusa. Do poszukiwania fragmentów vRNA8 komplementarnych do vRNA pozostałych segmentów wykorzystano program *BLAST* dostępny na stronie *NCBI*. W wyniku przeprowadzonej analizy, w cząsteczce vRNA8 znaleziono rejony komplementarne do vRNA pozostałych siedmiu, segmentów (Tab. 9). Długość fragmentów wahała się od 9 do 21 nukleotydów. Regiony te wykazywały pełną komplementarność lub możliwość wystąpienia pojedynczych niesparowań. Najwięcej rejonów komplementarnych pojawiło się między vRNA segmentu 8 i segmentu 3 (18 rejonów), natomiast vRNA8 oraz vRNA2 posiadały tylko jeden komplementarny fragment. Analiza wykazała, że niektóre rejony w różnych segmentach, komplementarne do vRNA8, częściowo pokrywają się (Rys. 43). Najwięcej miejsc komplementarnych dla innych cząsteczek vRNA znajduje się w rejonie 513-539 vRNA8. W regionie tym występują nukleotydy komplementarne do vRNA czterech innych segmentów (vRNA1 rejon 513-527, vRNA3 rejon 520-538; vRNA4 rejon 515-523 natomiast do vRNA5 dwa rejony 518-526 oraz 531-539). Dodatkowo, można wyróżnić trzy fragmenty, w których znajdują się sekwencje komplementarne do vRNA trzech segmentów, są to regiony: 267-286 dla vRNA segmentów 3, 5, 6; 572-589 dla vRNA segmentów 3, 4, 5 oraz 791-813 dla vRNA segmentów 3, 4, 6. Aż 11 fragmentów posiada wspólną część komplementarną do vRNA dwóch innych segmentów: 30-51 (vRNA1 i vRNA7); 84-96 (vRNA1 i vRNA5); 163-176 (vRNA5 i vRNA7); 176-192, 306-318, 640-653 oraz 689-714 (vRNA4 i vRNA7); 220-231 (vRNA3 i vRNA5); 330-344, 623-634 (vRNA3 i vRNA7); 770-785 (vRNA4 i vRNA6).

Na podstawie modelu CMC-vRNA8, informacji o komplementarności vRNA segmentu 8 wirusa grypy do vRNA innych segmentów oraz profilu dostępności vRNA8 dla sond oligonukleotydowych mikromacierzy izoenergetycznej wyznaczono dziesięć rejonów, które mogłyby stanowić dobry cel dla oligonukleotydów antysensowych. Ponadto, wytypowano jeden rejon, który mógłby służyć jako kontrola negatywa biorąc pod uwagę strukturę drugorzędową (Tab. 10; Rys. 44).

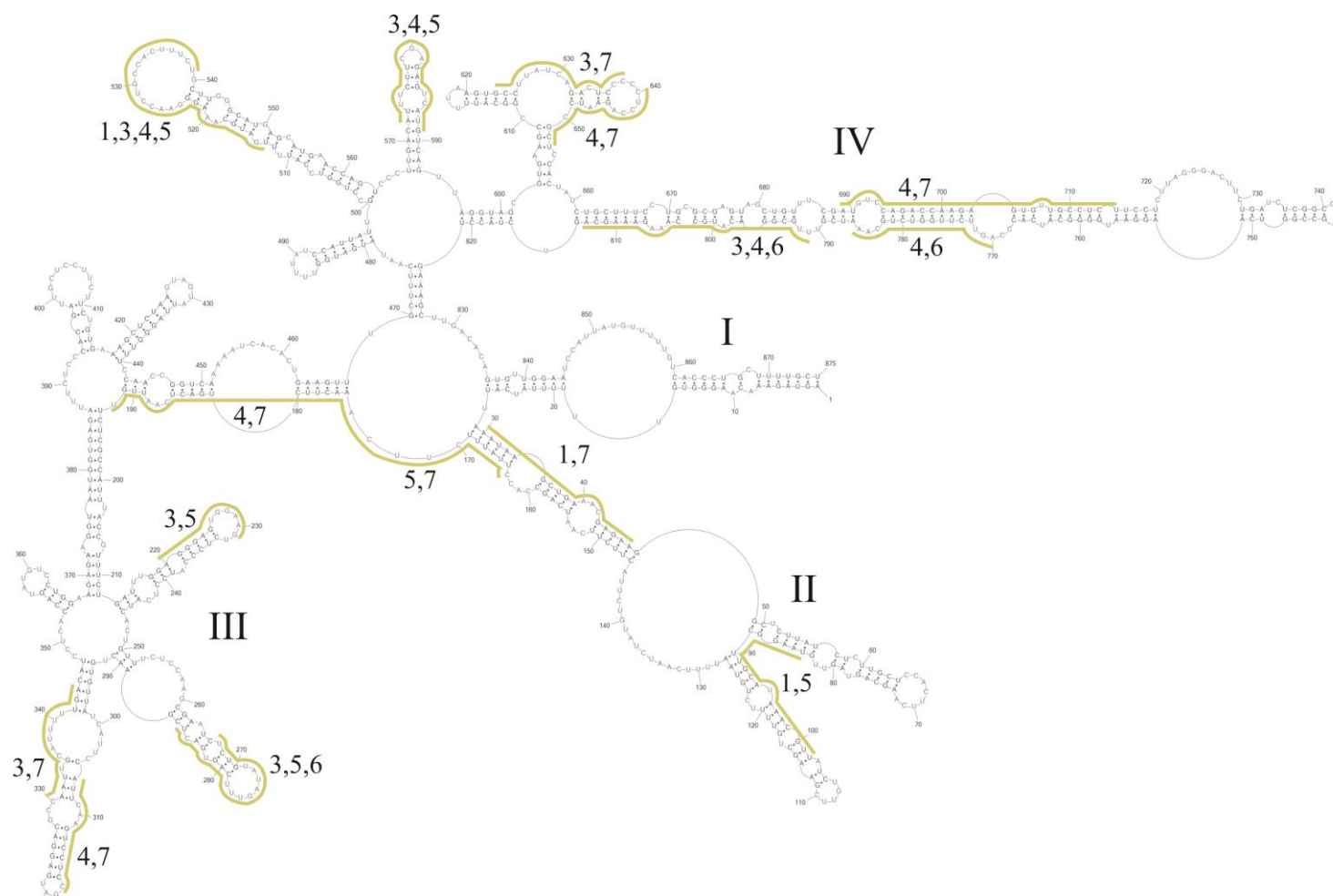


**Tabela 9.** Rejony vRNA8 komplementarne do pozostałych vRNA wirusa grypy.

Segment 8		lokalizacja	segment	Sekwencja 5'→3'	długość dupleksu	Ilość nukleotydów komplementarnych	Ilość niesparowań	
lokalizacja	Sekwencja 5'→3'							
30	47	AAUAAGCUGAAACGAGAA	685 702	7	UUCUCUUUCAGCUUCUU	18	16	2
40	51	AACGAGAAGGCU	1173 1184	1	AGCCUUCUAGUU	12	11	1
50	59	CUCUUAUCUC	772 781	1	GAGAUAAAGAG	10	10	0
76	92	AGUAGUUGUAAGGCUUG	820 836	1	CAAUACUUACAACUACU	17	15	2
84	102	UAAGGCUUGCAUAAACGUU	1695 1713	1	AACAUGUAUGCAACCAUUA	19	15	4
85	96	AAGGCUUGCAUA	865 876	5	UAUGCAAUCCUU	12	11	1
103	114	AUCUGUUCGAAG	1429 1440	5	CUUCCAACAGAU	12	11	1
127	139	AUUUCAAUCUAU	2049 2061	3	AUAAAGUGAAAAU	13	11	2
146	156	CUUCUCAAUC	447 457	3	GAUUGAAGAAG	11	11	0
163	173	CUUAUUUCUUC	54 64	5	GAAGAAUAAG	11	11	0
167	176	UUUCUCAA	168 177	7	UUUGAAGAAA	10	10	0
176	188	ACUUCUGACUCAA	832 844	7	UUUAGUCAGAGGU	13	11	2
181	192	UGACUCAAUUGU	370 381	4	ACAUUUGAGUCA	12	11	1
200	212	AUUUACCGUUUCU	811 823	1	AGAAACGGUCAAU	13	12	1
220	229	AGGGAGUGGA	324 333	3	UCCACUCCCU	10	10	0
221	231	GGGAGUGGAAG	340 350	5	CCUCCGCUUCU	11	7	4
229	238	AAGUCUCCA	1550 1559	3	UGGGAGACUU	10	10	0
251	260	UUUCUCCAAG	1888 1897	3	CUGGGAGAAA	10	9	1
267	280	UCUGUAUAGUUUCA	700 713	3	UGAAUCCAUAACAGA	14	12	2
276	284	UUUCAGUGA	271 279	6	UCACUGAAA	9	9	0
278	286	UCAGUGACU	1367 1375	5	AGUCACUGA	9	9	0
297	307	UAUCAUCCA	673 683	7	AUGGAAUGUUA	11	10	1

306	321	AUUCAAGUCCUCCGAU	238	253	7	AUAGGAUCACUUGAAU	16	13	3
310	318	AAGUCCUCC	1278	1286	4	GGAGGACUU	9	9	0
330	340	CAAUUGCAUUU	161	171	7	AAAUGCAUUUG	11	10	1
336	344	CAUUUUUGA	1426	1434	3	UCAAAAUG	9	9	0
344	352	ACAUCCUCA	842	850	5	UGAGGAUGU	9	9	0
362	370	CCUGGAAGA	1279	1287	5	UCUCCAGG	9	9	0
367	375	AAGAGAAGG	384	402	3	CCUUCUCUUU	9	9	0
386	400	AUUUCUCCCACGAUU	1885	1898	3	AAUCUGGGAGAAU	15	14	1
402	411	CUCCUUCUUC	77	86	3	GAGGAAGGAG	10	9	1
407	419	UCUUCUGUGAAAG	400	412	3	CUUUGACAGAAGA	13	12	1
416	424	AAAGCUCU	1132	1140	4	UAGAGCUUU	9	9	0
461	473	CUGAAGUUUGCUU	486	498	2	AAGCAGACUUCAG	13	12	1
507	515	CCAUUUUGA	1369	1377	4	UCAAAAUGG	9	9	0
513	527	UGAUGCAAAGGAAC	1684	1698	1	GUUCCCUUCCAACA	15	13	2
515	523	AUGCAAAGG	320	328	4	CCUUUGCAU	9	9	0
518	526	CAAAGGGAA	835	843	5	UUCCCUUUG	9	9	0
520	538	AAGGGAACCGCCACUUUC	167	182	3	GAAGGUCCAGGUUCC	16	13	3
531	539	CCACUUUCU	284	292	5	AGAAAGUGG	9	9	0
572	580	AUUUCUUCG	53	61	5	CGAAGAAU	9	9	0
576	589	CUUCGAGAGUCAUG	971	984	4	CAUUACUCUCGAAC	14	13	1
577	586	UUCGAGAGUC	340	349	3	GACUCUCCAA	10	9	1
595	610	UAGGUAGCGUGAAGCC	1559	1574	4	GGCUUCACUCCAUCUA	16	13	3
620	629	AGUGCCUUAU	127	136	3	AUCAGGCACU	10	9	1
623	638	GCCUUAUCAGACUCCC	1398	1413	3	GGUAGUCUGAGAGGGC	16	13	3
625	634	CUUAUCAGAC	480	489	7	GUCUGAUUAG	10	9	1
640	648	CUCCAGAAU	950	958	4	AUUCUGGAG	9	9	0
641	653	UCCAGAAUCCGCU	752	764	7	AGGGCAUUCUGGA	13	11	2

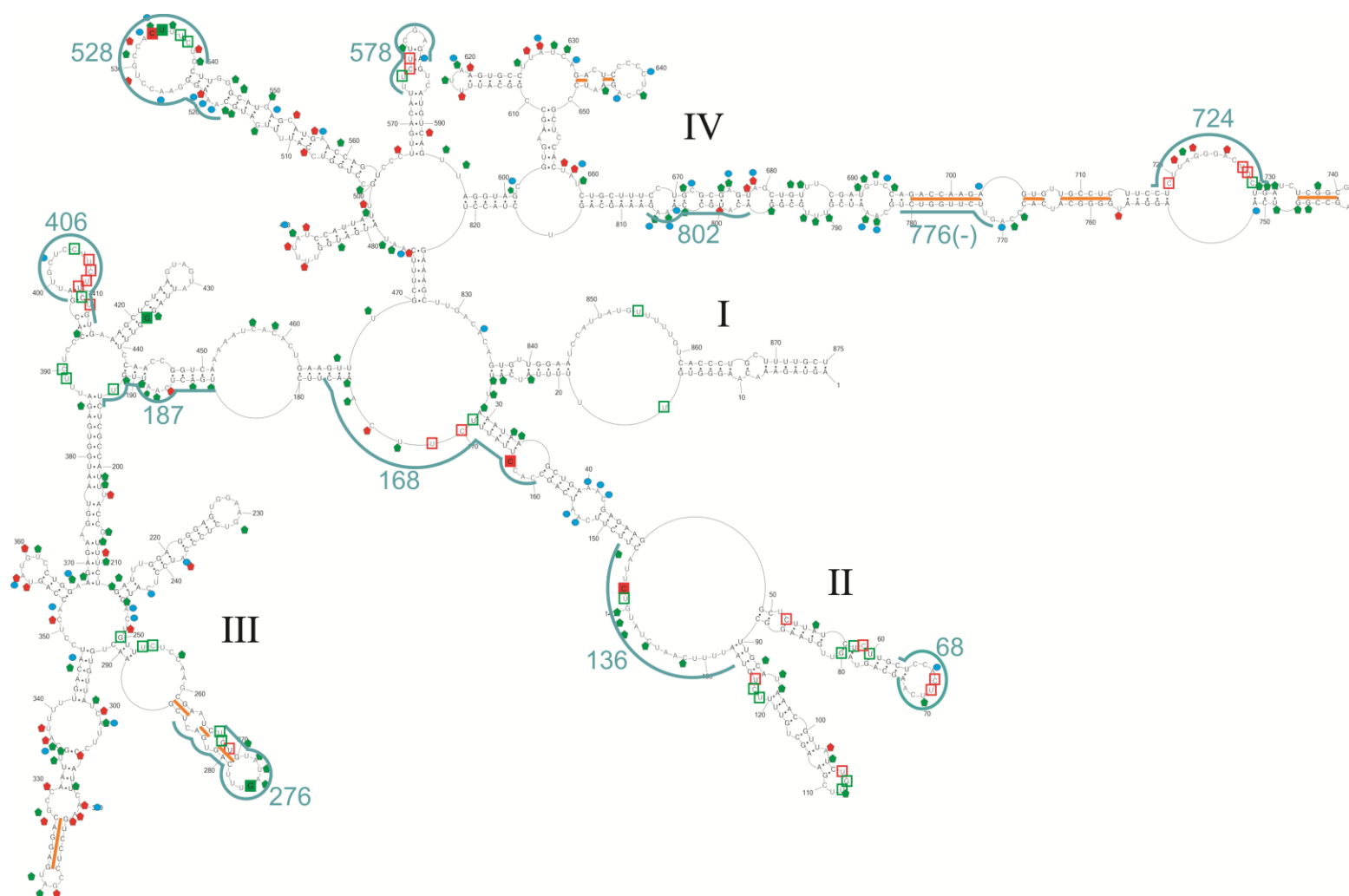
689	700	AUGUCCAGACCA	1291	1302	4	UGGUAUGGACAU	12	11	1
695	714	AGACCAAGAGUGUUGCCUCU	839	858	7	AGAGGUGACAGGAUUGGUCU	20	15	5
719	727	CUUAGGGAC	188	196	3	GUCCCUAAG	9	9	0
755	764	AAUGGGGCAU	474	483	3	AUGCCCAU	10	10	0
770	780	AGUUCUUGGUC	1336	1346	4	GACCAAGAACU	11	11	0
774	785	CUUGGUCUGCAA	895	906	6	UUGCUGACCAAG	12	11	1
791	811	UUGCGGACAUGCCAAAGAAAG	2143	2163	3	CUUUCAUUGCCUUUCCGCAA	21	17	4
797	808	ACAUGCCAAAGA	1612	1623	4	UCUUGGGCAUGU	12	11	1
802	813	CCAAAGAAAGCA	136	147	6	UGCUCUCUUUGG	12	11	1
825	844	AGCUUGACACAGUGUUGGAA	1641	1660	4	UCCAUAUUGUGUCAACCU	20	16	4



**Rysunek 43.** Rejony vRNA8 komplementarne do pozostałych vRNA wirusa grypy przedstawione na modelu CMC-vRNA8. Jasnozieloną linią zaznaczono rejony, które zawierają sekwencje komplementarne do vRNA pozostałych segmentów. Cyfrą arabską oznaczono numer segmentu, do którego sekwencji vRNA jest komplementarny dany region w vRNA8.

**Tabela 10.** Miejsca docelowe dla oligonukleotydów antysensowych w cząsteczce vRNA segmentu 8 wirusa grypy szczepu A/VietNam/1203/2004 (H5N1).

Miejsce docelowe dla oligonukleotydu antysensowego w vRNA8	Sekwencja 5'→3' komplementarna do vRNA8 w miejscu docelowym	Dodatkowe informacje
68	UGAAGUGGAG	
136	GUAAGACAUAGAUUGAAAAU	
168	GUUUGAAGAAUAAGGUG	rejon docelowy vRNA8 zawiera sekwencje komplementarną do vRNA5 i vRNA7
187	GAACAAUUGAGUCA	rejon docelowy vRNA8 zawiera sekwencje komplementarną do vRNA4 i vRNA7
276	AGUCACUGAAACGAGACAGA	rejon docelowy vRNA8 zawiera sekwencje komplementarną do vRNA3, vRNA5, vRNA6
406	ACAGAAGAAGGAGCAAU	
528	CAGAAAGUGGCAGGUUCCCUUUG	rejon docelowy vRNA8 zawiera sekwencje komplementarną do vRNA1, vRNA3, vRNA4, vRNA5
578	UCUCGAAGAAA	rejon docelowy vRNA8 zawiera sekwencje komplementarną do vRNA3, vRNA4, vRNA5
724	CAGAAGUCCCUAAGAG	
802	CUUUGGCAUGU	rejon docelowy vRNA8 zawiera sekwencje komplementarną do vRNA3, vRNA4, vRNA6
776	AGACCAAGAAC	kontrola negatywna



**Rysunek 44.** Miejsca docelowe dla oligonukleotydów antysensowych w cząsteczce vRNA segmentu 8 wirusa grypy szczepu A/VietNam/1203/2004 (H5N1) przedstawione na modelu struktury drugorzędowej M2C-vRNA8. (Tab. 10).

### 3.2. Badania na liniach komórkowych MDCK.

Do badań wybranych oligonukleotydów antysensowych wybrano linię komórkową MDCK (ang. *Madin-Darby Canine Kidney*). Są to komórki wyizolowane w 1958 roku przez S. H. Madin i N. B. Darby z tkanki nerki psa rasy cocker spaniel i z powodzeniem wykorzystywane w badaniach prowadzonych na różnych wirusach (np. Vaccinia, Coxsackie B5, adeno- oraz reowirusy, SVEV). System komórkowy z wykorzystaniem linii komórkowej MDCK do badania wirusa grypy opracowano w laboratorium profesora Luisa Martinez-Sobrido na Uniwersytecie w Rochester.

Opisane poniżej badania na liniach komórkowych zostały wykonane przez profesora Elżbietę Kierzek i profesora Ryszarda Kierzka w laboratorium profesora Luisa Martinez-Sobrido. Autorka niniejszej pracy od listopada 2014 rozpoczyna staż naukowy na Uniwersytecie w Rochester i takiego typu badania będzie prowadziła samodzielnie. Opisane poniżej wyniki zostały przedstawione, aby wykazać użyteczność informacji o strukturze RNA wirusa grypy do regulacji jego namnażania i wykazać praktyczny cel prowadzenia badań strukturalnych.

Zaprojektowane oligonukleotydy antysensowe badano na liniach komórkowych zainfekowanych wirusem grypy szczepu A/California/04/2009 (H1N1). Zmiana badanego szczepu wirusa grypy o podtypie H5N1 na bezpieczniejszy podtyp H1N1 wynikała przede wszystkim z wysokiej inwazyjności wirusa podtypu H5N1 i braku szczepionki na ten podtyp. Dodatkowo, w laboratorium profesora Luisa Martinez-Sobrido istnieje system zwierzący do badań wirusa grypy wybranego szczepu A/California/04/2009 (H1N1). Istnieje więc możliwość późniejszego wykorzystania najefektywniejszych oligonukleotydów w kolejnym etapie badań na modelu mysim.

W związku ze zmianą badanego szczepu, postanowiono również przeprowadzić analizę konserwatywności miejsc komplementarnych do zaprojektowanych oligonukleotydów. Analizę wykonano na 8118 unikatowych sekwencji vRNA8 dostępnych w bazie danych wirusa grypy (<http://www.fludb.org>). W tabeli 11 zestawiono sekwencje wybranych oligonukleotydów komplementarnych do vRNA8 szczepu A/VietNam/1023/2004 (H5N1) oraz odpowiednie do nich sekwencje komplementarne do vRNA8 szczepu A/California/04/2009 (H1N1). Dodatkowo, wyznaczono sekwencję oligomeru uniwersalnego dla obu szczepów wirusa. Zachowawczość dla wybranych rejonów była wyższa niż 80%.

**Tabela 11.** Zestawienie sekwencji oligonukleotydów komplementarnych do rejonu docelowego dla ASO w vRNA segmetu 8 szczepów A/VietNam/1203/2004 i A/California/04/2009 oraz konserwatywność sekwencji tych rejonów.

Miejsce docelowe w vRNA8 dla oligonukleotydu antysensowego (konserwatywność rejonu docelowego [%])	V – A/VietNam/1203/2004 C – A/California/04/2009 U – sekwencja uniwersalna dla obu szczepów	Sekwencja 5'→3' komplementarna do vRNA segmentu 8 w miejscu docelowym
68 (94,5)	V C U	U U G A A G U G G A G U U G A A G U A G A A U U G A A G U G G A A
136 (84)	V C U	G U A A G A C A U A G A U U G A A A A U A U G C G G C A C A G A U U G A A A G C G U A A G A C A C A G A U U G A A A A C
168 (88,7)	V C U	G U U U G A A G A A A U A A G G U G A U U U G A G G A A A U A A G G U G G U U U G A A G A A A U A A G G U G
187 (82,2)	V C U	G A A C A A U U G A G U C A G A G C A A U U G G G A C A G A A C A A U U G G G U C A
276 (94)	V C U	A G U C A C U G A A A C U A U A C A G A A G U C U C U G A A A A U A U A C A G A A G U C U C U G A A A A U C U A C A G A
406 (93)	V C U	A C A G A A G A A G G A G C A A U A C U G A G G A G G G A G C A A U A C C G A A G A A G G A G C A A U
528 (84)	V C U	C A G A A A G U G G C A G G U U C C C U U U G C A A A A G A U A A U A G G C C C U C U U U G C A A A A A A U G G U A G G C C C U C U U U G



578 (81)	V C U	U C U C G A A G A A A C C U C G A G G A A A U C U U G A G G A A A
724 (85)	V C U	C A G A A G U C C C U A A G A G C A A A A G U C C U U A A A A G C A G A A G U C C C U A A A A G
776 (-) (80)	V C U	A G A C C A A G A A C A G A C A A U G G A U A G A C C A A G A A C
802 (97)	V C U	C U U U G G C A U G U C U U U G G C A U A U C U U U G G C A U A U

Najniższą konserwatywność wykazywał rejon komplementarny do miejsca 776 (80,2%), najwyższą – region komplementarny do miejsca 802 (97,3%). Analiza ta pozwoliła także zaprojektować ASO, które były uniwersalne dla obu szczepów, były to oligomery komplementarne do miejsca 68, 168 oraz 724 (w części sekwencji istnieje możliwość tworzenia się stabilnej pary G-U w duplesie RNA/ASO). W pozostałych oligonukleotydach antysensowych wybrano sekwencje w pełni komplementarne do vRNA8 szczepu A/California/04/2009 (H1N1).

Jak wspomniano we wstępie literaturowym oligonukleotydy antysensowe zbudowane z modyfikowanych nukleotydów są bardziej odporne na działanie komórkowych nukleaz, a ich czas półtrwania w komórce jest dłuższy od oligonukleotydów RNA i DNA. Dlatego do badań na liniach komórkowych wybrano oligomery składające się w całości z 2'-O-metylo-RNA. Ponadto, zsyntetyzowano dwa oligomery (L276-8C, L528-8U), które posiadały dodatkowe reszty nukleotydowe typu LNA w celu zwiększenia ich stabilności termodynamicznej oraz dwa oligonukleotydy antysensowe (G276-8C, G528-8U) typu gapmer. Oligomery typu gapmer zbudowane są z fragmentu DNA, który na końcu 3' i 5' posiada cztery lub pięć reszt nukleotydowych typu 2'-O-metylo-RNA lub LNA. Tabela 12 przedstawia ASO, które były wykorzystane w badaniach na liniach komórkowych MDCK.

Linie komórkowe MDCK transfekowano wybranymi oligonukleotydami antysensowymi w stężeniu 4  $\mu$ M w obecności lipofektaminy 2000. Po 12 godzinach od transfekcji komórki infekowano szczepem wirusa grypy A/California/04/2009 (H1N1). Po 24 godzinnej hodowli komórek zainfekowanych wirusem, z nadwarstwy komórek zbierano pożywkę zawierającą nowopowstałe cząstki wirusa (TSC, ang. *Tissue Culture Supernatant*). TCS w wielokrotnych rozcieńczeniach służyło do infekcji kolejnej monowarstwy komórek MDCK. Do identyfikacji ilości zainfekowanych komórek wykorzystywano metodę immunofluorescencji pośredniej (IFA, ang. *Immunofluorescence Assay*). W pierwszej kolejności warstwę komórek utrwalano, a następnie blokowano z zastosowaniem surowiczej albuminy wołowej (BSA, ang. *Bovine Serum Albumin*). Tak przygotowane komórki inkubowano z niewyznakowanym przeciwciałem pierwszorzędowym (królicze monoklonalne przeciwciało skierowane przeciw wirusowemu białku NP). Do wizualizacji kompleksu antygen-przeciwciało wykorzystywano przeciwciało drugorzędowe posiadające znacznik fluorescencyjny FITC (mysie przeciwciało skierowane przeciwko przeciwciału

króliczemu). Dodatkowo do mieszaniny zawierającej przeciwciała drugorzędowe dodawano barwnik fluorescencyjny DAPI, który wybarwiał jądra komórkowe.

**Tab. 12.** ASO stosowane w badaniach na liniach komórkowych MDCK.

Nazwa oligomeru*	Sekwencja oligomeru 5'→3'**	Przewidziana $\Delta G^{\circ}_{37^{\circ}\text{C}}$ [kcal/mol]***
68-8U	UUGAAGUGGAA	-13,38
136-8C	AUGCGGCACAGAUUGAAAGC	-31,23
168-8U	GUUUGAGGAAAUAAGGUG	-23,93
187-8C	GAGCAAUUGGGACA	-20,65
276-8C	AGUCUCUGAAAAUAUACAGA	-25,19
406-8C	ACUGAGGAGGGAGCAAU	-28,16
528-8C	CAAAGAUAAUAGGCCUCUUUG	-31,93
578-8C	CCUCGAGGAAA	-15,58
724-8U	CAGAAGUCCUAAAAG	-19,39
802-8C	CUUUGGCAUUAU	-12,89
L276-8C	AGUCUCUGAAAAUAUACAGA	-31,89
L528-8U	CAAAGGUGGUAGGCCUCUUUG	-45,46
G276-8C	AGUCtctgaaaatataCAGA	
G528-8U	CAAAGgtgtaggcctCUUUG	
776-8C	AGACAAUGGAU	-12,57
NEG	AGACCUCUAUAGCAGCU	-27,16

\* L – ASO zawierający w swojej sekwencji nukleotydy typu LNA, G – ASO typu gapmer, liczby -68, 136, 168, 187, 276, 406, 528, 578, 724, 802, 776 – wyznaczają środkowy nukleotyd w miejscu wiązania ASO, 8 – numer segmentu, na którego było nakierowane ASO, U – sekwencja uniwersalna dla szczepu A/VietNam/1203/2004 (H5N1) oraz A/California/04/2009 (H1N1), C – sekwencja w pełni komplementarna do vRNA szczepu A/California/04/2009 (H1N1).

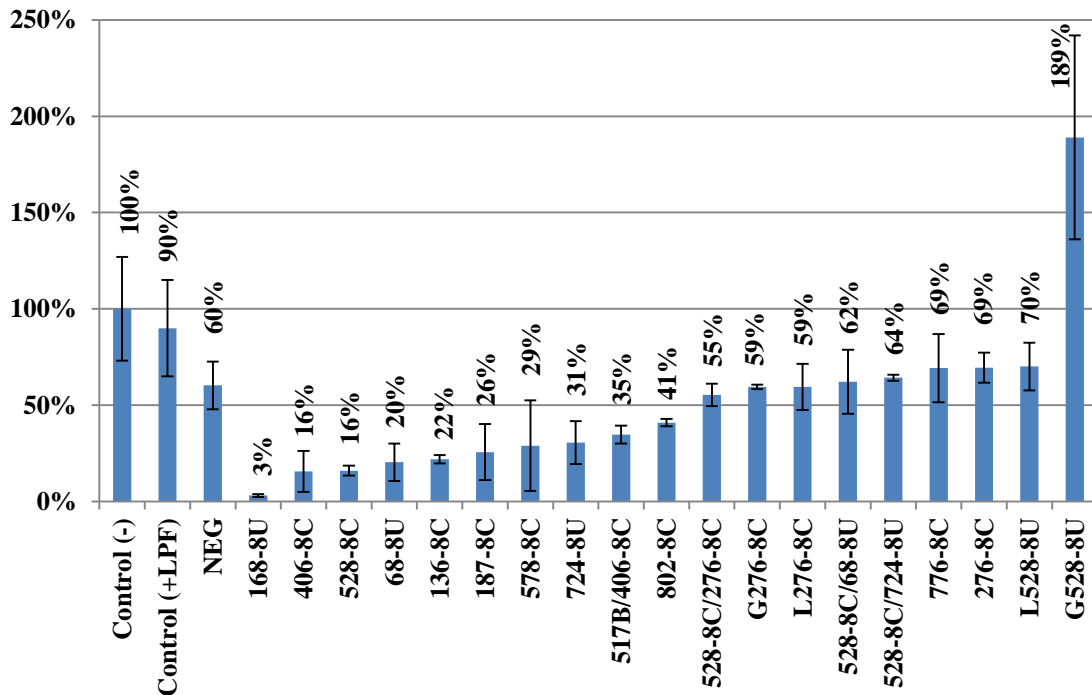
\*\* Kolorem czerwonym oznaczono reszty nukleotydowe typu LNA, małe litery oznaczają reszty nukleotydowe DNA.

\*\*\* Energia swobodna dupleksu w 100 mM NaCl przewidziana za pomocą kalkulatora dostępnego na stronie <http://rnachemlab.ibch.poznan.pl/calculator1.php>, który uwzględnia zastosowane modyfikacje.

W kolejnym etapie z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego zliczano zainfekowane jądra komórkowe. Na wykresie przedstawiono uśrednione wyniki (Rys. 45), wskazujące do jakiego poziomu zostało obniżone namnażanie wirusa grypy. Poziom namnażania wirusa grypy w komórkach MDCK, podany w procentach, określa stosunek zainfekowanych komórek w obecności oligonukleotydu do standardowej kontroli.

Dziewięć oligonukleotydów wykazywało inhibicję namnażania wirusa grypy do poziomu poniżej 50% w stosunku do kontroli. Największą efektywność wykazywała cząsteczka ASO 168-8U, która inhibowała namnażanie wirusa do poziomu 3%. Dwa oligonukleotydy obniżały ilość wirusa poniżej 20% (406-8C – 16% oraz 528-8C – 16%),

4 poniżej 30% (68-8U – 20%; 136-8C – 22%; 187-8C – 26%; 578-8C – 29%). Oligonukleotydy 724-8U oraz 802-8C hamowały powstawanie potomnych wirusów do poziomu odpowiednio 31% oraz 41%. Pozostałych pięć ASO nie wykazywało wpływu na cykl replikacyjny wirusa. Ponadto oligomer antysensowy typu gapmer (G528-8U) promował namnażanie się wirusa. W obecności tego oligonukleotydu, w stosunku do kontroli, ilość zainfekowanych komórek była niemalże dwukrotnie wyższa (189%).



**Rysunek 45.** Wykres przedstawiający poziom inibicji namnażania wirusa grypy A/California/04/2009 (H1N1) w obecności oligonukleotydów.

Oligonukleotyd antysensowy 776-8C zaprojektowany był jako kontrola negatywna dla vRNA8, biorąc pod uwagę strukturę drugorzędową. Nie wykazywał on, zgodnie z założeniami, istotnego wpływu na namnażanie się wirusa grypy i był on porównywalny z efektem wywołanym przez kontrolę negatywną (NEG). Jako kontrolę negatywną stosowano 2'-O-metylowany oligonukleotyd niespecyficzny sekwencyjnie do RNA badanego szczepu, który był wykorzystywany również przez inną grupę badawczą (100). Aby zwiększyć efekt inhibitorowy wywołany obecnością oligonukleotydów antysensowych, postanowiono wprowadzić do komórek równocześnie dwa różne ASO. Przetestowano trzy pary oligonukleotydów: 528-8C/276-8C (55%); 528-8C/68-8U (62%); 528-8C/724-8U (64%). Jednak nie wykazywały one istotnego efektu inibicji namnażania się wirusa. Podczas badań z zastosowaniem oligonukleotydów

antysensowych nakierowanych na vRNA8, równolegle były prowadzone analogiczne badania dla segmentu vRNA7 wirusa grypy. Stąd też powstał pomysł łączenia ze sobą oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do różnych segmentów. Przetestowano parę 517B (oligomer nacelowany na segment 7) oraz 406-8C (oligomer nacelowany na segment 8). Wywoływała ona inhibicję cyklu replikacyjnego wirusa do poziomu 35%.

Zaproponowana struktura CMC-vRNA na podstawie której projektowano oligomery okazała się bardzo pomocna. Wszystkie docelowe miejsca wiązania oligomerów antysensowych, z wyjątkiem jednego (276-8C), miały wpływ na cykl replikacyjny wirusa. Oligomer 168-8U, który wykazywał największą efektywność inhibicji, w modelu CMC-vRNA8 znajdował się rejonie, w którym występowało jednoznaczne miejsce wiązania sondy mikromacierzowej. Region ten również posiadał sekwencję komplementarną do vRNA segmentu 7 i 5. Kolejne dwa oligomery (406-8C oraz 528-8C), które w istotny sposób inhibowały namnażanie wirusa, w CMC-vRNA8 obejmowały w struktury typu spinki do włosów. W obu przypadkach były to miejsca do których hybrydyzowało kilka sond mikromacierzowych z rzędu. Dodatkowo, rejon wiązania 528-8C zawierał sekwencję komplementarną do vRNA czterech innych segmentów (1, 3, 4, 5). Interesujący jest fakt, że oligonukleotyd zbudowany z 2'-O-metylo-RNA komplementarny do miejsca 528 znacząco hamował cykl replikacyjny wirusa, natomiast oligonukleotyd G528-8U, który posiadał sekwencję uniwersalną, promował namnażanie wirusa. Zjawisko to wymaga jednak dodatkowych badań w celu jego wyjaśnienia.

### **3.3. Oligonukleotydy antysensowe – podsumowanie**

Uzyskaną wiedzę na temat struktury drugorzędowej vRNA8 wykorzystano podczas projektowania oligonukleotydów antysensowych. Oprócz danych uzyskanych z mapowań chemicznych i mikromacierzowych, postanowiono wykorzystać informacje o rejonach vRNA8 komplementarnych do innych segmentów. Analiza bioinformatyczna wskazała regiony vRNA8 komplementarne do vRNA pozostałych, siedmiu segmentów. Wizualizacja tych wyników na CMC-vRNA8 wykazała, że rejony te w dużej mierze obejmują fragmenty jednoniciowe.

Dane literaturowe wskazują na istnienie oddziaływań vRNA/vRNA pomiędzy segmentami i ich funkcjonalne znaczenie. Wykazano, że vRNA8 szczepu

A/Moscow/10/1999 (H3N2) w warunkach *in vitro* tworzy heterodimer z vRNA segmentu 4 oraz 5 (30). Ta sama grupa badawcza przedstawiła możliwość tworzenia się heterodimerów vRNA segmentu 8 szczepu A/Finch/England/2051/1991 (H5N2) z segmentami 3, 4 oraz 5 (79). Dodatkowo, w drugim przypadku wykazano, że oligonukleotydy antysensowe nakierowane na rejon 221-231, 364-377 oraz 517-527 vRNA8 istotnie hamują powstawanie heterodimeru odpowiednio z vRNA segmentów 5, 3 oraz 4 (79). Zaproponowane przez autorów rejony 221-231 oraz 517-527, odpowiedzialne za oddziaływanie między segmentem 8, a odpowiednio segmentem 5 i segmentem 4, zostały zidentyfikowane podczas analizy w programie *BLAST*. Natomiast, jako region komplementarny do vRNA segmentu 3, analiza wskazała rejon 336-346.

W toku badań vRNA8 przedstawionych w niniejszej pracy, zsyntetyzowano 14 oligonukleotydów antysensowych w oparciu o strukturę drugorzędową vRNA8 szczepu A/VietNam/1203/2004 (H5N1) i rejony vRNA8 komplementarne do vRNA innych segmentów. Ich działanie inhibitorowe sprawdzano na liniach komórkowych MDCK infekowanych szczepem A/California/04/2009 (H1N1). W związku ze zmianą badanego szczepu wirusa grypy, sprawdzono także konserwatywność sekwencji, na które były nakierowane oligonukleotydy antysensowe. Zachowawczość sekwencji vRNA8 w tych rejonach wahała się między 80 a 97%. Analiza poziomu namnażania wirusa w komórkach MDCK w obecności oligomerów antysensowych wykazywała w większości zahamowanie cyklu replikacyjnego. Inhibicję wywołało dziewięć na dziesięć oligomerów 2'-O-metylo-RNA, w tym ASO 168-8U obniżał poziom namnażania wirusa do 3%. Natomiast oligonukleotyd G528-8U wykazywał właściwości promujące namnażanie wirusa. Efekt wywołany tym oligonukleotydem antysensowym należałoby sprawdzić w kolejnych badaniach na liniach komórkowych.

Uzyskane wyniki wskazują na użyteczność danych dotyczących struktury drugorzędowej vRNA8 podczas projektowania ASO. Przypuszcza się, że zaprojektowane oligonukleotydy mogą wpływać na elementy strukturalne istotne podczas składania potomnego wirionu. Wykazano, że makromolekuła zbudowana ze wszystkich ośmiu vRNP powstaje podczas transportu vRNP do apikalnej części komórki (77). Ponadto, aby wirus grypy był zdolny do infekcji kolejnych komórek wymagana jest obecność wszystkich ośmiu segmentów w wirionie. Oddziaływanie ASO z vRNA może zaburzać proces tworzenia makromolekuły hamując w ten sposób powstawanie infekcyjnego wirionu.

Inną możliwością działania zaprojektowanych ASO jest inhibicja replikacji (powstawanie formy pośredniej cRNA) oraz transkrypcji. W tym przypadku prawdopodobne jest uzyskanie podwójnego efektu zaburzenia cyklu replikacyjnego wirusa. Pierwszy wywołany przez oligonukleotydy (zahamowanie replikacji i transkrypcji), co skutkuje brakiem nowopowstałych białek NS1. Drugi zwiększoną aktywnością enzymów z rodziny ADAR. Wykazano, że białko NS1 oddziałuje z deaminazą adenozyne działającą na RNA (ADAR1, ang. *Adenosine Deaminase Acting on RNA 1*), co pośrednio hamuje powstawanie interferonu, który jest pierwszym czynnikiem w odpowiedzi komórkowej na infekcję (150). W wyniku zmniejszonej ilości NS1 w komórce może dochodzić do zwiększonej deaminacji reszt adenozyne w wirusowych RNA, a w konsekwencji do zwiększonej, antywirusowej odpowiedzi komórkowej.

### III PODSUMOWANIE

Głównym celem niniejszej pracy było określenie struktury drugorzędowej genomowej cząsteczki RNA segmentu 8 (vRNA8) wirusa grypy A/VietNam/1203/2004 (H5N1). Badania struktury nakierowane były na poszukiwanie nowych celów dla terapii przeciwwirusowej, którymi mogłyby być miejsca dostępne w vRNA lub konserwatywne motywy struktury drugorzędowej o potencjalnej możliwości oddziaływania z oligonukleotydami antysensowymi.

Uzyskane wyniki można podsumować w następujących punktach:

1. Przeprowadzone mapowania chemiczne metodą SHAPE oraz z zastosowaniem siarczanu dimetylu doprowadziły do zaproponowania modelu struktury drugorzędowej CM-vRNA8. Wirusowe RNA segmentu 8 było wysoce ustrukturalizowane i charakteryzowało się czterodomenową budową, przy czym domenę I stanowiły oddziałujące końce 5' i 3' cząsteczki tworząc motyw strukturalny *panhandle* opisany wcześniej w literaturze.
2. Sekwencyjno-strukturalna analiza bioinformatyczna 8146 unikatowych sekwencji vRNA8 wirusa grypy, znajdujących się w bazie danych NCBI, wykazały występowanie w sześciu rejonach zachowawczych par zasad (261-270/279-288, 312-317/322-327, 632-636/645-649, 696-701/775-780, 704-713/767-758 oraz 736-740/744-748). Wprowadzenie tych danych wraz z wynikami eksperymentalnymi do programu *RNAstructure 5.3* pozwoliło wygenerować model CMC-vRNA8. Struktura drugorzędowa vRNA8 zaproponowana w tym modelu również posiadała cztery domeny strukturalne.
3. Przeprowadzono mapowanie vRNA8 z zastosowaniem izoenergetycznych mikromacierzy RNA. Zidentyfikowano wiązanie się sond oligonukleotydowych do vRNA8 w następujących pozycjach: 17, 68, 69, 117, 141, 142, 163, 169-171, 250, 253, 254, 275, 389, 390, 405, 407-412, 436, 534, 535, 537, 538, 575-577, 728-730 oraz 854. Miejsca te były zgodne z zaproponowanym modelem CMC-vRNA8.



4. Miejsca wiązania sond mikromacierzowych dodatkowo zweryfikowano stosując hydrolizę RNA w obecności RNazy H. Metoda ta potwierdziła dostępność rejonów wytypowanych w metodzie mapowania mikromacierzowego. Dodatkowo, uzyskane informacje mogą mieć zastosowanie w projektowaniu nowych oligomerów antysensowych typu gapmer nakierowanych na inhibicję namnażania wirusa w komórce.
5. Wykonane mapowania mikromacierzowe oraz kolejne analizy bioinformatyczne pozwoliły zweryfikować strukturę drugorzędową CMC-vRNA8. Stosując program *RNAstructure 5.3* obliczono prawdopodobieństwo występowania poszczególnych par zasad oraz odcinków jednoniciowych. Prawdopodobieństwo wyliczono na podstawie wszystkich suboptymalnych struktur przewidzianych przez program, zgodnych z wprowadzonymi danymi eksperymentalnymi. Największy stopień prawdopodobieństwa struktury drugorzędowej uzyskano dla domeny IV. Ponadto, po wprowadzeniu dodatkowych ograniczeń w postaci zachowawczych par zasad prawdopodobieństwo wystąpienia określonych par zasad i odcinków jednoniciowych w rejonie 206-374 (fragment domeny III) zwiększyło się w porównaniu do CM-vRNA8. Trzecim sposobem weryfikacji modelu struktury drugorzędowej vRNA8 było obliczenie częstości, z jaką mogą wystąpić kanoniczne pary zasad zaproponowane w analizowanym modelu w porównaniu z wszystkimi sekwencjami vRNA segmentu 8 wirusa grypy typu A dostępnymi w bazie danych. Uzyskano wysoki (87,4%) poziom kanonicznych par zasad dla struktury CMC-vRNA8 i był on wyższy o 0,4% od CM-vRNA8.
6. Indukowana hydroliza vRNA8 rodnikiem hydroksylowym pozwalała określić dostępne w roztworze rejony RNA. Uzyskane wyniki hydrolizy wniosły informację o trzeciorzędowych oddziaływaniach w cząsteczce vRNA8. Analiza wykazała, że większość nukleotydów w regionach: 254-389, 405-461, 532-539, 630-647 oraz 750-820 była dostępna dla hydrolizy w obecności wolnego rodnika. Natomiast większość nukleotydów w rejonach: 150-200, 217-235, 398-404, 526-531, 547-600 oraz 699-715 była niedostępna dla cięć wywołanych rodnikiem hydroksylowym.
7. W strukturze drugorzędowej vRNA8 występuje długa struktura typu spinki do włosów (661-814), która mogłaby stanowić wydajny substrat dla

- enzymów z rodziny ADAR. Analiza bioinformatyczna wskazała 31 adozyn, które z udziałem enzymu ADAR mogłyby ulegać deaminacji do inozyn.
8. Zaproponowano sześć potencjalnych oddziaływań trzeciorzędowych w vRNA8: 227-231/409-405 lub 226-231/533-528, 258-260/341-339, 426-430/852-848 lub 400-404/431-428,426 oraz 450-456/859-853.
  9. Zaprojektowano modelową cząsteczkę mini-vRNA8 i zanalizowano jej strukturę drugorzędową. Cząsteczka ta potencjalnie mogłaby tworzyć podstawę nowego DI RNA. Zawiera ona 182 nukleotydy z końca 5' i 188 z końca 3' cząsteczki vRNA8. Wiadomym jest, że rejony na 5' i 3' końcu o długości około 150-200 nukleotydów są potrzebne podczas pakowania vRNP do wirionu. Możliwe, że występujące w mini-vRNA8 motywy strukturalne są istotne podczas tego procesu. Analiza struktury drugorzędowej tej modelowej cząsteczki wykazuje duże podobieństwo do analogicznych rejonów w całym segmencie 8 vRNA. Zastosowanie mini-vRNA8, jako bazy dla nowego DI RNA, należałoby sprawdzić w badaniach na liniach komórkowych.
  10. Zaprojektowano i zaproponowano strukturę drugorzędową krótkich modelowych fragmentów vRNA8: M1-RNA (rejon 206-374), M2-RNA (rejon 694-782) oraz M3-RNA (rejon 503-561). Dwie pierwsze cząsteczki zawierały zachowawcze pary zasad. Natomiast trzecia cząsteczka była interesująca ze względu na dostępność tego rejonu dla sond mikromacierzowych oraz obecność sekwencji komplementarnej do vRNA czterech innych segmentów (segment 1, 3, 4 i 5). Do określenia struktury drugorzędowej wszystkich trzech cząsteczek zastosowano mapowanie chemiczne, częściową hydrolizę w obecności jonów ołowiu i mapowanie mikromacierzowe. Uzyskane wyniki potwierdzają możliwość wystąpienia zaproponowanych motywów strukturalnych w pełnej długości cząsteczce vRNA8.
  11. Z zastosowaniem programu *BLAST* określono rejony vRNA8 komplementarne do vRNA pozostałych segmentów. Wykazano, że fragment 513-539 jest komplementarny do vRNA czterech innych segmentów: segmentu 1 w rejonie 513-527, segmentu 3 w rejonie 520-538, segmentu 4 w rejonie 515-523 oraz segmentu 5 w rejonach 518-526 i 531-539. Określono

trzy rejony vRNA8, w których znajdują się miejsca komplementarne do vRNA trzech innych segmentów. Są to fragmenty 267-286 (dla vRNA segmentów 3, 5 i 6), 572-589 (dla vRNA segmentów 3, 4 i 5) oraz 791-813 (dla vRNA segmentów 3, 4 i 6). Aż 11 fragmentów posiada wspólną część komplementarną do dwóch innych segmentów: 30-51 (vRNA1 i vRNA7); 84-96 (vRNA1 i vRNA5); 163-176 (vRNA5 i vRNA7); 176-192, 306-318, 640-653 oraz 689-714 (vRNA4 i vRNA7); 220-231 (vRNA3 i vRNA5); 330-344, 623-634 (vRNA3 i vRNA7) oraz 770-785 (vRNA4 i vRNA6).

12. Na podstawie wyników uzyskanych dla vRNA segmentu 8 szczepu A/VietNam/1203/2004 (H5N1), obejmujących określenie struktury drugorzędowej, wyniki hybrydyzacji vRNA8 do mikromacierzy izoenergetycznych oraz analizę sekwencji vRNA8 komplementarnych do vRNA innych segmentów, zaprojektowano 14 oligonukleotydów antysensowych. Wykazano, że informacja o strukturze drugorzędowej była pomocna w projektowaniu oligonukleotydów antysensowych. W testach na liniach komórkowych, dziewięć na dziesięć 2'-O-metylowanych oligomerów RNA obniżało namnażanie wirusa do poziomu poniżej 50%, a jeden z nich, ASO 168-8U, hamował cykl replikacyjny wirusa do poziomu 3%. Oligomer ten był uniwersalny sekwencyjnie w stosunku do badanych szczepów wirusa grypy (w części sekwencji istnieje możliwość tworzenia się stabilnej pary G-U w dupleksie RNA/ASO). Oznacza to, że prawdopodobnie ASO 168-8U mogłoby inhibować namnażanie zarówno wirusa grypy o podtypie H1N1, jak i H5N1.

Reasumując, badania opisane w przedstawionej pracy doktorskiej po raz pierwszy określają strukturę drugorzędową genomowego RNA wirusa grypy typu A. Są to również pierwsze badania strukturalne pełnej długości jakiegokolwiek segmentu RNA wirusa grypy. Cząsteczka vRNA8 jest wysoce ustrukturalizowana i jej struktura drugorzędowa charakteryzuje się obecnością czterech domen. Sparowane końce 3' i 5', które wcześniej opisano w literaturze jako istotne w cyklu replikacyjnym wirusa stanowią część domeny I. Zidentyfikowano kilka stabilnych motywów strukturalnych o potencjalnym znaczeniu funkcjonalnym, mogących stanowić cel dla nowych strategii terapeutycznych.

Oligonukleotydy antysensowe zaprojektowane na podstawie określonej struktury drugorzędowej, wyników mapowania mikromacierzowego oraz analizy sekwencyjnej wykazują dużą skuteczność. Oznacza to, że podejście zaproponowane w niniejszej pracy jest godne zainteresowania i rozwijania w celu poszukiwania nowych terapeutyków oligonukleotydowych nakierowanych na wirusa grypy typu A.

## IV MATERIAŁY I METODY

### 1. Materiały

#### 1.1. Enzymy

Polimeraza DNA OptiTaq (5U/μl); polimeraza DNA Pfu (5U/μl); Kinaza polinukleotydowa T4 (20U/μl) – EURx.

Defosforylaza CIAP (1U/μl) – Invitrogen.

Rekombinowany inhibitor RNaz – RNasin (40U/μl) – producent Promega.

Ligaza DNA T4 (1U/μl) – Fermentas.

Ligaza RNA T4 (10U/μl) – Thermo scientific.

Enzymy restrykcyjne *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I (10U/μl) – Promega.

Rybonukleaza H (10U/μl) – Epicentre Biotechnologies.

#### 1.2. Gotowe zestawy do badań biochemicznych

Zestaw do odwrotnej transkrypcji Super Script® III – Invitrogen.

Zestaw do transkrypcji – Ampliscribe™ T7 High Yield Transcription Kit lub Amplictrible™ T7-Flash Transcription Kit – Epicentre Biotechnologies.

Zestaw do oczyszczania plazmidów – Plasmid Midi Kit – Qiagen.

Zestaw do oczyszczania – RNA Rneasy MiniElute Cleanup Kit – Qiagen.

Zestaw do oczyszczania produktów PCR – GeneMATRIX PCR/DNA Clean-Up Purification Kit – EURx.

#### 1.3. Izotop promieniotwórczy

[γ- 32P]ATP (1mCi) – Hartmann Analytic

#### 1.4. Odczynniki

Wszystkie odczynniki były wysokiej jakości i zostały dostarczane przez następujących producentów: Sigma, Fluka, BioShop i Serva.

## 1.5. Oligonukleotydy

**Tabela 13.** Oligodeoksynukleotydy stosowane jako startery w reakcjach sekwencjonowania.

Nazwa	Cząsteczka	długość (nt)	Sekwencja 5'→3'
Seq1	vRNA8	20	CACTTTCGGACATCTGGTTCG
Seq2	vRNA8	21	GAAAGTGGCAGGTTCCCTTTG
M13F	mini-vRNA8	24	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
M13R	mini-vRNA8	22	TCACACAGGAAACAGCTATGAC
Seq-pUC19	M1 i M4	22	TGCAAGGCGATTAAGTTGGGTA

**Tabela 14.** Startery stosowane w reakcji PCR w celu namnożenia matrycy do transkrypcji *in vitro* dla vRNA8 i mini-vRNA8.

Nazwa	długość (nt)	Sekwencja 5'→3'
vRNA8 Rev	30	AGCAAAAGCAGGGTGACAAAACATAATGG
vRNA8 For	61	AAAATAATACGACTCACTATAGGGAGTAGAAACAAG GGTGTTTTTTATCATTAAATAAGC

Podkreślone nukleotydy zawierają sekwencję promotora polimerazy RNA T7.

**Tabela 15.** Startery stosowane w reakcjach PCR w celu otrzymania matrycowego DNA do transkrypcji *in vitro* dla mini-vRNA8.

nazwa	długość (nt)	sekwencja 5'→3'
St1-mini	36	AAGAATTCAGTAGAAACAAGGGTGTTTTTTATCATT
St2-mini	33	AAGGATCCCAGAAGTTTGAAGAAATAAGGTGGC
St3-mini	30	AAGGATCCGATGTCCAGACCAAGAGTGTTG
St4- mini	25	AACTGCAGAGCAAAAGCAGGGTGAC

**Tabela 16.** Częsteczki DNA i startery wykorzystane w celu uzyskania cząsteczek matrycowych do transkrypcji *in vitro* dla modelowej cząsteczki M1-RNA.

Nazwa	Długość (nt)	sekwencja 5'→3'
M1-1	97	GGGGTTTCTGATTTGGAGGGAGTGGAAAGTCTCCCATCCTCAT CACTGTTTCTCCAAGCGAATCTCTGTATAGTTTCAGTGACTC GAACTGTGTTATC
M1-2	97	GGGTTCTCTTCCAGGACATACTGGTGAGGATGTCAAAAATGC AATTGGCGTCCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACA CAGTTCGAGTCACT
M1-st1	46	CACAGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGGTTTCTGATTTG GAGG
M1-st2	30	CACACTGCAGGGGTTCTCTTCCAGGACATA
M1-R	17	GGGTTCTCTTCCAGGAC
UT7-F	25	GAATTCTAATACGACTCACTATAGG

Nukleotydy podkreślone stanowią sekwencję promotora polimerazy RNA T7. Sekwencje zaznaczone kolorem niebieskim są wzajemnie komplementarne dla cząsteczek M1-1 i M1-2. Sekwencja zaznaczona kolorem żółtym jest to miejsce rozpoznawane przez enzym restrykcyjny EcoRI. Kolorem zielonym zaznaczono sekwencję rozpoznawaną przez enzym restrykcyjny PstI.

**Tabela 17.** Częsteczki DNA stosowane w transkrypcji *in vitro* fragmentów modelowych M2 i M3 RNA.

Nazwa	Długość (nt)	sekwencja 5'→3'
M2-St1	115	GGGACCAAGAACTGGGTGATGCCCATTCCTTGACCGGCT TCGCCGAGATCAGAAGTCCCTAAGAGGAAGAGGCAACAC TCTTGGTCCCTATAGTGAGTCGTATTA GAATTCGCG
M3-St2	82	GGGTTTCATGCTCATGCCCAAGCAGAAAGTGGCAGGTTCCC TTTGCATCAAAATGGACCCTATAGTGAGTCGTATTA GAAT TC
StT7	33	CACACGCGAATTCTAATACGACTCACTATAGGG

**Tabela 18.** Startery stosowane w reakcji odwrotnej transkrypcji.

Nazwa	długość (nt)	Region komplementarny w vRNA8	sekwencja 5'→3'
St1	23	847-869	AGCA <sup>L</sup> GGG <sup>L</sup> TGA <sup>L</sup> CAA <sup>L</sup> AACA <sup>L</sup> TAATG
St2	22	719-740	GCCG <sup>L</sup> AGA <sup>L</sup> TCA <sup>L</sup> GAAG <sup>L</sup> TCCCTA <sup>L</sup> AG
St3	23	572-591	CTGACATGACTCTCGAAGAAATG
St4	26	287-312	CTTGAATGGAATGATAACACAGTTCG
St5	22	429-450	GACCGGTTGGAAACCCTAATAC
St6	22	142-163	GGTGGCTGATTGAAGAAGTAAG
M1-S	11	-	GG <sup>L</sup> GT <sup>L</sup> TC <sup>L</sup> TC <sup>L</sup> TT <sup>L</sup> C

Na 5' końcu starterów znajdował się barwnik fluorescencyjny (FAM6). Startery St1-St6 używane były w reakcji odwrotnej transkrypcji dla vRNA8; startery St1, St2, St6 – dla mini-vRNA8, starter M1-S – dla M1-RNA. Indeks górny L przy danym nukleotydzie oznacza zastosowanie w danej pozycji nukleotydu LNA (*Locked Nucleic Acid*).

**Tabela 19.** Sondy mikromacierzy z biblioteki izoenergetycznych sond Zespołu Genomiki Strukturalnej RNA i Zakładu Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych komplementarne do badanych RNA.

Nazwa	sekwencja 5'→3'	29	DDCUAG	66	DCDDCG
2	DDDDCG	31	DDCUGG	68	DCDDUG
5	DDDCDG	32	DDCUUG	69	DCDCDG
6	DDDCCG	33	DDGDDG	70	DCDCC
7	DDDCGG	34	DDGDCG	72	DCDCUG
8	DDDCUG	35	DDGDGG	73	DCDGDG
10	DDDGCG	37	DDGCDG	74	DCDGC
12	DDDGUG	38	DDGCC	76	DCDGUG
14	DDDUCG	40	DDGCUG	77	DCDUDG
15	DDDUGG	41	DDGGDG	78	DCDUCG
17	DDCDDG	42	DDGGC	79	DCDUGG
18	DDCDCG	43	DDGGG	81	DCCDDG
19	DDCDGG	44	DDGGUG	83	DCCDGG
20	DDCDUG	45	DDGUDG	84	DCCDUG
21	DDCCDG	46	DDGUCG	88	ACCCUG
22	DDCCC	47	DDGUGG	91	ACCGG
25	DDCGAG	53	DDUCDG	93	DCCUDG
27	DDCGGG	55	DDUCGG	96	DCCUUG
28	DDCGUG	58	DDUGCG	100	DCGDUG
		59	DDUGGG	104	DCGCUG



108	DCGGUG
112	DCGUUG
114	DCUDCG
116	DCUDUG
118	DCUCCG
119	DCUCGG
120	DCUCUG
121	DCUGDG
122	DCUGCG
123	DCUGGG
124	DCUGUG
126	DCUUCG
129	DGDDDG
130	DGDDCG
131	DGD DGG
133	DGD CDG
134	AGDCC
136	DGD CUG
137	DGDGDG
138	DGDGCG
139	DGDGG
141	DGDUDG
142	DGDUCG
144	DGDUUG
145	DGCDDG
147	AGCDGG
152	AGCCUG
155	AGCGG
157	DGCUDG
160	DGCUUG
161	DGGDDG
162	DGGDC
163	DGGDG
164	DGGDUG
165	AGGCAG
169	AGGGAG
171	AGGGG
172	AGGGUG
173	AGGUAG
175	AGGUGG
176	DGGUUG
177	DGUDDG

181	DGU CDG
182	AGUCCG
184	DGU CUG
185	DGUGDG
187	DGUGGG
188	DGUGUG
190	DGUUCG
194	DUDDCG
195	DUDDGG
197	DUDCDG
201	DUDGDG
209	DUCDDG
211	DUCDGG
217	DUCGDG
219	DUCGGG
220	DUCGUG
222	DUCUCG
226	DUGDCG
227	DUGDGG
229	DUGCDG
230	AUGCCG
232	DUGCUG
233	DUGGDG
1234	AUGGCG
235	AUGGGG
238	DUGUCG
246	DUUCCG
247	DUUCGG
251	DUUGGG
257	CDDDDG
258	CDDDCG
260	CDDDUG
261	CDDCDG
264	CDDCUG
265	CDDGDG
266	CDDGCG
267	CDDGGG
269	CDDUDG
270	CDDUCG
275	CD CDGG
277	CDCCAG
278	CDCCC

282	CDGCGG
286	CD CUG
289	CDGDDG
290	CDGD CG
291	CDGDGG
292	CDGDUG
296	CDGCUG
297	CDGGAG
298	CDGGC
299	CDGGG
300	CDGGUG
303	CDGUGG
305	CDUDDG
306	CDUDCG
307	CDUDGG
309	CDUCDG
311	CDUCGG
313	CDUGDG
314	CDUGCG
316	CDUGUG
321	CCDDDG
322	CCDDCG
323	CCDDGG
328	CCDCUG
331	CCDGG
334	CCDUCG
336	CCDUUG
337	CCDA
340	CCDUG
341	CCCA
349	CCCUAG
350	CCUC
352	CCUUG
355	CCGDG
357	CCGCA
362	CCGGC
364	CCGGU
369	CCUDDG
373	CCUCDG
374	CCUCC
382	CCUUCG
383	CCUUGG

385	CGDDDG
386	CGDDCG
387	CGDDGG
393	CGDGDG
396	CGDGUG
401	CGCDDG
403	CGCDGG
407	CGCCG
410	CGCGC
413	CGCUDG
416	CGCUUG
419	CGGDG
420	CGGDUG
424	CGGCU
429	CGGUDG
432	CGGUUG
438	CGUCCG
443	CGUGGG
450	CUDDCG
451	CUDDGG
454	CUDDCG
456	CUDCUG
466	CUCDCG
468	CUCDUG
469	CUCCDG
470	CUCCC
473	CUCGDG
474	CUCGCG
476	CUCGUG
478	CUCUCG
482	UGDCG
484	UGDUG
488	UGCUG
489	UGGDG
491	UGGG
492	UGGUG
495	UGUGG
501	CUUCDG
502	CUUCCG
503	CUUCGG
504	CUUCUG
505	CUUGDG

507	CUUGGG
513	GDDDDG
514	GDDDCG
515	GDDDGG
517	GDDCDG
520	GDDCUG
521	GDDGDG
523	GDAGGG
524	GDDGUG
527	GDDUGG
529	GDCDDG
532	GDCDUG
533	GDCCAG
535	GDCCG
542	GDCUCG
543	GDCUGG
544	GDCUUG
545	GDGDDG
546	GDGDCG
548	GDGDUG
549	GDGCDG
550	GDGCC
551	GDGCG
552	GDGCUG
553	GDGGA
554	GAGGC
555	GAGGG
558	GDGUCG
561	GDUDDG
563	GDUDGG
565	GDUCDG
569	GDUGDG
570	GDUGCG
571	GDUGGG
572	GDUGUG
574	GDUUCG
575	GDUUGG
577	GCDDDG
578	GCDDCG
579	GCDDGG
580	GCDDUG
584	GCDCUG

585	GCDGDG
587	GCDGG
590	GCDUCG
591	GCDUGG
597	GCCCA
598	GCCCC
601	GCCGA
603	GCCGG
608	GCCUUG
611	GCGDG
613	GCGCA
617	GCGGA
622	GCGUC
626	GCUDCG
629	GUCUDG
633	GUCGDG
637	GCUUDG
638	GCUUCG
639	GCUUGG
641	GGDDDG
643	GGDDGG
644	GGDDUG
645	GGDCDG
646	GGDCC
648	GGACUG
649	GGDGAG
650	GGDGC
651	GGDGG
652	GGDGUG
653	GGDUDG
655	GGDUGG
656	GGDUUG
657	GGCDDG
658	GGDCG
659	GGCDGG
660	GGCDUG
665	GGCGA
668	GGCGUG
671	GGCUG
672	GGCUUG
674	GGGDC
675	GGGDG

681	GGGGA
683	GGGGG
687	GGGUGG
689	GGUDDG
691	GGUDGG
696	GGUCUG
697	GGUGDG
699	GGUGG
702	GGUUCG
703	GGUUGG
705	GUDDDG
707	GUDDGG
713	GUDGDG
721	GUCDDG
722	GUCDCG
723	GUCDGG
726	GUCCC
727	GUCCG
728	GUCCUG
735	GUCUGG
738	GUGDCG
739	GUGDGG
740	GUGDUG
745	GUGGDG
746	GUGGC
747	GUGGG
750	GUGUCG
751	GUGUGG
757	GUUCDG
758	GUUCCG
759	GUUCGG
763	GUUGGG
773	UDDCDG
775	UDDCGG
776	UDDCUG
777	UDDGDG
779	UDDGGG
783	UDDUGG
785	UDCDDG
787	UDCDGG
792	UDCCUG
798	UDCUCG

799	UDCUGG
802	UDGDCG
803	UDGDGG
815	UDGUGG
826	UDUGCG
833	UCDDDG
835	UCDDGG
837	UCDCDG
838	UCDCC
839	UCDCGG
840	UCDCUG
841	UCDGDG
842	UCDGCG
843	UCDGGG
844	UCDGUG
845	UCDUDG
846	UCDUCG
847	UCDUGG
849	UCCDDG
850	UCCDCG
851	UCCDGG
856	UCCUG
858	UCCGC
862	UCCUCG
864	UCCUUG
865	UCGDAG
867	UCGDGG
870	UCGCC
871	UCGCGG
872	UCGCUG
873	UCGGDG
879	UCGUGG
882	UCUDCG
885	UCUCDG
887	UCUCGG
888	UCUCUG
889	UCUGDG
891	UCUGGG
894	UCUUCG
897	UGDDDG
899	UGDDGG
900	UGDDUG

901	UGDCDG
902	UGACCG
904	UGDCUG
907	UGDGGG
908	UGDGUG
909	UGDUDG
911	UGDUGG
913	UGCDDG
915	UGCDGG
916	UGCDUG
918	UGCCC
919	UGCCG
926	UGCUCG
928	UGCUUG
929	UGGDDG
930	UGGDCG
931	UGGDGG
932	UGGDUG
933	UGGCA
935	UGGCG
936	UGGCUG
937	UGGGAG
940	UGGGUG
942	UGGUCG
943	UGGUGG
944	UGGUUG
949	UGUCDG
950	UGUCCG
953	UGUGDG
956	UGUGUG
966	UUDCCG
978	UUCDCG
979	UUCDGG
981	UUCDDG
982	UUCCCG
984	UUUCUG
985	UUCGDG
986	UUCGCG
990	UUCUCG
991	UUCUGG
994	UUGDCG
994	UUGDCG

995	UUGDGG	1002	UUGGCG	1023	UUUUGG
997	UUGCDG	1004	UUGGUG		
1001	UUGGDG	1018	UUUGCG		

Kolorem czerwonym oznaczono reszty nukleotydowe typu LNA, czarnym 2'-O-metylowane, a niebieskim dodatkową resztę LNA-G. Literą D oznaczono 2,6-diaminopurynorybozyd.

**Tabela 20.** Izoenergetyczne sondy heksamerowe zsyntetyzowane na potrzeby mapowania mikromacierzowego dla vRNA8.

Nazwa	sekwencja 5'→3'
7d	UGUUUCUPy
30d	UDUUUDAPy
126d	ADUUACAPy
174d	GUUUGDAPy
424d	ACUUAGAPy
430d	ADUDCUAPy
454d	GDUUUUUPy
476d	UDUUGDAPy
618d	CUUDADAPy
806d	UUCUUUGPy

Kolorem czerwonym oznaczono reszty nukleotydowe typu LNA, czarnym 2'-O-metylowane. Literą D oznaczono 2,6-diaminopurynorybozyd, Py – piren.

**Tabela 21.** Oligomery DNA zastosowane podczas hydrolizy RNA z udziałem RNazy H.

nazwa	sekwencja 5'→3'
6-mer	
D17	AAACAG
D68	AAGUGG
D108	GAACAG
D194	GAGAAG
9-mer	
D143	AGUAAGACA
D163	AUAAGGUGG
D170	UGAAGAAAU
D229	GACUCCAC
D275	GAAACUAUA
D408	AGAAGAAGG
D436	AAACCCUAA
D535	AGAAAGUGG
D576	CGAAGAAAU
D721	CCCUAAGAG
D729	UCAGAAGUC

## **1.6. Plazmidy**

Plazmid pUC19 – Invitrogen.

Plazmid pPoll zawierający sekwencję segmentu 8 wirusa grypy typu A szczepu A/VietNam/1203/2004 (H5N1) – pozyskano od prof. Beak Kim, Wydział Mikrobiologii i Immunologii Uniwersytetu w Rochester, USA.

## **1.7. Roztwory, bufony i pożywki**

### **Faza rozwijająca do chromatografii cienkowsarstwowej**

n-propanol/amoniak/woda 55/35/10 v/v/v

### **Bufor elektroforetyczny - 1x TBE**

100 mM Tris, pH 8.3

100 mM kwas borowy

1 mM EDTA

### **Bufor do faldowania RNA – 1x**

#### **FB1**

50 mM HEPES, pH 7.5

300 mM NaCl

5 mM MgCl<sub>2</sub>

#### **FB2**

10 mM Tris-HCl, pH 7.5

300 mM NaCl

5 mM MgCl<sub>2</sub>

### **Bufor do elucji z żelów poliakrylamidowych – 1x EB**

300 mM octan sodu, pH 5,5

### **Bufor obciążający do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących**

8 M mocznik

0,2% (w/v) błękit bromofenolowy

0,2% (w/v) cyjanol ksylenowy

0,1xTBE

**Bufor obciążający do rozdzielania elektroforytycznego kwasów nukleinowych w żelach agarozowych**

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

25% (w/v) glicerol,

0,2% (w/v) błękit bromofenolowy

0,2% (w/v) cyjanol ksylenowy

**Bufor PBS do drukowania macierzy**

3 x SSC (450 mM NaCl, 45 mM cytrynian sodu pH 7.0)

0,05 % SDS

0.001 % CHAPS

**Roztwór do redukcji nadrukowanych sond**

37 mM NaBH<sub>4</sub>,

72% PBS

28% etanol

**Bufor SB - do wygaszania reakcji cięć indukowanych jonami ołowiu**

8 M mocznik

20 mM EDTA

**Bufor ALM1**

50 mM dekstroza

10 mM EDTA

25 mM Tris pH 8.0

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

386,6 g akrylamidu

13,3 g bisakrylamidu

H<sub>2</sub>O do 1000 ml

**Pożywka płynna LB**

10 g lizatu białkowego  
5 g ekstraktu drożdżowego  
5 g NaCl  
H<sub>2</sub>O do 1000 ml

**Pożywka stała LB**

2 g lizatu białkowego  
1,25 g ekstraktu drożdżowego  
1,25 g NaCl  
3,75 g agar  
H<sub>2</sub>O do 250 ml

**Antybiotyk**

ampicylina – stężenie końcowe 0,1 mg/μl

**1.8. Wzorce długości kwasów nukleinowych****Wzorzec długości DNA**

Gene Ruler DNA ladder mix – Fermentas

**Wzorzec długości RNA**

RiboRuler™ High Range RNA ladder – Fermentas

**2. Metody****2.1 Synteza oligonukleotydów**

Syntezę oligonukleotydów metodą amidofosforynową na podłożu stałym przeprowadzono na syntetyzerze BioAutomation Corporation MerMade 12. Do syntezy wykorzystano komercyjnie dostępne amidofosforyny DNA, 2'-O-MeRNA, LNA-A i LNA-G oraz niedostępne komercyjnie, zsyntetyzowane w Zakładzie Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych, amidofosforyny LNA-C, LNA-U i Py.

## **2.2. Odblokowywanie i oczyszczanie oligodeoksyrybonukleotydów oraz modyfikowanych oligonukleotydów**

Podłoże z oligomerami DNA, 2'-O-MeRNA oraz oligomerami zawierającymi w niektórych pozycjach nukleotydy typu LNA przenoszono do probówek i zawieszano w 1,5 ml 32% roztworze wodnego amoniaku. Całość inkubowano w 55°C przez 16 godzin. W kolejnym etapie próby były schładzane przez 20 min w -20°C, a następnie roztwór nad osadu zbierano, a podłoże przemywano dwukrotnie wodą (2 x 0,5 ml). Całość odparowywano do sucha w wirówce próżniowej. Oligomery o długości do 16 nukleotydów oczyszczano przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej (TLC), natomiast dłuższe fragmenty z zastosowaniem metody rozdziału w żelach poliakrylamidowych (PAGE) w warunkach denaturujących.

## **2.3. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)**

Oligomery o długości do 16 nukleotydów rozpuszczano w 150 µl i oczyszczano przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na płytkach analitycznych z żelem krzemionkowym 60 F<sub>254</sub> z zastosowaniem fazy rozwijającej n-propanol/amoniak/woda. Prążki zawierające pożądane oligonukleotydy izolowano z płytki, po czym eluowano trzykrotnie przemywając 2 ml wody. Połączone frakcje odparowywano do sucha. Próbkę rozpuszczano w 500 µl wody i przenoszono do nowych probówek. Poprzednie probówki przepłukiwano dwukrotnie 200 µl wody. Całość wirowano 5 min 10000 rpm. Roztwór przenoszono do nowych probówek. Pozostałości silikażelu przepłukiwano 200 µl i wirowano 5 min 10000 rpm, roztwór z nad osadu łączono z wcześniej zebraną frakcją.

## **2.4. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych**

Metodę preparatywnego rozdziału kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym wykorzystywano do oczyszczania fragmentów RNA po transkrypcji *in vitro* (do 400 nukleotydów długości), oligomerów po syntezie chemicznej, oraz cząsteczek RNA wyznakowanych radioaktywnym fosforem. Analityczne rozdziały służyły do wizualizacji produktów uzyskanych w badaniu struktury drugorzędowej cząsteczek RNA metodami chemicznymi i enzymatycznymi.



Stosowano żele poliakrylamidowe o usieciowaniu 29:1 (stosunek wagowy akrylamidu do bisakrylamidu). W zależności od długości cząsteczki i przeznaczenia rozdziału wykorzystywano żele 10% i 12% z 8 M mocznikiem. Do elektroforezy wykorzystany był bufor 1xTBE, a próby przed rozdziałem mieszano w stosunku 1:1 z buforem obciążającym (8 M mocznik, 1xTBE wraz z odpowiednim barwnikiem elektroforetycznym). Każda elektroforeza była poprzedzona preelektroforezą, a następnie prowadzono właściwą elektroforezę, która w zależności od wielkości płyty była ograniczona mocą przepływającego prądu od 10 do 40 W. Wyniki wizualizowano za pomocą: lampy UV - cząsteczki RNA po transkrypcji *in vitro* oraz oligomery po syntezie chemicznej; autoradiografii – cząsteczki RNA znakowane radioaktywnie; ekranu odwzorującego – rozdziały fragmentów powstałych podczas mapowania struktury drugorzędowej.

## 2.5. Elucja kwasów nukleinowych z żeli poliakrylamidowych

Prążki, odpowiadające cząsteczkom RNA uzyskanym w reakcji transkrypcji *in vitro* oraz oligomerom uzyskanym w syntezie chemicznej, były wizualizowane w świetle UV. Następnie RNA lub oligomery wycinano i zawieszano w buforze do elucji. Elucję prowadzono 2 godziny w temperaturze 4°C w termobloku z wytrząsaniem. Czynność powtarzano trzykrotnie.

## 2.6. Strącanie kwasów nukleinowych

Do wyeluowanych cząsteczek kwasów nukleinowych dodawano 2 - 2,5 objętości 96% etanolu. Dodatkowo do próbek zawierających cząsteczki RNA dodawano 1 µl glikogenu. Wyjątek stanowiły fragmenty RNA przeznaczone do hybrydyzacji na mikromacierzach, do których nie dodawano glikogenu. Próbki strącano przez noc w temperaturze -20 °C, a następnie wirowano w 4° C przez 30 min przy 11000 rpm. Supernatant z nad osadu wylewano, a osad suszono i rozpuszczano w sterylnej wodzie.

## 2.7. Spektrometria mas

Dla wszystkich oligomerów obliczano masę teoretyczną, a następnie przeprowadzono analizę masową związków za pomocą spektrometru masowego

MALDI-TOF. Analizę wykonywano w Zakładzie Biochemii Produktów Naturalnych. Uzyskane wyniki porównywano, w celu potwierdzenia poprawności zsyntetyzowanych oligomerów.

## 2.8. Obliczanie stężeń kwasów nukleinowych

Stężenie kwasów nukleinowych w próbce określano za pomocą pomiaru absorbancji przy długości fali  $\lambda = 260\text{nm}$  z wykorzystaniem spektrofotometru PicoDrop lub NanoDrop, stosując wzór:

$$c = \frac{\varepsilon}{A_{260}} \times 10^{-6} [\mu\text{M}]$$

gdzie:

$c$  – stężenie oligonukleotydu

$\varepsilon$  - współczynniki ekstynkcji

$A_{260}$  – absorbancja przy długości fali 260 nm

Lub zależności:

RNA:  $1A_{260}/\text{ml} = 40 \mu\text{g}/\text{ml}$

ssDNA:  $1A_{260}/\text{ml} = 33 \mu\text{g}/\text{ml}$

dsDNA:  $1A_{260}/\text{ml} = 50 \mu\text{g}/\text{ml}$

## 2.9. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach agarozowych

Elektroforezę DNA w żelu agarozowym stosowano do analizy cząsteczek uzyskanych metodą PCR. Do tego celu przygotowywano 1% żel agarozowy w buforze 1xTBE zawierający bromek etydyny w stężeniu końcowym 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Do próbek DNA był dodawany bufor obciążający w stosunku 5:1. Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 130 V. Wynik rozdziału obserwowano w świetle UV.

Elektroforezę RNA w żelu agarozowym stosowano do analizy jakościowej cząsteczek RNA dłuższych niż 500 nukleotydów, uzyskanych w reakcji transkrypcji *in vitro*. Do tego celu stosowano 0,8% żel agarozowy w buforze 1xTBE z bromkiem etydyny w stężeniu końcowym 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Do próbek RNA był dodawany bufor obciążający w stosunku 5:1. Elektroforezę przeprowadzano stosując dwa napięcia: przy wyjściu prób z kieszonek stosowano napięcie 40 V, a następnie napięcie zwiększano do 60 V. Wynik rozdziału obserwowano w świetle UV.

### 2.10. Ekstrakcja fenol-chloroform

Metodę stosowano do odbiałczania próbek zawierających cząsteczki RNA lub DNA. Do próbek zawierający fragmenty RNA dodawano fenol o pH=4,8 oraz chloroform z alkoholem izoamylovym (24:1) odpowiednio 2:1:1 (v/v/v). Całość mieszano na vortex-ie, a następnie wirowano przez 15 min w temperaturze pokojowej przy 11000 rpm. W kolejnym etapie zbierano fazę wodną i dodawano do niej chloroform z alkoholem izoamylovym w stosunku 1:1 (v/v). Ponownie mieszano na vortex-ie i wirowano 5 min w temperaturze pokojowej przy 11000 rpm. Fazę wodną zbierano i wytrącono cząsteczki RNA. Podobne kroki stosowano w ekstrakcji cząsteczek DNA, jedyną różnicą był zastosowany fenol, którego pH wynosiło 7.8-8.2.

### 2.11. Transformacja komórek bakteryjnych

Plazmidem zawierającym sekwencję odpowiedniego RNA transfekowano kompetentne komórki bakteryjne szczepu *Escherichia coli* DH5a. Komórki rozmrażano 15min na lodzie, a następnie dodawano do nich roztwór zawierający plazmid. Całość inkubowano na lodzie przez 45 min. W kolejnym etapie komórki poddawano szokowi termicznemu (*heat shock*) przez 45 sek w temperaturze 42°C. Probówkę przenoszono na lód i inkubowano 2 min. Tak przygotowane zawiesiny komórek przenoszono do szklanych probówek zawierających płynną pożywkę LB i wytrząsano 45 min w temperaturze 37°C. Po tym czasie zawiesiny przenoszono na płytki ze stałą pożywką LB z ampicyliną. Dodatkowo, dla komórek transfekowanych plazmidem zawierającym operon *lacZ* wykonywano test „*blue-white screening*”, aby uwidocznić kolonie bakteryjne zawierające zrekombinowany plazmid (białe kolonie). Do tego celu przed wysianiem bakterii na płytki agarowe, do 250 µl zawiesiny dodawano 30 µl X-Gal (50 mg/1 ml DMF) oraz 15 µl 0,1 M IPTG. Kolejnego dnia wybrane kolonie namnażano w 2 ml płynnej pożywki LB z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku i inkubowano przez noc w temperaturze 37 °C z wytrząsaniem przy 225 rpm.

### 2.12. Oczyszczanie plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej

Oczyszczanie plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej na małą skalę wykonywano z 1,5 ml zawiesiny bakteryjnej. Zawiesinę wirowano w temperaturze pokojowej przez 1 min przy 10000 rpm. Supernatant zlewano, a osad zawieszano

w buforze do lizy ALM1 i inkubowano przez 5 min na termobloku z wytrząsaniem. Następnie próby przenoszono na lód i dodawano świeżo przygotowany 1% roztwór SDS w 0,2 M NaCl. Wszystko delikatnie mieszano po czym dodawano 7,5 M octan amonu i inkubowano przez 20 min na lodzie. Po tym czasie próby wirowano przez 15 min w temperaturze pokojowej przy 11000 rpm. Supernatant zbierano do nowych probówek i wytrącano plazmidowe DNA 2 objętościami 96% lodowatego etanolu. Próby inkubowano przez 20 min w temperaturze pokojowej i następnie wirowano przez 15 min przy 11000 rpm. Supernatant zlewano, a osad suszono i rozpuszczano w roztworze RNazy A o końcowym stężeniu 2,5 ng/μl. Roztwór inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej na termobloku z wytrząsaniem. Z próby pobierano 0,5 μl mieszaniny, która służyła jako matryca w kontrolnej reakcji PCR w celu potwierdzenia obecności wbudowanego insertu.

Skład mieszaniny:

Matryca DNA (oczyszczony plazmid)	0,5 μl
Starter 1	5 pmol
Starter 2	5 pmol
DTP	200 μM
bufor 10x A	1x
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
Polimeraza Opti Taq	2,5 U
H <sub>2</sub> O	do 10μl

Dla matrycy pUC19 stosowano startery M13F i M13R, natomiast dla plazmidu pPol1 stosowano startery vRNA8 For i vRNA8 Rev (Tab.13). Bufor 10x A – bufor reakcyjny dostarczono wraz z roztworem polimerazy DNA Opti Taq przez firmę EURx.

Profil temperaturowy reakcji:

Etap	Temperatura [°C]	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95	2 min	
Denaturacja	95	1 min	x30
Wiązanie starterów	55	30 sek	
Wydłużanie starterów	72	30 sek	
Wydłużanie końcowe starterów	72	7 min	
Chłodzenie	4	∞	

Produkty powstałe w reakcji analizowano na 1 % żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny w obecności wzorca długości DNA. Wynik wizualizowano w świetle UV. Wybrane plazmidy sekwencjonowano. Startery użyte w reakcji sekwencjonowania zestawiono w powyższych tabelach. W oczyszczaniu plazmidowego DNA na większą

skalę wykorzystywano 100ml zawiesiny bakteryjnej. Do tego celu używano komercyjnego zestawu - Plasmid Midi Kit - dostarczanego przez firmę Qiagen.

### 2.13. Otrzymywanie matrycy do transkrypcji *in vitro* vRNA8

Matrycowe DNA stosowane do transkrypcji *in vitro* uzyskiwano przy użyciu techniki PCR.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Matryca DNA (plazmid pPol1)	25 ng
vRNA8 Rev	15 pmol
vRNA8 For	15 pmol
DTP	200 $\mu$ M
10x bufor Pfu	1x
Polimeraza Pfu Plus	2,5 U
H <sub>2</sub> O	Do 50 $\mu$ l

10x bufor Pfu – bufor reakcyjny, dostarczony wraz z roztworem polimerazy Pfu Plus przez firmę EURx, zawierał 20 mM MgSO<sub>4</sub>.

Profil temperaturowy reakcji:

Etap	Temperatura [°C]	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95	2 min	
Denaturacja	95	1 min	x30
Wiązanie starterów	57	30 sek	
Wydłużanie starterów	72	1 min	
Wydłużanie końcowe starterów	72	7 min	
Chłodzenie	4	$\infty$	

Uzyskany produkt sprawdzano rozdzielając w 1% żelu agarozowym w obecności wzorca długości DNA. Następnie z próbki ekstrahowano DNA metodą ekstrakcji fenol- chloroform, a całość strącano w etanolu.

### 2.14. Otrzymywanie matrycy do transkrypcji *in vitro* mini-vRNA8

Matrycę DNA dla mini-vRNA8 otrzymano w 6 etapach:

#### *Etap I*

Wykonano dwie reakcje PCR, w których za matrycowe DNA posłużył plazmid pPol1, z użyciem odpowiednich starterów: pierwszy PCR – St1-mini i St2-mini, drugi PCR – St3-mini i St4-mini. Uzyskane DNA (DNA1 i DNA2) ekstrahowano mieszaniną

fenol-chloroform i strącano w etanolu. Skład mieszaniny reakcyjnej był taki sam, jak opisano w punkcie 2.13.

Profil temperaturowy reakcji PCR był następujący:

Etap	Temperatura [°C]	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95	2 min	
Denaturacja	95	1 min	x30
Wiązanie starterów	53	30 sek	
Wydłużanie starterów	72	30 sek	
Wydłużanie końcowe starterów	72	7 min	
Chłodzenie	4	∞	

Wynik każdej reakcji sprawdzano rozdzielając w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny i wizualizowano w świetle UV.

### ***Etap II***

Uzyskane dwa produkty PCR poddawano reakcji hydrolizy endonukleazą *BamHI*.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

DNA uzyskane w etapie I (DNA1 lub DNA2)	4 µg
10x bufor H	1 x
<i>BamHI</i>	30 U
H <sub>2</sub> O	do 50 µl

10x bufor H – bufor reakcyjny dostarczono wraz enzymem restrykcyjnym przez firmę Promega.

Reakcję prowadzono w temperaturze 37°C przez 3 godziny. Zhydrolizowane DNA oczyszczano metodą ekstrakcji fenol-chloroform i strącano w etanolu. Następnie zhydrolizowane DNA1 i DNA2 poddawano reakcji ligacji.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

DNA1	60 ng
DNA2	60 ng
Ligaza DNA T4	0,5 U
10x bufor	1x
H <sub>2</sub> O	do 10 µl

10x bufor – bufor został dostarczony przez producenta wraz z ligazą DNA T4.

Reakcję prowadzono w temperaturze 4°C przez 16 godzin. Uzyskany produkt oczyszczano przy użyciu komercyjnego zestawu do oczyszczania produktów PCR firmy EURx według załączonej procedury.

### ***Etap III***

Produkt uzyskany w etapie drugim amplifikowano w reakcji PCR przy użyciu starterów St1-mini i St4-mini.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Matryca DNA (DNA powstały w etapie II)	1 $\mu$ l
St1-mini	15 pmol
St4-mini	15 pmol
Dntp	200 $\mu$ M
10x bufor Pfu	1x
Polimeraza Pfu Plus	2,5 U
H <sub>2</sub> O	Do 50 $\mu$ l

10x bufor Pfu – bufor reakcyjny dostarczony wraz z roztworem polimerazy Pfu Plus przez firmę EURx, zawierał 20 mM MgSO<sub>4</sub>.

Profil temperaturowy reakcji:

Etap	Temperatura [°C]	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95	2 min	
Denaturacja	95	1 min	x30
Wiązanie starterów	53	30 sek	
Wydłużanie starterów	72	30 sek	
Wydłużanie końcowe starterów	72	7 min	
Chłodzenie	4	$\infty$	

Uzyskany produkt sprawdzano w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny i wizualizowano w świetle UV.

#### ***Etap IV***

Powielona w etapie III cząsteczka DNA została poddana reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi *EcoRI* i *PstI*. Adekwatną reakcję przeprowadzono dla plazmidu pUC19 w celu jego linearyzacji.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

DNA uzyskane w etapie III	2 $\mu$ g
10x bufor H	1x
<i>EcoRI</i>	50 U
<i>PstI</i>	50 U
H <sub>2</sub> O	do 100 $\mu$ l

Reakcję prowadzono w temperaturze 37°C przez 16 godzin. Następnie produkty reakcji oczyszczano za pomocą handlowo dostępnego zestawu do oczyszczania produktów PCR firmy EURx. Oczyszczony fragment DNA wbudowywano do plazmidu pUC19 z zastosowaniem ligazy DNA z faga T4. Reakcję prowadzono w temperaturze 4°C przez 16 godzin.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

DNA przecięty enzymami restrykcyjnymi	67 ng
Plazmid pUC19 przecięty enzymami restrykcyjnymi	100 ng
Ligaza DNA T4	1 U
Bufor 10x	1x
H <sub>2</sub> O	do 10 µl

#### ***Etap V***

Produkt ligacji wykorzystano do transformacji kompetentnych komórek bakteryjnych szczepu *Escherichia coli* DH5a. Proces postępowania opisano w punkcie 2.11. W kolejnym kroku oczyszczano uzyskany zrekombinowany plazmid według protokołu opisanego w punkcie 2.12.

#### ***Etap VI***

Uzyskany zrekombinowany plazmid, zawierający sekwencję DNA odpowiadającą cząsteczce mini-vRNA8, posłużył jako matryca w reakcji amplifikacji. W reakcji tej wykorzystano te same startery, które posłużyły do powielenia cząsteczki matrycowej dla vRNA8.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Matryca DNA (zrekombinowany plazmid pUC19)	25 ng
vRNA8 Rev	15 pmol
vRNA8 For	15 pmol
dNTP	200 µM
10x bufor Pfu	1x
Polimeraza Pfu Plus	2,5 U
H <sub>2</sub> O	Do 50 µl

10x bufor Pfu – bufor reakcyjny dostarczony wraz z roztworem polimerazy Pfu Plus przez firmę EURx, zawierał 20 mM MgSO<sub>4</sub>.

Zastosowano profil temperaturowy opisany w punkcie 2.13. Uzyskany produkt sprawdzano na 1% żelu agarozowym w obecności wzorca długości DNA. Następnie z próbki ekstrahowano DNA metodą ekstrakcji fenol-chloroform, a całość strącano w etanolu.



## 2.15. Otrzymywanie matrycy do transkrypcji *in vitro* M1-RNA

### *Etap I*

W celu otrzymania modelowego RNA M1 wykonano reakcję PCR. Matrycą w reakcji była para oligomerów: M1-1 i M1-2, które posiadały region wzajemnie komplementarny o długości 21 nukleotydów.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

M1-1	100 pmol
M1-2	100 pmol
DTP	200 $\mu$ M
10x bufor Pfu	1x
Polimeraza Pfu Plus	2,5 U
H <sub>2</sub> O	Do 50 $\mu$ l

Profil temperaturowy:

Etap	Temperatura [°C]	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95	2 min	
Denaturacja	95	30 sec	x7
Hybrydyzacja fragmentów	53	30 sek	
Uzupełnianie końców	72	1 min	
Chłodzenie	4	$\infty$	

Uzyskany produkt analizowano na 1% żelu agarozowym w obecności wzorca długości DNA. Następnie oczyszczono przy użyciu komercyjnego zestawu do oczyszczania produktów reakcji PCR firmy EURx

### *Etap II*

Produkt z etapu I poddano amplifikacji w celu dołączenia miejsc restrykcyjnych i sekwencji rozpoznawanej przez polimerazę RNA T7. Użyto odpowiednich starterów M1-st1 i M1-st2. Zastosowano skład mieszaniny reakcyjnej adekwatny do opisanego w punkcie 2.13.

Profil temperaturowy reakcji:

Etap	Temperatura [°C]	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95	2 min	
Denaturacja	95	1 min	x30
Wiązanie starterów	57	30 sek	
Wydłużanie starterów	72	30 sek	
Wydłużanie końcowe starterów	72	7 min	
Chłodzenie	4	$\infty$	

Uzyskany produkt analizowano na 1% żelu agarozowym w obecności wzorca długości DNA. Następnie oczyszczono przy użyciu komercyjnego zestawu do oczyszczania produktów reakcji PCR firmy EURx.

### ***Etap III i etap IV***

Dwa kolejne etapy były takie same jak opisano dla cząsteczki mini-vRNA8 w etapie IV i V.

### ***Etap V***

Wykonano reakcję PCR w celu uzyskania matrycowej cząsteczki DNA wykorzystywanej w reakcji transkrypcji *in vitro* cząsteczki M1-RNA. Użyto startery UT7-F oraz M1-R.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Matryca DNA (plazmid pUC19)	25 ng
UT7-F	15 pmol
M1-R	15 pmol
DTP	200 $\mu$ M
10x bufor Pfu	1x
Polimeraza Pfu Plus	2,5 U
H <sub>2</sub> O	Do 50 $\mu$ l

10x bufor Pfu – bufor reakcyjny dostarczony wraz z roztworem polimerazy Pfu Plus przez firmę EURx, zawierał 20 mM MgSO<sub>4</sub>.

Profil temperaturowy reakcji:

Etap	Temperatura [°C]	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95	2 min	
Denaturacja	95	1 min	x30
Wiązanie starterów	51	30 sek	
Wydłużanie starterów	72	30 sek	
Wydłużanie końcowe starterów	72	7 min	
Chłodzenie	4	$\infty$	

Uzyskany produkt analizowano na 1% żelu agarozowym w obecności wzorca długości DNA. Następnie z próbki ekstrahowano DNA metodą ekstrakcji fenol-chloroform, a całość strącano w etanolu.

## 2.16. Transkrypcja *in vitro* cząsteczek RNA

Cząsteczki vRNA8, mini-vRNA8, M1-RNA otrzymywano przy użyciu komercyjnego zestawu do transkrypcji firmy Epicentre Biotechnologies zgodnie z zaleceniami producenta. Jako matryce stosowano dwuniciowe DNA uzyskane w reakcji PCR.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Matryca DNA	1 µg
ATP	7,5 mM/9 mM
CTP	7,5 mM/9 mM
UTP	7,5 mM/9 mM
GTP	7,5 mM/9 mM
DTT	20 mM
10x bufor	1x
Polimeraza RNA T7	2 µl
RiboGuard™ Rnase Inhibitor	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	do 20 µl

Ilość zastosowanych trójfosforanów rybonukleotydów była uzależniona od zastosowanego zestawu. I tak, 7,5 mM NTP stosowano w Ampliscribe™ T7 High Yield Transcription Kit, natomiast 9 mM w Amplictribe™ T7-Flash Transcription Kit. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 37°C przez 2-4 godziny. Następnie dodawano 1 U DNazy i inkubowano kolejne 30 min w temperaturze 37°C. Otrzymane vRNA8 oczyszczano z zastosowaniem komercyjnego zestawu Rneasy MinElute Cleanup Kit firmy Qiagen, natomiast pozostałe transkrypty rozdzielano w 10% żelach poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Wynik reakcji wizualizowano przy pomocy światła UV, a prążki reprezentujące odpowiednie RNA wycinano, RNA poddawano elucji, strącano i rozpuszczano w wodzie. Cząsteczkę vRNA8 w celu analizy jakościowej rozdzielano w 0,8% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydy w obecności wzorca długości RNA.

Cząsteczki RNA M2 i M3 otrzymywano w analogiczny sposób, poprzedzając reakcję transkrypcji hybrydizacją jednoniciowej matrycy DNA: M2-St1 lub M2-St2 z oligomerem StT7 zawierającym sekwencję rozpoznawaną przez polimerazę RNA T7. W tym celu jednoniciową matrycę mieszano z StT7 w stosunku molarnym 1:1 (około 1 µg jednoniciowej matrycy DNA). Następnie mieszaninę inkubowano przez 5 min w temperaturze 95°C i schładzano do temperatury pokojowej przez 30 min.

## 2.17. Znakowanie RNA izotopem $^{32}\text{P}$

### Znakowanie kwasów rybonukleinowych na 5' końcu

Wszystkie cząsteczki RNA uzyskane metodą transkrypcji *in vitro* posiadały na końcu 5' grupę fosforanową. W celu usunięcia tej grupy wykonywano reakcję defosforylacji. Cząsteczki pochodzące z syntezy chemicznej poddawano bezpośrednio reakcji znakowania izotopem.

Defosforylacja RNA. Skład mieszaniny reakcyjnej:

RNA	50-100 pmol
10x bufor	1x
Defosforylaza CIAP	2 U
H <sub>2</sub> O	do 100 $\mu\text{l}$

10x bufor – bufor komercyjny dostarczony przez producenta wraz z enzymem.

Reakcję prowadzono w temperaturze 37°C przez 40 min. Usuwno enzym metodą ekstrakcji fenol-chloroform, następnie strącano i suszono.

W drugim etapie cząsteczki znakowano izotopem  $^{32}\text{P}$ .

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Zdefosforylowane RNA	osad
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (1mCi)	0,5-1 $\mu\text{l}$
10x bufor	1x
Kinaza polinukleotydowa T4	30 U
H <sub>2</sub> O	do 10 $\mu\text{l}$

10x bufor – bufor komercyjny dostarczony przez producenta wraz z enzymem.

Reakcję prowadzono w temperaturze 37°C przez 30 min. Następnie próby oczyszczano w 10% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Wyznakowane RNA eluowano, strącano i suszono. Osady rozpuszczano w wodzie, a poziom promieniowania mierzono przy pomocy licznika scyntylicyjnego MicroBeta firmy PerkinElmer.

### Znakowanie RNA na 3' końcu

W pierwszym etapie uzyskano  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{pCp}$ .

Skład mieszaniny reakcyjnej:

3'-monofosforan cytozyny	100 pmol
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (1mCi)	1 $\mu\text{l}$
10x bufor	1x
Kinaza polinukleotydowa T4	30 U
H <sub>2</sub> O	do 10 $\mu\text{l}$

10x bufor – bufor komercyjny dostarczony przez producenta wraz z enzymem.

Reakcję prowadzono w temperaturze 37°C przez 30 min. Następnie enzym dezaktywowano w temperaturze 95°C przez 5 min .

W drugim etapie wykonywano reakcję ligacji.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

RNA	100 pmol
[ $\gamma$ <sup>32</sup> P] pCp	100 pmol
10x bufor	1x
Ligaza T4	10 U
ATP	10 mM
H <sub>2</sub> O	do 20 $\mu$ l

10x bufor – bufor komercyjny dostarczony przez producenta wraz z enzymem.

Reakcję prowadzono w temperaturze 4°C przez 16 godzin. Całość mieszaniny reakcyjnej oczyszczano na 10% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Wyznakowane RNA eluowano, strącano i suszono. Osad rozpuszczano w wodzie, a poziom promieniowania mierzono przy pomocy licznika scyntylicyjnego MicroBeta firmy PerkinElmer.

## 2.18. Fałdowanie RNA

Odpowiednią cząsteczkę RNA w buforze do fałdowania (FB) ogrzewano 5 min w temperaturze 65°C. Następnie próbkę wolno schładzano do temperatury pokojowej (około 45 min). Tak przygotowane RNA było wykorzystywane do hybrydyzacji na maikromacierzach oraz w reakcjach modyfikacji chemicznej i enzymatycznej.

## 2.19. Preparatyka mikromacierzy izoenergetycznych

### 2.19.1. Przygotowanie płytek do wydruku mikromacierzy

Przygotowano 2% wodny roztwór agarozy, do którego dodawano 10 mM NaIO<sub>4</sub>. Roztwór wylewano na aminosilanizowane płytki mikroskopowe (2,5 x 7,5 cm) po 2 ml i pozostawiano na 1 godzinę. Następnie trzykrotnie płukano po 15 min w sterylnej wodzie w celu pozbycia się nadmiaru NaIO<sub>4</sub>. Pozostawiano do wyschnięcia. Tak sporządzone płytki przechowywano w temperaturze pokojowej do kilku miesięcy.

### 2.19.2. Przygotowanie sond do drukowania mikromacierzy izoenergetycznej

Wybrano sondy z posiadanej biblioteki izoenergetycznej komplementarne do badanych RNA, posługując się napisanym w tym celu programem. Oligomery te były komplementarne krok po korku, z przesunięciem co 1 nukleotyd, w stosunku do badanej cząsteczki RNA. Wyselekcjonowane sondy wraz z dodatkowo zsyntetyzowanymi zostały pobrane w odpowiedniej ilości i odparowane do sucha w wirówce próżniowej. Osady rozpuszczano w buforze do drukowania do stężenia 0,1 mM (zwykle w objętości 30  $\mu$ l). Roztwory przenoszono na 384 dołkową płytkę do drukowania. Na płytce w kilku miejscach umieszczano dodatkowo oligomer  $U^M U^M U^M U^M U^M$ , monomer  $U^M$  oraz sam bufor do drukowania jako kontrole negatywne.

### 2.19.3. Drukowanie sond mikromacierzy

Nadruk sond na płytce wykonywano w Europejskim Centrum Bioinformatyki i Genomiki z zastosowaniem drukarki NanoPrint™ firmy Arrayit. Podczas drukowania zachowywano wilgotność 60%, a każdą sondę drukowano w 3 powtórzeniach. Odległość pomiędzy kolejnymi nadrukowanymi punktami wynosiła 750  $\mu$ m. Płytki z nadrukowanymi sondami inkubowano 16 godzin w temperaturze 37°C zachowując 100% wilgotności. Następnie płytki pokrywano 1 ml świeżo przygotowanego roztworu do redukcji i inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej. Płytki płukano trzykrotnie w sterylnej wodzie MQ po 15 minut. W kolejnym etapie płytki zanurzano w 1% roztworze SDS i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 55°C w celu pozbycia się nadmiaru sond niezwiązanych kowalencyjnie z agarozą. Ponownie wykonywano trzykrotne płukanie po 15 min w wodzie. Następnie mikromacierze suszono w temperaturze pokojowej.

## 2.20. Hybrydyzacja RNA do izoenergetycznych mikromacierzy

W pojedynczym eksperymencie wykorzystywano wcześniej wyznakowane radioaktywnie RNA w ilości około 200 000 cpm. Pofałdowane badane RNA w buforze nanoszono na mikromacierz. Mikromacierz z RNA umieszczano w komorze hybrydyzacyjnej w której zachowywano 100% wilgotności. Hybrydyzację prowadzono przez 16 godzin w temperaturze 4°C, RT lub 37°C. Następnie roztwór usuwano, a mikromacierz płukano przez 5 min w buforze hybrydyzacyjnym o temperaturze hybrydyzacji. Szkiełka osuszano wirując je 2 min przy 2 000 rpm i zawijano w bezbarwną folię stretch. Wynik wizualizowano przy użyciu ekranów

odwzorowujących oraz skanera materiałów promieniotwórczych i fluorescencyjnych FLA-5100.

### **2.21. Analiza komputerowa wyników mikromacierzowych**

Do analizy intensywności wiązania się badanej cząsteczki do sondy mikromacierzowej wykorzystywano oprogramowanie ArrayGauge V2.1. Wyniki eksportowano do programu Microsoft Excel, gdzie następowało dalsze przetwarzanie uzyskanych danych. Za intensywne przyjęto uznawać te miejsca wiązania, które wykazywały sygnał od 1 do 3-krotnie słabszy od najintensywniejszego miejsca wiązania. Średnio intensywne od 3 do 9-krotnie słabsze, natomiast słabe od 9 do 27-krotnie słabsze od najintensywniejszego. Dla każdego miejsca wiązania sprawdzano możliwość występowania alternatywnego miejsca wiązania wykorzystując funkcję „*fold RNA bimolecular*” dostępną w programie RNAstructure. Dla każdego alternatywnego miejsca wiązania przewidywano wartość energii swobodnej powstałego dupleksu.

### **2.22. Regeneracja mikromacierzy**

Po zakończonym eksperymencie hybrydyzacji płytki z nadrukowaną macierzą odzyskiwano do ponownego użycia. W tym celu płytki płukano trzykrotnie po 15 min w sterylnej wodzie. Następnie zanurzano w 1% roztworze SDS i inkubowano w temperaturze 55°C przez 1 godzinę, aby pozbyć się cząsteczek związanych z sondami. Ponownie płukano trzykrotnie po 15 min w sterylnej wodzie. Odzyskane mikromacierze suszono w temperaturze pokojowej i używano ponownie. Jedną macierz wykorzystywano maksymalnie 3 razy stosując każdorazowo powyższą procedurę.

### **2.23. Mapowanie chemiczne RNA**

#### **2.23.1. Metoda SHAPE (ang. *selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*)**

Reakcję modyfikacji poprzedzało fałdowanie 2 pmoli RNA rozpuszczonego w 9  $\mu$ l buforu FB 1x. Próbkę dzielono na dwie. Do jednej dodawano 0,5  $\mu$ l roztworu NMIA w bezwodnym DMSO do końcowego stężenia 4 Mm (reakcja „+”). Do drugiej

próby dodawano 0,5  $\mu$ l bezwodnego DMSO (reakcja „-”). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Następnie próbki strącano i suszono. W kolejnym etapie przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji opisaną w punkcie 2.24.

### **2.23.2. Modyfikacja chemiczna RNA z zastosowaniem siarczanu dimetylu (DMS)**

Reakcję modyfikacji podobnie jak przy metodzie SHAPE poprzedzało fałdowanie cząsteczki RNA. Następnie próbkę dzielono na dwie. Do jednej dodawano 0,5  $\mu$ l roztworu DMS w 96% etanolu do stężenia końcowego 30 mM (reakcja „+”). Do drugiej próby dodawano 0,5  $\mu$ l wody (reakcja „-”). Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej przez 15 min. Następnie próbki strącano, a otrzymany osad suszono. W kolejnym etapie przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji opisaną w punkcie 2.24.

### **2.23.3. Indukowanie cięć RNA w obecności jonów ołowiu (II)**

Mieszanina reakcyjna zawierała znakowane radioizotopowo RNA (25000 cpm na linie) rozpuszczone w buforze FB2. RNA fałdowano, a następnie dodawano równą objętość roztworu octanu ołowiu do końcowego stężenia 1 mM i inkubowano 1, 5, 15, lub 30 min w temperaturze pokojowej. Następnie reakcję zatrzymywano dodając bufor SB w stosunku 1:1 i przenoszono na lód. Produkty reakcji rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

### **2.23.4. Indukowanie cięć RNA w obecności rodnika hydroksylowego**

Reakcję indukowania cięć poprzedzało fałdowanie 2 pmoli RNA rozpuszczonych w buforze FB1 do końcowej objętości 54  $\mu$ l. Próbkę dzielono na dwie. Do jednej próby dodawano w odpowiedniej kolejności po 1  $\mu$ l: roztworu 7,5 mM  $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$  w 11,25 mM EDTA, 0,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 150 mM askorbinianu sodu (reakcja „+”). Do drugiej próby dodawano po 1  $\mu$ l:  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 150 mM askorbinianu sodu (reakcja „-”). Reakcję prowadzono przez 5 min w temperaturze pokojowej, a następnie wygaszano 10  $\mu$ l 75% glicerolu. Produkty reakcji strącano i suszono. W kolejnym etapie przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji opisaną w punkcie 2.24.



## 2.24. Hydroliza RNA z udziałem RNazy H

Reakcję hydrolizy RNA z udziałem RNazy H poprzedzało fałdowanie 6 pmoli RNA rozpuszczonych w buforze FB1 do końcowej objętości 10  $\mu$ l. Następnie do próby dodawano 3 pmole oligomeru DNA, 0,5  $\mu$ l  $MgCl_2$ , 0,4  $\mu$ l DTT, 0,5  $\mu$ l RNazy H oraz  $H_2O$  do 20  $\mu$ l. Próbę inkubowano przez 30 min w 37°C. Reakcję zatrzymywano poprzez dezaktywację enzymu w 65°C przez 10 min. Każdorazowo adekwatnie wykonywano próbę kontrolną do której nie dodawano oligomeru DNA. Następnie próby strącano w etanolu, do identyfikacji miejsc cięcia stosowano odwrotną transkrypcję z wykorzystaniem 6 starterów z dołączonym znacznikiem FAM-6 (Tab. 18), szczegółowo opisaną w punkcie 2.25. 9-mery testowano w trójkach lub dwójkach stosując po 3 pmole każdego oligomeru (408, 721, 143; 535,275, 229; 576, 729, 163 oraz 170, 436). Oligomery mieszano tak, aby nie posiadały podobnych miejsc alternatywnych. Wszystkie heksamery testowano indywidualnie.

## 2.25. Reakcja wydłużania starterów

Reakcję odwrotnej transkrypcji wykonywano z użyciem komercyjnego zestawu Super Script® III. Mieszaninę reakcyjną przygotowywano zgodnie z zaleceniami producenta. Osady uzyskane w reakcji modyfikacji lub cięcia rozpuszczano w buforze dostarczonej przez producenta i dodawano 1 pmol odpowiedniego startera (stosunek RNA: starter, 1:1) (Tab. 18). Przeprowadzano denaturację w 90°C przez 3 minuty, następnie próby inkubowano w temperaturze 55°C przez 10 min w celu przyłączenia się startera. W kolejnym etapie do mieszaniny dodawano równą objętość roztworu zawierającego 1x bufor FS, 12 mM DTT, 2,5mM dNTP, 50 U odwrotnej transkryptazy Superscript III oraz 10 U inhibitora RNaz. Reakcję prowadzono w temperaturze 55°C przez 50 min. Następnie przeprowadzano reakcję hydrolizy RNA. W tym celu do próby dodawano jedną objętość NaOH do stężenia końcowego 0,5 M. Całość dobrze mieszano i inkubowano przez 5 min w 95°C. Dodawano HCl do stężenia końcowego 0,5 M w celu zobojętnienia pH roztworu. RNA strącano i dodatkowo przemywano 75% schłodzonym etanolem, następnie suszono i rozpuszczano w 10  $\mu$ l sterylnej wody. Tak przygotowane produkty reakcji były przekazywane do rozdzielania w elektroforezie kapilarnej. Rozdział produktów następował z zastosowaniem urządzenia ABI 3130xl

w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu.

### **2.26. Analiza produktów reakcji wydłużania starterów**

Dane otrzymane w wyniku rozdziału produktów w elektroforezie kapilarnej analizowano z zastosowaniem programu PeakScanner™ Software v1.0. Następnie dane eksportowano do programu Microsoft Excel, gdzie następowało dalsze przetwarzanie. Reaktywność poszczególnych nukleotydów sprowadzano do skali 0-1 zgodnie z zasadą „2-8%” (117). W pierwszej kolejności odrzucano piki, które posiadały wysokie tło (około 5%). W celu normalizacji pozostałych wyników w pierwszej kolejności odrzucano 2% najwyższych pików, a następnie z kolejnych 8% najwyższych pików liczonego średnią. Stosunek wysokości poszczególnych pików do wyliczonej średniej określał reaktywność danego nukleotydu. Za miejsca wysoce reaktywne uznawano te, których reaktywność była wyższa od 0,7; średnio reaktywne: 0,3 - 0,7; słabo reaktywne: 0,1 - 0,3. Miejsca modyfikacji odczytywano porównując ścieżki rozdziału z drabinką dideoksy uzyskaną z zastosowaniem ddGTP i ddATP.

### **2.27. Analiza produktów reakcji po separacji w żelach poliakrylamidowych**

Produkty reakcji rozdzielane w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących były wizualizowane z zastosowaniem ekranu odwzorującego i skanera materiałów radioaktywnych i fluorescencyjnych FLA-5000. Analizę intensywności poszczególnych prążków przeprowadzano za pomocą programu MultiGuage V3.0. W kolejnym etapie uzyskane dane były przetwarzane w programie Microsoft Excel. W pierwszej kolejności porównywano intensywności prążków pochodzących z reakcji i kontroli. Ocena intensywności prążków wyznaczano porównując z najintensywniejszym. Za miejsca o wysokiej podatności na przecinanie uznawano te, w których sygnał znajdował się powyżej 70% najintensywniejszego prążka, średnie 50-70%, a słabe 30-50%.

## 2.28. Przewidywanie struktury drugorzędowej RNA

Eksperymentalne dane o strukturze drugorzędowej badanych RNA posłużyły do zaproponowania ich struktury drugorzędowej z zastosowaniem programu RNAstructure5.4. W przewidywaniu struktury wykorzystywano wyniki otrzymane podczas mapowania metodą SHAPE oraz z zastosowaniem siarczanu dimetylu. Wyniki uzyskane metodą SHAPE wprowadzono do programu RNAstructure korzystając z funkcji: *read SHAPE reactivity - pseudo energy constraints*. Program przeliczał wyliczone reaktywności dla każdej reszty nukleotydowej *i* na pseudo-energię według wzoru:

$$\Delta G_{\text{SHAPE}(i)} = m \ln [\text{reaktywność SHAPE}_i + 1] + b$$

gdzie:

*m* (*slope*) – reprezentuje niekorzystną pseudo-energię dla sparowanej reszty nukleotydu o wysokiej reaktywności SHAPE – w konsekwencji parametr *m* jest dodatni.

*b* (*intercept*) – reprezentuje wkład korzystnej pseudo-energii reszty nukleotydu, która jest sparowana, o reaktywności SHAPE równej 0 – w konsekwencji parametr *b* jest ujemny

Przewidując strukturę RNA w programie RNAstructure wykorzystano zgodnie z danymi literaturowymi parametry równe: *slope*: 2,6 kcal/mol oraz *intercept*: -0,8 kcal/mol. Wyniki mapowania struktury RNA uzyskane podczas modyfikacji siarczanem dimetylu wprowadzono w module „*chemical modification*”.

## 2.29. Testy oligonukleotydów antysensowych *in vitro* na liniach komórkowych MDCK

Testy oligomerów antysensowych *in vitro* na liniach komórkowych MDCK zostały wykonane w laboratorium Luisa Martinez- Sobrido na Uniwersytecie Rochester. Hodowlę *in vitro* komórek MDCK prowadzono w temperaturze 37°C w atmosferze 5% dwutlenku węgla w pożywce DMEM z dodatkiem 10% FBS oraz 1% PSG (penicylina, streptomycyna, L-glutamina). Komórki MDCK transfekowano oligonukleotydami antysensowymi o stężeniu 4 μM w obecności lipofektaminy 2000. Następnie dalszą hodowlę prowadzono na płytkach 96- dołkowych (25000 komórek/dołek), na której każdy oligonukleotyd występował w 3-krotnym powtórzeniu. 18 godzin po transfekcji komórki infekowano wirusem szczepu A/California/04/2009 (H1N1) o współczynniku zakażenia MOI = 0,01 (MOI – ang. *Multiplicity of Infection* – stosunek liczby cząstek wirusa zakażającego do znanej liczby komórek w hodowli). Dalszą hodowlę

prowadzono z zastosowaniem pożywki PI MEM ( ang. *post infection media* – DMEM , 0,3% BSA, 1% PSG) w temperaturze 33°C w atmosferze 5% dwutlenku węgla. Po 24h od infekcji zbierano pożywkę zawierającą uwolnione cząstki wirusa (TCS – ang. *Tissue Culture Supernatant*), która w różnych rozcieńczeniach służyła do infekcji kolejnej monowarstwy komórek MDCK. Po godzinnej inkubacji komórek w obecności TCS wymieniano ją na pożywkę PI MEM. Po 8-10 godzinach hodowli wykonywano test immunofluorescencyjny z zastosowaniem dwóch przeciwciał. W pierwszej kolejności jądra komórkowe znakowano przeciwciałem pierwszorzędowym skierowanym przeciw NP. W celu wykrycia przeciwciała pierwszorzędowego stosowano monoklonalne przeciwciało królicze, które je rozpoznawało, a jednocześnie posiadało znacznik fluorescencyjny FITC. Wyznakowane jądra komórkowe zliczano stosując mikroskop fluorescencyjny.

## V BIBLIOGRAFIA

1. Martin, P. M., and Martin-Granel, E. (2006) 2,500-year evolution of the term epidemic, *Emerg Infect Dis* 12, 976-980.
2. Shope, R. E. (1931) Swine Influenza: Filtration Experiments and Etiology, *J Exp Med* 54, 373-385.
3. Smith, W., Andrewes, C. H., and Laidlaw, P. P. (1933) A virus obtained from influenza patients., *The Lancet* 222, 66-68.
4. Li, H., Wei, Q., Tan, A., and Wang, L. Epidemiological analysis of respiratory viral etiology for influenza-like illness during 2010 in Zhuhai, China, *Virology Journal* 10, 143.
5. Neumann, G., Noda, T., and Kawaoka, Y. (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus, *Nature* 459, 931-939.
6. Kobasa, D., Takada, A., Shinya, K., Hatta, M., Halfmann, P., Theriault, S., Suzuki, H., Nishimura, H., Mitamura, K., Sugaya, N., Usui, T., Murata, T., Maeda, Y., Watanabe, S., Suresh, M., Suzuki, T., Suzuki, Y., Feldmann, H., and Kawaoka, Y. (2004) Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus, *Nature* 431, 703-707.
7. Peiris, J. S., Cheung, C. Y., Leung, C. Y., and Nicholls, J. M. (2009) Innate immune responses to influenza A H5N1: friend or foe?, *Trends Immunol* 30, 574-584.
8. Watanabe, T., Watanabe, S., and Kawaoka, Y. (2010) Cellular networks involved in the influenza virus life cycle, *Cell Host Microbe* 7, 427-439.
9. Miotto, O., Heiny, A. T., Albrecht, R., Garcia-Sastre, A., Tan, T. W., August, J. T., and Brusica, V. (2010) Complete-proteome mapping of human influenza A adaptive mutations: implications for human transmissibility of zoonotic strains, *PLoS One* 5.
10. Wang, T. T., and Palese, P. (2009) Unraveling the Mystery of Swine Influenza Virus, *Cell* 137, 983-985.
11. Olsen, C. W. (2002) The emergence of novel swine influenza viruses in North America, *Virus Res* 85, 199-210.
12. Taubenberger, J. K., and Kash, J. C. (2010) Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation, *Cell Host Microbe* 7, 440-451.
13. Bouvier, N. M., and Palese, P. (2008) The biology of influenza viruses, *Vaccine* 26, D49-D53.
14. Samji, T. (2009) Influenza A: understanding the viral life cycle, *Yale J Biol Med* 82, 153-159.
15. Arranz, R., Coloma, R., Javier Chichon, F., Javier Conesa, J., Carrascosa, J. L., Valpuesta, J. M., Ortin, J., and Martin-Benito, J. (2012) The Structure of Native Influenza Virion Ribonucleoproteins, *Science* 338, 1634-1637.
16. Baudin, F., Bach, C., Cusack, S., and Ruigrok, R. W. H. (1994) Structure of Influenza-Virus Rnp .1. Influenza-Virus Nucleoprotein Melts Secondary Structure in Panhandle RNA and Exposes the Bases to the Solvent, *EMBO J.* 13, 3158-3165.
17. Moeller, A., Kirchdoerfer, R. N., Potter, C. S., Carragher, B., and Wilson, I. A. (2012) Organization of the Influenza Virus Replication Machinery, *Science* 338, 1631-1634.

18. Rossman, J. S., and Lamb, R. A. Influenza virus assembly and budding, *Virology* 411, 229-236.
19. Nayak, D. P., Balogun, R. A., Yamada, H., Zhou, Z. H., and Barman, S. (2009) Influenza virus morphogenesis and budding, *Virus Research* 143, 147-161.
20. Edinger, T. O., Pohl, M. O., and Stertz, S. (2013) Entry of influenza A virus: host factors and antiviral targets, *J Gen Virol* 95, 263-277.
21. Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin, *Annu Rev Biochem* 69, 531-569.
22. Hutchinson, E. C., and Fodor, E. (2013) Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus, *Viruses* 5, 2424-2446.
23. Hutchinson, E. C., and Fodor, E. (2012) Nuclear import of the influenza A virus transcriptional machinery, *Vaccine* 30, 7353-7358.
24. Engelhardt, O. G., and Fodor, E. (2006) Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection, *Rev Med Virol* 16, 329-345.
25. Resa-Infante, P., Jorba, N., Coloma, R., and Ortin, J. (2011) The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function, *RNA Biol* 8, 207-215.
26. Zheng, W., Olson, J., Vakharia, V., and Tao, Y. J. (2013) The crystal structure and RNA-binding of an orthomyxovirus nucleoprotein, *PLoS Pathog* 9.
27. Chakrabarti, A. K., and Pasricha, G. (2013) An insight into the PB1F2 protein and its multifunctional role in enhancing the pathogenicity of the influenza A viruses, *Virology* 440, 97-104.
28. Zheng, W., and Tao, Y. J. (2013) Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex, *FEBS Lett* 587, 1206-1214.
29. Fournier, E., Moules, V., Essere, B., Paillart, J.-C., Sirbat, J.-D., Isel, C., Cavalier, A., Rolland, J.-P., Thomas, D., Lina, B., and Marquet, R. (2012) A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments, *Nucleic Acids Res.* 40, 2197-2209.
30. 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, 7359-7367.
31. Desselberger, U., Racaniello, V. R., Zazra, J. J., and Palese, P. (1980) The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity, *Gene* 8, 315-328.
32. Fujii, K., Fujii, Y., Noda, T., Muramoto, Y., Watanabe, T., Takada, A., Goto, H., Horimoto, T., and Kawaoka, Y. (2005) Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza a virus NS segment for its efficient incorporation into virions, *J. Virol.* 79, 3766-3774.
33. Gultyaev, A. P., Fouchier, R. A. M., and Olsthoorn, R. C. L. (2010) Influenza Virus RNA Structure: Unique and Common Features, *International Reviews of Immunology* 29, 533-556.
34. Cheong, H. K., Cheong, C., and Choi, B. S. (1996) Secondary structure of the panhandle RNA of influenza virus A studied by NMR spectroscopy, *Nucleic Acids Res* 24, 4197-4201.
35. Widjaja, I., de Vries, E., Rottier, P. J., and de Haan, C. A. (2012) Competition between influenza A virus genome segments, *PLoS One* 7.

36. Kim, H. J., Fodor, E., Brownlee, G. G., and Seong, B. L. (1997) Mutational analysis of the RNA-fork model of the influenza A virus vRNA promoter in vivo, *J Gen Virol* 78 ( Pt 2), 353-357.
37. te Velthuis, A. J., Turrell, L., Vreede, F. T., and Fodor, E. (2013) Uncoupling of influenza A virus transcription and replication through mutation of the unpaired adenosine in the viral RNA promoter, *J Virol* 87, 10381-10384.
38. Jorba, N., Coloma, R., and Ortin, J. (2009) Genetic trans-Complementation Establishes a New Model for Influenza Virus RNA Transcription and Replication, *Plos Pathogens* 5.
39. Pritlove, D. C., Poon, L. L., Devenish, L. J., Leahy, M. B., and Brownlee, G. G. (1999) A hairpin loop at the 5' end of influenza A virus virion RNA is required for synthesis of poly(A)<sup>+</sup> mRNA in vitro, *J Virol* 73, 2109-2114.
40. Fodor, E., Pritlove, D. C., and Brownlee, G. G. (1994) The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription, *J Virol* 68, 4092-4096.
41. Backstrom Winquist, E., Abdurahman, S., Tranell, A., Lindstrom, S., Tingsborg, S., and Schwartz, S. (2012) Inefficient splicing of segment 7 and 8 mRNAs is an inherent property of influenza virus A/Brevig Mission/1918/1 (H1N1) that causes elevated expression of NS1 protein, *Virology* 422, 46-58.
42. Lamb, R. A., and Horvath, C. M. (1991) Diversity of coding strategies in influenza viruses, *Trends Genet* 7, 261-266.
43. Robb, N. C., Jackson, D., Vreede, F. T., and Fodor, E. (2010) Splicing of influenza A virus NS1 mRNA is independent of the viral NS1 protein, *J Gen Virol* 91, 2331-2340.
44. 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.
45. Ilyinskii, P. O., Schmidt, T., Lukashev, D., Meriin, A. B., Thoidis, G., Frishman, D., and Shneider, A. M. (2009) Importance of mRNA Secondary Structural Elements for the Expression of Influenza Virus Genes, *Omic* 13, 421-430.
46. 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*, submitted for publication.
47. Buratti, E., and Baralle, F. E. (2004) Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process, *Mol Cell Biol* 24, 10505-10514.
48. Gultyaev, A. P., Heus, H. A., and Olsthoorn, R. C. L. (2007) An RNA conformational shift in recent H5N1 influenza A viruses, *Bioinformatics* 23, 272-276.
49. 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.
50. 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.
51. Moss, W. N., Dela-Moss, L. I., Kierzek, E., Kierzek, R., Priore, S. F., and Turner, D. H. The 3' Splice Site of Influenza A Segment 7 mRNA Can Exist in Two Conformations: A Pseudoknot and a Hairpin, *Plos One* 7.
52. Kash, J. C., Goodman, A. G., Korth, M. J., and Katze, M. G. (2006) Hijacking of the host-cell response and translational control during influenza virus infection, *Virus Res* 119, 111-120.

53. Park, Y. W., and Katze, M. G. (1995) Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation, *J Biol Chem* 270, 28433-28439.
54. Garfinkel, M. S., and Katze, M. G. (1993) Translational control by influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region, *J Biol Chem* 268, 22223-22226.
55. Enami, K., Sato, T. A., Nakada, S., and Enami, M. (1994) Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein, *J Virol* 68, 1432-1437.
56. Burgui, I., Yanguez, E., Sonenberg, N., and Nieto, A. (2007) Influenza virus mRNA translation revisited: is the eIF4E cap-binding factor required for viral mRNA translation?, *J Virol* 81, 12427-12438.
57. Kash, J. C., Cunningham, D. M., Smit, M. W., Park, Y., Fritz, D., Wilusz, J., and Katze, M. G. (2002) Selective translation of eukaryotic mRNAs: functional molecular analysis of GRSF-1, a positive regulator of influenza virus protein synthesis, *J Virol* 76, 10417-10426.
58. Park, Y. W., Wilusz, J., and 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 U S A* 96, 6694-6699.
59. Fujii, K., Ozawa, M., Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., and Kawaoka, Y. (2009) Incorporation of influenza A virus genome segments does not absolutely require wild-type sequences, *J Gen Virol* 90, 1734-1740.
60. Hutchinson, E. C., von Kirchbach, J. C., Gog, J. R., and Digard, P. (2010) Genome packaging in influenza A virus, *J Gen Virol* 91, 313-328.
61. Marsh, G. A., Rabadan, R., Levine, A. J., and Palese, P. (2008) Highly conserved regions of influenza A virus polymerase gene segments are critical for efficient viral RNA packaging, *J Virol* 82, 2295-2304.
62. Enami, M., Sharma, G., Benham, C., and Palese, P. (1991) An influenza virus containing nine different RNA segments, *Virology* 185, 291-298.
63. Donald, H. B., and Isaacs, A. (1954) Counts of influenza virus particles, *J Gen Microbiol* 10, 457-464.
64. Hutchinson, E. C., Curran, M. D., Read, E. K., Gog, J. R., and Digard, P. (2008) Mutational analysis of cis-acting RNA signals in segment 7 of influenza A virus, *J Virol* 82, 11869-11879.
65. Muramoto, Y., Takada, A., Fujii, K., Noda, T., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Horimoto, T., Kida, H., and Kawaoka, Y. (2006) Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions, *J Virol* 80, 2318-2325.
66. Liang, Y., Hong, Y., and Parslow, T. G. (2005) cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments, *J Virol* 79, 10348-10355.
67. Dos Santos Afonso, E., Escriou, N., Leclercq, I., van der Werf, S., and Naffakh, N. (2005) The generation of recombinant influenza A viruses expressing a PB2 fusion protein requires the conservation of a packaging signal overlapping the coding and noncoding regions at the 5' end of the PB2 segment, *Virology* 341, 34-46.
68. Gog, J. R., Afonso Edos, S., Dalton, R. M., Leclercq, I., Tiley, L., Elton, D., von Kirchbach, J. C., Naffakh, N., Escriou, N., and Digard, P. (2007) Codon conservation in the influenza A virus genome defines RNA packaging signals, *Nucleic Acids Res* 35, 1897-1907.



69. Watanabe, T., Watanabe, S., Noda, T., Fujii, Y., and Kawaoka, Y. (2003) Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes, *J Virol* 77, 10575-10583.
70. Marsh, G. A., Hatami, R., and Palese, P. (2007) Specific residues of the influenza A virus hemagglutinin viral RNA are important for efficient packaging into budding virions, *J Virol* 81, 9727-9736.
71. Ozawa, M., Fujii, K., Muramoto, Y., Yamada, S., Yamayoshi, S., Takada, A., Goto, H., Horimoto, T., and Kawaoka, Y. (2007) Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication, *J Virol* 81, 30-41.
72. Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T., and Kawaoka, T. (2003) Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2002-2007.
73. Ozawa, M., Maeda, J., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Goto, H., Horimoto, T., and Kawaoka, Y. (2009) Nucleotide sequence requirements at the 5' end of the influenza A virus M RNA segment for efficient virus replication, *J Virol* 83, 3384-3388.
74. Noda, T., Sugita, Y., Aoyama, K., Hirase, A., Kawakami, E., Miyazawa, A., Sagara, H., and Kawaoka, Y. (2012) Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus, *Nat Commun* 3, 639.
75. Gao, Q., Chou, Y. Y., Doganay, S., Vafabakhsh, R., Ha, T., and Palese, P. (2012) The influenza A virus PB2, PA, NP, and M segments play a pivotal role during genome packaging, *J Virol* 86, 7043-7051.
76. Chou, Y. Y., Vafabakhsh, R., Doganay, S., Gao, Q., Ha, T., and Palese, P. (2012) One influenza virus particle packages eight unique viral RNAs as shown by FISH analysis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 9101-9106.
77. Chou, Y. Y., Heaton, N. S., Gao, Q., Palese, P., Singer, R. H., and Lionnet, T. (2013) Colocalization of different influenza viral RNA segments in the cytoplasm before viral budding as shown by single-molecule sensitivity FISH analysis, *PLoS Pathog.*
78. Lakdawala, S. S., Wu, Y., Wawrzusin, P., Kabat, J., Broadbent, A. J., Lamirande, E. W., Fodor, E., Altan-Bonnet, N., Shroff, H., and Subbarao, K. (2014) Influenza a virus assembly intermediates fuse in the cytoplasm, *PLoS Pathog* 10.
79. Gavazzi, C., Isel, C., Fournier, E., Moules, V., Cavalier, A., Thomas, D., Lina, B., and Marquet, R. (2013) An in vitro network of intermolecular interactions between viral RNA segments of an avian H5N2 influenza A virus: comparison with a human H3N2 virus, *Nucleic Acids Res.* 41, 1241-1254.
80. Ghosh, A., Nandy, A., and Nandy, P. (2010) Computational analysis and determination of a highly conserved surface exposed segment in H5N1 avian flu and H1N1 swine flu neuraminidase, *BMC Struct Biol* 10, 6.
81. Luksza, M., and Lassig, M. (2014) A predictive fitness model for influenza, *Nature* 507, 57-61.
82. Das, K., Aramini, J. M., Ma, L. C., Krug, R. M., and Arnold, E. (2010) Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets, *Nat Struct Mol Biol* 17, 530-538.
83. Jefferson, T., Demicheli, V., Di Pietrantonj, C., and Rivetti, D. (2006) Amantadine and rimantadine for influenza A in adults, *Cochrane Database Syst Rev*, CD001169.

84. Moscona, A. (2009) Global transmission of oseltamivir-resistant influenza, *N Engl J Med* 360, 953-956.
85. Stephenson, M. L., and Zamecnik, P. C. (1978) Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide, *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 285-288.
86. Deere, J., Iversen, P., and Geller, B. L. (2005) Antisense phosphorodiamidate morpholino oligomer length and target position effects on gene-specific inhibition in *Escherichia coli*, *Antimicrob Agents Chemother* 49, 249-255.
87. A. Swiatkowska, J. C. (2010) Oligonukleotydy jako potencjalne czynniki terapeutyczne skierowane przeciw wirusowi zapalenia wątroby typu C, *Biotechnologia* 88, 13-33.
88. Kurreck, J. (2003) Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications, *European Journal of Biochemistry* 270, 1628-1644.
89. Hui Bai, Y. Y., Xiaochen Bo, Shengqi Wang (2013) *Antisense antivirals: future oligonucleotides-based therapeutics for viral infectious diseases*, Vol. 3.
90. Hatta, T., Takai, K., Nakada, S., Yokota, T., and Takaku, H. (1997) Specific inhibition of influenza virus RNA polymerase and nucleoprotein genes expression by liposomally endocapsulated antisense phosphorothioate oligonucleotides: Penetration and localization of oligonucleotides in clone 76 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 545-549.
91. Abe, T., Mizuta, T., Hatta, T., Miyano-Kurosaki, N., Fujiwara, M., Takai, K., Shigeta, S., Yokota, T., and Takaku, H. (2001) Antisense therapy of influenza, *Eur J Pharm Sci* 13, 61-69.
92. Ge, Q., Pastey, M., Kobasa, D., Puthavathana, P., Lupfer, C., Bestwick, R. K., Iversen, P. L., Chen, J., and Stein, D. A. (2006) Inhibition of multiple subtypes of influenza A virus in cell cultures with morpholino oligomers, *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3724-3733.
93. Gabriel, G., Nordmann, A., Stein, D. A., Iversen, P. L., and 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, 939-948.
94. Lupfer, C., Stein, D. A., Mourich, D. V., Tepper, S. E., Iversen, P. L., and Pastey, M. (2008) Inhibition of influenza A H3N8 virus infections in mice by morpholino oligomers, *Arch Virol* 153, 929-937.
95. Duan, M., Zhou, Z., Lin, R. X., Yang, J., Xia, X. Z., and Wang, S. Q. (2008) In vitro and in vivo protection against the highly pathogenic H5N1 influenza virus by an antisense phosphorothioate oligonucleotide, *Antivir Ther* 13, 109-114.
96. Giannecchini, S., Clausi, V., Nosi, D., and Azzi, A. (2009) Oligonucleotides derived from the packaging signal at the 5' end of the viral PB2 segment specifically inhibit influenza virus in vitro, *Archives of Virology* 154, 821-832.
97. 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.
98. 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. Commun.* 365, 369-374.
99. Jin, Y., Zhang, G., Hu, Y., Ding, M., Li, Y., Cao, S., Xue, J., Sun, L.-Q., and Wang, M. (2011) Inhibition of highly pathogenic avian H5N1 influenza virus

- propagation by RNA oligonucleotides targeting the PB2 gene in combination with celecoxib, *The Journal of Gene Medicine* 13, 243-249.
100. 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.
  101. Wong, J. P., Christopher, M. E., Salazar, A. M., Dale, R. M., Sun, L. Q., and Wang, M. (2007) Nucleic acid-based antiviral drugs against seasonal and avian influenza viruses, *Vaccine* 25, 3175-3178.
  102. Dallas, A., and Vlassov, A. V. (2006) RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential, *Med Sci Monit* 12, RA67-74.
  103. Kumar, B., Khanna, M., Kumar, P., Sood, V., Vyas, R., and 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* 51, 27-36.
  104. Santoro, S. W., and Joyce, G. F. (1997) A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4262-4266.
  105. Tang, X. B., Hobom, G., and Luo, D. (1994) Ribozyme mediated destruction of influenza A virus in vitro and in vivo, *J Med Virol.* 1994 Apr;42(4):385-95.
  106. Lazarev, V. N., Shmarov, M. M., Zakhartchouk, A. N., Yurov, G. K., Misurina, O. U., Akopian, T. A., Grinenko, N. F., Grodnitskaya, N. G., Kaverin, N. V., and Naroditsky, B. S. (1999) Inhibition of influenza A virus reproduction by a ribozyme targeted against PB1 mRNA, *Antiviral Res.* 42, 47-57.
  107. Motard, J., Rouxel, R., Paun, A., von Messling, V., Bisailon, M., and Perreault, J.-P. (2011) A Novel Ribozyme-Based Prophylaxis Inhibits Influenza A Virus Replication and Protects from Severe Disease, *Plos One* 6.
  108. Takahashi, H., Hamazaki, H., Habu, Y., Hayashi, M., Abe, T., Miyano-Kurosaki, N., and Takaku, H. (2004) A new modified DNA enzyme that targets influenza virus A mRNA inhibits viral infection in cultured cells, *FEBS Lett* 560, 69-74.
  109. Evdokimov, A. A., Mazurkova, N. A., Malygin, E. G., Zarytova, V. F., Levina, A. S., Repkova, M. N., Zagrebnyi, S. N., and Netesova, N. A. (2013) Design of deoxyribozymes for inhibition of influenza a virus reproduction, *Molecular Biology* 47, 75-84.
  110. Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature* 411, 494-498.
  111. Bitko, V., and Barik, S. (2001) Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses, *BMC Microbiol* 1, 34.
  112. 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. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2718-2723.
  113. 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. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8676-8681.

114. Tompkins, S. M., Lo, C. Y., Tumpey, T. M., and Epstein, S. L. (2004) Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8682-8686.
115. Barik, S. (2010) siRNA for Influenza Therapy, *Viruses* 2, 1448-1457.
116. McGinnis, J. L., Dunkle, J. A., Cate, J. H. D., and Weeks, K. M. (2012) The Mechanisms of RNA SHAPE Chemistry, *J. Am. Chem. Soc.* 134, 6617-6624.
117. 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-U787.
118. Wilkinson, K. A., Merino, E. J., and Weeks, K. M. (2006) Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE): quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution, *Nature Protocols* 1, 1610-1616.
119. Tijerina, P., Mohr, S., and Russell, R. (2007) DMS footprinting of structured RNAs and RNA-protein complexes, *Nat Protoc* 2, 2608-2623.
120. Wilkinson, K. A., Gorelick, R. J., Vasa, S. M., Guex, N., Rein, A., Mathews, D. H., Giddings, M. C., and Weeks, K. M. (2008) High-throughput SHAPE analysis reveals structures in HIV-1 genomic RNA strongly conserved across distinct biological states, *Plos Biology* 6, 883-899.
121. Duncan, C. D., and Weeks, K. M. (2008) SHAPE analysis of long-range interactions reveals extensive and thermodynamically preferred misfolding in a fragile group I intron RNA, *Biochemistry* 47, 8504-8513.
122. Reuter, J. S., and Mathews, D. H. (2010) RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis, *BMC Bioinformatics* 11, 129.
123. Xia, T. B., 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.
124. Deigan, K. E., Li, T. W., Mathews, D. H., and Weeks, K. M. (2009) Accurate SHAPE-directed RNA structure determination, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 97-102.
125. Mathews, D. H. (2004) Using an RNA secondary structure partition function to determine confidence in base pairs predicted by free energy minimization, *RNA* 10, 1178-1190.
126. 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.
127. Kierzek, E., Fraczak, 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.
128. 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, *Nucleic Acids Res.* 33, 5082-5093.
129. 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., *Nucleic Acids Res.* 35, 4055-4063.

130. Pasternak, A., Kierzek, E., Pasternak, K., Fraczak, 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.
131. Donis-Keller, H. (1979) Site specific enzymatic cleavage of RNA, *Nucleic Acids Res* 7, 179-192.
132. Schultz, S. J., and Champoux, J. J. (2008) RNase H activity: structure, specificity, and function in reverse transcription, *Virus Res* 134, 86-103.
133. Marco De Vivo, M. D. P., and Michael L. Klein. (2008) Phosphodiester Cleavage in Ribonuclease H Occurs via an Associative Two-Metal-Aided Catalytic Mechanism, in *J. Am. Chem. Soc.*, pp 10955-10962.
134. Champoux, J. J., and Schultz, S. J. (2009) Ribonuclease H: properties, substrate specificity and roles in retroviral reverse transcription, *FEBS J* 276, 1506-1516.
135. Shcherbakova, I., and Brenowitz, M. (2008) Monitoring structural changes in nucleic acids with single residue spatial and millisecond time resolution by quantitative hydroxyl radical footprinting, *Nat Protoc* 3, 288-302.
136. Tullius, T. D., and Greenbaum, J. A. (2005) Mapping nucleic acid structure by hydroxyl radical cleavage, *Curr Opin Chem Biol* 9, 127-134.
137. Tomaselli, S., Bonamassa, B., Alisi, A., Nobili, V., Locatelli, F., and Gallo, A. (2013) ADAR enzyme and miRNA story: a nucleotide that can make the difference, *Int J Mol Sci* 14, 22796-22816.
138. Patterson, J. B., Cornu, T. I., Redwine, J., Dales, S., Lewicki, H., Holz, A., Thomas, D., Billeter, M. A., and Oldstone, M. B. A. (2001) Evidence That the Hypermutated M Protein of a Subacute Sclerosing Panencephalitis Measles Virus Actively Contributes to the Chronic Progressive CNS Disease, *Virology* 291, 215-225.
139. Samuel, C. E. (2011) Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs) are both antiviral and proviral, *Virology* 411, 180-193.
140. Suspene, R., Petit, V., Puyraimond-Zemmour, D., Aynaud, M. M., Henry, M., Guetard, D., Rusniok, C., Wain-Hobson, S., and Vartanian, J. P. (2011) Double-stranded RNA adenosine deaminase ADAR-1-induced hypermutated genomes among inactivated seasonal influenza and live attenuated measles virus vaccines, *J Virol* 85, 2458-2462.
141. Li, Z., Okonski, K. M., and Samuel, C. E. (2012) Adenosine deaminase acting on RNA 1 (ADAR1) suppresses the induction of interferon by measles virus, *J Virol* 86, 3787-3794.
142. Nishikura, K. (2010) Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases, *Annu Rev Biochem* 79, 321-349.
143. Tenover, B. R., Ng, S. L., Chua, M. A., McWhirter, S. M., Garcia-Sastre, A., and Maniatis, T. (2007) Multiple functions of the IKK-related kinase IKKepsilon in interferon-mediated antiviral immunity, *Science* 315, 1274-1278.
144. Eggington, J. M., Greene, T., and Bass, B. L. (2011) Predicting sites of ADAR editing in double-stranded RNA, *Nature Communications* 2, 319.
145. Ciesiolka, J., Michalowski, D., Wrzesinski, J., Krajewski, J., and Krzyzosiak, W. J. (1998) Patterns of cleavages induced by lead ions in defined RNA secondary structure motifs, *J. Mol. Biol.* 275, 211-220.
146. Forconi, M., and Herschlag, D. (2009) Metal ion-based RNA cleavage as a structural probe, *Methods Enzymol* 468, 91-106.
147. Lindell, M., Brannvall, M., Wagner, E. G., and Kirsebom, L. A. (2005) Lead(II) cleavage analysis of RNase P RNA in vivo, *RNA* 11, 1348-1354.

148. Duhaut, S., and Dimmock, N. J. (2000) Approximately 150 Nucleotides from the 5' End of an Influenza A Segment 1 Defective Virion RNA Are Needed for Genome Stability during Passage of Defective Virus in Infected Cells, *Virology* 275, 278-285.
149. Duhaut, S. D., and Dimmock, N. J. (2002) Defective segment 1 RNAs that interfere with production of infectious influenza A virus require at least 150 nucleotides of 5' sequence: evidence from a plasmid-driven system, *J Gen Virol* 83, 403-411.
150. Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A. A., and Garcia-Sastre, A. (2000) Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon, *J Virol* 74, 11566-11573.

## VI DODATEK

Dodatek zawiera:

- Uśrednione wyniki hybrydyzacji vRNA8 do mikromacierzy izoenergetycznej we wszystkich zastosowanych warunkach.
- Możliwe pary kanoniczne i niekanoniczne we wszystkich vRNA segmentu 8 wirusa grypy dostępnych w bazie danych *NCBI* na podstawie struktury CM-vRNA8.
- Możliwe pary kanoniczne i niekanoniczne we wszystkich vRNA segmentu 8 wirusa grypy dostępnych w bazie danych *NCBI* na podstawie struktury CMC-vRNA8.

**Tabela 22.** Uśrednione wyniki hybrydyzacji vRNA8 do mikromacierzy izoenergetycznej we wszystkich zastosowanych warunkach. Miejsce silnego wiązania sondy mikromacierzowej > 33,3% (kolor czerwony); średnie wiązanie 11,1-33,3% (kolor zielony); słabe wiązanie 3,7-11,1% (niebieski kolor). W sekwencji sondy: czerwonym kolorem oznaczono reszty nukleotydydowe typu LNA, czarnym 2'-O-metylowane, a niebieskim dodatkową resztę LNA G. Literą D oznaczono 2,6-diaminopurytorybozyd.

Miejsce wiązania w cząsteczce vRNA8	Sekwencja sondy	300mM NaCl, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 50mM HEPES pH 7.5, 4°C	300 mM KCl, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 50mM HEPES pH 7.5, 4°C	1M NaCl, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 50mM HEPES pH 7.5, 4°C	1M KCl, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 50mM HEPES pH 7.5, 4°C	300mM NaCl, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 50mM HEPES pH 7.5, RT	300 mM KCl, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 50mM HEPES pH 7.5, RT	1M NaCl, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 50mM HEPES pH 7.5, RT	1M KCl, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 50mM HEPES pH 7.5, RT	300mM NaCl, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 50mM HEPES pH 7.5, 37°C	300 mM KCl, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 50mM HEPES pH 7.5, 37°C	1M NaCl, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 50mM HEPES pH 7.5, 37°C	1M KCl, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 50mM HEPES pH 7.5, 37°C
3	CUDCUG												
4	UCUDCG												
11 (752)	CCUUGG												
12 (522)	CCCUUG												
13 (436)	ACCCUG	6,29%	8,00%			4,43%	6,88%	3,93%	6,53%	19,05%	8,60%	5,70%	17,09%
14	CDCCC											3,98%	4,32%
15	DCDCC												
16 (295, 706, 838)	DDCDG	8,60%			11,95%			5,99%				3,76%	
17 (118, 251, 684, 854)	DDDCG	20,04%	62,77%	8,71%	7,71%	18,32%	40,44%	19,59%	5,28%	23,87%	12,31%	19,77%	12,97%
18 (119, 487, 855)	DDDCG	6,30%	9,71%		5,54%	3,86%		4,41%					
23 (55, 103, 298, 490, 628)	GDUDDG	14,17%	4,31%	4,96%		11,05%	8,95%						
24 (299, 629)	UGDUDG	24,49%	57,53%	27,89%	8,32%	7,06%	5,80%	31,52%	17,93%				
27 (495, 849)	UDDUGG	22,56%	3,88%	20,13%		6,34%	7,94%	29,37%					
34	GCUUDG												
35 (114, 419, 826)	DGCUUG												
36 (115, 681)	CDGCUG												



37	UCDGCG												
38 (463, 822)	UUCDGG	12,98%	22,15%	20,14%	4,59%			4,76%	4,19%			20,62%	
43	CUCGUG												
44 (581)	UCUCGG											30,00%	
45 (371)	UUCUCG												9,33%
46 (372)	CUUCUG												
47 (373)	CCUUCG												
48 (87)	GCCUUG												
49 (88)	AGCCUG												
50	GDGCC												
51 (421)	DGDGCG	27,17%	15,04%	7,02%		21,60%	21,94%	12,47%					6,02%
52 (59, 713, 719)	DDGDGG	64,72%	67,57%	57,48%	69,05%	75,10%	65,08%	62,14%	53,67%	48,37%	24,57%	50,46%	20,68%
53 (143, 720)	UDDGDG	34,51%	4,18%	18,86%		26,76%	28,17%	56,03%		6,15%		12,96%	5,42%
54 (165, 627)	DUDDGG	9,37%	19,31%	5,42%	5,55%	8,40%	10,54%	8,58%					
55 (23, 103, 298, 490, 628)	GDUDDG	14,17%	4,31%	4,96%		11,05%	8,95%						
56 (104, 660)	DGDUDG	21,47%	18,44%	9,46%	4,76%	27,75%	5,63%	16,92%	9,34%				
57 (266, 735)	GDGDUG	48,57%	34,26%	17,81%	9,10%	19,14%	40,07%	33,47%	7,86%		10,16%	18,95%	14,71%
58 (267)	DGDGDG	33,36%	86,33%	20,29%	6,22%	37,44%	94,81%	13,02%	6,26%	23,93%	10,60%	44,95%	19,94%
59 (52, 713, 719)	DDGDGG	64,72%	67,57%	57,48%	69,05%	75,10%	65,08%	62,14%	53,67%	48,37%	24,57%	50,46%	20,68%
60 (775)	CDDGDG	16,68%	54,55%	10,37%		30,62%	24,19%	6,82%		19,66%	9,13%	12,79%	24,96%
61 (91)	GCDGCG	11,57%	5,09%	8,44%		4,73%	5,96%	12,16%				5,06%	
62 (401, 470, 873)	DGCDDG	9,06%				16,89%		8,87%					
63 (402)	GDGCDG	17,68%		9,86%	5,10%	16,45%	24,51%	35,75%			4,35%	7,26%	6,21%
64 (403, 653)	GGDGC	5,90%											
65 (256, 642, 654)	UGGDGG	32,21%	76,47%	44,19%	14,01%	24,94%	42,28%	22,84%	73,50%				
66 (655)	GUGGDG	79,58%	67,07%	46,28%	20,44%	77,00%	76,73%	67,23%	17,49%	3,86%		9,06%	9,54%
67 (533, 656)	DGUGGG	15,35%	63,93%	15,45%	4,15%	23,50%	35,56%	5,26%	0,79%				-3,68%
68 (534)	DDGUGG	37,82%	79,94%	16,23%	5,97%	26,24%	69,62%	10,46%	6,31%	44,49%	24,13%	57,32%	60,00%

69 (147, 178, 728)	GDDGUG	17,00%	8,90%	21,05%	3,81%	6,99%	19,13%	5,93%	3,64%	72,41%	51,06%	50,13%	98,21%
70 (151, 172)	UGDDGG	65,28%	86,21%	21,39%	59,24%	21,37%	32,82%	40,14%	49,23%	8,70%		27,67%	18,06%
72 (310, 751)	CUUGDG									4,61%			
73 (259)	GCUUGG	6,14%			8,03%			4,14%					
74 (811)	UGCUUG												
75 (812)	CUGCUG												
76 (813)	DCUGCG												
77 (356)	UDCUGG	10,79%		7,90%									
78 (427, 678)	CUDCUG												
79 (428)	DCUDCG												
80 (275)	DDCUAG									22,41%			
81	CDDCUG												
82	DCDDCG	7,44%											
83	UDCDDG	13,79%	9,07%		15,71%	9,11%	3,87%	6,55%					
87 (48)	GCCUUG												
88 (49)	AGCCUG												
89	DDGCC												
90 (542, 828)	CDDGCG												
91 (61)	GCDDGG	11,57%	5,09%	8,44%		4,73%	5,96%	12,16%				5,06%	
92 (335)	UGCDDG												
93 (336)	DUGCDDG												
94	UDUGCG			4,98%									
99	DCGUUG												
100	DDCGUG												
101	UDDCGG												
102 (297)	DUDDCG												
103 (23, 55, 298, 490, 628)	GDUDDG	14,17%	4,31%	4,96%		11,05%	8,95%						
104 (56, 660)	DGDUDG	21,47%	18,44%	9,46%	4,76%	27,75%	5,63%	16,92%	9,34%				

105 (661)	CDGDUG		5,54%										
106 (123, 269, 412)	DCDGDG	46,18%	70,92%	12,94%		42,61%	81,01%	17,02%	6,47%	47,72%	10,51%	32,43%	31,69%
107 (117, 250, 683)	DDCDGG	69,56%	70,81%	30,11%	85,56%	75,76%	74,60%	77,58%	57,77%	26,61%	5,36%	14,68%	12,80%
108 (192)	GDDCDG	17,41%	5,05%	4,06%		11,73%	18,39%	6,14%		11,26%	10,36%	19,54%	20,09%
109	CGDDCG	6,89%	3,82%			4,62%		5,54%					
110 (579, 687)	UCGDAG												
111 (288)	UUCGDG										8,42%		6,93%
112 (742)	CUUCGG												
113 (607, 743)	GCUUCG												
114 (35, 419, 826)	DGCUUG												
115 (36, 681)	CDGCUG												
116 (682)	DCDGC	9,62%	5,94%		5,18%								
117 (107, 250, 683)	DDCDGG	69,56%	70,81%	30,11%	85,56%	75,76%	74,60%	77,58%	57,77%	26,61%	5,36%	14,68%	12,80%
118 (17, 251, 684, 854)	DDDCDG	20,04%	62,77%	8,71%	7,71%	18,32%	40,44%	19,59%	5,28%	23,87%	12,31%	19,77%	12,97%
119 (18, 487, 855)	DDDDCG	6,30%	9,71%		5,54%	3,86%		4,41%					
120 (130)	GDDDDG	23,50%	6,63%			11,84%	5,66%	22,11%				5,75%	
121 (169, 210, 253, 389, 537, 575)	DGDDDG	41,36%	87,54%	21,53%	4,19%	46,33%	66,81%	14,12%	6,29%	23,02%	10,85%	23,66%	19,43%
122 (180, 211, 411, 538, 730)	CDGDDG	20,73%	34,30%	8,65%	17,63%	25,21%	29,84%	34,12%	9,61%	16,14%	9,60%	22,12%	11,95%
123 (106, 269, 412)	DCDGDG	46,18%	70,92%	12,94%		42,61%	81,01%	17,02%	6,47%	47,72%	10,51%	32,43%	31,69%
124 (270)	UDCDGG	11,24%		12,40%		8,09%	7,30%	28,18%					
130 (120)	GDDDDG	23,50%	6,63%			11,84%	5,66%	22,11%				5,75%	
131 (278, 474)	UGDDDG	57,96%	79,96%	24,64%	10,57%	26,56%	17,39%	45,24%	23,76%	7,56%		8,38%	9,01%
134 (154)	GDUUGG	48,88%	10,78%	16,57%		6,36%	36,36%	20,76%					
135 (265)	DGDUUG	3,92%											
137	DUDGDG	24,96%	21,60%	9,47%	58,97%	31,90%	32,24%	27,29%	8,47%	4,97%		12,48%	
138	CDUDGG												
139 (360, 852)	DCDUDG												
140 (360, 589, 691)	GDCDUG												

141	DGDCDG	28,08%	13,44%	14,90%	2,80%	36,03%	37,91%	15,96%	2,37%	20,72%	13,36%	38,80%	26,28%
142	DDGDCG	32,11%	63,97%	13,23%	20,74%	30,55%	56,07%	30,56%	8,23%	49,13%	20,59%	22,96%	21,77%
143 (53, 720)	UDDGDG	34,51%	4,18%	18,86%		26,76%	28,17%	56,03%		6,15%		12,96%	5,42%
144	GUDDGG	17,74%	12,05%	5,47%				9,09%				4,18%	8,04%
145	DGUDDG	10,64%		6,48%				11,86%					4,17%
146	DDGUDG	36,46%	45,67%	8,70%	3,39%	33,83%	17,96%	15,73%	4,44%	9,38%	4,21%	7,28%	9,32%
147 (69, 178, 728)	GDDGUG	17,00%	8,90%	21,05%	3,81%	6,99%	19,13%	5,93%	3,64%	72,41%	51,06%	50,13%	98,21%
148 (179, 407, 410, 729)	DGDDGG	93,99%	90,97%	30,35%	17,91%	99,77%	99,24%	32,89%	99,57%	49,67%	15,47%	8,07%	42,66%
149 (170, 408, 576, 774)	DDGDDG	28,11%	77,77%	14,39%	12,34%	21,17%	73,23%	17,32%	10,20%	100,00%	63,73%	97,61%	82,78%
150 (171, 409, 577, 714)	GDDGDG	59,12%	11,16%	13,47%	8,16%	39,82%	34,49%	33,20%	10,63%	62,99%	38,39%	82,15%	53,81%
151 (70, 172)	UGDDGG	65,28%	86,21%	21,39%	59,24%	21,37%	32,82%	40,14%	49,23%	8,70%		27,67%	18,06%
154 (134)	GDUUGG	48,88%	10,78%	16,57%		6,36%	36,36%	20,76%					
156 (630)	CUGDUG	8,23%	5,05%	4,12%	5,92%								
157	GCUGDG												
158	GGCUG												
159	UGGCUG		14,22%										21,60%
157 (532)	GUGGC	5,38%		12,57%									
161	GGUGG	8,91%		5,95%									
162	AGGUGG	43,99%	66,10%	31,40%	19,13%	51,02%	41,45%	39,26%	38,80%	4,09%			7,20%
163	DDGGUG	26,12%	72,83%	11,01%		22,47%	7,14%	7,97%	3,78%	44,70%	14,97%	27,21%	43,57%
164 (626)	UDDGGG	17,78%		7,99%		20,15%	9,80%	34,94%					
165 (54, 627)	DUDDGG	9,37%	19,31%	5,42%	5,55%	8,40%	10,54%	8,58%					
169 (121, 210, 253, 389, 537, 575)	DGDDDG	41,36%	87,54%	21,53%	4,19%	46,33%	66,81%	14,12%	6,29%	23,02%	10,85%	23,66%	19,43%
170 (149, 408, 576, 774)	DDGDDG	28,11%	77,77%	14,39%	12,34%	21,17%	73,23%	17,32%	10,20%	100,00%	63,73%	97,61%	82,78%
171 (150, 409, 577, 714)	GDDGDG	59,12%	11,16%	13,47%	8,16%	39,82%	34,49%	33,20%	10,63%	62,99%	38,39%	82,15%	53,81%
172 (70, 151)	UGDDGG	65,28%	86,21%	21,39%	59,24%	21,37%	32,82%	40,14%	49,23%	8,70%		27,67%	18,06%
178 (69, 147, 728)	GDDGUG	17,00%	8,90%	21,05%	3,81%	6,99%	19,13%	5,93%		72,41%	51,06%	50,13%	98,21%
179 (148, 407, 410, 729)	DGDDGG	93,99%	90,97%	30,35%	17,91%	99,77%	99,24%	32,89%	99,57%	49,67%	15,47%	8,07%	42,66%

180 (122, 211, 411, 538, 730)	CDGDDG	20,73%	34,30%	8,65%	17,63%	25,21%	29,84%	34,12%	9,61%	16,14%	9,60%	22,12%	11,95%
181 (212, 731)	UCDGDG	6,76%	30,45%	4,19%			5,73%	10,33%	12,08%			4,38%	5,46%
182	GUCDGG	31,59%		15,31%		5,60%	21,19%	18,58%					
183 (284)	DGUCDG												
184 (285, 634)	GDGUCG												
185	UGDGUG	19,99%	30,67%	50,29%	12,63%			3,76%	7,01%				
186	UUGDGG	28,75%	38,43%	24,72%	5,55%	4,06%	5,52%	23,17%	8,24%				
190	DCDDUG												
191	DDCDDG	10,22%	17,27%	4,09%	5,47%	8,13%		7,98%					
192 (108)	GDDCDG	17,41%	5,05%	4,06%		11,73%	18,39%	6,14%		11,26%	10,36%	19,54%	20,09%
193 (773)	DGDDCG	9,10%	12,14%			13,94%						4,01%	2,23%
194 (254, 390)	GDGDDG	64,56%	18,13%	26,55%	6,63%	37,75%	70,28%	31,04%	6,47%	26,59%	14,66%	57,22%	34,89%
195 (736)	CGDGDG	59,77%	16,00%	31,39%	9,12%	43,30%	76,68%	42,95%	3,84%	7,89%	10,96%	43,99%	17,94%
196	GCGDG												
197	GGCGA												
198 (329)	UGGCG	10,14%	5,09%	5,65%									22,05%
199	AUGGCG	8,39%	13,03%	3,77%	8,99%			8,81%					
200 (306, 494, 509, 848)	DDUGGG	22,91%	45,86%	9,93%		21,42%	21,07%	5,73%	4,03%			5,58%	
201 (338, 510, 573, 615)	DDDUGG	19,76%	53,61%	12,64%	11,74%	31,49%	53,31%	21,83%	7,69%	4,33%	4,14%	18,10%	5,62%
203	GUDDDG	18,66%		10,11%		3,82%		7,92%					
204	GGUDDG	31,06%	6,75%	12,89%		4,13%		13,22%					4,47%
205	CGGUDG							3,87%					
206	DCGGUG		4,43%										
207	DDCGGG	10,97%	11,04%	6,51%		12,16%		5,41%					
208 (790)	DDDCGG	47,00%	55,92%	28,23%	84,73%	32,86%	34,67%	57,53%	25,14%	10,29%	5,17%	3,71%	4,45%
209 (252, 277, 439, 685)	GDDDCG	11,63%					3,70%	14,25%				3,93%	5,98%
210 (121, 169, 253, 389, 537, 575)	DGDDDG	41,36%	87,54%	21,53%	4,19%	46,33%	66,81%	14,12%	6,29%	23,02%	10,85%	23,66%	19,43%

211 (122, 180, 411, 538, 730)	CDGDDG	20,73%	34,30%	8,65%	17,63%	25,21%	29,84%	34,12%	9,61%	16,14%	9,60%	22,12%	11,95%
212 (181, 731)	UCDGDG	6,76%	30,45%	4,19%			5,73%	10,33%	12,08%			4,38%	5,46%
213 (732)	DUCDGG	6,09%											
214	DDUCDG												
215 (387)	DDDUCG												
216	CDDDUG												
217	CCDDDG	17,80%				4,25%		5,16%					
218 (841)	UCCDDG												
219	CUCCDG												
220	CCUCC						14,09%						
221	CCCUC												
222 (523, 724)	UCCUG									3,81%			7,37%
223	CUCCC												
224	DCUCCG												
225 (704)	CDCUCG												
226	CCDCUG												
227	UCCDCG												
228 (366, 842)	UUCCDG												
229 (367)	CUUCCG												
230 (465)	DCUUCG												
231 (312)	GDCUUG												
232 (815)	DGDCUG												
233	GDGDCG	27,17%	58,72%	7,73%	10,57%	8,51%	14,91%	26,58%	18,71%	6,47%	3,84%	14,93%	13,99%
234 (255, 391)	GGDGAG	58,19%	84,16%	18,25%	23,20%	43,71%	58,75%	52,60%	56,80%			4,72%	5,54%
235 (392, 636)	GGGDG	39,78%		28,04%		32,97%	13,42%	45,36%					
236 (393)	UGGAG	54,27%	46,42%	53,70%	13,11%	31,71%	14,13%	53,53%	23,52%				
237	AUGGGG				34,24%								
238	GDUGGG	55,64%	33,56%	20,12%	7,14%	40,88%	17,41%	39,57%	9,72%				

239 (347)	GGDUGG	39,67%	17,52%	13,69%	11,74%	7,58%	10,51%	17,17%	8,82%				4,27%
240 (348)	DGGDUG	34,08%	34,43%	14,15%	3,80%	39,50%	28,92%	22,63%					
241 (315, 349, 717)	GDGGA	40,96%	10,08%	16,94%		5,18%	9,11%	20,91%					
242 (350)	UGDGGG	31,77%	41,52%	76,98%	27,67%	17,38%	18,90%	23,59%	18,75%				
243	DUGDGG	50,06%	61,51%	10,11%	22,83%	35,80%	54,57%	30,56%	21,14%			23,65%	10,26%
244	GDUGDG	29,03%	7,59%	12,41%		7,57%	30,41%	30,58%				11,15%	3,72%
245 (764)	UGDUGG	63,81%	82,31%	35,17%	9,12%	6,15%	12,64%	27,07%	25,83%			5,27%	4,59%
246 (457, 765)	GUGDUG	13,45%	10,85%	6,24%								9,79%	
247	DGUGDG	15,01%	15,01%	7,00%		10,43%	9,19%	8,88%				7,64%	
248 (461)	CDGUGG	4,32%	6,72%										
249 (292)	DCDGUG												
250 (107, 117, 683)	DDCDGG	69,56%	70,81%	30,11%	85,56%	75,76%	74,60%	77,58%	57,77%	26,61%	5,36%	14,68%	12,80%
251 (17, 118, 684, 854)	DDDCDG	20,04%	62,77%	8,71%	7,71%	18,32%	40,44%	19,59%	5,28%	23,87%	12,31%	19,77%	12,97%
252 (209, 277, 439, 685)	GDDDCG	11,63%					3,70%	14,25%				3,93%	5,98%
253 (121, 169, 210, 389, 537, 575)	DGDDDG	41,36%	87,54%	21,53%	4,19%	46,33%	66,81%	14,12%	6,29%	23,02%	10,85%	23,66%	19,43%
254 (194, 390)	GDGDDG	64,56%	18,13%	26,55%	6,63%	37,75%	70,28%	31,04%	6,47%	26,59%	14,66%	57,22%	34,89%
255 (234, 391)	GGDGAG	58,19%	84,16%	18,25%	23,20%	43,71%	58,75%	52,60%	56,80%			4,72%	5,54%
256 (65, 642, 654)	UGGDGG	32,21%	76,47%	44,19%	14,01%	24,94%	42,28%	22,84%	73,50%				
257 (442)	UUGGDG	69,63%	99,83%	85,58%	35,49%	50,31%	38,32%	62,63%	90,76%				7,78%
258 (700)	CUUGGG												
259 (73)	GCUUGG	6,14%			8,03%			4,14%					
260	CGCUUG												
261	UCGCUG		5,43%	3,80%									
262 (741)	UUCGCG												
263	DUUCGG												
264 (647, 844)	GDUUCG												
265 (135)	DGDUUG	3,92%											
266 (57, 735)	GDGDUG	48,57%	34,26%	17,81%	9,10%	19,14%	40,07%	33,47%	7,86%	2,71%	10,16%	18,95%	14,71%

267 (58)	DGDGDG	33,36%	86,33%	20,29%	6,22%	37,44%	94,81%	13,02%	6,26%	23,93%	10,60%	44,95%	19,94%
268	CDGDGG	65,55%	81,43%	25,41%	13,80%	66,23%	90,87%	34,82%	18,69%	12,39%		7,28%	5,67%
269 (106, 123, 412)	DCDGDG	46,18%	70,92%	12,94%		42,61%	81,01%	17,02%	6,47%	47,72%	10,51%	32,43%	31,69%
270 (124)	UDCDGG	11,24%		12,40%		8,09%	7,30%	28,18%					
271	DUDCDG		5,38%		10,57%			4,70%		3,79%			
274	DCUDUG												
275 (80)	DDCUAG									22,41%			
276 (467)	DDDCUG	4,90%	5,23%										
277 (209, 252, 439, 685)	GDDDCG	11,63%					3,70%	14,25%				3,93%	5,98%
278 (131, 474)	UGDDDG	57,96%	79,96%	24,64%	10,57%	26,56%	17,39%	45,24%	23,76%	7,56%		8,38%	9,01%
280 (592)	DCUGDG												
281 (836)	CDCUGG												
282	UCDCUG												
283	GUCDCG												
284 (183)	DGUCDG												
285 (184, 634)	GDGUCG												
286	CGDGUG	6,16%	5,17%	4,42%		5,16%							
287	UCGDGG		6,38%										
288 (111)	UUCGDG										8,42%		6,93%
289	GUUCGG												
290	DGUUCG												
292 (249)	DCDGUG												
293 (413)	CDCDGG	23,19%	36,06%	8,25%		18,11%	7,06%	7,21%					
294	DCDCDG	8,27%			7,46%	4,06%		7,11%					
295 (16, 706, 838)	DDCDCG	8,60%			11,95%			5,99%				3,76%	
296	UDDCDG	12,65%	5,65%	12,76%		8,31%	4,29%	36,77%				14,14%	
297 (102)	DUDDCG												
298 (23, 55, 103, 490, 628)	GDUDDG	14,17%	4,31%	4,96%		11,05%	8,95%						



299 (24, 629)	UGDUDG	24,49%	57,53%	27,89%	8,32%	7,06%	5,80%	31,52%	17,93%				
302 (307)	GDDUGG	27,12%	14,72%	12,74%		14,97%	21,26%	5,92%	5,63%	3,79%		7,26%	7,89%
303	GGDDUG	53,87%	78,81%	18,64%	29,00%	8,75%	19,34%	26,58%	23,94%		48,68%	7,60%	12,11%
304 (441)	UGGDDG	100,00%	95,12%	52,05%	16,88%	58,04%	44,39%	95,04%	69,25%			7,49%	9,51%
305 (493, 508, 847)	DUGGDG	41,07%	83,92%	16,39%	16,22%	33,06%	87,95%	23,44%	11,93%			12,58%	3,94%
306 (200, 494, 509, 848)	DDUGGG	22,91%	45,86%	9,93%		21,42%	21,07%	5,73%	4,03%			5,58%	
307 (302)	GDDUGG	27,12%	14,72%	12,74%		14,97%	21,26%	5,92%	5,63%	3,79%		7,26%	7,89%
308	UGDDUG	12,81%	11,19%	4,62%				4,88%					
310 (72, 751)	CUUGDG									4,61%			
312 (231)	GDCUUG												
313 (563)	GGACUG												
314 (362)	DGGDC	6,63%				5,29%		4,38%					
315 (241, 349, 717)	GDGGA	40,96%	10,08%	16,94%		5,18%	9,11%	20,91%					
316 (641)	GGDGG	22,39%	7,56%	24,06%	18,01%	10,31%	9,46%	19,96%					
317	CGGDG	18,50%	46,68%	4,64%	21,38%	11,33%	14,98%	21,55%	16,14%				
318	UCGGDG	9,97%	39,82%	6,42%	4,38%		4,88%	4,65%	7,45%				
319	DUCGGG												
320 (689)	CDUCGG												
321	UCDUCG												
322 (550)	CUCDUG												
323	CCUCDG												
324	UCCUCG												
325	GUCCUG												
326	CGUCCG												
327	GCGUC												
328	GGCGUG												
329 (198)	UGGCG	10,14%	5,09%	5,65%				1,15%					22,05%
330 (803)	UUGGCG	44,95%	63,06%	74,29%	11,76%	6,34%		14,33%				39,58%	16,04%
331	DUUGGG	41,91%	7,51%	21,54%	31,01%	35,93%		35,72%					

334 (400, 499)	G <b>C</b> DDUG												
335 (92)	UG <b>C</b> DDG												
336 (93)	DUG <b>C</b> DG												
337 (614)	DDUG <b>C</b> G	4,37%											
338 (201, 510, 573, 615)	DDDUG <b>G</b>	19,76%	53,61%	12,64%	11,74%	31,49%	53,31%	21,83%	7,69%	4,33%	4,14%	18,10%	5,62%
341 (512, 857, 871)	CDDDD <b>G</b>	9,86%	7,29%			6,19%		5,13%					
342 (513)	UCDDDD <b>G</b>		5,17%										
343 (569, 830)	GUCDD <b>D</b> G												
344 (570, 831)	UGUCD <b>G</b>												
345 (571, 798)	DUGUC <b>G</b>												
346	GDUG <b>U</b> G	4,36%											
347 (239)	GGDUG <b>G</b>	39,67%	17,52%	13,69%	11,74%	7,58%	10,51%	17,17%	8,82%				4,27%
348 (240)	DGGD <b>U</b> G	34,08%	34,43%	14,15%	3,80%	39,50%	28,92%	22,63%					
349 (241, 315, 717)	GDG <b>G</b> A	40,96%	10,08%	16,94%		5,18%	9,11%	20,91%					
350 (242)	UGD <b>G</b> GG	31,77%	41,52%	76,98%	27,67%	17,38%	18,90%	23,59%	18,75%				
351	GUGD <b>G</b> G	27,06%	18,01%	31,19%	10,48%	14,84%	27,21%	23,41%	7,19%				
352 (766, 862)	GGUGD <b>G</b>	55,99%	10,57%	51,77%	7,26%	28,61%	9,75%	10,03%	7,31%				4,10%
353	UGG <b>U</b> GG	16,47%	17,87%	22,51%	7,98%		20,59%	4,17%					
354 (560)	CUG <b>G</b> UG			7,87%									
355 (561, 770)	DCUG <b>G</b> G	8,89%	10,49%	3,18%		4,39%							
356 (77)	UDC <b>U</b> GG	10,79%		7,90%									
358	CDUD <b>C</b> G												
359 (139, 852)	DCDUD <b>G</b>												
360 (140, 589, 691)	GDCD <b>U</b> G												
361 (692)	GGD <b>C</b> DG	24,90%	5,77%		4,80%	11,87%		34,01%					
362 (314)	DGG <b>D</b> C	6,63%				5,29%		4,38%					
363 (669)	CDG <b>G</b> AG	33,26%	52,54%	15,23%		46,56%	34,62%	13,74%	4,94%	4,81%	4,11%	6,18%	5,46%
364 (503)	CCD <b>G</b> G												
365	UCCD <b>G</b> G												

366 (228, 842)	UUCDDG												
367 (229)	CUUCCG												
368	UCUUCG												
370	UCUCUG												
371 (45)	UUCUCG												9,33%
372 (46)	CUUCUG												
373 (47)	CCUUCG												
374	DCCUUG												
375 (598)	UDCCUG												3,79%
376	UUDCCG												16,20%
379 (757)	CCDUUG												
380 (484)	DCCDUG												
381	CDCCAG												
382	UCDCC												
383	CUCDCG												
384	UCUCDG												
385	DUCUCG												
387 (215)	DDUCG												
389 (121, 169, 210, 253, 537, 575)	DGDDDG	41,36%	87,54%	21,53%	4,19%	46,33%	66,81%	14,12%	6,29%	23,02%	10,85%	23,66%	19,43%
390 (194, 254)	GDGDDG	64,56%	18,13%	26,55%	6,63%	37,75%	70,28%	31,04%	6,47%	26,59%	14,66%	57,22%	34,89%
391 (234, 255)	GGDGAG	58,19%	84,16%	18,25%	23,20%	43,71%	58,75%	52,60%	56,80%			4,72%	5,54%
392 (235, 636)	GGGDG	39,78%		28,04%		32,97%	13,42%	45,36%					
393 (236)	UGGAG	54,27%	46,42%	53,70%	13,11%	31,71%	14,13%	53,53%	23,52%				
394	GUGGG	42,63%		28,76%		26,62%	11,25%	39,19%					
395	CGUGGG	28,94%	6,10%	24,10%		7,76%	7,04%	7,29%					
396	UCGUGG		4,62%		7,51%								
397	DUCGUG												10,40%
398	DDUCGG												

399	CDDUCG													
400 (334, 499)	GCDDUG													
401 (62, 470, 873)	DGCDDG	9,06%				16,89%		8,87%						
402 (63)	GDGCDG	17,68%		9,86%	5,10%	16,45%	24,51%	35,75%				4,35%	7,26%	6,21%
403 (64, 653)	GGDGC	5,90%												
404	DGGDG	34,25%	75,51%	9,88%	21,44%	35,99%	48,02%	39,80%	23,94%				4,91%	
405	DDGGDG	44,62%	36,67%	21,93%	13,30%	46,45%	95,75%	23,19%	11,52%	13,02%	11,74%	50,98%	20,62%	
406	GDAGGG	21,15%	6,75%	17,22%		20,51%	23,25%	35,65%						
407 (148, 179, 410, 729)	DGDDGG	93,99%	90,97%	30,35%	17,91%	99,77%	99,24%	32,89%	99,57%	49,67%	15,47%	8,07%	42,66%	
408 (149, 170, 576, 774)	DDGDDG	28,11%	77,77%	14,39%	12,34%	21,17%	73,23%	17,32%	10,20%	100,00%	63,73%	97,61%	82,78%	
409 (150, 171, 577, 714)	GDDGDG	59,12%	11,16%	13,47%	8,16%	39,82%	34,49%	33,20%	10,63%	62,99%	38,39%	82,15%	53,81%	
410 (148, 179, 407, 729)	DGDDGG	93,99%	90,97%	30,35%	17,91%	99,77%	99,24%	32,89%	99,57%	49,67%	15,47%	8,07%	42,66%	
411 (122, 180, 211, 538, 730)	CDGDDG	20,73%	34,30%	8,65%	17,63%	25,21%	29,84%	34,12%	9,61%	16,14%	9,60%	22,12%	11,95%	
412 (106, 123, 269)	DCDGDG	46,18%	70,92%	12,94%		42,61%	81,01%	17,02%	6,47%	47,72%	10,51%	32,43%	31,69%	
413 (293)	CDCDGG	23,19%	36,06%	8,25%		18,11%	7,06%	7,21%						
414	UCDCDG		4,43%	18,17%										
415 (605)	UUCDCG													37,31%
419 (35, 114, 826)	DGCUUG													
420	GDGUG													
421 (51)	DGDGCG	27,17%	15,04%	7,02%		21,60%	21,94%	12,47%						6,02%
422	UDGDGG	71,88%	89,53%	100,00%	69,47%	80,57%	69,81%	86,93%	47,63%					
427 (78, 678)	CUUCUG													
428 (79)	DCUDCG													
434 (596, 722)	CCUDDG													
435 (723)	CCCUAG													
436 (13)	ACCCUG	6,29%	8,00%			4,43%	6,88%	3,93%	6,53%	19,05%	8,60%	5,70%	17,09%	
437	DDCCC													
438 (486)	DDDCCG	9,20%				12,42%								

439 (209, 252, 277, 685)	GDDDCG	11,63%					3,70%	14,25%				3,93%	5,98%
440 (667)	GGDDDG	62,73%	19,95%	62,79%	39,61%	53,10%	70,14%	35,37%	13,64%		7,05%	7,03%	7,65%
441 (304)	UGGDDG	100,00%	95,12%	52,05%	16,88%	58,04%	44,39%	95,04%	69,25%			7,49%	9,51%
442 (257)	UUGGDG	69,63%	99,83%	85,58%	35,49%	50,31%	38,32%	62,63%	90,76%				7,78%
443	GUUGGG	36,92%		20,23%		11,85%		19,95%					
444	GGUUGG	35,52%	4,58%	20,63%		8,69%	8,34%	18,62%					
445	CGGUUG												
446	CCGGU												
447 (747)	ACCGG												
448 (748)	GDCCG												
449 (749)	UGACCG												
450 (750)	UUGDCG	5,32%	5,36%	7,60%									
452	UUUUGG			11,08%									
457 (246, 765)	GUGDUG	13,45%	10,85%	6,24%								9,79%	
458	UGUGDG	41,47%	67,29%	72,73%	18,23%			18,94%	17,32%				
459	GUGUGG	85,93%	71,86%	69,23%	24,00%	7,46%	15,98%	35,93%	13,49%				5,80%
460	DGUGUG	14,31%	36,37%	7,89%	8,19%	6,52%		7,34%					
461 (248)	CDGUGG	4,32%	6,72%										
462	UCDGUG										19,62%		
463 (38, 822)	UUCDGG	12,98%	22,15%	20,14%	4,59%			4,76%	4,19%			20,62%	
464 (606)	CUUCDG												
465 (230)	DCUUCG												
466	DDCUUG												
467 (276)	DDDCUG	4,90%	5,23%										
468 (791)	CDDDCG												
469 (792, 872)	GCDDDG							4,62%					
470 (62, 401, 873)	DGCDDG	9,06%				16,89%		8,87%					
471 (541, 664, 868)	DDGCDG	11,02%	22,83%	5,92%		12,14%	18,96%			10,64%	5,51%	11,05%	13,76%
472 (665, 869)	DDDGCG		10,19%										

473 (536, 666)	GDDDG	31,55%	7,49%	29,90%	6,01%	22,79%	16,50%	10,63%	5,84%	5,74%		7,94%	4,89%
474 (131, 278)	UGDDG	57,96%	79,96%	24,64%	10,57%	26,56%	17,39%	45,24%	23,76%	7,56%		8,38%	9,01%
480	UCDUDG												
481	-												
482 (515)	CDUCDG												
483	CCDUCG												
484 (380)	DCCDUG												
485	DDCCDG												
486 (438)	DDCCG	9,20%			12,42%								
487 (18, 119, 855)	DDDCG	6,30%	9,71%		5,54%	3,86%		4,41%					
490 (23, 55, 103, 298, 628)	GDUDDG	14,17%	4,31%	4,96%		11,05%	8,95%						
491	GGDUDG	69,51%	79,91%	21,80%	41,62%	42,87%	41,53%	46,04%	29,80%				
492 (846)	UGGDUG	64,53%	80,17%	61,53%	20,94%	7,46%	7,81%	35,61%	23,25%				
493 (305, 508, 847)	DUGGDG	41,07%	83,92%	16,39%	16,22%	33,06%	87,95%	23,44%	11,93%			12,58%	3,94%
494 (200, 306, 509, 848)	DDUGGG	22,91%	45,86%	9,93%		21,42%	21,07%	5,73%	4,03%			5,58%	
495 (27, 849)	UDDUGG	22,56%	3,88%	20,13%		6,34%	7,94%	29,37%					
498	CDDUDG									7,96%			
499 (334, 400)	GCDUG												
500 (709)	GGCDDG	9,92%		7,54%		7,20%	7,24%	3,79%					
501 (624, 710)	AGGCAG	19,06%	14,63%	6,36%		17,45%	4,04%	11,04%	5,37%				
502	CDGGC	4,38%						6,20%					
503 (364)	CCDGG												
504	DCCDGG												
505 (778)	GDCCAG												
506	GGDCC												
507 (693)	UGGDCG	29,61%	38,66%	17,09%	19,18%	1,29%		15,58%	11,65%		25,17%		16,29%
508 (305, 493, 847)	DUGGDG	41,07%	83,92%	16,39%	16,22%	33,06%	87,95%	23,44%	11,93%			12,58%	3,94%
509 (200, 306, 494, 848)	DDUGGG	22,91%	45,86%	9,93%		21,42%	21,07%	5,73%	4,03%			5,58%	

510 (201, 338, 573, 615)	DDDU <sup>GG</sup>	19,76%	53,61%	12,64%	11,74%	31,49%	53,31%	21,83%	7,69%	4,33%	4,14%	18,10%	5,62%
512 (341, 857, 871)	CDDDD <sup>G</sup>	9,86%	7,29%			6,19%		5,13%					
513 (342)	UCDDDD <sup>G</sup>		5,17%										
514	DUCDD <sup>DG</sup>												
515 (482)	CDUCD <sup>G</sup>												
516	GCDUC <sup>CG</sup>												
517	UGCDU <sup>G</sup>												
518 (783)	UUGC <sup>DG</sup>												17,25%
519 (784)	UUUGC <sup>CG</sup>												
522 (12)	CCCU <sup>UG</sup>												
523 (212, 724)	UCCC <sup>UG</sup>									3,81%			7,37%
524	UUCCC <sup>G</sup>												13,58%
525	GUUCC <sup>G</sup>												
526 (558)	GGUUC <sup>G</sup>												
527	DGGU <sup>UG</sup>	20,12%	24,03%	3,73%	12,32%			20,26%	4,77%				
528 (820)	CDGG <sup>UG</sup>	13,79%	39,48%	6,22%		12,63%	4,36%	5,62%					
529 (670, 866)	GCDG <sup>GG</sup>	13,95%	8,57%	18,03%				8,37%					
530	GGCD <sup>GG</sup>	14,13%	13,42%	12,92%			5,93%	23,20%	4,14%				
531 (802)	UGGCA												
532 (157)	GUGGC	5,38%		12,57%									
533 (67, 656)	DGUG <sup>GG</sup>	15,35%	63,93%	15,45%	4,15%	23,50%	35,56%	5,26%					
534 (68)	DDGUG <sup>G</sup>	37,82%	79,94%	16,23%	5,97%	26,24%	69,62%	10,46%	6,31%	44,49%	24,13%	57,32%	60,00%
535	DDDG <sup>UG</sup>	15,25%	46,57%		13,77%	19,43%	20,35%	11,94%		12,54%	5,50%		9,04%
536 (473, 666)	GDDDD <sup>G</sup>	31,55%	7,49%	29,90%	6,01%	22,79%	16,50%	10,63%	5,84%	5,74%		7,94%	4,89%
537 (121, 169, 210, 253, 389, 575)	DGDDDD <sup>G</sup>	41,36%	87,54%	21,53%	4,19%	46,33%	66,81%	14,12%	6,29%	23,02%	10,85%	23,66%	19,43%
538 (122, 180, 211, 411, 730)	CDGDD <sup>DG</sup>	20,73%	34,30%	8,65%	17,63%	25,21%	29,84%	34,12%	9,61%	16,14%	9,60%	22,12%	11,95%
539 (662, 781)	GCDGD <sup>DG</sup>	24,97%	10,83%	11,19%	19,29%	16,24%	31,46%	28,03%	6,62%			8,84%	9,24%
540 (663, 867)	AGCD <sup>GG</sup>	25,23%	34,26%	10,31%	8,11%	40,48%	6,44%	21,49%	39,53%			6,34%	

541 (471, 664, 868)	DDGCDG	11,02%	22,83%	5,92%		12,14%	18,96%			10,64%	5,51%	11,05%	13,76%
542 (90, 828)	CDDGCG												
543 (776)	CCDDGG												
544	CCCDA												
545	GCCCA												
546 (761)	UGCCC												
547 (613, 762)	AUGCCG												
548 (554)	CDUGCG												
549 (555)	UCDUGG												
550 (322)	CUCDUG												
551	GCUCDG								5,00%				
552	UGCUCG												
553	DUGCUG												
554 (548)	CDUGCG												
555 (549)	UCDUGG												
557	GUUCDG												
558 (526)	GGUUCG												
559	UGGUUG	13,50%		20,39%									
560 (354)	CUGGUG			7,87%									
561 (355, 770)	DCUGGG	8,89%	10,49%			4,39%							
562 (814)	GDCUGG	7,80%	4,69%	3,71%									
563 (313)	GGACUG												
564	GGGDC	20,61%		23,13%		5,81%		32,58%					
565	AGGGAG	10,77%	6,43%	10,91%	20,24%	6,12%	16,04%	6,34%					
566	DDGGG	10,37%	21,90%	6,49%		9,45%	5,59%						
567	CDDGGG	28,29%	25,00%	13,07%	15,18%	34,40%	11,40%	16,87%	4,79%				
568 (829)	UCDDGG	6,16%	10,05%	14,51%	4,18%			5,41%					
569 (343, 830)	GUCDDG												
570 (344, 831)	UGUCDG												



571 (345, 798)	DUGUCG												
573 (201, 338, 510, 615)	DDDUGG	19,76%	53,61%	12,64%	11,74%	31,49%	53,31%	21,83%	7,69%	4,33%	4,14%	18,10%	5,62%
575 (121, 169, 210, 253, 389, 537)	DGDDDG	41,36%	87,54%	21,53%	4,19%	46,33%	66,81%	14,12%	6,29%	23,02%	10,85%	23,66%	19,43%
576 (149, 170, 408, 774)	DDGDDG	28,11%	77,77%	14,39%	12,34%	21,17%	73,23%	17,32%	10,20%	100,00%	63,73%	97,61%	82,78%
577 (150, 171, 409, 714)	GDDGDG	59,12%	11,16%	13,47%	8,16%	39,82%	34,49%	33,20%	10,63%	62,99%	38,39%	82,15%	53,81%
578	CGDDGG	65,18%	54,92%	24,79%	8,02%	66,41%	39,64%	51,93%	20,21%				
579 (110, 687)	UCGDAG												
580	CUCGDG												
581 (44)	UCUCGG											30,00%	
582	CUCUCG												
583 (703)	DCUCUG												
584	GDCUCG												
585	UGDCUG												
586	DUGDCG		9,52%										
587	CDUGDG												
588	DCDUGG												
589 (140, 360, 691)	GDCDUG												
590 (860)	UGDCDG												
591	CUGDCG												
592 (280)	DCUGDG												
593 (771)	DDCUGG	31,69%	50,45%	17,69%	66,76%	27,66%	23,69%	22,02%	14,33%		12,87%		
594	UDDCUG												
595	CUDDCG												
596 (434, 722)	CCUDDG												
597	DCCUDG												
598 (375)	UDCCUG												3,79%
599	CUDCCG						6,58%					6,24%	
600 (679)	GCUDCG												

601	CGCUDG													
602	DCGCUG													
603	CDCGCG													
604	UCDCGG													
605 (415)	UUCDCG													37,31%
606 (464)	CUUCDG													
607 (113, 743)	GCUUCG													
608 (744)	GVCUUG													
609 (745)	CGGCU													
610 (746)	CCGGC													
611	GCCGG													
612	UGCCG					6,88%								
613 (547, 762)	AUGCCG													
614 (337)	DDUGCG	4,37%												
615 (201, 338, 510, 573)	DDDUGG	19,76%	53,61%	12,64%	11,74%	31,49%	53,31%	21,83%	7,69%	4,33%	4,14%	18,10%	5,62%	
622	GCDCUG													
623	GGDCG													
624 (501, 710)	AGGCAG	19,06%	14,63%	6,36%		17,45%	4,04%	11,04%	5,37%					
625	DDGGC	29,15%	18,46%		16,43%	18,21%		18,76%						
666 (164)	UDDGGG	17,78%		7,99%		20,15%	9,80%	34,94%						
627 (54, 165)	DUDDGG	9,37%	19,31%	5,42%	5,55%	8,40%	10,54%	8,58%						
628 (23, 55, 103, 298, 490)	GDUDDG	14,17%	4,31%	4,96%		11,05%	8,95%							
629 (24, 299)	UGDUDG	24,49%	57,53%	27,89%	8,32%	7,06%	5,80%	31,52%	17,93%					
630 (156)	CUGDUG	8,23%	5,05%	4,12%	5,92%									
631	UCUGDG													5,35%
632 (696)	GUCUGG	21,55%	4,97%	10,07%			11,65%	14,18%						
633	DGUCUG													
634 (184, 285)	GDGUCG													

635	GGDGUG	42,65%	17,89%	31,67%	21,94%	40,63%	59,73%	28,07%	20,06%	6,61%	7,50%	7,46%	15,22%
636 (235, 392)	GGGDG	39,78%		28,04%		32,97%	13,42%	45,36%					
637	GGGGA												
638	GGGGG												
639	AGGGG												
640	GAGGG	16,65%		9,59%		6,61%		4,12%					
641 (316)	GGDGG	22,39%	7,56%	24,06%	18,01%	10,31%	9,46%	19,96%					
642 (65, 256, 654)	UGGDGG	32,21%	76,47%	44,19%	14,01%	24,94%	42,28%	22,84%	73,50%				
643 (694)	CUGGDG	26,01%	9,70%	6,29%	6,31%	9,53%	22,64%	24,25%	10,31%		3,91%		
644 (695)	UCUGGG	12,26%	24,72%	16,57%				4,71%	7,47%				
645	UUCUGG	4,94%		13,19%									
647 (264, 844)	GDUUCG												
648 (845)	GGDUUG	21,76%	4,58%	4,88%				9,13%					
649	CGGDUG	29,24%	11,22%	9,41%	27,90%	7,22%	16,27%	35,23%	7,36%				
650	GCGGA												
651	AGCGG												
652	GDGCG												
653 (64, 403)	GGDGC	5,90%											
654 (65, 256, 642)	UGGDGG	32,21%	76,47%	44,19%	14,01%	24,94%	42,28%	22,84%	73,50%				
655 (66)	GUGGDG	79,58%	67,07%	46,28%	20,44%	77,00%	76,73%	67,23%	17,49%	3,86%		9,06%	9,54%
656 (67, 533)	DGUGGG	15,35%	63,93%	15,45%	4,15%	23,50%	35,56%	5,26%					
657	UDGUGG	31,81%	69,70%	66,72%	29,31%	31,65%	14,92%	40,24%	33,23%				
659	GDUDGG	31,38%	15,78%	12,47%	5,29%	8,55%	6,95%	23,03%					5,25%
660 (56, 104)	DGDUDG	21,47%	18,44%	9,46%	4,76%	27,75%	5,63%	16,92%	9,34%				
661 (105)	CDGDUG		5,54%										
662 (539, 781)	GCDGDG	24,97%	10,83%	11,19%	19,29%	16,24%	31,46%	28,03%	6,62%			8,84%	9,24%
663 (540, 867)	AGCDGG	25,23%	34,26%	10,31%	8,11%	40,48%	6,44%	21,49%	39,53%			6,34%	
664 (471, 541, 868)	DDGCDG	11,02%	22,83%	5,92%		12,14%	18,96%			10,64%	5,51%	11,05%	13,76%
665 (472, 869)	DDDGCG		10,19%										

666 (473, 536)	GDDDG	31,55%	7,49%	29,90%	6,01%	22,79%	16,50%	10,63%	5,84%	5,74%		7,94%	4,89%
667 (440)	GGDDG	62,73%	19,95%	62,79%	39,61%	53,10%	70,14%	35,37%	13,64%		7,05%	7,03%	7,65%
668 (716)	DGGDD	56,42%	17,01%	30,85%	9,38%	59,73%	56,02%	41,57%	4,64%			10,93%	4,91%
669 (363)	CDGGAG	33,26%	52,54%	15,23%		46,56%	34,62%	13,74%	4,94%	4,81%	4,11%	6,18%	5,46%
670 (529, 866)	GCDGG	13,95%	8,57%	18,03%				8,37%					
671	CGCDGG	13,55%	16,08%	3,75%		13,85%	5,98%	7,75%					
672	GCGCA												
673	CGCGC												
674	UCGCGG												
675	CUCGCG												
676	DCUCGG												
677	UDCUCG												
678 (78, 427)	CUDCUG												
679 (600)	GCUDCG												
680	DGCUDG												
681 (36, 115)	CDGCUG												
682 (116)	DCDGC	9,62%	5,94%		5,18%								
683 (107, 117, 250)	DDCDGG	69,56%	70,81%	30,11%	85,56%	75,76%	74,60%	77,58%	57,77%	26,61%	5,36%	14,68%	12,80%
684 (17, 118, 251, 854)	DDDCDG	20,04%	62,77%	8,71%	7,71%	18,32%	40,44%	19,59%	5,28%	23,87%	12,31%	19,77%	12,97%
685 (209, 252, 277, 439)	GDDDCG	11,63%					3,70%	14,25%				3,93%	5,98%
686	CGDDDG	18,12%	4,07%	8,96%		28,40%	9,14%	17,49%					
687 (110, 579)	UCGDAG												
688	DUCGDG												
689 (320)	CDUCGG												
690	DCDUCG												
691 (140, 360, 533)	GDCDUG												
692 (361)	GGDCDG	24,90%	5,77%		4,80%	11,87%		34,01%					
693 (507)	UGDCG	29,61%	38,66%	17,09%	19,18%			15,58%	11,65%		25,17%		16,29%
694 (643)	CUGGDG	26,01%	9,70%	6,29%	6,31%	9,53%	22,64%	24,25%	10,31%		3,91%		

695 (644)	UCUGGG	12,26%	24,72%	16,57%				4,71%	7,47%				
696 (632)	GUCUGG	21,55%	4,97%	10,07%			11,65%	14,18%					
697	GGUCUG												
698	UGGUCG												
699	UUGGUG	19,26%	23,92%	48,78%	7,72%								
700 (258)	CUUGGG												
703 (583)	DCUCUG												
704 (225)	CDCUCG												
705 (837)	DCDCUG												
706 (16, 295, 838)	DDCDG	8,60%			11,95%			5,99%				3,76%	
707 (839)	CDDCDG												
708	GCDDCG												
709 (500)	GGCDDG	9,92%		7,54%		7,20%	7,24%	3,79%					
710 (501, 624)	AGGCAG	19,06%	14,63%	6,36%		17,45%	4,04%	11,04%	5,37%				
711	GAGGC												
712 (718)	DGDGG	61,51%	13,60%	31,05%	6,05%	30,00%	43,00%	70,22%	4,50%				
713 (52, 59, 719)	DDGDGG	64,72%	67,57%	57,48%	69,05%	75,10%	65,08%	62,14%	53,67%	48,37%	24,57%	50,46%	20,68%
714 (150, 171, 409, 577)	GDDGDG	59,12%	11,16%	13,47%	8,16%	39,82%	34,49%	33,20%	10,63%	62,99%	38,39%	82,15%	53,81%
715	GGDDGG	44,58%	26,89%	35,15%	28,33%	45,64%	73,81%	27,78%	26,48%			5,36%	
716 (668)	DGGDDG	56,42%	17,01%	30,85%	9,38%	59,73%	56,02%	41,57%	4,64%			10,93%	4,91%
717 (241, 315, 349)	GDGGA	40,96%	10,08%	16,94%		5,18%	9,11%	20,91%					
718 (712)	DGDGG	61,51%	13,60%	31,05%	6,05%	30,00%	43,00%	70,22%	4,50%				
719 (52, 59, 713)	DDGDGG	64,72%	67,57%	57,48%	69,05%	75,10%	65,08%	62,14%	53,67%	48,37%	24,57%	50,46%	20,68%
720 (53, 143)	UDDGDG	34,51%	4,18%	18,86%		26,76%	28,17%	56,03%		6,15%		12,96%	5,42%
721	CUDDGG				4,19%								
722 (434, 596)	CCUDDG												
723 (435)	CCCUAG												
724(212, 523)	UCCUG									3,81%			7,37%
725	GUCCC												

726	AGUCCG												
727	DDGUCG	20,07%	25,64%	4,87%	29,85%	31,99%	9,56%	43,77%	37,24%	8,01%			
728 (69, 147, 178)	GDDGUG	17,00%	8,90%	21,05%	3,81%	6,99%	19,13%	5,93%		72,41%	51,06%	50,13%	98,21%
729 (148, 179, 407, 410)	DGDDGG	93,99%	90,97%	30,35%	17,91%	99,77%	99,24%	32,89%	99,57%	49,67%	15,47%	8,07%	42,66%
730 (122, 180, 211, 411, 538)	CDGDDG	20,73%	34,30%	8,65%	17,63%	25,21%	29,84%	34,12%	9,61%	16,14%	9,60%	22,12%	11,95%
731 (181, 212)	UCDGDG	6,76%	30,45%	4,19%			5,73%	10,33%	12,08%			4,38%	5,46%
732 (213)	DUCDGG	6,09%											
733	GDUCDG												
734	DGDUCG												
735 (57, 266)	GDGDUG	48,57%	34,26%	17,81%	9,10%	19,14%	40,07%	33,47%	7,86%		10,16%	18,95%	14,71%
736 (195)	CGDGDG	59,77%	16,00%	31,39%	9,12%	43,30%	76,68%	42,95%	3,84%	7,89%	10,96%	43,99%	17,94%
737	CCGDG												
738	GCCGA												
739	CGCCG												
740	UCGCC									6,10%			
741 (262)	UUCGCG												
742 (112)	CUUCGG												
743 (113, 607)	GCUUCG												
744 (608)	GGCUUG												
745 (609)	CGGCU												
746 (610)	CCGGC												
747 (447)	ACCGG												
748 (448)	GDCCG												
749 (449)	UGACCG												
750 (450)	UUGDCG	5,32%	5,36%	7,60%									
751 (72, 310)	CUUGDG									4,61%			
752 (11)	CCUUGG												
753	UCCUUG												8,49%

754	U <u>U</u> CCUG												
755 (843)	D <u>U</u> CCG												
757 (379)	CC <u>D</u> UUG												
758	CC <u>C</u> DUG												
759	CC <u>C</u> CA												
760	G <u>C</u> CCC												
761 (546)	U <u>G</u> CCC												
762 (547, 613)	A <u>U</u> GCCG												
763	G <u>D</u> UGCG												
764 (245)	U <u>G</u> DUGG	63,81%	82,31%	35,17%	9,12%	6,15%	12,64%	27,07%	25,83%			5,27%	4,59%
765 (246, 457)	G <u>U</u> GDUG	13,45%	10,85%	6,24%								9,79%	
766 (352, 862)	G <u>G</u> UGDG	55,99%	10,57%	51,77%	7,26%	28,61%	9,75%	10,03%	7,31%				4,10%
767 (863)	G <u>G</u> GUGG	25,42%	3,71%	30,98%		9,95%	5,14%	6,53%					
768	U <u>G</u> GGUG	23,82%	27,90%	16,06%		5,19%		9,57%	5,18%				
769	C <u>U</u> GGG												3,87%
770 (355, 561)	D <u>C</u> UGGG	8,89%	10,49%			4,39%							
771 (593)	D <u>D</u> CUGG	31,69%	50,45%	17,69%	66,76%	27,66%	23,69%	22,02%	14,33%		12,87%		
772	G <u>D</u> DCUG	14,85%	9,53%		4,39%			6,41%					
773 (193)	D <u>G</u> DDCG	9,10%	12,14%			13,94%						4,01%	
774 (149, 170, 408, 576)	D <u>D</u> GDDG	28,11%	77,77%	14,39%	12,34%	21,17%	73,23%	17,32%	10,20%	100,00%	63,73%	97,61%	82,78%
775 (60)	C <u>D</u> DGDG	16,68%	54,55%	10,37%		30,62%	24,19%	6,82%		19,66%	9,13%	12,79%	24,96%
776 (543)	CC <u>D</u> DGG												
777	D <u>C</u> DDG												
778 (505)	G <u>D</u> CCAG												
779	A <u>G</u> DCC												
780	C <u>D</u> GDCG	17,23%	29,36%	4,72%		12,21%	4,24%	4,84%					
781 (539, 662)	G <u>C</u> DGDG	24,97%	10,83%	11,19%	19,29%	16,24%	31,46%	28,03%	6,62%			8,84%	9,24%
782	U <u>G</u> CDGG		7,02%										
783 (518)	U <u>U</u> GCDG												17,25%

784 (519)	UUUGCG												
788	DCGDUG												
789	DDCGAG	28,84%	25,10%	9,38%	35,27%	23,68%	6,41%	21,75%		8,51%			
790 (208)	DDDCGG	47,00%	55,92%	28,23%	84,73%	32,86%	34,67%	57,53%	25,14%	10,29%	5,17%	3,71%	4,45%
791 (468)	CDDDCG												
792 (469, 872)	GCDDDG							4,62%					
793	CGCDDG												
794	CCGCA												
795	UCCGC												
796	GUCCG												
797	UGUCCG												
798 (345, 571)	DUGUCG												
799	CDUGUG												
800	GCDUGG												
801	GGCDUG	6,08%											
802 (531)	UGGCA												
803 (330)	UUGGCG	44,95%	63,06%	74,29%	11,76%	6,34%		14,33%				39,58%	16,04%
811 (74)	UGCUUG												
812 (75)	CUGCUG												
813 (76)	DCUGCG												
814 (562)	GDCUGG	7,80%	4,69%	3,71%									
815 (232)	DGDCUG												
816	UDGDCG	7,17%		9,50%									
817	GUDGDG	45,35%	11,35%	18,10%	8,71%	20,34%	34,15%	46,05%	4,14%			4,28%	4,34%
818	GGUDGG	51,73%	16,22%	17,69%	7,95%	10,58%	11,14%	31,60%	4,25%			19,64%	
819	AGGUAG	30,32%	7,58%	9,87%		5,96%		11,71%				14,43%	
820 (528)	CDGGUG	13,79%	39,48%	6,22%		12,63%	4,36%	5,62%					
821	UCDGGG	23,97%	22,23%	7,08%		17,28%	14,46%	5,65%					
822 (38, 463)	UUCDGG	12,98%	22,15%	20,14%	4,59%			4,76%	4,19%			20,62%	



826 (35, 114, 419)	DGCUUG												
827	DDGCUG												
828 (542, 90)	CDDGCG												
829 (568)	UCDDGG	6,16%	10,05%	14,51%	4,18%			5,41%					
830 (343, 569)	GUCDDG												
831 (344, 570)	UGUCDG												
832	GUGUCG	5,10%											
833	UGUGUG												
834	CUGUGG	7,91%		10,09%		16,81%							
835	DCUGUG											34,58%	
836 (281)	CDCUGG												
837 (705)	DCDCUG												
838 (16, 295, 706)	DDCDCG	8,60%			11,95%			5,99%				3,76%	
839 (707)	CDDCDG												
840	CCDDCG												
841 (218)	UCCDDG												
842 (228, 366)	UUCDDG												
843 (755)	DUUCCG												
844 (264, 647)	GDUUCG												
845 (648)	GGDUUG	21,76%	4,58%	4,88%				9,13%					
846 (492)	UGGDUG	64,53%	80,17%	61,53%	20,94%	7,46%	7,81%	35,61%	23,25%				
847 (305, 493, 508)	DUGGDG	41,07%	83,92%	16,39%	16,22%	33,06%	87,95%	23,44%	11,93%			12,58%	3,94%
848 (200, 306, 494, 509)	DDUGGG	22,91%	45,86%	9,93%		21,42%	21,07%	5,73%	4,03%			5,58%	
849 (27, 495)	UDDUGG	22,56%	3,88%	20,13%		6,34%	7,94%	29,37%					
851	CDUDDG												
852 (139, 359)	DCDUDG												
853	DDCDUG												
854 (17, 118, 251, 684)	DDDCDG	20,04%	62,77%	8,71%	7,71%	18,32%	40,44%	19,59%	5,28%	23,87%	12,31%	19,77%	12,97%
855 (18, 119, 487)	DDDDCG	6,30%	9,71%		5,54%	3,86%		4,41%					

857 (341, 512, 871)	CDDDDG	9,86%	7,29%			6,19%		5,13%					
859	GDCDDG	19,78%	8,48%			4,29%		16,93%					
860 (590)	UGDCDG												
861	GUGDCG										4,52%		4,81%
862 (352, 766)	GGUGDG	55,99%	10,57%	51,77%	7,26%	28,61%	9,75%	10,03%	7,31%				4,10%
863 (767)	GGGUGG	25,42%	3,71%	30,98%		9,95%	5,14%	6,53%					
864	AGGGUG	14,85%	8,81%	10,97%		26,69%	14,15%	13,90%					
865	CDGGG	7,54%	10,04%										
866 (529, 670)	GCDGG	13,95%	8,57%	18,03%				8,37%					
867 (540, 663)	AGCDGG	25,23%	34,26%	10,31%	8,11%	40,48%	6,44%	21,49%	39,53%			6,34%	
868 (471, 541, 664)	DDGCDG	11,02%	22,83%	5,92%		12,14%	18,96%			10,64%	5,51%	11,05%	13,76%
869 (472, 665)	DDDGCG		10,19%										
870	DDDDGG												
871 (341, 512, 857)	CDDDDG	9,86%	7,29%			6,19%		5,13%					
872 (469, 792)	GCDDDG							4,62%					
62 (401, 470, 873)	DGCDDG	9,06%				16,89%		8,87%					

**Tabela 23.** Możliwe pary kanoniczne i niekanoniczne we wszystkich vRNA segmentu 8 wirusa grypy dostępnych w bazie danych *NCBI* na podstawie struktury CM-vRNA8. Kolorem niebieskim zaznaczono rejony różniące się w stosunku do modelu CMC-vRNA8.

i	j	GC	CG	AU	UA	GU	UG	GA	AG	AA	GG	UU	CC	AC	UC	CA	CU	Procent kanonicznych par zasad [%]
1	875	2	0	1658	1	2	1	0	0	2	0	11	2	8	0	0	5	98,3
2	874	1726	1	1	0	5	3	0	1	0	8	1	0	6	14	0	1	98,2
3	873	2	3	4	0	3	1848	0	5	0	8	14	3	1	6	0	1	98,0
4	872	0	1	1718	0	4	0	0	10	2	3	2	0	179	1	0	0	89,7
5	871	5	0	16	0	1971	0	1	1	0	1	2	0	1	0	0	0	99,7
6	870	0	0	2039	0	4	0	0	1	1	0	2	0	0	0	0	0	99,8
7	869	0	0	2077	0	13	0	0	0	0	0	4	0	15	0	0	0	99,1
9	867	0	2229	0	0	0	1	0	13	1	0	0	12	1	0	4	3	98,5
11	866	0	1	2275	0	3	0	0	38	0	1	1	0	6	0	0	6	97,8
12	865	2275	0	1	0	32	0	5	2	0	6	0	1	21	3	0	0	98,4
13	864	2400	0	0	0	4	0	4	1	0	5	0	1	5	0	0	0	99,3
14	863	5191	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	1	2	16	0	0	99,6
15	862	1	0	0	5181	0	14	89	0	0	0	10	0	1	21	0	0	97,7
16	861	5363	0	3	1	1	0	17	0	0	9	0	1	1	18	0	0	99,2
19	844	0	19	0	6165	0	2249	3	1	2	1	4	0	0	1	4	0	99,8
20	843	0	0	0	8827	0	222	4	0	2	0	4	0	0	1	5	0	99,8
21	842	0	6	0	26	0	11113	0	39	0	1	20	0	0	1	0	0	99,5
22	841	0	4	1	227	0	10948	0	22	0	2	294	0	0	3	0	0	97,2
23	840	0	0	10849	0	70	1	0	680	3	0	253	0	2	0	0	14	92,0
25	838	0	9119	0	71	0	2480	0	8	3	3	1	1	0	0	539	7	95,4
26	837	0	0	12328	0	8	0	0	8	0	0	10	0	1	0	0	44	99,5
27	836	0	1844	0	5	0	12856	0	2	0	0	2	0	0	1	0	0	100,0
29	169	0	0	14705	0	0	0	0	0	4	0	1	0	0	0	0	0	100,0

30	168	9	0	10296	3	47	0	0	1	1	0	6	0	4334	1	0	11	70,4
31	167	0	0	14379	0	1	0	0	5	1	0	5	0	318	0	0	1	97,8
32	166	0	0	0	14690	0	8	0	0	10	0	1	0	0	0	0	0	99,9
33	165	0	0	12970	0	138	1	0	1514	20	8	7	0	48	0	2	1	89,1
34	164	0	0	14677	0	2	0	0	20	0	0	2	0	1	0	0	6	99,8
35	159	14470	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	232	2	0	0	98,4
36	158	0	9746	0	7	0	16	6	5	1	0	0	1	0	0	4870	58	66,4
37	157	0	0	0	14695	0	2	1	0	2	0	2	0	0	1	7	0	99,9
38	156	8392	0	0	0	5873	0	151	0	0	292	1	0	0	0	0	0	97,0
39	155	0	0	14633	0	33	0	0	0	1	0	3	0	40	0	0	0	99,7
43	151	53	0	2	0	13136	0	0	0	0	1517	1	0	0	0	0	1	89,7
44	150	0	0	14029	0	3	0	0	47	277	0	7	0	341	0	0	4	95,4
45	149	12639	0	0	0	4	0	0	0	0	2	1	0	2061	1	0	2	85,9
46	148	0	0	14684	0	8	0	0	3	2	0	3	0	9	0	0	0	99,9
47	147	0	0	13445	0	5	0	0	6	8	0	5	0	1240	0	0	0	91,4
48	146	1067	0	2356	1208	365	1	28	3	289	0	13	865	8444	52	3	16	34,0
49	89	14692	0	3	0	2	0	1	0	0	1	0	1	7	2	0	0	99,9
50	88	0	3091	0	1	0	11607	0	2	0	6	0	1	0	0	0	0	99,9
52	87	0	9510	0	0	0	10	0	0	0	2	2	33	0	0	216	4937	64,7
53	86	0	0	0	14581	0	78	41	0	1	0	1	0	0	2	4	0	99,7
54	85	0	0	0	13595	0	0	30	0	841	0	1	0	0	1	241	0	92,4
55	84	0	0	12757	0	2	0	0	0	3	0	1	0	1945	0	0	1	86,7
56	83	0	1	0	0	0	14697	0	0	0	4	5	0	0	2	0	0	99,9
57	80	0	14465	0	0	0	133	0	15	0	1	0	4	0	0	74	17	99,2
58	79	0	0	0	14704	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	100,0
60	77	0	2529	0	3893	0	6736	9	21	1495	0	0	0	0	3	20	0	89,5
61	76	0	0	0	13202	0	5	3	0	9	0	0	0	0	2	1488	1	89,8

62	75	12104	0	0	0	1068	2	8	0	0	0	1514	3	0	7	0	2	89,6
63	74	0	7107	0	3566	0	4003	0	1	0	1	0	0	0	1	31	0	99,8
64	73	0	0	0	14691	0	7	3	0	0	0	0	0	0	0	9	0	99,9
90	127	0	31	0	6365	0	6426	0	3	4	0	971	16	0	42	9	841	87,2
91	126	0	0	1	5068	0	695	5	0	2	3	4707	0	1	4224	4	0	39,2
92	125	8	0	1	0	14691	0	2	0	0	2	1	0	0	0	3	1	99,9
93	124	0	14474	0	0	0	174	0	50	0	5	0	0	0	0	5	1	99,6
94	123	0	0	10446	0	1	0	0	31	3973	0	1	0	257	0	0	0	71,0
96	120	2343	0	2862	0	1861	0	2	2	3	0	0	2	7634	1	0	0	48,0
97	119	0	0	14700	0	0	0	0	0	0	0	4	0	6	0	0	0	99,9
98	118	0	0	14450	0	2	0	0	11	0	0	0	0	247	0	0	0	98,2
99	117	0	3153	0	9595	0	1043	92	36	315	6	1	0	0	0	468	0	93,8
100	115	14703	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3	0	1	0	0	100,0
101	114	0	2	0	8181	0	6523	0	0	0	2	0	0	0	1	1	0	100,0
102	113	0	0	0	14578	0	1	30	0	101	0	0	0	0	0	0	0	99,1
104	112	0	0	0	14691	0	3	1	0	1	0	14	0	0	0	0	0	99,9
105	111	0	2794	0	6626	0	4080	0	6	2	1	0	0	0	0	1197	1	91,8
175	468	0	0	14679	0	2	0	0	1	0	0	1	0	24	0	0	1	99,8
176	467	0	0	14702	0	1	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0	100,0
177	466	0	4845	0	221	0	3694	0	8	0	0	0	3	0	0	5932	3	59,6
178	465	0	0	0	14656	0	6	1	0	1	0	1	0	0	1	41	0	99,7
179	464	0	0	0	14700	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	100,0
180	463	0	10991	0	20	0	3192	0	41	1	0	0	0	0	0	458	2	96,6
181	451	0	6	0	12110	0	2567	0	1	9	0	5	0	0	2	7	0	99,8
182	450	10275	0	0	0	4424	0	1	0	0	2	0	3	0	2	0	0	99,9
183	449	29	0	9782	1	1344	1	0	0	0	1	3113	2	370	38	0	24	75,9

184	448	0	9412	0	2	0	1	0	0	0	0	0	39	0	0	4980	272	64,0
185	447	0	7581	0	1	0	6677	0	0	0	0	406	1	0	3	0	39	96,9
189	444	0	3944	0	6012	0	4403	0	0	0	1	27	2	0	2	131	186	97,6
190	443	0	0	0	14692	0	1	0	0	2	0	0	0	0	2	11	0	99,9
191	442	6065	2	0	1	6938	0	174	0	0	0	2	1241	0	13	0	271	88,4
193	386	0	0	0	14654	0	2	3	0	2	0	0	0	0	0	49	0	99,6
194	385	0	6472	2	35	0	29	0	0	1	3	12	0	0	0	6776	1378	44,5
195	384	0	0	0	13496	0	1	1	0	7	0	8	0	0	0	1197	0	91,8
196	383	0	14544	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	30	134	98,9
197	382	2	0	0	160	11986	3	1357	0	0	5	1197	0	0	0	0	0	82,6
198	381	0	14687	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1	0	0	14	5	99,8
199	380	0	14586	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	104	99,2
200	379	0	0	11813	0	0	0	0	1503	103	0	0	0	1285	0	0	2	80,3
201	378	0	10	6	9428	3	308	91	2	16	3	1446	1	0	31	3354	11	66,3
202	377	0	0	0	13012	0	15	1521	0	9	0	0	0	0	0	151	0	88,6
204	376	56	0	28	9	1	1	50	9	1459	0	6294	936	24	4980	0	862	0,6
205	375	0	9424	0	21	0	3683	0	18	0	1520	7	0	0	0	33	3	89,3
206	374	0	14355	0	0	0	94	0	28	0	4	0	1	0	0	187	40	98,2
212	247	0	0	0	14060	0	639	5	0	0	0	3	0	0	0	0	0	99,9
213	246	5361	0	358	0	8135	0	9	5	4	231	8	3	592	1	0	0	94,2
214	245	71	1	1287	0	146	1	0	0	0	0	5494	2	2	1	0	7705	10,2
215	244	0	0	0	13802	0	1	877	0	1	0	0	0	0	1	28	0	93,8
218	241	14694	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	100,0
219	240	6093	0	209	0	7377	0	0	0	0	1	709	27	177	112	0	2	93,0
220	239	0	0	13466	0	3	0	0	820	59	0	0	0	358	0	0	1	91,6
221	237	14101	0	3	0	394	3	6	0	3	5	0	0	189	5	0	1	98,6

222	236	9999	0	1	0	31	0	0	2	0	0	2	64	950	3660	0	0	68,2
223	235	8726	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0	5	2595	3380	0	0	59,3
224	234	6	0	9630	0	28	0	0	32	0	1	9	0	4967	35	0	1	65,7
225	233	12926	0	6	0	17	0	1	0	0	1	0	1	1754	1	0	0	88,0
249	262	0	134	0	104	0	9213	66	2675	23	2491	0	0	0	0	0	0	64,3
250	261	14337	0	0	0	281	0	23	0	1	2	9	1	45	10	0	0	99,4
251	260	0	9841	0	0	0	3242	0	1600	1	3	2	0	0	0	10	3	89,0
252	259	0	0	0	13274	0	1	9	0	4	0	0	0	0	0	1419	0	90,3
253	258	0	0	0	14675	0	11	2	0	1	0	3	0	0	2	12	0	99,9
265	372	0	0	0	14699	0	3	1	0	2	0	0	0	0	0	4	0	100,0
266	371	0	14580	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	36	71	99,3
267	370	0	0	0	13873	0	828	0	0	0	0	4	0	0	0	3	0	100,0
268	369	0	9795	0	1	0	20	0	3	0	0	0	7	0	0	3355	1526	66,7
269	368	0	0	0	14701	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	100,0
271	295	0	3	0	242	0	14458	0	4	0	0	0	0	0	0	1	0	100,0
272	294	0	0	13162	0	0	0	0	5	1514	0	0	0	27	0	0	0	89,5
273	293	0	32	0	1	12	5128	0	467	0	9067	2	0	0	0	0	0	35,2
274	292	0	0	11094	0	18	0	0	1	18	0	0	0	3577	0	0	1	75,5
275	291	6644	0	6	1	53	1	0	0	0	2	1533	48	441	5973	1	5	45,6
276	290	0	0	0	14201	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	505	0	96,6
277	289	0	0	0	14483	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	223	0	98,5
278	288	0	4	0	1	0	14252	0	0	0	0	449	0	0	3	0	0	96,9
280	286	0	0	14330	0	1	0	0	2	1	0	0	0	375	0	0	0	97,4
281	285	14210	0	1	0	483	0	1	0	0	7	0	0	3	1	0	0	99,9
322	351	14371	0	0	0	319	0	0	0	0	3	0	0	13	0	0	0	99,9
323	350	0	0	14705	0	1	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	100,0

324	349	14696	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	5	7	0	0	99,9
325	348	14576	0	0	0	42	0	0	0	0	0	0	1	16	74	0	0	99,4
326	347	0	0	14639	0	61	0	0	0	0	5	0	1	0	0	0	3	99,9
330	343	0	14694	0	0	0	13	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	100,0
331	342	0	0	14663	0	3	0	0	37	0	0	0	0	5	0	0	2	99,7
332	341	0	0	14702	0	3	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	100,0
353	366	0	1105	1	10	0	9516	1	2587	3	1472	0	0	0	0	12	3	72,3
354	365	0	5846	0	4	0	6587	0	2256	4	8	0	0	0	0	4	0	84,6
355	364	0	0	14702	0	1	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	1	100,0
356	363	14627	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	18	61	0	0	99,4
394	415	0	2905	0	60	5	1555	10	7583	113	1781	0	0	0	0	697	0	30,8
395	414	0	0	14673	0	25	0	0	1	5	0	0	0	4	0	0	0	99,9
396	413	0	14581	0	0	0	92	0	2	0	0	0	21	0	0	4	9	99,8
397	411	2842	0	108	0	18	4	0	0	0	0	18	2	8869	2847	0	0	20,2
398	410	1	0	14643	0	3	0	0	1	1	0	0	0	60	0	0	0	99,6
417	440	0	0	14680	0	6	0	0	1	1	0	1	0	14	0	0	5	99,9
418	439	168	0	4463	1	230	0	0	150	13	0	94	36	9255	271	0	25	33,1
419	438	734	0	0	0	13954	0	14	0	0	2	1	0	0	0	0	3	99,9
420	437	0	13628	0	0	0	1	0	2	0	0	0	14	0	0	10	1053	92,7
421	436	0	4827	0	1181	0	2744	0	0	0	0	1682	73	0	12	2280	1909	59,5
422	435	0	7633	0	8	0	8	0	0	0	0	0	2	0	0	5068	1987	52,0
423	434	0	0	0	14686	0	1	19	0	0	0	0	0	0	0	2	0	99,9
424	433	303	71	3353	2	1806	6	9	3	7	10	2839	406	407	4133	0	1354	37,7
425	432	3	0	10474	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4231	0	0	0	71,2
470	827	13175	0	0	0	4	0	3	0	0	1522	0	3	1	0	0	0	89,6
471	826	0	10351	0	0	0	0	0	2	1	0	0	1492	0	0	2837	24	70,4



472	825	0	1	0	13049	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	1654	0	88,7
473	824	0	0	0	14687	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0	15	0	99,9
474	823	0	0	0	11293	0	3411	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	100,0
475	822	0	12354	0	0	0	652	0	454	0	1240	0	2	0	0	1	4	88,4
479	498	41	0	10676	0	2087	0	0	0	0	0	24	0	1874	0	0	4	87,1
480	497	0	17	0	12085	0	327	3	0	10	0	0	0	0	0	2266	0	84,5
481	496	101	1	277	1060	4718	2394	1460	447	49	4109	88	0	2	0	0	1	58,1
482	495	0	0	14135	0	5	0	0	74	37	0	0	0	457	0	0	0	96,1
483	494	0	0	0	14413	0	98	6	2	0	0	1	0	0	3	185	0	98,7
484	493	12623	0	1	0	95	0	137	0	1	7	32	959	202	649	1	1	86,5
485	492	1693	0	2	0	19	0	0	0	0	0	79	1387	235	11135	0	156	11,7
500	563	63	0	12	0	14621	0	0	0	0	9	2	0	0	0	0	0	99,9
502	562	0	11594	16	623	0	424	0	2	0	1	310	61	0	10	347	1319	86,1
503	561	1	0	0	14698	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	99,9
504	560	14702	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	2	0	0	100,0
505	559	13052	0	0	0	0	0	2	0	1	2	0	1	1647	1	0	0	88,8
506	558	0	0	0	14642	0	42	0	0	1	0	4	0	0	16	1	0	99,9
508	556	0	13134	0	0	0	385	0	6	0	0	2	26	0	0	414	737	91,9
509	555	0	0	14690	0	10	0	0	1	1	0	0	0	3	0	0	1	100,0
510	554	0	1	0	12393	0	3	34	2	2239	0	0	0	0	5	28	0	84,3
512	552	0	11283	0	17	0	3371	0	2	0	0	6	3	0	0	11	10	99,8
513	551	0	0	0	11375	0	2	3327	0	0	0	0	0	0	0	0	0	77,4
515	549	0	0	14663	0	3	0	0	7	12	0	0	0	21	0	0	1	99,7
516	548	0	0	0	8976	0	4	2	0	29	0	4	3	0	0	5687	1	61,1
517	547	8126	0	73	0	39	0	691	0	3	2	0	1418	4248	84	0	18	56,0
518	546	0	13094	0	0	0	73	0	1537	0	0	0	0	0	0	2	0	89,5

521	543	0	0	14697	0	0	0	0	3	0	0	1	0	5	0	0	0	99,9
522	542	4754	0	35	0	9843	0	12	0	0	3	6	0	53	2	0	0	99,5
523	541	4849	0	194	0	1828	7	5	0	8	0	13	8	7728	60	0	1	46,8
567	593	0	6	0	21	5	11020	18	0	0	3487	5	0	0	147	0	0	75,1
568	592	3	1	1	12820	4	145	583	48	281	639	73	0	0	8	104	0	88,2
569	591	13185	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	1513	3	3	0	2	89,7
570	590	0	0	13154	0	11	0	0	0	1	0	1522	0	17	1	0	4	89,5
571	589	0	12160	0	1427	0	220	1	5	1	0	7	1	0	1	774	112	93,9
572	588	0	0	14695	0	6	0	0	1	6	0	1	0	0	0	0	1	99,9
573	587	0	0	0	12122	0	1	4	0	2576	0	0	0	0	0	7	0	82,4
576	584	0	13145	0	0	0	5	0	0	0	0	0	1526	0	0	3	30	89,4
577	583	0	4736	0	5733	0	246	3	13	220	0	25	1	1	3	3720	7	72,9
578	582	0	14	0	11	0	9441	0	0	0	1	4553	1	0	683	0	5	64,4
596	821	0	0	14693	0	2	0	0	0	2	0	8	0	3	0	0	2	99,9
597	820	9749	0	0	2	1	0	0	0	0	4	0	72	488	4394	0	0	66,3
598	819	13399	0	0	0	4	0	1	0	0	1	0	0	1304	0	0	0	91,1
599	818	0	0	0	14699	0	5	1	0	0	0	1	0	0	1	3	0	100,0
600	817	0	0	14698	0	7	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	100,0
601	816	8957	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	2220	447	3080	0	1	60,9
603	657	14407	0	1	0	134	0	5	0	0	5	4	0	127	26	1	0	98,9
604	656	0	0	0	6241	0	2	91	1	1513	0	0	2	0	2	6857	0	42,4
605	655	9173	0	2	10	3632	0	1842	0	2	19	0	0	28	1	0	0	87,1
607	653	1	0	14126	0	238	0	0	1	2	0	234	1	25	0	0	79	97,7
608	652	8173	0	28	1	6247	0	16	0	0	3	4	5	178	49	0	1	98,3
609	651	0	3632	4	3189	0	567	0	203	128	0	60	1498	2	10	47	5365	50,3
611	625	11103	0	1	0	2339	0	320	0	12	16	4	2	891	14	0	0	91,4
612	624	9617	0	20	0	4918	0	74	0	0	15	13	0	47	2	0	0	99,0

613	623	1	12871	1163	0	18	212	0	3	36	0	299	0	1	0	28	74	97,0
614	622	0	0	12877	0	67	0	6	361	1213	0	28	0	144	0	0	10	88,0
615	621	0	46	0	662	0	13949	13	2	1	6	14	2	0	2	3	0	99,7
616	620	0	1	0	13289	0	108	6	0	2	0	3	0	0	1	1292	1	91,1
632	649	12141	0	7	240	819	13	88	10	0	1322	28	1	19	7	13	2	89,9
633	648	1	0	13013	0	119	0	0	3	1	0	1516	0	48	3	0	5	89,3
635	646	0	5	0	11020	0	3647	0	0	0	1	17	0	0	9	10	0	99,7
636	645	0	11161	0	10	0	27	0	0	0	0	2	0	0	0	3476	32	76,1
661	814	0	4474	0	2584	0	4123	27	515	165	6	3	2	1	1	2807	1	76,0
662	813	0	0	0	14364	0	2	0	0	226	0	1	0	0	1	115	0	97,7
663	812	13148	0	0	0	2	0	1	0	0	5	0	2	4	1547	0	0	89,4
664	811	0	8562	0	3429	0	2024	2	2	1	1	0	0	0	0	688	0	95,3
665	810	0	0	0	14532	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	173	0	98,8
666	809	0	0	3	13157	0	4	1	0	0	0	1537	0	0	0	6	0	89,5
667	808	0	3308	0	7931	0	1349	1214	1	9	5	0	0	0	0	890	0	85,6
668	807	0	14603	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	57	46	99,3
670	804	0	1	0	3003	0	0	62	0	9074	0	0	0	0	2	2566	0	20,4
671	803	5592	0	0	2	0	0	3	0	0	0	0	12	6853	2247	0	0	38,0
673	802	883	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1551	12133	141	0	0	6,0
674	801	0	6921	6	7	0	2875	0	4869	3	15	0	0	0	0	7	6	66,7
675	800	5	0	1317	0	11822	0	0	0	1	0	1561	0	0	0	0	3	89,4
677	798	7472	0	1	0	7219	0	1	0	0	5	0	0	9	2	0	0	99,9
678	797	0	0	0	14695	0	5	0	0	2	0	0	0	0	0	8	0	99,9
681	796	0	12850	0	0	0	6	0	29	7	0	1	7	0	0	260	1549	87,4
682	795	0	608	3	2	0	11743	0	383	1	511	38	0	0	1	0	1418	84,0
683	794	13127	0	0	0	3	0	2	0	0	1	0	12	1534	31	0	0	89,3

684	793	0	108	2	24	0	10203	5	19	1	236	24	2201	1	74	13	1799	70,3
687	789	0	9819	0	2	3	3473	1	0	0	1262	21	0	0	0	0	127	90,4
688	788	8981	0	10	280	3741	0	10	2	0	1	3	1	376	65	1240	0	88,5
689	787	30	0	12134	0	6	0	1	0	11	0	0	0	2528	0	0	0	82,7
690	786	0	0	0	9378	0	55	5	70	5	1444	168	1	1	3552	30	1	64,1
694	782	1512	7017	0	2568	2	313	8	232	1	3024	0	2	2	8	20	0	77,6
695	781	0	0	13002	0	3	0	0	1261	275	0	2	0	167	0	0	0	88,4
696	780	12885	0	2	0	1584	1	7	0	0	0	4	2	127	97	0	0	98,4
697	779	4	0	10045	1054	3122	1	0	2	0	0	3	0	2	0	468	8	96,7
698	778	0	13092	0	1	0	26	0	0	0	2	0	1520	0	1	46	16	89,2
699	777	0	9455	1	0	0	13	0	8	1	0	453	6	0	0	270	4501	64,4
700	776	11	0	9328	0	3519	0	1	1	2	0	9	0	1828	0	3	4	87,4
701	775	0	0	11036	0	3	0	0	16	3344	0	0	0	309	0	0	0	75,1
702	774	14335	0	0	0	310	0	0	0	0	0	1	0	1	61	0	0	99,6
703	773	3269	0	9326	0	140	0	0	1	1	0	1537	2	427	3	0	1	86,6
704	767	14680	0	0	0	12	0	7	0	0	0	0	2	1	6	0	0	99,9
705	766	0	1	0	13721	0	944	1	0	0	0	11	0	0	20	10	0	99,7
706	765	13289	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1401	15	0	0	90,3
708	763	0	0	0	14639	0	30	3	0	29	0	0	0	0	0	8	0	99,7
709	762	14391	0	0	0	5	0	8	0	0	0	0	2	291	12	0	0	97,9
710	761	0	14693	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	11	2	99,9
711	760	0	12466	0	260	0	460	0	4	9	0	3	1	0	1	1485	20	89,6
712	759	0	485	0	0	0	14222	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	100,0
713	758	0	14704	0	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
714	756	0	0	0	14656	0	5	44	0	0	0	0	0	0	1	2	0	99,7
715	755	0	0	0	14281	0	3	1	0	8	0	1	0	0	0	414	0	97,1
716	754	0	12253	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2451	0	83,3

717	753	0	13122	0	0	0	30	0	0	0	0	0	1506	0	2	5	42	89,4
718	752	0	3	0	9044	0	4	0	0	2	0	9	1	0	1	4125	1519	61,5
724	746	10056	0	0	0	1	0	2	0	0	4	0	168	2823	1655	0	0	68,4
725	745	13288	0	0	0	1391	0	8	0	0	3	0	19	0	0	0	0	99,8
727	744	0	12709	0	2	0	1903	0	0	0	0	5	42	0	0	8	40	99,4
728	743	0	0	0	12246	0	3	1	0	0	0	0	0	0	2	2458	0	83,3
729	742	0	1	0	9638	0	4899	0	0	0	2	131	0	0	38	0	0	98,8
730	741	0	9043	0	5	0	4353	0	6	0	1	1175	0	0	0	6	119	91,1

**Tabela. 24.** Możliwe pary kanoniczne i niekanoniczne we wszystkich vRNA8 wirusa grypy dostępnych w bazie danych *NCBI* na podstawie struktury CMC-vRNA8. Tabela przedstawia wyłącznie te fragmenty, które wykazały różnicę w stosunku do modelu CM-vRNA8 oraz rejony zawierające zachowawcze pary zasad. Rejony zawierające zachowawcze pary zasad zaznaczono kolorem pomarańczowym.

i	j	GC	CG	AU	UA	GU	UG	GA	AG	AA	GG	UU	CC	AC	UC	CA	CU	Procent kanonicznych par zasad [%]
208	372	0	0	0	14606	0	3	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	99,3
209	371	0	0	0	36	0	14602	0	0	0	0	71	0	0	0	0	0	99,5
210	370	0	2	0	13410	0	826	0	0	0	0	4	0	0	0	468	0	96,8
211	369	0	9732	0	0	0	87	0	0	0	1	1	4	0	3	3356	1525	66,8
212	368	0	0	0	14699	0	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
213	246	5361	0	358	0	8135	0	9	5	4	231	8	3	592	1	0	0	94,2
214	245	71	1	1287	0	146	1	0	0	0	0	5494	2	2	1	0	7705	10,2
215	244	0	0	0	13802	0	1	877	0	1	0	0	0	0	1	28	0	93,8
218	241	14694	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	100,0
219	240	6093	0	209	0	7377	0	0	0	0	1	709	27	177	112	0	2	93,0
220	239	0	0	13466	0	3	0	0	820	59	0	0	0	358	0	0	1	91,6
221	237	14101	0	3	0	394	3	6	0	3	5	0	0	189	5	0	1	98,6
222	236	9999	0	1	0	31	0	0	2	0	0	2	64	950	3660	0	0	68,2

223	235	8726	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0	5	2595	3380	0	0	59,3
224	234	6	0	9630	0	28	0	0	32	0	1	9	0	4967	35	0	1	65,7
225	233	12926	0	6	0	17	0	1	0	0	1	0	1	1754	1	0	0	88,0
250	291	13043	0	2	0	1595	0	2	0	0	3	0	1	44	19	0	0	99,5
251	290	0	2	0	3243	0	1	3	0	1601	0	0	0	0	0	9852	0	22,1
252	289	0	1	0	13274	0	1	9	0	4	0	0	0	0	0	1418	0	90,3
261	288	1	13945	0	0	0	287	0	24	0	1	3	2	0	0	1	446	96,8
262	287	14227	0	1	0	285	0	0	0	0	1	0	0	192	0	0	0	98,7
263	286	0	0	14318	0	2	0	0	2	1	0	10	1	272	102	0	1	97,4
265	284	0	1	0	12467	0	1516	1	0	2	0	5	0	0	714	3	0	95,1
266	283	0	13153	0	0	0	17	0	0	0	0	0	1513	0	3	7	13	89,6
268	281	0	14676	0	0	0	21	0	3	0	0	0	0	0	0	4	1	99,9
269	280	0	0	0	14706	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	100,0
270	279	11906	0	0	0	2794	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	99,9
293	347	1	0	1	0	14693	0	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	99,9
294	346	0	0	0	13162	0	0	5	0	1514	0	0	0	0	1	27	0	89,5
295	345	14440	0	0	0	23	0	4	0	0	0	0	0	243	0	0	0	98,3
296	344	0	0	0	14703	0	3	1	0	0	0	1	0	0	0	2	0	100,0
297	343	0	2	0	0	0	14703	0	4	0	0	1	0	0	0	0	0	100,0
298	342	0	0	14663	0	5	0	0	37	0	0	0	0	5	0	0	0	99,7
305	335	0	14709	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	100,0
306	333	1	0	11477	0	0	0	0	4	32	0	1	0	3193	0	0	0	78,0
307	332	0	0	0	14555	0	3	2	0	0	0	5	0	0	0	144	0	99,0
308	331	0	0	0	14700	0	3	2	0	1	0	0	0	0	2	2	0	100,0
312	327	11627	0	161	0	2022	0	9	3	0	3	0	0	879	5	0	0	93,9
313	326	0	7	0	13781	0	54	0	0	2	0	5	0	0	3	857	0	94,1
314	325	0	14605	0	0	0	13	0	0	0	0	0	1	0	0	16	74	99,4

315	324	0	14694	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	5	7	99,9
316	323	0	0	0	12069	0	1	24	0	1521	0	1	0	0	0	1094	0	82,1
317	322	0	14426	0	0	0	270	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	99,9
696	780	12885	0	2	0	1584	1	7	0	0	0	4	2	127	97	0	0	98,4
697	779	4	0	10045	1054	3122	1	0	2	0	0	3	0	2	0	468	8	96,7
698	778	0	13092	0	1	0	26	0	0	0	2	0	1520	0	1	46	16	89,2
699	777	0	9455	1	0	0	13	0	8	1	0	453	6	0	0	270	4501	64,4
700	776	11	0	9328	0	3519	0	1	1	2	0	9	0	1828	0	3	4	87,4
701	775	0	0	11036	0	3	0	0	16	3344	0	0	0	309	0	0	0	75,1
704	767	14680	0	0	0	12	0	7	0	0	0	0	2	1	6	0	0	99,9
705	766	0	1	0	13721	0	944	1	0	0	0	11	0	0	20	10	0	99,7
706	765	13289	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1401	15	0	0	90,3
708	763	0	0	0	14639	0	30	3	0	29	0	0	0	0	0	8	0	99,7
709	762	14391	0	0	0	5	0	8	0	0	0	0	2	291	12	0	0	97,9
710	761	0	14693	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	11	2	99,9
711	760	0	12466	0	260	0	460	0	4	9	0	3	1	0	1	1485	20	89,6
712	759	0	485	0	0	0	14222	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	100,0
713	758	0	14704	0	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
731	751	0	0	0	13225	0	684	0	0	1	0	747	0	0	34	16	0	94,6
732	750	14691	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	17	0	0	99,9
733	749	0	0	13284	0	1410	0	0	0	4	0	10	0	1	0	0	1	99,9
736	748	0	466	0	8566	0	5306	1	157	4	4	0	0	0	3	203	0	97,5
737	747	0	13084	0	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0	0	2	1620	88,9
738	746	13059	0	0	0	1	0	2	0	0	4	0	4	0	1639	0	0	88,8
739	745	12857	0	2	0	184	0	8	1	0	2	969	11	122	316	0	236	88,7
740	744	0	14602	0	0	0	5	0	1	0	1	1	42	0	0	10	44	99,3

# SPIS RYSUNKÓW I TABEL

## SPIS RYSUNKÓW

<b>Rysunek 1.</b>	Schematyczne przedstawienie standardowej nomenklatury stosowanej w opisie wirusa grypy typu A.	<b>17</b>
<b>Rysunek 2.</b>	Schematyczne przedstawienie budowy wirusa grypy typu A	<b>18</b>
<b>Rysunek 3.</b>	Cykl replikacyjny wirusa grypy.	<b>20</b>
<b>Rysunek 4.</b>	Schematyczne przedstawienie cyklu replikacji i transkrypcji.	<b>22</b>
<b>Rysunek 5.</b>	Schemat budowy segmentu 8 vRNA.	<b>24</b>
<b>Rysunek 6.</b>	Motywy strukturalne tworzone przez 3' i 5' końce segmentów vRNA wirusa.	<b>26</b>
<b>Rysunek 7.</b>	Motywy strukturalne fragmentu 81-148 mRNA segmentu 8.	<b>27</b>
<b>Rysunek 8.</b>	Motywy strukturalne obejmujące rejon 3' miejsca splicingowego mRNA segmentu 8.	<b>28</b>
<b>Rysunek 9.</b>	Motywy strukturalne obejmujące rejon 3' miejsca splicingowego mRNA segmentu 7.	<b>28</b>
<b>Rysunek 10.</b>	Struktura spinki RNA znajdująca się na 5' końcu mRNA NP.	<b>29</b>
<b>Rysunek 11.</b>	Rejony kodujące i niekodujące vRNA istotne w procesie pakowania wirusa grypy typu A.	<b>31</b>
<b>Rysunek 12.</b>	Trójwymiarowy model ułożenia ośmiu vRNP w różnych wirionach.	<b>32</b>
<b>Rysunek 13.</b>	Model selektywnego pakowania vRNP do wirionu.	<b>33</b>
<b>Rysunek 14.</b>	Budowa chemiczna modyfikowanych oligonukleotydów stosowanych, jako potencjalne terapeutyki.	<b>36</b>
<b>Rysunek 15.</b>	Rozdział vRNA8 w 0,8% żelu agarozowym.	<b>42</b>
<b>Rysunek 16.</b>	Rozdział elektroforetyczny vRNA8 w 6% żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych.	<b>43</b>
<b>Rysunek 17.</b>	Schemat selektywnej modyfikacji grupy 2'-hydroksylowej za pomocą NMIA w metodzie SHAPE.	<b>44</b>
<b>Rysunek 18.</b>	Schematyczne przedstawienie metod mapowania chemicznego.	<b>45</b>
<b>Rysunek 19.</b>	Schematyczne przedstawienie poszczególnych etapów mapowania chemicznego.	<b>46</b>
<b>Rysunek 20.</b>	Przykładowy wynik elektroforezy kapilarnej dla startera St3.	<b>48</b>
<b>Rysunek 21.</b>	Reaktywność nukleotydów w vRNA8.	<b>50</b>



<b>Rysunek 22.</b> Struktura drugorzędowa vRNA8 wygenerowana przez program <i>RNAstructure 5.3</i> bez dodatkowych ograniczeń.	<b>53</b>
<b>Rysunek 23.</b> CM-vRNA8. Struktura drugorzędowa vRNA8 wygenerowana w programie <i>RNAstructure 5.3</i> .	<b>54</b>
<b>Rysunek 24.</b> CM-vRNA8. Prawdopodobieństwo występowania par zasad i rejonów jednoniciowych oszacowane w programie <i>RNAstructure</i> .	<b>56</b>
<b>Rysunek 25.</b> CMC-vRNA8. Struktura drugorzędowa vRNA8 wygenerowana w programie <i>RNAstructure 5.3</i> .	<b>60</b>
<b>Rysunek 26.</b> CMC-vRNA8. Prawdopodobieństwo występowania par zasad i rejonów jednoniciowych oszacowane w programie <i>RNAstructure</i> .	<b>61</b>
<b>Rysunek 27.</b> Przykładowe wyniki hybrydyzacji vRNA8 w różnych buforach i temperaturach.	<b>65</b>
<b>Rysunek 28.</b> Wynik hybrydyzacji vRNA8 do mikromacierzy izoenergetycznych przedstawiony na modelu struktury CMC-vRNA8.	<b>71</b>
<b>Rysunek 29.</b> Miejsca niedostępne w cząsteczce vRNA8 dla wiązania się sond mikromacierzowych przedstawione na modelu CMC-vRNA8.	<b>72</b>
<b>Rysunek 30.</b> Reaktywność nukleotydów w vRNA8 w obecności wolnego rodnika.	<b>80</b>
<b>Rysunek 31.</b> Wynik hydrolizy vRNA8 w obecności rodnika hydroksylowego przedstawiony na modelu struktury CMC-vRNA8.	<b>81</b>
<b>Rysunek 32.</b> Fragment 661-814 modelu CMC-vRNA8 z zaznaczonymi resztami adenozyiny, które mogą ulegać deaminacji do inozyny z udziałem enzymów ADAR.	<b>83</b>
<b>Rysunek.33.</b> Prawdopodobne oddziaływania trzeciorzędowe w vRNA8.	<b>85</b>
<b>Rysunek 34.</b> Połączone wyniki wszystkich eksperymentów dotyczących struktury drugorzędowej vRNA8 przedstawione na modelu CMC-vRNA8.	<b>88</b>
<b>Rysunek 35.</b> Reaktywność nukleotydów w mini-vRNA8.	<b>92</b>
<b>Rysunek 36.</b> CM-mini-vRNA8. Struktura drugorzędowa mini-vRNA8 wygenerowana w programie <i>RNAstructure 5.3</i> .	<b>94</b>
<b>Rysunek 37.</b> CMC-mini-vRNA8. Struktura drugorzędowa mini-vRNA8 wygenerowana w programie <i>RNAstructure 5.3</i> .	<b>96</b>
<b>Rysunek 38.</b> Wynik hybrydyzacji mini-vRNA8 do mikromacierzy izoenergetycznych przedstawiony na modelu struktury CMC-mini-vRNA8.	<b>103</b>
<b>Rysunek 39.</b> Reaktywność nukleotydów w M1-RNA.	<b>106</b>

<b>Rysunek 40.</b> Modelowe struktury M1-RNA wygenerowane w programie <i>RNAstructure 5.3</i> .	<b>108</b>
<b>Rysunek 41.</b> Modele struktury drugorzędowej M2-RNA.	<b>113</b>
<b>Rysunek 42.</b> Modele struktury drugorzędowej M3-RNA.	<b>116</b>
<b>Rysunek 43.</b> Rejony vRNA8 komplementarne do pozostałych vRNA wirusa grypy przedstawione na modelu CMC-vRNA8.	<b>119</b>
<b>Rysunek 44.</b> Miejsca docelowe dla oligonukleotydów antysensowych w cząsteczce vRNA segmentu 8 wirusa grypy szczepu A/VietNam/1203/2004 (H5N1) przedstawione na modelu struktury drugorzędowej CMC-vRNA8.	<b>123</b>
<b>Rysunek 45.</b> Wykres przedstawiający poziom inhibicji namnażania wirusa grypy A/California/04/2009 (H1N1) w obecności oligonukleotydów.	<b>130</b>

## SPIS TABEL

<b>Tabela 1.</b> Zestawienie danych dotyczących vRNA oraz białek wirusa grypy typu A, na przykładzie szczepu A/PuertoRico/8/1934 (H1N1).	<b>19</b>
<b>Tabela 2.</b> Zestawienie ASO zaproponowanych w literaturze, nacelowanych na wirusowe RNA.	<b>37</b>
<b>Tabela 3.</b> Wynik hybrydyzacji vRNA8 do mikromacierzy izoenergetycznych.	<b>67</b>
<b>Tabela 4.</b> Wynik hydrolizy vRNA8 z zastosowaniem rybonukleazy H.	<b>74</b>
<b>Tabela 5.</b> Prawdopodobne oddziaływania trzeciorzędowej w vRNA8.	<b>86</b>
<b>Tabela 6.</b> Wynik hybrydyzacji mini-vRNA8 do mikromacierzy izoenergetycznych.	<b>98</b>
<b>Tabela 7.</b> Wynik hybrydyzacji M2-RNA do mikromacierzy izoenergetycznych.	<b>111</b>
<b>Tabela 8.</b> Wynik hybrydyzacji M3-RNA do mikromacierzy izoenergetycznych.	<b>114</b>
<b>Tabela 9.</b> Rejony vRNA8 komplementarne do pozostałych vRNA wirusa grypy.	<b>119</b>
<b>Tabela 10.</b> Miejsca docelowe dla oligonukleotydów antysensowych w cząsteczce vRNA segmentu 8 wirusa grypy szczepu A/VietNam/1203/2004 (H5N1).	<b>123</b>

- Tabela 11.** Zestawienie sekwencji oligonukleotydów komplementarnych do rejonu docelowego dla ASO w vRNA segmentu 8 szczepów A/VietNam/1203/2004 i A/California/04/2009 oraz konserwatywność sekwencji tych rejonów. **126**
- Tabela 12.** ASO stosowane w badaniach na liniach komórkowych MDCK. **129**
- Tabela 13.** Oligodeoksynukleotydy stosowane jako startery w reakcjach sekwencjonowania. **140**
- Tabela 14.** Startery stosowane w reakcji PCR w celu namnożenia matrycy do transkrypcji *in vitro* dla vRNA8 i mini-vRNA8. **140**
- Tabela 15.** Startery stosowane w reakcjach PCR w celu otrzymania matrycowego DNA do transkrypcji *in vitro* dla mini-vRNA8. **140**
- Tabela 16.** Częsteczki DNA i startery wykorzystane w celu uzyskania cząsteczek matrycowych do transkrypcji *in vitro* dla modelowej cząsteczki M1-RNA. **141**
- Tabela 17.** Częsteczki DNA stosowane w transkrypcji *in vitro* fragmentów modelowych M2 i M3 RNA. **141**
- Tabela 18.** Startery stosowane w reakcji odwrotnej transkrypcji. **142**
- Tabela 19.** Sondy mikromacierzy z biblioteki izoenergetycznych sond Zespołu Genomiki Strukturalnej RNA i Zakładu Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych komplementarne do badanych RNA. **142**
- Tabela 20.** Izoenergetyczne sondy heksamerowe zsyntetyzowane na potrzeby mapowania mikromacierzowego dla vRNA8. **146**
- Tabela 21.** Oligomery DNA zastosowane podczas hydrolizy RNA z udziałem RNazy H. **146**
- Tabela 22.** Uśrednione wyniki hybrydyzacji vRNA8 do mikromacierzy izoenergetycznej we wszystkich zastosowanych warunkach. **182**
- Tabela 23.** Możliwe pary kanoniczne i niekanoniczne we wszystkich vRNA segmentu 8 wirusa grypy dostępnych w bazie danych *NCBI* na podstawie struktury CM-vRNA8. **209**
- Tabela 24.** Możliwe pary kanoniczne i niekanoniczne we wszystkich vRNA segmentu 8 wirusa grypy dostępnych w bazie danych *NCBI* na podstawie struktury CMC-vRNA8. **219**