

INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ POLSKIEJ  
AKADEMII NAUK W POZNANIU

Paula Michalak

**STRUKTURA DRUGORZĘDOWA PIĄTEGO  
SEGMENTU vRNA WIRUSA GRYPY TYPU A I JEJ  
WYKORZYSTANIE W PROJEKTOWANIU  
ANTYSENSOWYCH OLIGONUKLEOTYDÓW**

Praca doktorska została wykonana  
w Zakładzie Genomiki Strukturalnej RNA

Promotor:  
dr hab. Elżbieta Kierzek, prof. IChB PAN

POZNAŃ 2017

*Serdeczne podziękowania składam  
Pani Profesor Elżbiecie Kierzek  
za wyrozumiałość, okazaną pomoc oraz opiekę promotorską*

*Panu Profesorowi Ryszardowi Kierzkowi  
dziękuję za cenne rady i uwagi*

*Zakładowi Genomiki Strukturalnej RNA dziękuję za wspólne rozmowy i  
wspaniałą atmosferę koleżeńską*

*Pracę dedykuję mojej Rodzinie, a w szczególności Tomaszowi,  
w podziękowaniu za wieloletnie wsparcie oraz  
pomoc w realizacji planów życiowych*

# SPIS TREŚCI

CEL PRACY .....	6
STRESZCZENIE.....	8
ABSTRACT.....	10
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW .....	12
<b>II. WSTĘP TEORETYCZNY .....</b>	<b>14</b>
1. Wprowadzenie .....	14
2. Wirus grypy typu A .....	14
2.1. Podstawowe informacje o wirusie.....	14
2.2. Wirus ptasiej grypy .....	16
2.3. Budowa wirionu wirusa grypy typu A .....	17
2.4. Znaczenie struktury vRNP.....	18
2.5. Cykl replikacyjny wirusa grypy typu A.....	19
3. Wirusy grypy pozostałych typów .....	25
4. Kierunki terapeutyczne w leczeniu grypy .....	28
4.1. Leki stosowane w leczeniu grypy.....	28
4.2. Nanotechnologia w walce z grypką.....	31
4.3. Oligonukleotydy antysensowe .....	32
4.4. Modyfikacje i dokomórkowy transport antysensowych oligonukleotydów.....	34
5. Profilaktyka zakażeń wirusem grypy .....	36
6. Pozostałe wirusy z rodziny Orthomyxoviridae .....	37
7. Motywy strukturalne RNA wirusa grypy.....	40
8. Metody przewidywania struktur RNA .....	43
8.1. Przewidywanie struktury drugorzędowej RNA.....	43
8.2. Przewidywanie struktury trzeciorzędowej RNA .....	46
<b>III. WYNIKI I DYSKUSJA .....</b>	<b>49</b>
1. Badania struktury drugorzędowej vRNA5.....	49
1.1. Otrzymanie i fałdowanie vRNA5 .....	49
1.2. Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej vRNA5.....	50
1.3. Optymalizacja reakcji odwrotnej transkrypcji .....	51
1.4. Reaktywność vRNA5 wobec odczynników mapujących.....	56
1.5. Model struktury drugorzędowej vRNA5 .....	59
1.6. Prawdopodobieństwo występowania par zasad i niesparowań w strukturze drugorzędowej vRNA5 wirusa grypy typu A.....	61
1.7. Analiza dostępności struktury vRNA5 do wiązania sond mikromacierzy izoenergetycznych.....	63
1.8. Analiza dostępności rejonów jednoniciowych cząsteczki vRNA5 dla hybrydyzacji oligonukleotydów z wykorzystaniem rybonukleazy H.....	67
2. Badania inhibicji namnażania wirusa grypy w obecności oligonukleotydów antysensowych .....	73
2.1. Projektowanie oligonukleotydów antysensowych w oparciu o strukturę drugorzędową vRNA5 .....	73
2.2. Wpływ oligonukleotydów antysensowych na namnażanie wirusa grypy.....	78
2.3. Określenie wydajności transfekcji komórek MDCK oligonukleotydami antysensowymi .....	80
2.4. Optymalizacja infekcji.....	82
2.5. Inhibicja namnażania wirusa sciIAV .....	83
2.6. Inhibicja namnażania wirusa A/California/04/2009 (H1N1) typu dzikiego.....	85
2.7. Określenie cytotoksyczności oligonukleotydów antysensowych.....	92
3. Oligonukleotydy antysensowe w badaniach namnażania wirusa grypy typu A- wyniki innych grup badawczych .....	94
4. Model struktury trzeciorzędowej vRNA5 wirusa grypy typu A .....	96
5. Konserwatywność struktury drugorzędowej vRNA5.....	102
6. Motyw pseudowęzła w vRNA5 .....	108
7. Potencjalne funkcje elementów strukturalnych vRNA5 wirusa grypy typu A .....	111

<b>IV.</b>	<b>MATERIAŁY I METODY .....</b>	<b>113</b>
1.	Wykaz stosowanego sprzętu laboratoryjnego .....	113
2.	Materiały .....	114
2.1.	<i>Badania struktury RNA</i> .....	114
2.1.1.	Enzymy .....	114
2.1.2.	Komercyjne zestawy .....	114
2.1.3.	Zestawy do oczyszczania kwasów nukleinowych .....	114
2.1.4.	Antybiotyki do hodowli komórek bakterii .....	114
2.1.5.	Bufory .....	114
2.1.6.	Pożywki .....	115
2.1.7.	Elektroforeza .....	116
2.1.8.	Markery wielkości kwasów nukleinowych .....	116
2.1.9.	Odczynniki do modyfikacji RNA .....	116
2.1.10.	Pozostałe odczynniki .....	117
2.1.11.	Akcesoria .....	117
2.2.	<i>Hodowla linii komórkowej MDCK</i> .....	117
2.2.1.	Linie komórkowe .....	117
2.2.2.	Odczynniki do hodowli komórkowej .....	117
2.2.3.	Plastiki do hodowli komórkowej .....	117
2.2.4.	Media hodowlane .....	118
2.3.	<i>Namnażanie wirusa grypy typu A</i> .....	118
2.3.1.	Stosowane szczepy wirusa grypy typu A .....	118
2.3.2.	Media stosowane podczas infekcji .....	118
2.3.3.	Odczynniki do izolacji RNA .....	119
2.3.4.	Przeciwciała .....	119
2.3.5.	Pozostałe odczynniki .....	119
2.3.6.	Akcesoria .....	119
3.	Metody .....	119
3.1.	<i>Badania struktury RNA</i> .....	119
3.1.1.	Transformacja komórek oraz izolacja plazmidów .....	119
3.1.2.	Synteza oligonukleotydów .....	120
3.1.3.	Odblokowywanie oligonukleotydów .....	120
3.1.4.	Znakowanie starterów barwnikami fluorescencyjnymi .....	121
3.1.5.	Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) .....	121
3.1.6.	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (PAGE) .....	121
3.1.7.	Strącanie .....	121
3.1.8.	Spektrometria mas .....	122
3.1.9.	PCR – otrzymanie matrycy do transkrypcji in vitro vRNA5 .....	122
3.1.10.	Elektroforeza w żelu agarozowym .....	122
3.1.11.	Transkrypcja in vitro .....	123
3.1.12.	Znakowanie vRNA5 [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] ATP .....	123
3.1.13.	Oczyszczanie RNA po transkrypcji .....	123
3.1.14.	Sekwencjonowanie oraz analiza kapilarna .....	123
3.1.15.	Fałdowanie cząsteczki vRNA5 .....	123
3.1.16.	Reakcja mapowania chemicznego .....	124
3.1.17.	Reakcja odwrotnej transkrypcji .....	124
3.1.18.	Przygotowanie płytek do drukowania mikromacierzy izoenergetycznych .....	125
3.1.19.	Drukowanie mikromacierzy izoenergetycznych .....	126
3.1.20.	Redukcja mikromacierzy izoenergetycznych .....	126
3.1.21.	Hybrydyzacja vRNA5 do sond mikromacierzy izoenergetycznych .....	126
3.1.22.	Analiza wyników uzyskanych z mikromacierzy izoenergetycznych .....	127
3.1.23.	Hydrolyza RNA rybonukleazą H .....	127
3.1.24.	Kontrole wzorcowe wielkości rozdzielanych w elektroforezie kapilarnej produktów .....	127
3.1.25.	Generowanie struktur drugorzędowych .....	128
3.1.26.	Określenie prawdopodobieństwa występowania par zasad oraz rejonów jednoniciowych w modelu struktury drugorzędowej vRNA5 .....	128

3.1.27.	Przewidywanie obecności pseudowęzłów w vRNA5 .....	128
3.2.	Hodowla linii komórkowej MDCK.....	129
3.2.1.	Hodowla linii komórkowej MDCK i MDCK-HA .....	129
3.2.2.	Transfekcja komórek MDCK WT oraz MDCK-HA.....	129
3.3.	Namnażanie wirusa grypy typu A.....	130
3.3.1.	Infekcja wirusowa.....	130
3.3.2.	Znakowanie z użyciem przeciwciał .....	131
3.3.3.	Izolacja RNA .....	131
3.3.4.	qPCR.....	131
3.4.	Badanie cytotoksyczności antysensowych oligonukleotydów w linii komórkowej MDCK.....	132
4.	Wykaz sekwencji .....	132
4.1.	Sekwencja segmentu 5 vRNA wirusa grypy szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1).....	132
4.2.	Sekwencja segmentu 5 vRNA wirusa grypy szczepu A/California/04/2009 (H1N1) .....	133
4.3.	Sekwencja plazmidu– PHH21 (bez insertu) .....	133
4.4.	Pozostałe sekwencje .....	134
<b>IV.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>143</b>

## CEL PRACY

Wirus grypy typu A jest poważnym zagrożeniem dla zdrowia i życia ludzi. Co roku dotyka nas epidemia grypy sezonowej. Rocznie choruje na grypę około miliarda osób, w tym u 3-5 milionów ludzi obserwuje się ciężki przebieg choroby, natomiast 250-500 tysięcy umiera z powodu infekcji lub powikłań pogrypowych. Istnieje też ciągle zagrożenie pandemią grypy, która ma miejsce, gdy zwierzęcy wirus grypy (szczególnie ptasi) nabiera zdolność do transmisji pomiędzy ludźmi, powodując szybkie rozprzestrzenienie się choroby i gwałtowny jej przebieg. Zmienność genomowa wirusa grypy wynika z naturalnych błędów polimerazy wirusowej, które prowadzą do powstawania mutacji, a także ze zdolności wirusa do reasortacji genomu. Obecnie wciąż istnieją wirusy grypy o potencjale pandemicznym, na przykład, ptasi wirus grypy typu A (H5N1) czy (H7N9). Powoduje to konieczność zintensyfikowania prac badawczych nad wirusem, nowymi metodami zapobiegania grypy, jak i poszukiwaniem nowych związków i podejść o potencjalnie terapeutycznymi.

Genom wirusa grypy składa się z ośmiu segmentów jednoniciowego RNA o ujemnej polarności (vRNA). Cykl życiowy wirusa jest na każdym jego etapie zależny od RNA. Ostatnie badania, także w Zakładzie Genomiki Strukturalnej RNA, wskazują, że wiedza o pofałdowaniu wirusowego RNA jest konieczna, aby lepiej zrozumieć biologię wirusa. Naturalna zmienność sekwencyjna RNA musi bowiem korelować z zachowaniem istotnych funkcyjnie motywów strukturalnych w wirusowym RNA. Zależność struktury i funkcji RNA wirusa grypy może z kolei być wykorzystana w projektowaniu skutecznych inhibitorów jego namnażania.

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie struktury drugorzędowej segmentu 5 vRNA wirusa grypy (vRNA5). Wiedza taka była podstawą w projektowaniu antysensowych oligonukleotydów mających inhibować namnażanie wirusa. Obiektem badań był segment 5 vRNA szczepu A/VietNam/1203/2004 (H5N1).

Szczegółowe cele badań były następujące:

1. Przeprowadzenie mapowań chemicznych metodą SHAPE oraz z zastosowaniem DMS, CMCT i ketoksalu dla określenia struktury drugorzędowej vRNA5.
2. Wykorzystanie metody mapowania mikromacierzowego, z użyciem mikromacierzy izoenergetycznych RNA, do weryfikacji struktury drugorzędowej i określenia dostępnych dla wiązania oligonukleotydów miejsc w vRNA5.

3. Określenie struktury drugorzędowej vRNA5 na podstawie danych eksperymentalnych z zastosowaniem programu *RNAstructure*.

4. Wyznaczenie rejonów w vRNA5, które pod względem dostępności w strukturze lub umiejscowienia w danym motywie strukturalnym stanowią dobry cel dla oligonukleotydów antysensowych.

5. Przeprowadzanie testów komórkowych z wykorzystaniem oligonukleotydów antysensowych na wybranym szczepie wirusa grypy H1N1 w linii komórkowej MDCK i określenie ich potencjalnych właściwości inhibitorowych w namnażaniu wirusa.

6. Przeprowadzenie analizy bioinformatycznej nakierowanej na poszukiwanie konserwatywnych motywów strukturalnych w vRNA5 oraz określenie stopnia uniwersalności struktury drugorzędowej vRNA5 dla wirusa grypy typu A.

## STRESZCZENIE

Wirus grypy typu A jest odpowiedzialny za śmierć prawie pół miliona osób rocznie. Niebezpieczeństwo, jakie niesie powoduje, że jest on obiektem badań wielu uczonych na całym świecie.

Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania miały na celu określenie struktury drugorzędowej piątego segmentu wirusa grypy typu A (vRNA5). Obiektem badań był vRNA5 szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) o długości 1565 nt. Zaprezentowany w pracy doktorskiej model struktury drugorzędowej vRNA5 uwzględnia wyniki mapowania chemicznego. Eksperymenty mapowania chemicznego zostały wykonane z użyciem DMS, CMCT, ketoksalu oraz NMIA. Do przewidywania struktury drugorzędowej wirusowego RNA wykorzystano program *RNAstructure*. Do programu zostały wprowadzone wyznaczniki stanowiące wyniki z eksperymentów mapowania chemicznego. Struktura drugorzędowa vRNA5 wirusa grypy typu A została zaprezentowana po raz pierwszy. Struktura drugorzędowa vRNA5 posiada trzy domeny: domenę I (rejony 1-69 nt oraz 1285-1565 nt), domenę II (70-797 nt) oraz domenę III (798-1284 nt). W obrębie domeny III znajduje się wysoce ustrukturyzowany rejon 1065-1281nt wraz z stabilną spinką 1074-1115 nt. Określono także prawdopodobieństwo występowania par zasad i rejonów jednoniciowych w zaproponowanej strukturze drugorzędowej vRNA5.

W toku badań wykonano również eksperymenty z zastosowaniem mikromacierzy izoenergetycznych, które miały na celu zidentyfikować w vRNA5 rejony dostępne dla wiązania oligonukleotydów. Eksperymenty hybrydizacyjne były prowadzone w 37°C w dwóch różnych buforach (sodowy i potasowy). Przeprowadzone badania hydrolizy vRNA5 w obecności rybonukleazy H pozwoliły na potwierdzenie dostępności miejsc dla wiązania sond mikromacierzy izoenergetycznych. Do potwierdzonych dostępnych miejsc wiązania sond mikromacierzy izoenergetycznych należą pozycje 469, 646, 683, 883, 1073, 1251 oraz 1330. Otrzymane wyniki pozwoliły również potwierdzić wiązanie antysensowych oligonukleotydów do vRNA5 wirusa grypy typu A

Dokonano analizę konserwatywności zaproponowanej struktury drugorzędowej vRNA5 wirusa grypy typu A analizując sekwencje 18500 szczepów. Zachowawczość par zasad modelu zaprezentowanej w pracy doktorskiej struktury drugorzędowej vRNA5 wynosi 87,1%. Struktura drugorzędowa vRNA5 jest wysoce zachowawcza, co wskazuje, że niektóre motywy strukturalne mogą występować także u innych szczepów wirusa grypy typu A.



W oparciu o strukturę drugorzędową vRNA5 wirusa grypy typu A zostało zaprojektowanych 16 antysensowych oligonukleotydów. Rejony docelowe oligonukleotydów antysensowych uwzględniały także wyniki otrzymane z mikromacierzy izoenergetycznych. Oligonukleotydy antysensowe posiadały modyfikacje typu LNA oraz 2'-O-MeRNA. Wśród oligonukleotydów znajdowały się także gapmery, których zadaniem było aktywowanie komórkowej rybonukleazy H.

Oligonukleotydy antysensowe zostały przetestowane pod kątem inhibicji namnażania wirusa grypy typu A. Badania zostały wykonane na modyfikowanej linii komórkowej MDCK-HA oraz wirusie scIAV A/California/07/2009 (H1N1), a także na linii komórkowej MDCK oraz wirusie A/California/07/2009 (H1N1). W badaniach monitorowano zarówno poziom wirusowego RNA, jak i ilość wirusa. Przeprowadzone badania pozwoliły wyselekcjonować oligonukleotydy antysensowe najefektywniej hamujące namnażanie wirusa grypy typu A. Najlepszym oligonukleotydem antysensowym był 7.5L powodujący 88% inhibicję namnażania wirusa grypy A/California/07/2009 (H1N1). Oligonukleotyd ten wiąże się w rejonie dużej pętli (rejon 878-888 nt), której dostępność była potwierdzona hybrydyzacją sond mikromacierzy izoenergetycznych. Do oligonukleotydów wykazujących znaczną inhibicję namnażania wirusa grypy A/California/04/2009 (H1N1) należały także 4.5 (inhibicja na poziomie 64%), 11.5L i 11.5 (inhibicja na poziomie około 48%) oraz oligonukleotydy typu gapmer 19GP i 23GP (inhibicja powyżej 36%).

Oligonukleotydy antysensowe zostały zbadane pod kątem potencjalnej cytotoksyczności za pomocą testu MTT. Wykazano, że w stosowanych w eksperymentach stężeniach (0,5  $\mu$ M) oligonukleotydy nie zmniejszały (lub tylko nieznacznie zmniejszały) przeżywalność komórek.

W oparciu o strukturę drugorzędową vRNA5 wirusa grypy typu A został wygenerowany model struktury trzeciorzędowej w programie *RNAComposer*. Model potwierdza dostępność rejonów w strukturze vRNA5 dla wiązania skutecznych antysensowych oligonukleotydów. Struktura trzeciorzędowa jest również w dużej części zgodna z profilem wiązania białka NP do vRNA5 w wirionie. Zdeterminowane motywy strukturalne mogą pełnić istotną rolę w cyklu namnażania wirusa w takich procesach, jak: pakowanie RNA do wirionów potomnych, replikacja, oddziaływania z białkami wirusowymi lub komórkowymi czy transport komórkowy.

## ABSTRACT

Every year influenza A virus causes 500 000 deaths worldwide. Influenza is important research subject for scientists around the world because of its threat to humanity.

The main goal of conducted research presented in this PhD dissertation was determination of secondary structure of influenza A virus segment 5 vRNA (vRNA5). The object of the research was vRNA5 of strain A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), which length is 1565nt. Presented secondary structure of vRNA5 was predicted with constraints from chemical mapping. Chemical mapping experiments were conducted with DMS, CMCT, kethoxal and NMIA. *RNAstructure* was used for secondary structure prediction using experimental data. Influenza A virus vRNA5 secondary structure was presented here for the first time. Secondary structure of vRNA5 has three domains: domain I (regions 1-69 nt and 1285-1565 nt), domain II (70-797 nt) and domain III (798-1284 nt). In the domain III there is highly structured region 1065-1281 nt with a stable hairpin 1074-1115 nt. Also, probability of forming base pairs in presented vRNA5 secondary structure was predicted.

Isoenergetic microarrays were used for determination of accessibility for oligonucleotides binding. Hybridization experiments were performed in two different buffers (containing either sodium or potassium) in 37°C. RNase H hydrolysis allowed to confirm isoenergetic microarray probes binding sites. The confirmed binding sites are 469, 646, 683, 883, 1073, 1251 and 1330. Obtained results also allow to confirm binding sites of antisense oligonucleotides to influenza virus vRNA5.

Bioinformatic analysis of proposed influenza A virus vRNA5 secondary structure was also performed toward how structural conserved are predicted base pairs, and how universal is the structure across type A. 18500 strains of type A were used for this analysis. The base pair conservation for the proposed model is 87,1% in average. This confirms that vRNA5 structure is highly conserved and various motifs presented in this structure may also occur in the other strains of influenza A virus.

On the basis of influenza A virus vRNA5 secondary structure, 16 antisense oligonucleotides were designed. Results from isoenergetic microarrays experiments were also used for decision of designed oligonucleotide target regions. Antisense oligonucleotides contained LNA and 2'-O-MeRNA modifications. There were also gaps within antisense oligonucleotides, that were used to activate cellular RNase H.

Antisense oligonucleotides were tested for inhibition of influenza virus A replication. Modified MDCK-HA cell line with sciIAV A/California/07/2009 (H1N1) virus and MDCK

cell line with A/California/07/2009 (H1N1) virus were used for experiments. In research both, level of virus RNA and virus titer were monitored. On the basis of these experiments antisense oligonucleotides that the most inhibit influenza A virus replication were selected. The best inhibitory oligonucleotide 7.5L caused 88% inhibition of strain A/California/07/2009 (H1N1) replication. This oligonucleotide binding site is located within large loop (878-888nt), which availability was confirmed by the isoenergetic microarray probes hybridization. High inhibition of A/California/04/2009 (H1N1) replication was also measured for oligonucleotide 4.5 (inhibition of 64%), 11.5L, 11.5 (around 48%) and gapmers 19GP and 23GP (more than 36%).

MTT assay was performed to test potential cytotoxicity of antisense oligonucleotides. It was showed that for the concentrations used in experiments the tested oligonucleotides showed no (or low) cytotoxicity.

Tertiary structure model was generated using *RNAComposer* software on the basis of influenza A virus vRNA5 secondary structure. This model confirmed accessibility of effective antisense oligonucleotides binding regions within the structure of vRNA5. Tertiary structure is mostly in agreement with NP-vRNA5 binding profile in virion. Determined structural motifs might have important role in the virus replication cycle in such processes as RNA packaging to progeny virions, replication, interaction with viral or cellular proteins and vRNA transport in cell.

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

<b>APS</b>	- nadsiarczan amonu
<b>ASO</b>	- (ang. <i>antisense oligonucleotide</i> ) oligonukleotyd antysensowy
<b>ATP</b>	- adenzyjno-5'-trifosforan
<b>AUG</b>	- kodon start
<b>BB</b>	- (ang. <i>bromophenol blue</i> ) błękit bromofenolowy
<b>CCS</b>	- (ang. <i>cell culture supernatant</i> ) pobrane medium z hodowli komórkowej
<b>CMCT</b>	- N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho-p-toluenesulfonate
<b>CHAPS</b>	- hydrat 3-[(3-cholamidopropyl)dimetyloamoniolo]-1-propanosulfonianu
<b>COPI</b>	- (ang. <i>coat protein complex I</i> ) kompleks białek okrywających I
<b>cpm</b>	- (ang. <i>counts per minute</i> ) ilość zliczeń na minutę
<b>cRNA</b>	- (ang. <i>complementary RNA</i> ) komplementarny RNA
<b>DMS</b>	- (ang. <i>dimethyl sulfate</i> ) siarczan dimetylu
<b>dNTP</b>	- trifosforan deoksynukleozydu
<b>DTT</b>	- ditiotreitrol
<b>EDTA</b>	- kwas etylenodiaminotetraoctowy
<b>FFU</b>	- (ang. <i>fluorescent focus unit</i> ) jednostka wyrażająca miano wirusa w metodzie immunofluorescencji
<b>g</b>	- przyspieszenie grawitacyjne
<b>GFP</b>	- (ang. <i>green fluorescent protein</i> ) białko zielonej fluorescencji
<b>HA</b>	- hemaglutynina
<b>HEPES</b>	- kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazylo]etanosulfonowy
<b>HPAI</b>	- (ang. <i>highly pathogenic avian influenza</i> ) wysoce zjadliwy wirus grypy ptasiej
<b>IFA</b>	- (ang. <i>indirect immunofluorescence assay</i> ) metoda immunofluorescencji pośredniej
<b>IFN</b>	- interferon
<b>IAV</b>	- (ang. <i>influenza A virus</i> ) wirus grypy typu A
<b>IBV</b>	- (ang. <i>influenza B virus</i> ) wirus grypy typu B
<b>ICV</b>	- (ang. <i>influenza C virus</i> ) wirus grypy typu C
<b>IDV</b>	- (ang. <i>influenza D virus</i> ) wirus grypy typu D
<b>IPTG</b>	- izopropyl-beta-d-1-tiogalaktopiranozyd
<b>ISAV</b>	- (ang. <i>infectious salmon anemia virus</i> ) wirus zakaźnej anemii łososi
<b>LB</b>	- (z ang. <i>lysogeny broth</i> ) bulion lizogenny
<b>LNA</b>	- (ang. <i>locked nucleic acid</i> ) modyfikowane kwasy nukleinowe o usztywnionej konformacji
<b>LPAI</b>	- (ang. <i>low pathogenicity avian influenza</i> ) wirus grypy ptasiej o niskiej zjadliwości
<b>mRNA</b>	- (ang. <i>messenger RNA</i> ) informacyjny RNA
<b>N</b>	- dowolny nukleotyd
<b>NA</b>	- neuraminidaza
<b>NCBI</b>	- <i>National Center for Biotechnology Information</i> , baza danych

<b>NES</b>	- (ang. <i>nuclear export signal</i> ) sygnał eksportu jądrowego
<b>NLS</b>	- (ang. <i>nuclear localization signal</i> ) sygnał lokalizacji jądrowej
<b>NMIA</b>	- (ang. <i>N-methylisatoic anhydride</i> ) bezwodnik kwasu metyloizatoinowego
<b>NP</b>	- nukleoproteina
<b>nt</b>	- nukleotydy
<b>MDCK</b>	- (ang. <i>Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells</i> ) komórki nabłonka nerki psa
<b>MDCK-HA</b>	- linia komórkowa MDCK wykazująca konstytutywną ekspresję hemaglutyniny
<b>MTT</b>	- bromek 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
<b>NAST</b>	- <i>Nucleic Acid Simulation Tool</i> , program
<b>PAA</b>	- poliakrylamid
<b>PAGE</b>	- (ang. <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> ) elektroforeza w żelu poliakrylamidowym
<b>PBS</b>	- (ang. <i>phosphate buffered saline</i> ) bufor fosforanowo-potasowy
<b>PCR</b>	- (ang. <i>polymerase chain reaction</i> ) łańcuchowa reakcja polimerazy
<b>PDB</b>	- <i>Protein Data Bank</i> baza danych
<b>PMO</b>	- (ang. <i>phosphorodiamidate morpholino oligomer</i> ) oligonukleotyd zawierający ugrupowania fosforoamido-morfolinowe
<b>PS</b>	- (ang. <i>phosphorothioate</i> ) wiązania tiofosforanowe
<b>qPCR</b>	- (ang. <i>quantitative PCR</i> ) reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym
<b>vRNA</b>	- (ang. <i>virial RNA</i> ) wirusowy RNA
<b>RNP</b>	- (ang. <i>ribonucleoprotein complex</i> ) kompleks rybonukleoproteinowy
<b>rpm</b>	- (ang. <i>revolutions per minute</i> ) obroty na minutę
<b>RT</b>	- (ang. <i>reverse transcription</i> ) reakcja odwrotnej transkrypcji
<b>sciIAV</b>	- (ang. <i>single cycle infection Influenza A Virus</i> ) jednocykliczny wirus grypy typu A
<b>SHAPE</b>	- (ang. <i>selective 2' hydroxyl acylation analyzed by primer extension</i> ) selektywna acylacja grupy 2'-hydroksylowej analizowana w reakcji wydłużania starterów
<b>SDS</b>	- dodecylosiarczan sodu
<b>TBE</b>	- bufor, Tris/kwas borowy/EDTA
<b>TEMED</b>	- N,N,N',N'-tetrametyloetyloetylenodiamina
<b>TLC</b>	- (ang. <i>thin-layer chromatography</i> ) chromatografia cienkowarstwowa
<b>Tris</b>	- tris(hydroksymetylo)aminometan
<b>TPCK</b>	- (ang. <i>N-tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone</i> )
<b>UTR</b>	- (ang. <i>untranslated region</i> ) rejon niepodlegający translacji
<b>UV</b>	- promieniowanie ultrafioletowe
<b>WT</b>	- (ang. <i>wild type</i> ) typ dziki
<b>XC</b>	- (ang. <i>xylene cyanol</i> ) cyjanol ksylenowy

## II. WSTĘP TEORETYCZNY

### 1. Wprowadzenie

Wirusy, których materiał genetyczny stanowi RNA są nazywane wirusami RNA. Posiadanie RNA, jako materiału genetycznego wiąże się z większą częstością mutacji. Związane jest to z cechą polimeraz RNA wirusowych, które nie posiadają aktywności korekcyjnej.

Wirusy RNA mogą posiadać materiał genetyczny w postaci jednoniciowej (ang. *single stranded RNA viruses, ssRNA viruses*), jak i dwuniciowej (ang. *double stranded RNA viruses, dsRNA viruses*). Wirusy posiadające genom w postaci jednoniciowego RNA dzielą się na wirusy RNA(+) oraz wirusy RNA(-). Wirusy RNA(+), to takie wirusy, których RNA może bezpośrednio służyć do biosyntezy białek. Do wirusów RNA(+) można zaliczyć np. pikornawirusy, które stanowią dużą grupę wirusów, potrafiących atakować wiele narządów. Do pikornawirusów należą między innymi rinowirusy, wywołujące powszechnie występujące przeziębienie.

W przypadku wirusów RNA(-), materiał genetyczny wirusa musi najpierw zostać przepisany na komplementarny do niego mRNA, który następnie służy, jako matryca w procesie translacji.

Dodatkowo, genomowe RNA wirusów może być segmentowane, tzn. cały genom podzielony jest na mniejsze segmenty RNA, z których każdy koduje jedno lub więcej białek wirusowych. Pośród wirusów o genomie segmentowanym RNA(-) możemy wyróżnić rodzinę *Orthomyxoviridae*. Do rodziny *Orthomyxoviridae* zaliczamy wirusy grypy (*Influenza virus*), a także wirusy z rodzaju *Thogotovirus*, *Quaranjavirus* oraz *Isavirus*. Istnieją cztery typy wirusa grypy: A, B, C oraz D. Obiektem badań opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej jest wirus grypy typu A. Podtypy wirusa typu A różnią się białkami powierzchniowymi wirionu, hemaglutyniną (HA) i neuraminidazą (NA), stąd w nazwach podtypu litera H oraz N.

### 2. Wirus grypy typu A

#### 2.1. Podstawowe informacje o wirusie

Pojawienie się nowych szczepów wirusa grypy typu A, skutkuje corocznym występowaniem epidemii, która w przypadku niekontrolowanego rozprzestrzeniania się, może przekształcić się w pandemię. Najbardziej znaną pandemią, wywołaną wirusem grypy typu A H1N1, była tzw. grypa hiszpanka, która w 1918 roku spowodowała śmierć około 50-100 milionów ludzi [1]. Innym przykładem jest pandemia w roku 1957, spowodowana przez wirus o podtypie H2N2 oraz w roku 1968, wywołana przez wirus o podtypie H3N2.

Ostatnia opisana pandemia była w 2009 i spowodowała śmierć około 18000 ludzi. Wywołał ją wirus o podtypie H1N1 [2].

Wirus grypy może infekować zarówno ludzi, jak i ptaki, świnie oraz małe ssaki takie jak: myszy, fretki oraz nietoperze. Za wysoką zmienność i zarazem infekcyjność wirusa grypy odpowiadają mechanizmy skoku antygenowego (ang. *antigenic shift*) oraz przesunięcia antygenowego (ang. *antigenic drift*) [3].

Skok antygenowy polega na wytworzeniu nowego podtypu, posiadającego na swojej powierzchni antygeny pochodzące od różnych szczepów. Skok antygenowy jest związany z podzieleniem genomu wirusa na segmenty. Kiedy jeden organizm zostanie zakażony dwoma różnymi podtypami wirusa, może dojść do reasortacji segmentów. W wyniku wymiany segmentów między wirusami, może powstać wirus o nowych cechach antygenowych. Organizm, w którym może dojść do takiego zjawiska, nazywany jest naczyniem mieszającym. Naczyniem mieszającym może być, na przykład, świnia, która może być zainfekowana zarówno wirusem ludzkim, jak i grypą ptasią. Skok antygenowy jest bardzo niebezpiecznym zjawiskiem, które może odpowiadać za wywołanie pandemii. Wirus H1N1, który spowodował pandemię w latach 2009-2010, powstał w wyniku reasortacji segmentów pomiędzy trzema różnymi podtypami wirusa tzw. grypy świńskiej, ludzkiej oraz ptasiej [4].

Przesunięcie antygenowe polega na kumulowaniu się pojedynczych mutacji w genach kodujących białka powierzchniowe wirusa, neuraminidazy (NA) i hemaglutyniny (HA), w wyniku czego zmieniają się właściwości antygenów powierzchniowych. Nagromadzenie mutacji może prowadzić do sytuacji, w której przeciwciała gospodarza nie będą rozpoznawać antygenów powierzchniowych wirusa, mimo, że gospodarz miał wcześniej styczność z wirusem w wyniku infekcji. Przesunięcie antygenowe powoduje, że co roku konieczne jest opracowywanie nowych szczepionek.

Prócz infekcyjnych cząstek wirusowych podczas pączkowania powstają cząstki wirusowe o niekompletnym zestawie segmentów w wirionie. Procent niekompletnych cząstek wirusowych produkowanych w cyklu namnażania zależy między innymi od szczepu wirusa. Przykładowo, dla szczepu A/PuertoRico/8/1934 (A/PR8) wykazano, że prawie połowa cząstek wirusowych nie była zdolna do produkcji przynajmniej jednego wirusowego białka, co prawdopodobnie wynikało z zaburzeń pakowania segmentów do wirionów. Tylko kompletny - posiadający osiem segmentów wirion jest zdolny do samodzielnego przeprowadzenia całego cyklu replikacyjnego i wytworzenia wirionów potomnych [5].

W badaniach opisanych w niniejszej pracy doktorskiej wykorzystywano dwa szczepy wirusa grypy, A/Vietnam/1023/2004 (H5N1) oraz A/California/04/2009 (H1N1). W nazwie szczepu zawarte są podstawowe informacje na temat wirusa. W pierwszej kolejności podawany jest typ wirusa (A), a następnie nazwa gatunkowa organizmu, z którego został wyizolowany. W przypadku izolatów pochodzących z organizmu człowieka, ten etap jest pomijany. W dalszej kolejności podaje się miejsce izolacji (Vietnam, California), numer izolacji (1023), rok izolacji (2004, 2009) oraz podtyp (H5N1, H1N1) [6].

## **2.2. Wirus ptasiej grypy**

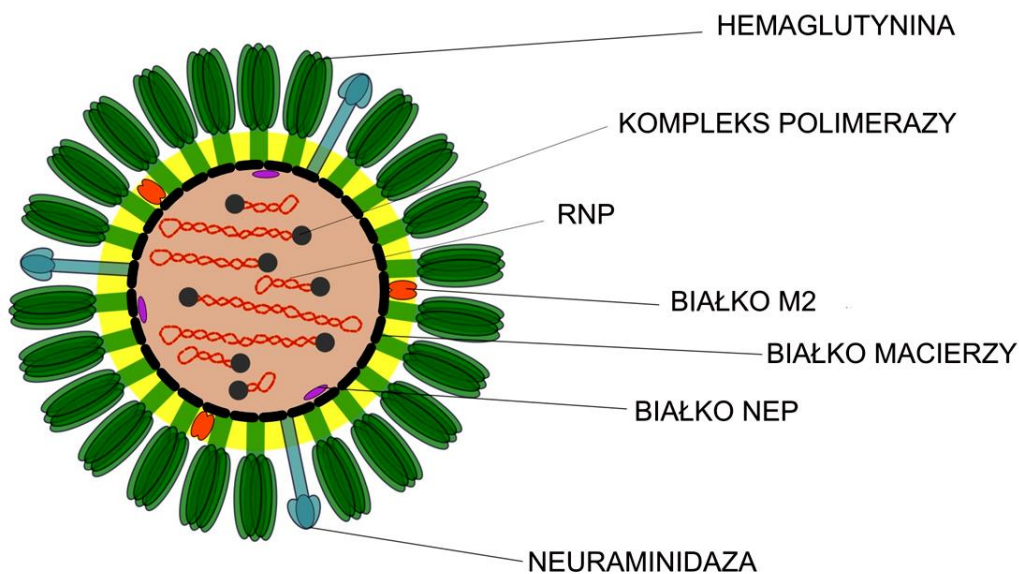
Duże zainteresowanie i obawy budzi wirus ptasiej grypy. Infekcje ptasią grypą wśród ludzi zdarzają się stosunkowo rzadko. Jednak ich pojawienie stanowi spory problem, ponieważ istnieje duże ryzyko, że w wyniku reasortacji segmentów wirusa grypy ptasiej i ludzkiej stanie się możliwe przenoszenie choroby pomiędzy ludźmi. Badania wirusa ptasiej grypy mają szczególne znaczenie, gdyż spowodowana przez niego infekcja mogłaby się gwałtownie rozprzestrzeniać wśród populacji ludzkiej. Objawy zakażenia wirusem ptasiej grypy mogą mieć szerokie spektrum od łagodnych do ciężkich, włącznie ze śmiercią pacjenta. Ze względu na przebieg choroby u zakażonego drobiu, wyróżniono dwa typy wirusa ptasiej grypy: HPAI (*highly pathogenic avian influenza*), wysoce zjadliwy wirus ptasiej grypy oraz LPAI (*low pathogenic avian influenza*), wirus ptasiej grypy o niskiej zjadliwości. Najczęściej wirusy HPAI są bardzo patogenne także w przypadku zakażenia ludzi. Oprócz człowieka, wirus ptasiej grypy może infekować także psy, koty, świnie, foki, lamparty czy tygrysy [7]. Do wirusów HPAI należą między innymi H5N1, H5N6, H5N2, H5N3, oraz H5N8, z czego dwa pierwsze wymienione podtypy mogą być odpowiedzialne za infekcje u ludzi. Pierwszy przypadek zakażenia człowieka ptasią grypą zarejestrowano w 1997 roku w Hong Kongu. Obecność wirusa H5N1 stwierdzono wówczas u 18 osób, w wyniku czego 6 zmarło [8, 9].

Zakażenia wirusem ptasiej grypy, zarówno ludzi jak i drobiu, dotychczas występowały w ponad 60 krajach na całym świecie. Dla wirusa HPAI H5N1 do tej pory zarejestrowano przeszło 850 przypadków zakażeń od 2003 roku. Z tego powyżej 50% przypadków zakończyło się śmiercią [9, 10]. Średni wiek pacjentów chorujących na grypę wywołaną wirusem H5N1, w okresie od 1 maja 1997 do 30 kwietnia 2015, wyniósł 19 lat. W każdym kolejnym roku odnotowuje się więcej nowych zachorowań spowodowanych wirusem H5N1 [10].



### 2.3. Budowa wirionu wirusa grypy typu A

Wirion wirusa grypy typu A jest sferyczny i ma około 100 nm średnicy (Rysunek 1). Sporadycznie występują także formy filamentarne, których długość może wynosić nawet 1  $\mu\text{m}$ . Formy filamentarne były obserwowane głównie w klinicznych izolatach, natomiast formy sferyczne u szczepów namnażanych w warunkach laboratoryjnych. Na ostateczny kształt cząstek wirusowych mają wpływ białka wirusowe neuraminidazy (NA), hemaglutyniny (HA), białka M1, M2 oraz nukleoproteina (NP) [11].



**Rysunek 1.** Model wirionu wirusa grypy typu A.

Na powierzchni wirionu występuje dwuwarstwa lipidowa, w której umieszczone są białka hemaglutynina i neuraminidaza, przy czym, tych pierwszych jest cztery razy więcej. Zidentyfikowano 18 typów białka hemaglutyniny oraz 11 rodzajów neuraminidazy. Obecność w osłonce wirusa danego rodzaju białek HA i NA determinuje podtyp wirusa grypy typu A. Łączna możliwa liczba kombinacji podtypów wynosi 198 [12]. W osłonce zakotwiczone jest również białko M2, obecne w ilości około 20 cząsteczek na wirion. Stanowi ono kanał jonowy. W osłonce wirusowej występują również białka komórek gospodarza, w których nastąpiła replikacja wirusa, takie jak, na przykład, białka cytoszkieletu, aneksyny czy enzymy glikolityczne. Rola tych białek w cyklu replikacyjnym wirusa nie została jeszcze poznana [13].

Pod powierzchnią osłonki lipidowej znajduje się warstwa białek macierzy (białko M1). Osłania ona rdzeń wirusa, czyli 8 segmentów wirusowego RNA (vRNA)

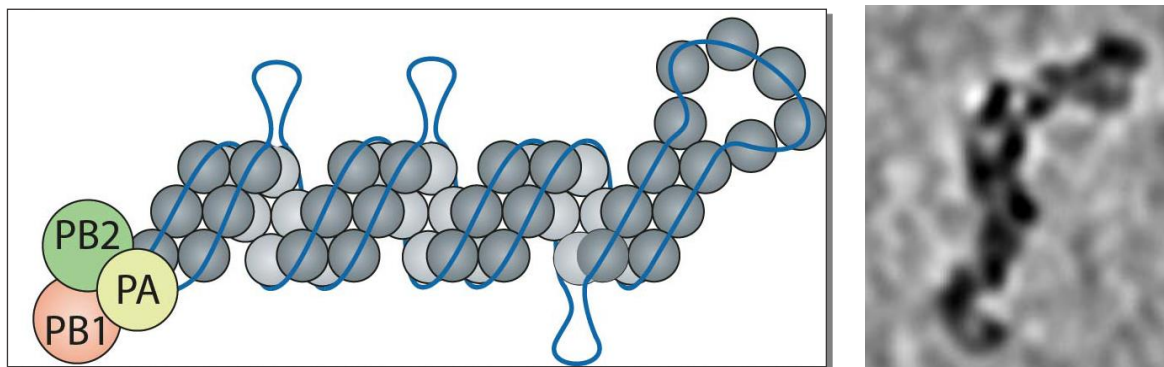
związanych z białkiem NP i polimerazą wirusową tworząc osiem kompleksów rybonukleoproteinowych (ang. *ribonucleoprotein complex*, RNP).

#### 2.4. Znaczenie struktury vRNP

Genom wirusa grypy składa się z ośmiu segmentów vRNA. Segmenty wirusowe zostały nazwane numerami nadanymi zgodnie z wielkością segmentu od najdłuższego do najkrótszego vRNA. Kwasy nukleinowe we wnętrzu kapsydu występują w postaci kompleksów rybonukleoproteinowych (vRNP). Oprócz białka NP w kompleksie rybonukleoproteinowym występują także białka polimerazy: białko PB1, PB2, PA [6, 14, 15]. Wirusowe kompleksy rybonukleoproteinowe różnią się rozmiarami cząsteczek. Najkrótszy kompleks ma około 30 nm, najdłuższy około 120 nm. Średnica wszystkich vRNP jest taka sama i wynosi 12 nm [5].

vRNP są rozmieszczone w wirionie, według schematu „7+1”, co oznacza, że wokół centralnie położonego segmentu, umieszczonych jest siedem pozostałych vRNP. Charakterystyczne rozmieszczenie vRNP w wirionie oraz ich wspólny transport w zainfekowanej komórce, świadczy, że pomiędzy poszczególnymi vRNA może dochodzić do oddziaływań [5, 14].

Na podstawie wyników uzyskanych z transmisyjnej mikroskopii elektronowej potwierdzono, że w jednym wirionie najczęściej umieszczonych jest osiem segmentów. Wiriony niekompletne, posiadające mniej niż osiem segmentów, występują w mniejszości. Precyzyjne umieszczenie vRNP w segmentach sugeruje, że mechanizm pakowania nie jest przypadkowy, a cząsteczka vRNP musi nieść informację, która pozawala na odróżnienie od siebie poszczególnych vRNP. Taką informacją mogłaby być, na przykład, struktura vRNA tworzącego vRNP [16, 17].



**Rysunek 2.** Budowa kompleksu rybonukleoproteinowego. Po lewej stronie schematyczne przedstawienie budowy vRNP. Niebieskim kolorem zaznaczono vRNA, szarym rdzeń utworzony z białka NP. Pewne fragmenty vRNA w wirionie są niezwiązane z NP. Białka PA, PB1, PB2 stanowią podjednostki wirusowej polimerazy RNA zależnej od RNA. Po prawej zdjęcie vRNP wykonane techniką mikroskopii krioelektronowej. Zauważyć można, że cząsteczkę vRNP cechuje pewna elastyczność [18, 19].

Cząsteczka vRNP ma strukturę przypominającą spinkę do włosów, w której trzon stanowi prawoskrętna anty-równoległa podwójna helisa zakończona pętlą [19-21]. RNA jest nawinięte na rdzeń utworzony z białka NP, w nierównomierny sposób (Rysunek 2). vRNP nie jest sztywną strukturą, ale ma możliwość zginania się i dopasowywania do kolistego kształtu wirionu. Jest to możliwe dzięki tworzeniu przez białko NP charakterystycznych pierścieni, które powstają z 7, 6, lub 5 cząsteczek nukleoproteiny. Za sprawą przerw, które występują między pierścieniami, dochodzi do relaksacji struktury vRNP. Takie nierównomierne rozmieszczenie NP w vRNP może przyczynić się do tego, że są obserwowane różne wartości skoku helisy vRNP [19-21].

Profil wiązania NP jest częściowo podobny u szczepów tego samego podtypu, co świadczy o tym, że może mieć charakter uniwersalny. Niezwiązane z białkiem vRNA może brać udział w oddziaływaniach między segmentami czy też w obrębie segmentu, tworząc funkcjonalne motywy strukturalne. Zarówno rejony vRNA niezwiązane z nukleoproteiną RNA, jak i te wiążące białko mogą pełnić istotną biologiczną funkcję. Niektóre segmenty, na przykład vRNA3 wiążą znacznie mniej białka NP niż inne segmenty (np. vRNA1) co może świadczyć o tym, że w vRNA istnieją różnej długości rejony pozbawione NP [18].

W niektórych segmentach (np. w vRNA5) na 3' oraz 5' końcach oraz w rejonie UTR może być również wiązane białko NP. Segmenty mogą różnić się między sobą funkcją, jaką pełnią podczas pakowania wirionów. Segmenty, które posiadają nieopłaszczone nukleoproteiną 3' i 5' UTR, mogą wzajemnie oddziaływać i/lub tworzyć motywy strukturalne regulujące proces pakowania. W celu zweryfikowania znaczenia różnic w dostępności 3' i 5' końców segmentów dla białka NP potrzebne są dalsze badania [14, 18, 20, 21].

Oddziaływania RNA-RNA, białko-białko oraz RNA-białko regulują procesy zachodzące podczas infekcji. W tych oddziaływaniach kluczową rolę pełni struktura komponentów vRNP. Poznanie struktury vRNA, oraz dokładnej organizacji w vRNP jest istotne by zrozumieć lepiej funkcję vRNP w cyklu namnażania wirusa grypy.

## **2.5. Cykl replikacyjny wirusa grypy typu A**

Cykl replikacyjny wirusa grypy jest złożonym procesem, w którym biorą udział zarówno białka wirusowe, jak i białka gospodarza - stanowi on sieć wzajemnych interakcji. W czasie infekcji dochodzi do aktywowania 128 genów ludzkich, które są powiązane z takimi procesami jak: inicjacja translacji, endocytoza i transport jądrowy [22]. Dla prawidłowego

przebiegu cyklu namnażania ma znaczenie także struktura RNA, co zostało przybliżone w podrozdziale „Znaczenie badań struktury RNA wirusa grypy”.

W cyklu replikacyjnym wirusa powstaje więcej niż 13 białek wirusowych (Tabela 1). Osiem z nich to białka strukturalne, tworzące wirion. Oprócz tego występują jeszcze białka regulatorowe, które są obecne tylko podczas trwania cyklu namnażania wirusa i nie są białkami występującymi w kapsydzie [23].

**Tabela 1.** Białka kodowane przez poszczególne segmenty vRNA wirusa grypy typu A [23-30].

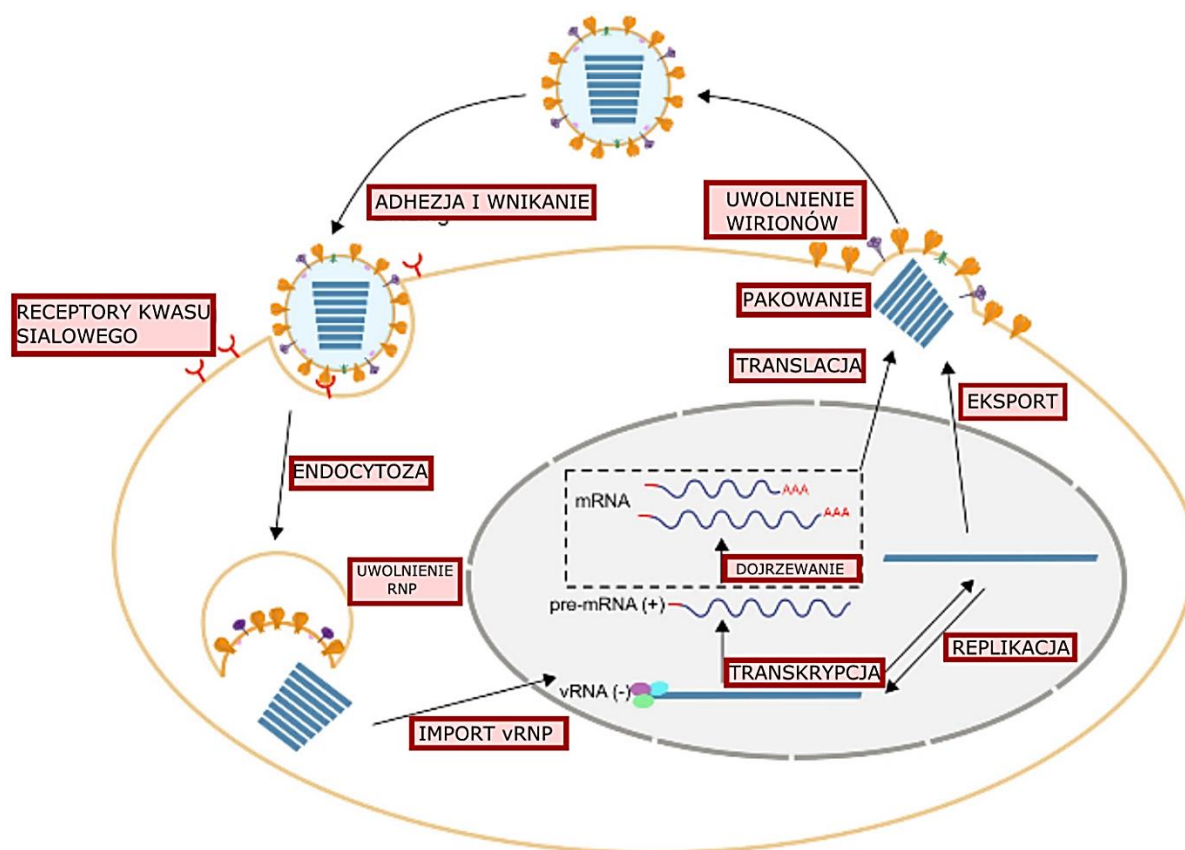
Segment	Nazwa białka	Uwagi
1	PB2	Tworzy kompleks rybonukleoproteinowy. Jest podjednostką polimerazy wirusowej. Odpowiada za hamowanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza poprzez wpływ na IFN typu I.
2	PB1	Tworzy kompleks rybonukleoproteinowy. Jest podjednostką polimerazy wirusowej, odpowiada za syntezę RNA.
	PB1-F2	Regulacja odpowiedzi immunologicznej gospodarza, powstaje na drodze zmiany ramki odczytu w mRNA segmentu 2.
	PB1-N40	Oddziałuje z kompleksem polimerazy, peptyd istotny w procesie replikacji. Powstaje na drodze zmiany ramki odczytu w mRNA PB1.
3	PA	Tworzy kompleks rybonukleoproteinowy. PA wchodzi w skład polimerazy wirusowej. Odpowiedzialne za hydrolizę mRNA gospodarza.
	PA-X	Hamowanie syntezy białek gospodarza, inhibicja IFN $\beta$ .
	PA-N155	Wspomaga replikację, dokładna rola nie jest znana. Skrócone z N-końca białko PA.
	PA-N182	Funkcja nieznana. Skrócone z N-końca białko PA.
4	HA	Glikoproteina. Białko powierzchniowe cząstki wirusa. Odpowiada za adhezję i wnikanie wirusa.
5	NP	Tworzy kompleks rybonukleoproteinowy (RNP), łączy vRNP z białkiem M1. Bierze udział w procesie replikacji, posiada sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) oraz sygnał eksportu jądrowego (NES).
6	NA	Glikoproteina. Białko powierzchniowe cząstki wirusa. Katalizuje reakcje rozpadu wiązania $\alpha$ -glikozydowego w cząsteczce kwasu sialowego. Odpowiedzialne za uwalnianie wirusów potomnych z komórki gospodarza.
7	M1	Białko macierzy, tworzy wewnętrzną białkową otoczkę wirusa. Regulator transkrypcji. Odpowiada za eksport jądrowy oraz pakowanie vRNP do wirionów.
	M2	Białko transbłonowe, tworzy kanał jonowy. Odpowiada za utrzymanie odpowiedniego pH wewnątrz wirionu oraz pęcherzyków transportujących. Powstaje na drodze alternatywnego splicingu mRNA M1.
	M42	Białko pełniące funkcję kanału jonowego.
8	NS1	Wzmaga replikację wirusa. Powoduje inhibicję syntezy IFN typu I, bierze udział w splicingu wirusowego RNA. Odpowiada za hamowanie poliadenylacji oraz eksportu jądrowego mRNA gospodarza.
	NEP (NS2)	Odpowiada za eksport vRNP. Posiada sygnał eksportu jądrowego (NES), posiada sygnał lokalizacji jądrowej (NLS). Powstaje na drodze alternatywnego splicingu z mRNA segmentu 8
	NS3	Zwiększenie poziomu replikacji wirusa. Inhibicja IFN $\beta$

Unoszące się w powietrzu cząstki wirusa grypy mogą dostać się do górnych dróg oddechowych. Wirusy mogą być obecne w powietrzu np. w wyniku kaszlu zainfekowanych osób, czy też trzepotania skrzydeł zakażonego drobiu. Do zakażenia może dojść także w wyniku kontaktu bezpośredniego, który obejmuje dotykane zakażonych powierzchni, a następnie przenoszenie zanieczyszczeń w okolice twarzy. W przewodzie oddechowym człowieka panuje temperatura optymalna dla namnażania się wirusa grypy, wynosząca 33°C. W wyniku postępującej infekcji może dojść do rozprzestrzenienia się zakażenia w dolnych drogach oddechowych. Temperatura powietrza obecnego w oskrzelach i płucach wynosi 37°C i jest również korzystną temperaturą dla wielu szczepów wirusa grypy. Zanim dojdzie do zakażenia, wirus musi pokonać grubą (nawet do 50 µm) warstwę śluzu, pokrywającą tkanki układu oddechowego. Śluz jest bogaty w oligosacharydy - między innymi zawiera kwas sialowy. Białko NA uwalnia wiriony ze śluzu, dzięki swojej aktywności hydrolitycznej. Wiriony mogą przedostać się przez warstwę śluzu a następnie wiązać się do receptorów nabłonka oddechowego [31].

Białko HA bierze udział w procesie adhezji, rozpoznając wiązania  $\alpha$ -2,3 glikozydowe (wirus grypy ptasiej) lub  $\alpha$ -2,6 glikozydowe (wirus grypy ludzkiej) występujące w kwasie sialowym. Kwas sialowy jest obecny na powierzchni komórek. Wirus świńskiej grypy może rozpoznawać zarówno wiązania glikozydowe typu  $\alpha$ -2,6, jak i  $\alpha$ -2,3 [23, 32].

Wiązanie HA inicjuje proces endocytozy. Następnie, w wyniku aktywowania białka M2 przez obecność niskiego pH w endosomie, dochodzi do fuzji osłonki wirusa z błoną pęcherzyka endocytarnego. Osłabieniu ulegają oddziaływania między białkami i w efekcie vRNP zostają odłączone od białka M1. W wyniku fuzji pęcherzyka z osłonką, vRNP zostają uwolnione do cytoplazmy i zostają przetransportowane do jądra komórkowego, gdzie rozpoczyna się replikacja materiału genetycznego (Rysunek 3) [23]. Białka wchodzące w skład kompleksu rybonukleoproteinowego, takie jak: PB1, PB2, PA tworzą razem wirusową polimerazę RNA zależną od RNA [23]. Wirusowy RNA stanowi matrycę do syntezy mRNA (ang. *messenger RNA*) oraz cRNA (ang. *complementary RNA*). Cząsteczka cRNA natomiast jest matrycą, na której jest syntezowany potomny vRNA. Replikacja wirusowego RNA nie wymaga obecności startera, ale w procesie tym niezbędna jest obecność białka NP. Powstające w wyniku replikacji vRNA mogą służyć, jako matryca dla kolejnych mRNA lub mogą być transportowane do cytoplazmy w celu tworzenia nowych cząstek wirusowych. Do syntezy białek wirusowych w procesie translacji służy nie w pełni komplementarne do vRNA - mRNA. Cząsteczki mRNA dzięki traktom 5-7 reszt urydynowych w vRNA posiadają tzw. ogon poli(A). Natomiast czapeczkę guanozynową

(kap) wirusowe mRNA uzyskuje w procesie tzw. *cap-snatching* z pre-mRNA gospodarza. N-końcowa domena białka PA ma aktywność endonukleazy, co umożliwia hydrolizę mRNA gospodarza. Białko PB2 natomiast przechwytuje kap z 5' końca pre-mRNA, w wyniku czego powstają 10-15 nukleotydowe startery potrzebne do rozpoczęcia syntezy wirusowego mRNA. Pre-mRNA, wykorzystane do przechwytywania kapu, wybierane są losowo. Za syntezę wirusowego mRNA odpowiada podjednostka polimerazy PB1. Częsteczki Wirusowe mRNA posiada podobnie, jak mRNA gospodarza, ogon poli(A) na 3' końcu oraz kap na końcu 5'. Powoduje to, że wirusowy mRNA oraz pre-mRNA gospodarza nie są rozróżniane przez komórkę [6, 24, 33].



**Rysunek 3.** Ogólny schemat cyklu namnażania wirusa grypy typu A [34].

Następnie mRNA jest transportowany z jądra do cytoplazmy i rozpoczyna się synteza białek. Wszystkie białka powstające z wirusowego RNA zostały przedstawione w tabeli 1. Każdy segment koduje przynajmniej jedno białko. Z mRNA segmentów pierwszego, czwartego, piątego i szóstego powstaje po jednym białku wirusowym. Pozostałe segmenty kodują więcej białek.

Początkowo uważano, że vRNA2 koduje tylko białko PB1. Jednak okazuje się, że możliwa jest synteza białka z alternatywnych miejsc inicjacji translacji w wyniku, czego powstają białka PB1-F2 oraz PB1-N40 [26]. Bezpośrednio z mRNA segmentu trzeciego

powstaje białko PA. W wyniku przesunięcia ramki odczytu możliwa jest synteza białka PA-X. W mRNA segmentu trzeciego są obecne także dodatkowe kodony AUG, z których odbywa się synteza białek PA-N155 i PA-N182 [31]. Dodatkowe białka z segmentów siódmego oraz ósmego powstają na drodze alternatywnego splicingu. W procesie alternatywnego składania wirusowego mRNA udział biorą białka komórki gospodarza. Z segmentu siódmego powstają trzy białka: M1, M2 oraz M42. Natomiast, z segmentu ósmego powstają białka NS1, NS2 oraz NS3 [34].

Postuluje się, że etap splicingu może być kluczowy dla regulacji całej infekcji. U różnych szczepów zaobserwowano różne wydajności splicingu. W przypadku szczepu A/Brevig Mission/1918/1 (H1N1) mało wydajny splicing prowadzi do nagromadzenia białka NS1, co ma wpływ na infekcyjność wirusa. Uważa się, że zaburzenia splicingu mogły być przyczyną wysokiej śmiertelności powodowanej przez grypę hiszpankę [35].

Poszczególne szczepy mogą różnić się profilem syntezy białek. Nie zawsze pełen zestaw białek jest obecny u wszystkich szczepów. Przykładowo, NS3 zaobserwowano u szczepów, które przystosowały się do namnażania u myszy, natomiast nie wykryto jak dotąd tego białka w wirusie namnażającym się u człowieka. Obecność białka była związana z pojawieniem się mutacji i w efekcie nowego miejsca splicingowego [30].

Kolejnym etapem regulacji cyklu namnażania wirusa grypy są procesy modyfikacji białek. W początkowej fazie cyklu, białko M1 jest ubikwitynowane przy lizynie 242. W tej samej pozycji, w fazie późnej, białko M1 podlega sumoilacji, co powoduje, że zwiększa się jego stabilność i dochodzi do jego akumulacji. Większa ilość białka M1 powoduje, że wzmagany jest proces eksportu jądrowego vRNP.

Synteza białek HA, M2 i NA zachodzi w retikulum endoplazmatycznym szorstkim. Hemaglutynina jest syntetyzowana w postaci prekursora H0. W wyniku działania enzymów proteolitycznych, obecnych w komórkach zainfekowanego gospodarza, dochodzi do hydrolizy wiązania peptydowego i powstania dwóch podjednostek hemaglutyniny: HA1 oraz HA2 [23]. Przedwczesnemu dojrzewaniu hemaglutyniny przeciwdziała białko M2, które kontroluje pH w pęcherzyku endosomalnym. Zarówno białko hemaglutyniny oraz neuraminidazy podlegają glikozylacji [11, 23].

Białka HA, M2, NA do apikalnej części błony komórkowej są transportowane za pomocą kompleksu białek oplaszczających - COPI. Mechanizm transportu białek HA, NA, M2 jest inny niż w przypadku transportu kompleksu RNP. Z jądra do cytoplazmy transportowany jest zarówno vRNA, jak i cRNA [28].

Białko M1 nie posiada sygnału, który pozwoliłby na kierowanie tego białka do błony komórkowej w części apikalnej komórki, dlatego prawdopodobnie jest transportowane razem z vRNP przez pory jądrowe do cytoplazmy. Proces transportu odbywa się przy udziale eksportyn i wymaga energii z ATP. Eksportyny znajdują sygnał eksportu jądrowego NES obecny w białku NEP, które oddziałuje z białkiem M1. vRNP są transportowane w postaci kompleksów tworzących się z trzech do czterech segmentów. Nie zaobserwowano natomiast transportu pojedynczych segmentów oraz wszystkich ośmiu segmentów jednocześnie [36].

W procesie eksportu jądrowego bierze udział białko NP, które również posiada NES. W eksporcie vRNP mogą uczestniczyć także białka gospodarza jak, na przykład oddziałujące z NP białko NXT1 czy białko szoku Hsc70, które oddziałuje z białkiem M1 [27]. vRNP transportowane są w kierunku wewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Proces zachodzi między innymi przy udziale mikrotubuli oraz pęcherzyków endocytarnych. W procesie transportu kompleksu vRNP biorą udział inne białka komórkowe takie, jak STAU1, HRB czy Rab11. vRNP gromadzą się po wewnętrznej stronie błony komórkowej, przy czym znaczenie ma odłączenie się od vRNP białka Rab11. Białko Rab11 bierze także udział w transporcie białka M2 do części apikalnej komórki.

Proces pakowania segmentów do wirionów nie jest dokładnie znany. Wiadomo, że najprawdopodobniej nie jest procesem losowym oraz jest zależny od sygnałów pakowania obecnych w sekwencji vRNA na końcach 5' oraz 3'. Mutacje w sygnale pakowania jednego segmentu powodują upośledzenie pakowania pozostałych segmentów, gdyż w pakowaniu istotne może być występujące oddziaływanie pomiędzy segmentami. Umieszczenie sygnału pakowania na końcach 5' i 3' może mieć związek z pakowaniem do wirionów tylko segmentów o pełnej długości. Możliwe jest pakowanie mniejszej liczby segmentów niż ośmiu do wirionów, przy czym takie wiriony nie są zdolne do dalszej replikacji. Natomiast nie zaobserwowano większej liczby segmentów niż osiem w wirionie (nawet w dużych formach filamentarnych). W procesie pakowania vRNP duże znaczenie mogą mieć interakcje RNA-RNA. Niektóre rejony w vRNA niezwiązane z białkiem NP mogą tworzyć motywy strukturalne RNA. Takie dostępne rejony RNA mogłyby ze sobą oddziaływać i tworzyć kompleksy, które będą wspólnie pakowane do wirionu. Proces pakowania wirusa grypy jest w dalszym ciągu badany [14, 16, 18].

W wyniku nagromadzenia białek w części apikalnej dochodzi do powstania strefy pączkowania i wypuklenia błony komórkowej. Białko M2 ma znaczenie przy formowaniu kształtu pęcherzyka i odrywaniu go od błony komórkowej [37]. Białko NA odpowiada za usuwanie reszty kwasu sjałowego z oligosacharydów białek osłonki, dzięki czemu możliwe



jest uwolnienie wirusów, a cząstki wirusowe nie agregują [31]. Wirusowe mRNA nie są pakowane, gdyż posiadają kap oraz ogon poli(A) i są traktowane jak pre-mRNA komórki. Białko M1 może wiązać się z vRNP, natomiast nie oddziałuje z cRNP. Powoduje to, że transport vRNP oraz cRNP w cytozolu się różni. Oddziaływanie z M1, między innymi, odpowiada za pakowanie vRNP do wirionów. Natomiast cRNP nie wiąże M1, więc nie podlega pakowaniu. Nowe wiriony opuszczają komórkę i cykl namnażania wirusa grypy typu A rozpoczyna się od początku [28].

### 3. Wirusy grypy pozostałych typów

Wirus grypy typu A jest najlepiej zbadanym wirusem w rodzinie *Orthomyxoviridae*. Oprócz niego do tej grupy wirusów zaliczamy wirusy grypy typu B, C oraz D.

Wirus grypy typu B (ang. *influenza B virus*, IBV) został odkryty w 1940 roku. Epidemie powodowane przez IBV występują, co 2-4 lata. Choroba spowodowana infekcją tym wirusem może skutkować wysoką śmiertelnością. Za 29% wszystkich przypadków śmiertelnych, spowodowanych przez wirusy grypy w USA w latach 1997-2009, odpowiadały wirusy grypy typu B [38]. Najbardziej podatne na infekcję wirusem są dzieci i młodzież w wieku 5-19 lat [39]. Objawy są bardzo podobne do zakażenia spowodowanego IAV. W przypadku wirusa grypy typu B częściej dochodzi do powstania powikłań ze strony układu nerwowego i układu mięśniowo- szkieletowego. U dorosłych zmarłych w wyniku IBV częściej wdawały się też infekcje bakteryjne powodujące zapalenie płuc [40, 41].

IBV posiada, podobnie jak IAV, 8 segmentów vRNA, natomiast białka wytwarzane przez wirus grypy B różnią się sekwencją i długością od białek wirusa grypy typu A. Segmenty 1-3 kodują PB1, PB2, PA-białka polimerazy wirusowej. Funkcje białek są podobne u obu wirusów. Segment 4 koduje hemaglutyninę, która uczestniczy w wiązaniu wirusa do receptorów nabłonka oddechowego. HA wiąże się do kwasu sialowego z mniejszą wydajnością niż jest to obserwowane w przypadku wirusa grypy typu A. Mimo, że sekwencja białka HA z IBV różni się od sekwencji aminokwasowej białka pochodzącego z IAV, to struktura i funkcje są podobne [42]. Segment 5 koduje białko NP. Nukleoproteina wirusa grypy typu B znacznie różni się od białka NP wirusa grypy typu A. Białko posiada dwie dodatkowe domeny, dzięki którym białko NP IVB może pełnić dodatkowe, nieznanne jeszcze funkcje. Białko NP wirusa grypy typu B hamuje namnażanie wirusa grypy typu A, między innymi, poprzez oddziaływanie z białkiem PB2 [43]. Z segmentu 6 powstają białka NB oraz neuraminidaza. Neuraminidaza odpowiada za uwolnienie wirusów z komórki gospodarza, a także bierze udział w hydrolizie kwasu sialowego i wnikaniu wirusa do komórek. Tym

samym pełni funkcję identyczną, jak w przypadku wirusa grypy typu A. Białko NB jest białkiem charakterystycznym dla IBV. Funkcja białka NB nie została poznana, jednak obecność tego białka w komórkach zwiększa wydajność replikacji IBV [44]. Segment 7 koduje białka BM1 i BM2. Rola białka BM1 w cyklu replikacyjnym wirusa grypy typu B nie została jeszcze poznana. Białko BM2 może brać udział w pakowaniu vRNP do potomnych wirionów, ma też wpływ na infekcyjność wirusa. [45]. Segment 8 koduje białko NEP i NS1. Białko NS1 pełni istotne funkcje podczas cyklu namnażania wirusa. Zarówno białko NEP, jak i NS1 mają podobne funkcje jak u wirusa IAV. U wirusa grypy typu A dochodzi do oddziaływania białka NEP z vRNP poprzez białko M1. Natomiast, w przypadku IBV dochodzi do bezpośredniego oddziaływania vRNP i NEP [45].

Gospodarzem dla wirusa grypy typu B jest zazwyczaj tylko człowiek, co skutkuje tym, że w przypadku IBV istnieje mniejsze ryzyko pandemii niż dla IAV. Tymczasem IAV z powodzeniem może namnażać się także w organizmach ptaków czy świń, co znacznie ułatwia rozprzestrzenianie infekcji. Chociaż istnieją przypadki infekcji innych zwierząt, na przykład IBV wyizolowano z organizmu foki. RNA wirusa grypy typu B był obecny też w górnych drogach oddechowych świń, natomiast nie udało się wyizolować cząstek wirusowych. Przeciwciała skierowane przeciwko wirusowi były obecne u świnki morskiej [46].

W przypadku wirusa grypy typu B może także dochodzić do skoku i przesunięcia antygenowego [39, 43]. Inhibitory neuraminidazy są znacznie mniej skuteczne w przypadku wirusa grypy typu B niż w przypadku wirusa grypy typu A. Stosowane w leczeniu IAV rymantadyna i amantadyna nie są skuteczne w przypadku IBV [47].

Wirus grypy C (ang. *influenza C virus*, ICV), podobnie jak wirus grypy typu B atakuje głównie dzieci oraz młodzież. Wirus jest najczęściej wykrywany w organizmach osób poniżej 5 roku życia. Większość dorosłych ludzi posiada przeciwciała skierowane przeciwko wirusowi grypy typu C, co oznacza, że infekcja powodowana przez tego wirusa nie jest rzadkością. Zazwyczaj powoduje powstanie łagodnych objawów ze strony układu oddechowego oraz gorączkę. Może powodować zapalenie spojówek lub przebiegać bezobjawowo. Atakuje zarówno górne, jak i dolne drogi oddechowe. Wirus grypy typu C najlepiej namnaża się w temperaturze 33°C, jednak może namnażać się z mniejszą wydajnością także w 37°C. Materiał genetyczny wirusa grypy typu C stanowi siedem segmentów wirusowego RNA.[48, 49].

Niewiele wiadomo na temat białek kodowanych przez ICV. Segmenty 1-3 kodują białka polimerazy. Wirus nie posiada białka neuraminidazy ani hemaglutyniny. Segment 4 koduje białko HEF, które odpowiada za fuzję wirusa z błoną komórkową gospodarza. Segment 5 koduje białko NP. Natomiast, segment 6 koduje białka M1 oraz CM2. To ostatnie bierze udział w pakowaniu segmentów do wirionów potomnych oraz uwalnianiu segmentów z kapsydu w endosomach. Fosforylacja białka CM2 ma wpływ na wydajność namnażania wirusa [49, 50].

Wirus może także atakować świnię oraz psy, jednak jego głównym gospodarzem jest człowiek. Niektóre szczepy wirusa mogą być przenoszone pomiędzy świnią [49, 51]. Wirus podlega procesowi przesunięcia antygenowego. Badania japońskich naukowców potwierdziły, że reasortacja segmentów ICV może prowadzić do powstania nowego szczepu zdolnego do powodowania epidemii [48, 51].

Wirus grypy typu D (ang. *influenza D virus*, IDV) został odkryty w 2011 roku w USA. Wirus powoduje infekcję bydła, które było wcześniej uważane za odporne na wirusa grypy. Wirus ten początkowo pomyłono z ICV, jednak istniejące różnice, między innymi, w sekwencji spowodowały, że konieczne było wyodrębnienie nowego typu. Na temat wirusa grypy typu D wciąż niewiele wiadomo. Występowanie wirusa odnotowano we Francji, Włoszech oraz Chinach [51-53]. Wirus namnaża się w górnych oraz dolnych drogach oddechowych. Najwyższy poziom replikacji wirusa zaobserwowano w temperaturze 37°C [49].

Podobnie jak wirus grypy typu C materiał genetyczny wirusa IDV zbudowany jest z siedmiu segmentów RNA. Sekwencje końców 5' i 3' tworzące motyw *panhandle* (opisany niżej, w rozdziale *Motywy strukturalne RNA wirusa grypy*) są niemal identyczne, jak u ICV oraz IDV. Podobnie jak w przypadku ICV, białka wirusa nie zostały w pełni zbadane. Segmenty 1-3 kodują białka tworzące wirusową polimerazę (białka PB1, PB2, P3). Segment 4 koduje białko HEF, białko esterazy hemaglutyniny, które odpowiada za adhezję wirusa na powierzchni komórek nabłonka oddechowego. Białko HEF ICV oraz IDV posiadają sekwencję aminokwasową identyczną w 55%. Struktura trzeciorzędowa obu białek jest niemal identyczna. Białko HEF, nie wykazuje takiej zmienności jak HA czy NA, stąd uważa się, że zachorowanie na grypę spowodowaną infekcją wirusa grypy typu C lub D, daje długotrwałą odporność [49, 51-53]. Segment 5 koduje nukleoproteinę, a segment 6 koduje białko błonowe M1 oraz transbłonowe białko CM2. Natomiast segment 7 koduje białka NS1 oraz NS2, które są odpowiedzialne za hamowanie odpowiedzi immunologicznej komórki

gospodarza oraz eksport potomnych cząsteczek rybonukleoproteinowych z jądra komórkowego [49].

Wirus może powodować infekcję u świń oraz u fretki [51-53]. Świnia może być naczyniem mieszającym dla ICV oraz IDV. Wirus może również infekować ludzi, jednak znacznie rzadziej niż pozostałe typy wirusów grypy. Szacuje się, że około 1,3% światowej populacji ludzkiej posiada przeciwciała skierowane przeciwko hemaglutynie wirusa grypy typu D. Ryzyko zakażenia znacznie rośnie, wśród ludzi pracujących z bydłem. Wciąż nie wiadomo, czy wirus może być przenoszony z człowieka na człowieka [49].

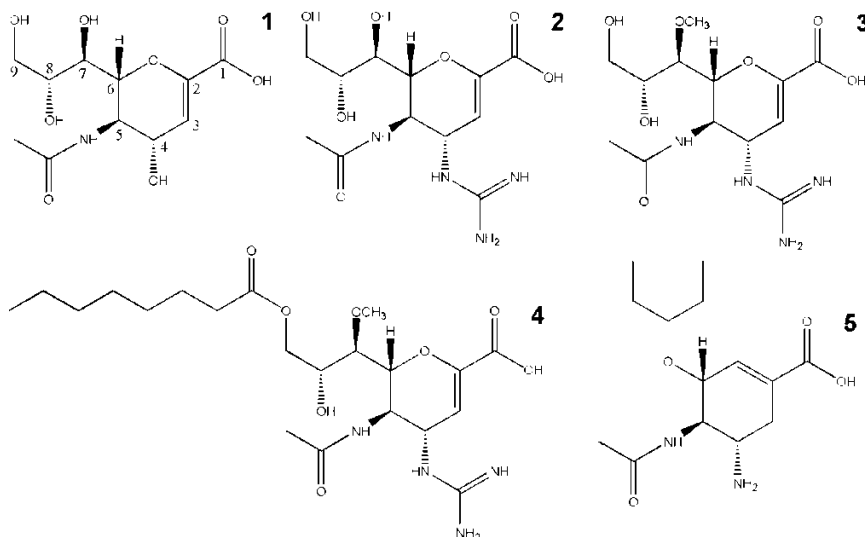
## **4. Kierunki terapeutyczne w leczeniu grypy**

W poniżej zostaną przedstawione wybrane kierunki związane z projektowaniem nowych leków przeciwko wirusowi grypy. Zaprezentowane zostaną także aktualnie stosowane, skuteczne terapie oraz zagadnienia związane z profilaktyką grypy.

### **4.1. Leki stosowane w leczeniu grypy**

Aktualnie leki zatwierdzone przez FDA do stosowania w terapii zakażeń wirusem grypy to: oseltamiwir, peramiwir oraz zanamiwir. W Polsce stosowany jest oseltamiwir w postaci preparatu *Tamiflu*. W Japonii dostępny jest nowy związek - laninamiwir. Wszystkie leki są inhibitorami neuraminidazy (Rysunek 4) [54, 55].

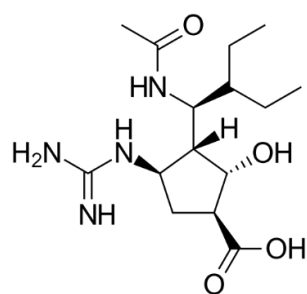
Oseltamiwir jest podawany doustnie. W wątrobie ulega przekształceniu do karboksylanu oseltamiwiru, który wykazuje właściwości przeciwwirusowe. Lek jest naczelniany na neuraminidazę i działa na szczepy wirusa grypy typu A i B. Oseltamiwir wykazuje mniejsze podobieństwo strukturalne do kwasu sjałowego i jego analogu – DANA niż zanamiwir. Jest to powodem, że zanamiwir jest uważany za skuteczniejszy lek, mniej podatny na wytworzenie oporności przeciwko niemu. Wykazano, że oseltamiwir podawany w postaci aerozolu daje lepsze efekty terapeutyczne, niż podawany w standardowy sposób [56, 57].



**Rysunek 4.** Wzory strukturalne inhibitorów neuraminidazy. (1) DANA - analog stanu przejściowego kwasu sjałowego wiązanego przez NA, (2) zanamivir, (3) laninamiwir, (4) oktanian laninamiwiru i (5) oseltamiwir [56].

Zanamivir wykazuje skuteczne działanie przeciwwirusowe i jest powszechnie stosowany przeciwko wirusowi grypy typu A oraz B. Nie zaobserwowano, aby inhalowany zanamivir był toksyczny. Niestety lek przy doustnym podawaniu wykazuje słabą przyswajalność, gdyż wykazuje silną polarność. Jedną z możliwości podania leku jest stosowanie inhalacji, co jest kłopotliwe, szczególnie dla osób z astmą, gdyż zanamivir występuje w preparacie w postaci proszku. Dodatkowo, obserwowane jest częste zapychanie inhalatora. Lek nie powinien być stosowany przez osoby posiadające alergię na białko mleka, które wchodzi w skład preparatu. Trwają badania nad alternatywnym sposobem podawania leku, na przykład drogą dożylną [57-60].

Kolejnym lekiem jest peramiwir (Rysunek 5). Stosowany w ciężkich przypadkach zakażeń świńską grypą, charakteryzował się wysoką skutecznością. Lek podawano, mimo, że badania kliniczne nie zostały zakończone. Peramiwir budził kontrowersje, gdyż ostateczne wyniki IV fazy badań nie wykazały istotnych różnic pomiędzy próbą a kontrolą. Raport z badań, jako przyczynę podał mutacje obecne w szczepach wykorzystywanych w badaniach klinicznych. Ostatecznie peramiwir został jednak zatwierdzony przez FDA w 2014 roku. Lek podawany jest dożylnie [54, 59]. Laninamiwir to inhibitor neuraminidazy, skuteczny w walce z szczepami opornymi na oseltamiwir. Laninamiwir wykazuje podobieństwo strukturalne do zanamiviru. Stosowany jest w postaci proleku – oktanianu laninamiwiru.



**Rysunek 5.** Strukturalny wzór peramiwiru.

Oktanian laninamiwiru jest stosowany, jako proszek do inhalacji i w przeciwieństwie do zanamiwiru potrzebne jest tylko jednorazowe podanie, ponieważ lanamiwir ma przedłużoną trwałość w płucach [55, 56].

Niestety stosowanie leków przeciwwirusowych często wiąże się z wystąpieniem oporności u szczepów wirusa grypy. Przykładowo, dziś nie zaleca się już stosowania amantadyny i rymantadyny. Amantadyna oraz rymantadyna były lekami naczelnymi na białko M2 i powodowały zaburzenia działania kanału jonowego, co blokowało procesy usunięcia otoczki i fuzji osłonki z błoną pęcherzyka endocytarnego [61].

W 1994 roku obserwowana oporność u podtypu H3N2 na amantadynę i rymantadynę wynosiła 1%, natomiast w roku 2005 wzrosła już do 91% [62, 63]. Rośnie także procent szczepów opornych na oseltamiwir. Wystąpienie mutacji skutkującej zastąpieniem histydyny przez tyrozynę w pozycji 274 w NA powoduje słabsze wiązanie oseltamiwiru [64]. Właśnie ze względu na pojawiającą się oporność, nowe substancje o działaniu przeciwwirusowym muszą być nieustannie poszukiwane.

Kierunki poszukiwań obejmują, między innymi, inhibitory, które celują w interakcje zachodzące pomiędzy białkami gospodarza i vRNP wirusa. Do takich inhibitorów mogą należeć wielonienasycone kwasy tłuszczowe, naturalnie występujące w komórce. Badania na myszach wykazały, że protektyna D wykazuje inhibicję namnażania wirusa grypy typu A [65].

Jako, że splicing jest kluczowym etapem infekcji wirusowej, duże znaczenia ma poszukiwanie inhibitorów tego procesu. Do zidentyfikowanych niskocząsteczkowych związków, które zaburzają proces splicingu wirusowego mRNA, należy TG003. Związek ten jest inhibitorem białka CLK1, które uczestniczy w splicingu. Namnażanie wirusa grypy typu A w linii komórkowej A549 w obecności TG003 było obniżone o 93%, bez zaobserwowania efektów toksycznych [66].

Poza badaniami cyklu namnażania wirusa i poszukiwaniem jego nowych inhibitorów stosowane są także badania przeciwwirusowych właściwości substancji pochodzących z ekstraktów roślin stosowanych zwyczajowo w leczeniu grypy. Badania najczęściej mają na celu identyfikację substancji czynnej, która mogłaby być stosowana, jako suplement wspomagający leczenie grypy. Do roślin, które posiadają właściwości przeciwwirusowe należy między innymi *Jatropha multifida*, która jest rośliną z rodzaju wilczomleczowatych, występującą na terenie Republiki Związku Mjanmy (dawniej Birma). Wodne oraz chloroformowe ekstrakty z *J. multifida* inhibowały namnażanie wirusa H1N1. Dodatkowo, wodne ekstrakty zwiększały przeżywalność komórek MDCK zakażonych wirusem grypy typu A [67].

#### **4.2. Nanotechnologia w walce z grypą**

Trwają prace z wykorzystaniem nanocząstek w walce z wirusem grypy. W ciągu ostatnich 10 lat znaczenie nanotechnologii w walce z wirusami znacznie wzrosło. Poza zastosowaniem w leczeniu, nanocząstki wykorzystywane są w detekcji, obrazowaniu wirusa grypy i badaniu efektywności szczepionek [68].

Nanocząstki stosuje się, między innymi, w celu lepszego dostarczenia leku czy zwiększenia przeciwwirusowego działania. Przykładowo, Lin i współpracownicy stworzyli nanocząstki selenu, które pozwalają na efektywne dostarczenie zanamiwiru. Selen dodatkowo stymuluje układ immunologiczny. Nanocząstki selenu charakteryzuje też niska toksyczność. Oprócz selenu stosowano także nanocząstki srebra z zanamiwirem, które wykazuje właściwości przeciwwirusowe. W obu przypadkach przeżywalność zakażonych komórek traktowanych nanocząstkami była większa niż w kontroli [58, 69].

Stosowano także nośniki złota, mimo, że nanocząstki złota nie wykazują właściwości przeciwwirusowych. Sametband i współpracownicy pokryli nanocząstki złota merkaptoetansulfonianem (MES) oraz kwasem merkaptobursztynowym (MSA). Oba typy nanocząstek inhibowały namnażanie wirusa grypy w linii komórkowej MDCK. Za właściwości przeciwwirusowe stosowanych w badaniach nanocząstek były odpowiedzialne sulfoniany, polisulfoniany i polisiarczany wykazujące działanie przeciwwirusowe poprzez wiązanie białka HA i zahamowanie wnikania wirusa grypy do komórki [70, 71]. Nanocząstki mogą być też wykorzystywane w dostarczaniu antysensowych oligonukleotydów [72].

### 4.3. Oligonukleotydy antysensowe

Trwają prace nad wykorzystaniem kwasów nukleinowych w walce z wirusem grypy. Jednym z przykładów terapeutycznych kwasów nukleinowych są antysensowe oligonukleotydy (ASO). Informacje dotyczące wyników badań inhibicji namnażania wirusa grypy w obecności oligonukleotydów antysensowych nakierowanych na vRNA5 znajdują się w rozdziale „*Wyniki i Dyskusja*”. W tej części zostaną przedstawione wybrane przykłady antysensowych oligonukleotydów nacelowanych na pozostałe segmenty wirusów grypy. Antysensowe oligonukleotydy są stosowane w badaniach inhibicji namnażania wirusa grypy począwszy od lat 90 ubiegłego wieku [73].

W badaniach wykorzystujących ASO w inhibicji namnażania wirusów grypy, zastosowano dwa różne podejścia. Antysensowe oligonukleotydy mogą być nakierowane na wirusowe mRNA lub na vRNA.

Grupa Mizuty używała oligonukleotyd antysensowy zawierający tiofosforany, którego celem był mRNA PB2. Oligonukleotyd był 20-merem a jego rejon docelowy nachodził na kodon AUG. Oligonukleotyd był dostarczany do myszy z pomocą liposomów. Dla oligonukleotydu antysensowego stosowanego w dawce 40 mg/kg zaobserwowano 10-krotne obniżenie miana wirusa w płucach myszy infekowanych wirusem H1N1 w stosunku do kontroli. Wynik był porównywalny z próbą, w której stosowano rybawiryne (stężenie rybawiryny wynosiło 40 mg/kg) [74].

Grupa Martelli’ego stosowała wektory lentiwirusowe, aby dostarczyć antysensowe oligonukleotydy do linii komórkowej A23. W wyniku integracji z DNA komórki dochodziło do konstytutywnej ekspresji i utrzymania stałego poziomu oligonukleotydów antysensowych. Oligonukleotydy były nakierowane na 5’UTR w vRNA1, vRNA2, vRNA3. Największy poziom inhibicji namnażania wirusa grypy typu A (H1N1) zaobserwowano dla oligonukleotydu nakierowanego na vRNA2 i wynosił on  $1,2 \log_{10}$  [75].

Istotnym podejściem przy projektowaniu antysensowych oligonukleotydów nakierowanych na wirusa grypy typu A, jest uwzględnienie struktury drugorzędowej vRNA. Jest to metoda stosowana w macierzystym Zakładzie Genomiki Strukturalnej RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN. Dotychczas opublikowane prace prezentują wyniki inhibicji namnażania wirusa grypy typu A (H1N1), w wyniku działania ASO zaprojektowanych w oparciu o strukturę drugorzędową vRNA segmentu ósmego (vRNA8) oraz mRNA segmentu piątego (mRNA5). W przypadku ASO nakierowanych na vRNA8 pięć oligonukleotydów ze wszystkich zaprojektowanych antysensowych oligonukleotydów wykazywało 5-krotne obniżenie namnażania wirusa w stosunku do kontroli. W ASO



stosowano modyfikacje typu 2'O-metyloRNA oraz LNA. Badane oligonukleotydy antysensowe nie wykazywały cytotoksyczności [76, 77].

Chińscy naukowcy badali trzy antysensowe oligonukleotydy posiadające modyfikacje typu 2'O-metyloRNA oraz podstawnik butylowy przy 3'-końcu. Oligonukleotydy były nakierowane na konserwatywne rejony w mRNA segmentu 8 wirusa grypy H5N1. Jako nośnika dla dostarczenia antysensowych oligonukleotydów używano lipofektaminy. Wszystkie oligonukleotydy powodowały obniżenie poziomu białka HA przy stosowanym zakresie stężeń wynoszącym od 0,2 do 2  $\mu$ M. Przeprowadzono także testy *in vivo*, w których oligonukleotydy były dostarczane drogą donosową. Najlepszy efekt uzyskano dla mieszaniny oligonukleotydów antysensowych. Wykazano, że 87,5% infekowanych kurcząt przeżyło, gdy podano im mieszaninę trzech oligonukleotydów. Prawdopodobnie wiązanie jednego oligonukleotydu, prowadziło do zwiększenia dostępności RNA dla pozostałych [78].

Opisane powyżej przykłady dotyczą oligonukleotydów antysensowych, wykorzystanych w badaniach laboratoryjnych. Aby oligonukleotyd antysensowy został wykorzystany, jako terapeutyk musi posiadać szereg cech, między innymi, być: stabilny w środowisku komórkowym, po spełnieniu swojej roli powinien zostać wydalony z organizmu (lub rozłożony), nie może być toksyczny, musi być skuteczny, dostarczony precyzyjnie i specyficznie oddziaływać z tylko z docelowym RNA.

Radavirsen jest przykładem oligonukleotydu antysensowego, który może wkrótce znaleźć zastosowanie w leczeniu ludzi. Działanie radavirsenu polega na hamowaniu translacji białek M2 oraz M1. Radavirsen wiąże się do mRNA segmentu siódmego i stanowi zawadę przestrzenną w procesie translacji. Oligonukleotyd został zaprojektowany tak, by wiązać się w rejonie wykazującym silną konserwatywność sekwencji. Oligonukleotyd wpływa także na proces splicingu. Radavirsen zawiera ugrupowania fosforoamido-morfolinowe (PMO). Lek jest w fazie badań klinicznych, natomiast wstępne wyniki sugerują, że jest bezpieczny, w zakresie stosowanych, terapeutycznych dawek. Najpowszechniejszym skutkiem ubocznym u ochotników biorących udział w badaniach były bóle głowy. Radavirsen jest skuteczny tylko w przypadku wirusa grypy typu A [79].

Powyższe przykłady pokazują, że antysensowe oligonukleotydy mogą być skuteczne w inhibicji namnażania wirusa grypy oraz mają szansę zostać powszechnie stosowanym lekiem.

#### 4.4. Modyfikacje i dokomórkowy transport antysensownych oligonukleotydów

Ważne zagadnienie stanowi również sposób dostarczenia antysensownych oligonukleotydów, gdyż terapeutyczne RNA są najczęściej ujemnie naładowanymi (na grupie fosforanowej) cząsteczkami i ich transport przez błony jest problematyczny. Terapeutyczne RNA wnikają do komórki i są transportowane w postaci pęcherzyków endocytarnych. Oligonukleotydy antysensowne będąc zamknięte w pęcherzykach nie mogą oddziaływać z cząsteczkami obecnymi w cytozolu czy jądrze [80].

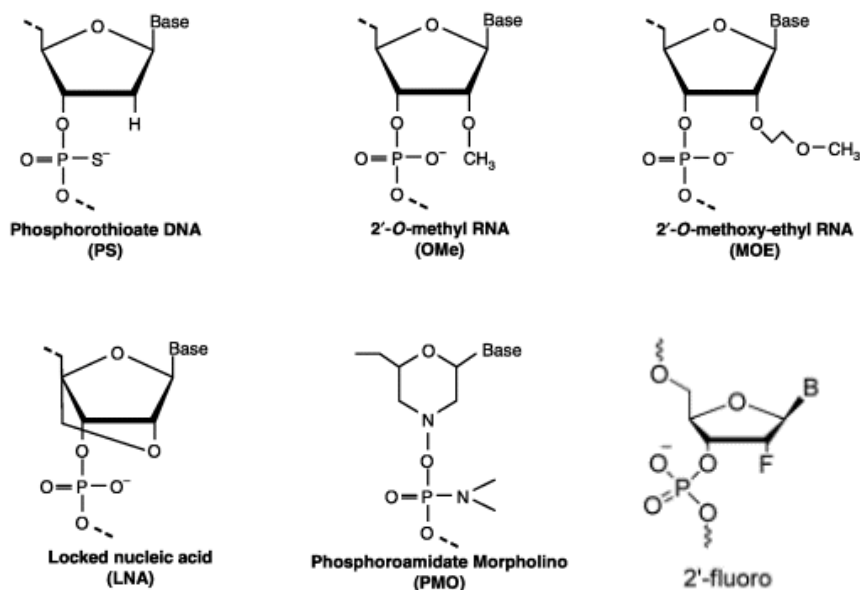
W skuteczności działania oligonukleotydów duże znaczenie mają modyfikacje, które wpływają na ładunek cząsteczki oraz chronią ASO przed działaniem endonukleaz. Przykładowo, modyfikowane nukleotydy typu morfolinowego w PMO nie posiadają ładunku, przez co cechują się zwiększoną siłą wiązania do RNA oraz łatwiej wnikają do komórek [72].

Kolejnym przykładem jest zastosowanie modyfikowanych nukleotydów tiofosforanowych (ang. *phosphothioate*, PS). Obecność w łańcuchu wiązań tiofosforanowych, zwiększa odporność oligonukleotydu antysensownego na degradację powodowaną przez nukleazy. Oligonukleotydy posiadające tiofosforany mogą wiązać się do białek osocza, co zapobiega szybkiemu wydaleniu z organizmu. Wiązanie do białek osocza pozwala także na rozprowadzenie oligonukleotydów antysensownych w całym organizmie. Oligonukleotydy PS mogą wiązać się do białek wewnątrzkomórkowych, co powoduje, że takie oligonukleotydy są stopniowo uwalniane w komórce. Kolejną zaletą oligonukleotydów zawierających PS jest zdolność do samoistnego przenikania przez pęcherzyk endocytarny (*gymnosis*). Proces ten nie został jeszcze dokładnie poznany [80-83].

Zastosowanie modyfikowanych nukleotydów, które zwiększają powinowactwo (tworzenie termodynamicznie trwalszych dupleksów) antysensownego oligonukleotydu do docelowego RNA, również pośrednio ułatwia jego dostarczenie, gdyż pozwala skrócić jego długość. Do modyfikacji, które zwiększają wiązanie oligonukleotydu do RNA należą między innymi modyfikacje cukrów w pozycji 2' jak: 2'-O-metylo, 2'-fluoro czy 2'-O-metoksyetylo (ang. *2'-O-methoxyethyl*, 2'-MOE). Oligonukleotydy te również opierają się działaniu rybonukleaz [81, 83].

Bardzo silne wiązanie do docelowego RNA wykazują również oligonukleotydy posiadające LNA (ang. *locked nucleic acid*, LNA). Ryboza w LNA ma dodatkowe wiązanie między węglem C4' a tlenem O2'. Oligonukleotydy antysensowne posiadające modyfikacje LNA charakteryzują się wysoką odpornością na działanie nukleaz. Dla krótkich LNA

również zaobserwowano *in vitro* zjawisko bezpośredniego wnikania oligonukleotydów [83, 84].



**Rysunek 6.** Rysunek przedstawia modyfikacje nukleotydów stosowane w antysensownych oligonukleotydach [83, 85].

W przypadku oligonukleotydów antysensownych mających wykazywać działanie terapeutyczne ważnym aspektem jest kierowanie ASO do docelowego narządu. W przypadku wirusa grypy będą to drogi oddechowe. Pomocne w procesie precyzyjnego dostarczenia do narządu staje się sprzężanie oligonukleotydów z cząsteczkami pomocniczymi oraz stosowanie odpowiednich nośników jak na przykład lipofektamina. To czy w ogóle oraz jakiego rodzaju powinny być zastosowane nośniki, a także, z jakimi cząsteczkami powinien być sprzężony oligonukleotyd zależy od długości ASO, jego sekwencji, stosowanych modyfikacji oraz narządu, w którym oligonukleotyd ma wykazywać działanie [86].

W przypadku dróg oddechowych precyzyjne dostarczenie może zapewnić odpowiedni sposób podania antysensownego oligonukleotydu. Bardzo pomocne może stać się suszenie rozpyłowe antysensownych oligonukleotydów oraz zastosowanie aerozolu czy inhalacji, co pozwala na uzyskanie wysokiego stężenia terapeutyku bezpośrednio w drogach oddechowych [87]. Niestety bez zastosowania nośnika czy cząsteczek pomocniczych może nie być obserwowany efekt terapeutyczny w płucach, co może wynikać, między innymi, z dużej warstwy śluzu oraz surfaktantów płucnych obecnych w drogach oddechowych, rzęsek obecnych na komórkach czy aktywowania przez oligonukleotydy receptorów TLR. Jeżeli

stanie się możliwe dostarczenie do docelowej komórki, pozostaje jeszcze problem uwięzienia w endosomach [72, 88, 89].

Cząsteczkami pomocniczymi w dostarczaniu oligonukleotydów antysensowych do komórek mogą być na przykład peptydy, lipidy czy związki niskocząsteczkowe [72]. Peptydy mają za zadanie zmieniać pH wewnątrz endosomu, co ma skutkować jego destabilizacją i w efekcie uwolnieniem znajdujących się w nim oligonukleotydów. Lipidy kationowe mogą naruszać błonę endosomu. Związki niskocząsteczkowe mogą zwiększać przepuszczalność błony endosomalnej lub wzmacniać zdolność oligonukleotydów do samodzielnego przenikania. Po wnikięciu do cytoplazmy jednoniciowe kwasy nukleinowe są transportowane do jądra komórkowego [72, 90].

## **5. Profilaktyka zakażeń wirusem grypy**

Nie można zapomnieć o profilaktyce, gdyż jest ona istotnym filarem walki z wirusem grypy. Podczas występującej pandemii najistotniejsze jest zachowanie odpowiedniej higieny jak częste mycie rąk czy stosowanie maseczek. Istotne są warunki mieszkaniowe osób zagrożonych epidemią. Generalnie powinno unikać się mieszkania w jednym pomieszczeniu z inwentarzem, co niestety jest często spotykane w Afryce czy Azji. Przykładowo, Egipt jest krajem, w którym na przestrzeni lat 2003 do 2017 zarejestrowano najwięcej na świecie zachorowań na grypę powodowaną H5N1. Ponadto, 200 przypadków zachorowań zarejestrowano w Indonezji, a 127 w Wietnamie. Poza utrzymywaniem odpowiedniej higieny istotna jest także, identyfikacja źródła zakażenia czy monitorowanie padłego ptactwa oraz izolacja chorych [91].

Niezbędne jest także przeprowadzanie akcji corocznych szczepień. Aby wyprodukować i zatwierdzić nową szczepionkę potrzebne jest około od 6 do 8 miesięcy. Począwszy od 1972 roku WHO zatwierdza wytyczne, które powinny zostać spełnione dla kolejnej szczepionki przeciwko grypie. W marcu zatwierdzane są wymagania dotyczące szczepionek stosowanych w krajach półkuli północnej, natomiast we wrześniu dla krajów półkuli południowej. Szczepionka taka powinna chronić zarówno przed infekcją spowodowaną szczepami wirusa grypy typu A, jak i wirusa grypy typu B. WHO wybiera także dopuszczalne szczepy, w oparciu, o które powinna powstać szczepionka [92].

Danych potrzebnych do stworzenia wytycznych dostarcza Globalna Sieć Nadzoru nad Grypą (*Global Influenza Surveillance and Response*), która polega na współpracy laboratoriów z całego świata. Globalna Sieć Nadzoru nad Grypą monitoruje występujące szczepy w sezonie poprzedzającym projektowane szczepionki i określa, które z nich

występują najczęściej. Poza tym, ocenia oporność szczepów na stosowane leki antywirusowe i szacuje ryzyko występowania pandemii.

W sezonie epidemiologicznym jesień 2017/zima 2018 na półkuli północnej zalecane jest stosowanie szczepionki trójwalentnej oraz czterowalentnej. Szczepionka trójwalentna zawiera antygeny pochodzące z szczepów wirusa grypy typu A: Michigan/45/2015 (H1N1), Hong Kong/4801/2014 (H3N2) i wirusa grypy typu B (szczep Brisbane/60/2008 Victoria). Szczepionka czterowalentna oprócz powyższych, zawiera także antygeny dodatkowego wirusa grypy typu B szczep Phuket/3073/2013 (Yamagata) [92].

## 6. Pozostałe wirusy z rodziny Orthomyxoviridae

Poza wirusami grypy, do rodziny *Orthomyxoviridae* zaliczamy, między innymi, wirusy z rodzaju *Thogotovirus*, *Quarantavirus*, *Isavirus*.

Wirusy rodzaju *Thogotovirus* powodują choroby odkleszczowe. W tej grupie możemy wyróżnić wirusy: *Dhori*, *Thogoto*, *Burbon Araguari*, *Aransas Bay*, *Jos* czy wirus *Upolu*. Wśród wymienionych wirusów tylko trzy pierwsze powodują choroby u ludzi [93]. Do charakterystycznych objawów infekcji spowodowanej przez wirusy z rodzaju *Thogoto* należą wysypka plamkowo-grudkowa, limfadenopatia, uczucie przybicia, pojawienie się objawów oponowych i piramidowych. Nieswoiste, ale często występujące objawy to mdłości, osłabienie, biegunka, gorączka [93, 94]. Segmenty 1-3 kodują białka PB2, PB1 oraz PA. Segment 4 koduje białko GP, które jest glikoproteiną odpowiedzialną za wnikanie wirusa do komórki oraz fuzję z endosomem. Segment 5 koduje nukleoproteinę, natomiast segment 6 koduje białko macierzy oraz białko ML, które hamuje odpowiedź immunologiczną gospodarza [95]. Pierwsze przypadki zakażeniem wirusem *Thogoto* odnotowano w latach 60 ubiegłego wieku w Kenii. Zakażenia wirusem występowały także na południu Europy oraz w Japonii. Wirus *Thogoto*, oprócz ludzi, może również infekować bydło, szczury, owce, wielbłądy oraz małpy [96]. Infekcja wirusem *Thogoto*, oprócz gorączki, może także skutkować pojawieniem się zespołu Devic'a i encefalopatii [94].

Kolejnym wirusem z rodzaju *Thogotovirus* jest wirus *Dhori*, którego materiał genetyczny stanowi siedem segmentów RNA. Jego występowanie odnotowano w Portugalii, Egipcie oraz w Azji. W przeciwieństwie do pozostałych togotowirusów do zakażenia wirusem *Dhori* może dojść także drogą kropelkową [95]. Przebieg infekcji wirusem *Dhori* charakteryzuje się bardzo wysoką gorączką i występowaniem parestezji. U myszy choroba objawia się podobnie jak infekcja wirusem grypy H5N1 [97].

Wirus Burbon jest stosunkowo niedawno (2014 rok) odkrytym wirusem. Pierwszy przypadek występowania wirusa Burbon odnotowano w Stanach Zjednoczonych, we wsi Burbon w stanie Kentucky. Dotychczas zidentyfikowano go u dwóch osób i obie osoby zmarły. Bezpośrednio przed pojawieniem się objawów obie osoby miały kontakt z kleszczem. Do objawów wywoływanych przez zakażenie wirusem Burbon, prócz objawów charakterystycznych dla innych przedstawicieli *Thogotovirus*, należą dodatkowo, leukopenia, trombocytopenia, hiponatremia, hipokaliemia oraz zwiększony poziom enzymów wątrobowych. U jednej z zakażonych osób pojawiła się limfocytarioza hemofagocytarna (HLH) [93].

Niestety w leczeniu chorób powodowanych przez wirusy z rodzaju *Thogotovirus* stosuje się tylko leczenie objawowe, gdyż dotychczas nie stworzono szczepionki ani skutecznego leku przeciwwirusowego. Zalecana jest też profilaktyka polegająca na unikaniu kontaktu z kleszczem.

*Quarjanvirus* jest nowym rodzajem z rodziny *Orthomyxoviridae*. Wirusy z rodzaju *Quarjanvirus* zazwyczaj infekują ptaki i skorupiaki. Wirus *Quarjanfil virus* jest jedynym przedstawicielem w rodzaju, który może infekować ludzi. Podobnie, jak u *Thogotovirus*, wektorem przenoszącym wirusy w przypadku kręgowców jest kleszcz. Genom wirusów z rodzaju *Quarjanvirus* składa się zazwyczaj z sześciu segmentów RNA, które kodują sześć białek. Wyjątek stanowi wirus *Wellfleet Bay*, który ma siedem segmentów RNA. Segmenty 1, 2 oraz 3 kodują odpowiednio białka PA, PB1 i PB2 czyli białka polimerazy wirusowej. Segment 5 koduje białko GP, które jest występującą na powierzchni kapsydu glikoproteiną. Sekwencja aminokwasów białka GP jest w 30-40% zgodna z sekwencją białka gp64 występującego u bakulowirusów. Pozostałe segmenty kodują białka o nieznanym funkcji [98]. Wirusy z tego rodzaju są odpowiedzialne głównie za choroby drobiu i ptactwa wodnego. Wirusy *Cygnat River* i *Wellfleet Bay* były odpowiedzialne za pomór wśród kaczek w latach 2006-2010 powodując biegunkę, letarg i problemy z układem oddechowym [99, 100].

Wirus *Quarjanfil* został po raz pierwszy wyizolowany w roku 1953 z kleszcza *Argas arboreus*. Pierwsze przypadki choroby spowodowanej przez tego wirusa odnotowano w latach 60-tych w wiosce Quarjanfil w Egipcie. Poza Afryką zakażenia pojawiały się także w Azji. Charakterystycznym objawem choroby jest gorączka. Wirus długo nie mógł zostać przypisany do odpowiedniej grupy taksonomicznej i dopiero sekwencjonowanie materiału genetycznego wirusów pozwoliło dowieść podobieństwo z wirusami rodziny *Orthomyxoviridae*. U myszy wirus *Quarjanfil* powoduje powstanie ciężkiej choroby, natomiast w przypadku ludzi choroba ma łagodny przebieg. [98, 101].

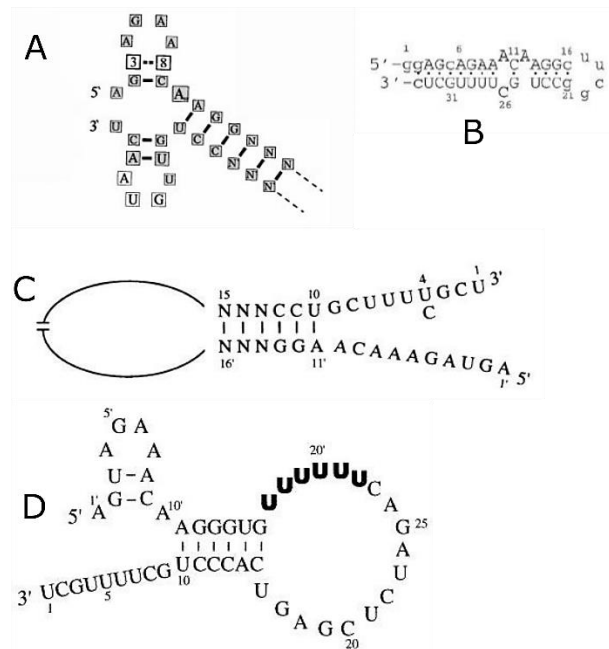
Do rodziny *Orthomyxoviridae* zalicza się także rodzaj *Isavirus*, który zawiera tylko jeden gatunek wirusa, wywołującego zakaźną anemię łososi. Wirus zakaźnej anemii łososi (ang. *infectious salmon anemia virus*, ISAV) został po raz pierwszy zidentyfikowany w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku w Norwegii. Na przestrzeni przeszło 30 lat wirus pojawiał się w północnej Europie i obu Amerykach [102]. Wirus ten jest najbardziej ze wszystkich ortomyksowirusów podobny do wirusa grypy i tak jak IAV posiada osiem segmentów RNA. [103, 104]. Segmenty 1 i 2 kodują białka polimerazy wirusowej a segment 3 koduje białko NP. Segmenty 5 i 6 kodują dwa specyficzne dla wirusa białka: fuzyjne (F) oraz białko esterazę hemaglutyniny (HE). Segment 7 koduje białka NS1 oraz NEP. Natomiast segment 8 koduje białka macierzy M1 i M2 [105]. Wirus atakuje erytrocyty łososia. Do objawów choroby należą, między innymi, blednięcie skrzel, obrzęk i pływanie ryb tuż przy powierzchni wody. Zarejestrowano przypadki, które nie dawały żadnych widocznych objawów. Śmiertelność może sięgać nawet 95% [106]. Nosicielem wirusa może być pstrąg tęczowy i brunatny oraz łosoś pacyficzny. W roku 2000 w Chile wykryto wirusa w hodowli pacyficznego łososia kizucza (*Oncorhynchus kisutch*) [107]. Zakażenie wirusem odbywa się w wyniku kontaktu z zakażoną rybą oraz jej wydzielinami. Wirus może być przenoszony również przez pasożytujące na rybach wszy morskie jak np. *Lepeophtheirus salmonis* [108]. ISAV może powodować znaczne straty hodowlane sięgające milionów dolarów. Zostały stworzone szczepionki przeciwko ISAV, które są powszechnie stosowane w USA i Kanadzie. Jednocześnie wciąż trwają prace nad ich udoskonalaniem [106]. Na wirusa najbardziej narażone są komercyjne hodowle łososia atlantyckiego. ISAV może stanowić także zagrożenie dla dzikiego łososia. W 2009 roku wykryto u poławianego dziko żyjącego łososia atlantyckiego obecność przeciwciała skierowanego przeciwko wirusowi ISAV [109]. Kanadyjska Agencja Inspekcji Żywności oraz Centrum Bezpieczeństwa Żywności oraz Zdrowia Publicznego na Uniwersytecie Stanu Iowa wydały oświadczenia, że wirus nie stanowi zagrożenia dla ludzi. Zainfekowane ryby, mogą być bez obaw spożywane, gdyż wirus nie namnaża się w temperaturze wyższej niż 25°C [104, 110].

Poza opisanymi grupami istnieją jeszcze niesklasyfikowane ortomyksowirusy. Należy do nich między innymi wirus *Sinu*, który został wyizolowany w Kolumbii z komórek komara. Jego zdolność do zakażenia komórek kręgowców nie jest jeszcze znana [111].

## 7. Motywy strukturalne RNA wirusa grypy

W podrozdziale „Znaczenie struktury RNP„ została już opisana dostępność dla oddziaływań vRNA w vRNP. W tej części zostaną opisane wybrane motywy strukturalne RNA oraz ich znaczenie dla cyklu namnażania wirusa.

Każdy z segmentów RNA wirusa grypy posiada dwanaście z końca 3' i trzynaście z końca 5' konserwatywnych reszt nukleotydowych, które są komplementarne. Końce parują ze sobą i mogą tworzyć motywy struktury drugorzędowej znane jako: *panhandle*, *fork*, *hook* oraz *corkscrew*. Badania potwierdzają znaczenie struktur konserwatywnych końców w procesach replikacji oraz transkrypcji. Końce 3' i 5' wiążą podjednostki polimerazy wirusowej i pełnią funkcję promotora [112, 113].



**Rysunek 7.** Struktury tworzone przez konserwatywne końce vRNA segmentów wirusa grypy. A) motyw *corkscrew*, B) motyw *panhandle*, C) motyw *fork* D) motyw *hook*. Rysunek zmodyfikowany [114-116].

Motyw *panhandle* pełni istotną rolę podczas inicjacji replikacji. Struktura motywu *panhandle* została rozwiązana za pomocą metod NMR. Odkrycie tego motywu pozwoliło wyjaśnić, między innymi, mechanizm replikacji. Motyw *panhandle* występuje również w strukturach drugorzędowych vRNA7 oraz vRNA8, które zostały określone w oparciu o dane eksperymentalne (mapowanie chemiczne) i program *RNAstructure* [112, 115, 117, 118]. Motyw *fork* stanowi częściowo otwartą strukturę *panhandle*. Powstał w odpowiedzi na wyniki eksperymentów, które dowiodły, że dla inicjacji transkrypcji nie jest niezbędne parowanie się końców 5' i 3' [112, 119]. Motyw *hook*, struktura spinki na końcu 5' bierze udział w procesie poliadenylacji- pozwala na wiązanie polimerazy do końca 5', co pełni



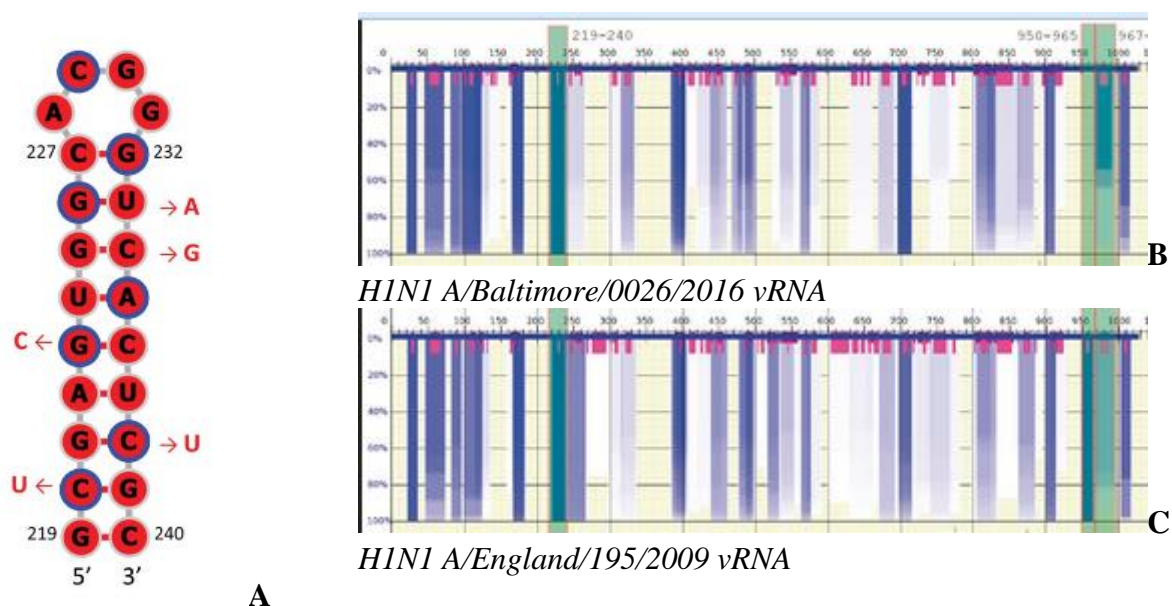
funkcję regulatora allosterycznego dla polimerazy i umożliwia aktywację enzymu [120, 121]. Model *corkscrew*, posiada strukturę dwóch spinek na końcach 5' i 3'. Struktura ta jest istotna dla silnego wiązania polimerazy oraz jej endonukleolitycznej aktywności [122, 123].

Za silnie konserwatywnymi końcami znajduje się trakt charakterystycznych dla poszczególnych segmentów nukleotydów, które również oddziałują ze sobą, tworząc helisę. W przypadku vRNA4, utworzenie pary zasad przez nukleotyd 15 z końca 5' i nukleotyd 14 (licząc z końca 3') ma znaczenie dla syntezy RNA oraz produkcji białka HA. Jeżeli w pozycji 14 na końcu 5' występuje C i tworzy parę z G, to pakowanie wirionów przebiega z maksymalną wydajnością [113]. Na obu końcach wszystkich segmentów znajduje się UTR (ang. *untranslated region*). Długość UTR waha się między 17 a 60 nt dla różnych segmentów. W obrębie UTR znajdują się sygnały pakowania oraz struktury regulujące replikację i transkrypcję [113].

Mimo, że w przypadku wirusów grypy może dochodzić do częstych mutacji w sekwencji RNA, struktura drugorzędowa RNA, jeśli pełni funkcje biologiczne, powinna zostać zachowana. Ważna jest weryfikacja czy dane motywy strukturalne RNA są konserwatywne wśród wszystkich szczepów wirusa. Zachowawcze motywy strukturalne najprawdopodobniej pełnią istotną rolę biologiczną. Zdeterminowane na podstawie danych eksperymentalnych struktury drugorzędowe vRNA7 i vRNA8 posiadają wysoką konserwatywność strukturalną odpowiednio 91,4 oraz 82,6% dla typu A, obliczoną na podstawie analizy 15946 (vRNA7) i prawie 14 000 (vRNA8) szczepów, potwierdzając istnienie ważnych dla cyklu życiowego wirusa grypy motywów strukturalnych [117, 118].

Niezależnie przeprowadzona analiza konserwatywności dla vRNA7 przez Dawson'a i współpracowników potwierdza występowanie konserwatywnego motywu spinki do włosów w strukturze drugorzędowej vRNA7 (rejon 788-808 nt w vRNA7). Motyw analogicznej spinki może także występować w komplementarnym cRNA7, w rejonie 219-240 nt (Rysunek 8) [124]. Również badania RNA7 wykonane przez grupę Kobayashi potwierdzają, że w określonych rejonach cząsteczki cRNA7 i vRNA7 mogą tworzyć się stabilne, konserwatywne struktury drugorzędowe [125]. Analiza konserwatywności została przeprowadzona dla przeszło 1800 szczepów. Znaczenie stabilnych konserwatywnych motywów strukturalnych zostało wykazane w badaniach namnażania wirusa zawierającego mutacje synonimiczne w vRNA7. Szczególnie istotne dla namnażania wirusa były stabilne struktury drugorzędowe znajdujące się w rejonie 219-240 nt oraz 967-994 nt vRNA7. Spinki znajdują się w rejonie odpowiedzialnym za proces pakowania. Wprowadzenie mutacji prowadzących do destabilizacji spinek, powodowało zwiększenie puli nieprawidłowych

częstek wirusowych, które najprawdopodobniej posiadały niewłaściwą liczbę segmentów [124, 125].



**Rysunek 8.** Rysunek **A** przedstawia stabilną konserwatywną spinkę vRNA7. Analogiczna spinka może tworzyć się także w cRNA7. Rysunki **B** oraz **C** przedstawiają położenie stabilnych motywów struktury drugorzędowej w vRNA7 wybranych szczepów H1N1. Stabilne motywy zaznaczono kolorem niebieskim. Brak koloru oznacza rejon niestabilny. Zielonym kolorem zaznaczono opisane w tekście motywy 219-240nt, 950-964nt oraz 967-994nt w vRNA7 [124, 125].

W (+)RNA5, za pomocą analiz bioinformatycznych, został zidentyfikowany stabilny termodynamiczny motyw, tworzący trzy spinki [77]. Znaczenie motywu w cyklu namnażania wirusa zostało potwierdzone w badaniach na linii komórkowej MDCK. Zakażone komórki transfekowano oligonukleotydami antysensowymi, które wiążąc się w docelowym rejonie, powodowały destabilizację motywu. Struktura motywu została dodatkowo potwierdzona *in vitro* za pomocą mapowań enzymatycznych, chemicznych (DMS, CMCT, ketoksal, NMIA) oraz mapowań z użyciem mikromacierzy izoenergetycznych na cząsteczce modelowej. Badania eksperymentalne całego segmentu 5 RNA(+) doprowadziły do powstania modelu struktury drugorzędowej o wysokiej zachowawczości strukturalnej (85%), w której uprzednio znaleziony motyw był zachowany[77].

Badania struktury RNA wirusa grypy są konieczne, ponieważ każdy etap cyklu replikacyjnego wirusa jest zależny od RNA. Wiedza o strukturze poszczególnych segmentów RNA może pozwolić wyjaśniać procesy zachodzące w infekowanych komórkach oraz interakcje występujące w wirionie. Informacje te, mogą przysłużyć się do projektowania nowych, lepszych leków, nacelowanych na wirusowe RNA.

## 8. Metody przewidywania struktur RNA

### 8.1. Przewidywanie struktury drugorzędowej RNA

Struktura RNA determinuje jego funkcje, gdyż ma kluczowe znaczenie w oddziaływaniu cząsteczek, zarówno w rozpoznawaniu białek, jak i w oddziaływaniu z innymi kwasami nukleinowymi. Programy komputerowe do przewidywania struktur drugorzędowych RNA wykorzystują dwa główne podejścia: metodę minimalizacji energii oraz analizę porównawczą z wykorzystaniem sekwencji homologicznych. Znacznie rzadziej są wykorzystywane inne metody takie, jak analiza kinetyki fałdowania zastosowana w programie *Kinwalker* [126]. Na chwilę obecną istnieje ponad 50 programów do przewidywania struktury drugorzędowej. Do najpopularniejszych z nich należą: *RNAstructure*, *RNAfold*, *mfold*, *CentroidAlifold*, *RNAalifold*, *Pfold* czy *Carnac* [127]. Ze względu na tak znaczną liczbę programów do przewidywania struktury drugorzędowej RNA, poniżej przedstawione zostały tylko wybrane.

Analiza porównawcza to metoda, która wykorzystuje porównanie RNA o wspólnym pochodzeniu. Zachowawczość struktury danej cząsteczki jest znacznie większa niż zachowawczość sekwencji. Jeżeli w sekwencji funkcjonalnego RNA pojawiła się mutacja, to z dużym prawdopodobieństwem reszta nukleotydowa tworząca ze zmutowaną resztą parę zasad również uległa mutacji, tak, aby para zasad i struktura tego fragmentu RNA została zachowana. Są to tzw. mutacje kompensacyjne. Często również spotykana jest delecja dwóch reszt nukleotydowych tworzących parę zasad, jeżeli w jednej z nich wystąpiła mutacja uniemożliwiająca tworzenie tej pary zasad. Zjawisko to ma na celu zapobiegać rearanżacji struktury, mogącym powodować utratę przez RNA jego funkcji. W wyniku występowania takiej ewolucji cząsteczek RNA, sekwencje o zachowanej strukturze mogą się znacznie różnić i mogą zostać pominięte w analizie, co generowałoby dodatkowe błędy.

W ostatnich latach powstało wiele programów i stron internetowych, które w różny sposób próbują rozwiązać problem modelowania struktury drugorzędowej z wykorzystaniem sekwencji homologicznych. Poniżej opisane zostały wybrane z nich.

Program *Carnac* [128, 129], aby wygenerować strukturę drugorzędową wykonuje cztery kolejne kroki. Najpierw analizuje każdą z sekwencji w poszukiwaniu najlepszych kandydatów do utworzenia par zasad, następnie analizuje sekwencje w poszukiwaniu regionów o dużym podobieństwie pomiędzy sekwencjami. W kolejnym kroku wybierane są odpowiednie regiony na podstawie wcześniej przygotowanych danych. Ostatni krok to stworzenie wspólnej struktury z wykorzystaniem minimalizacji energii oraz wcześniej przygotowanych fragmentów.

Podejście wykorzystujące maksymalizację oczekiwanej dokładności (ang. *maximum expected accuracy*) jest szeroko wykorzystywane w bioinformatyce. Program *CentroidAlifold* [130] służy do modelowania struktury drugorzędowej RNA na bazie dostarczonego przyrównania sekwencji. W tym celu wykorzystuje funkcję maksymalizacji sumy oczekiwanego zysku oraz macierze prawdopodobieństwa tworzenia par zasad.

Program *RNAalifold* [131] wykorzystuje metodę maksymalnego prawdopodobieństwa w celu przewidywania konsensusowej struktury na bazie przyrównanych sekwencji. Program ten, pomimo że jest jednym z najstarszych tego typu programów, jest ciągle rozwijany i udoskonalany, na przykład, poprzez wykorzystanie matryc *RIBOSUM* czy skuteczniejszy model dla przerw w sekwencji nukleotydowej. Na bazie programu *RNAalifold* stworzono również program *PhyloRNAalifold* [132], który dodatkowo uwzględnia informacje filogenetyczne.

Kolejnym popularnym programem jest program *Pfold* [133], który wykorzystuje probabilistyczną gramatykę bezkontekstową (w tym algorytm KH-99 oraz CYK). Powstała również nowa wersja algorytmu – *Ppfold* [134], wykorzystująca obliczenia równoległe i przez to pozwalająca na analizę dłuższych sekwencji RNA.

Warto wspomnieć również o programie *Dynalign* [135], który obecnie stanowi część pakietu *RNAstructure*.

Niektóre programy łączą w sobie zarówno podejście bazujące na minimalizacji energii, jak i podejście ewolucyjne. Przykładem takiego programu jest *PETfold*, który wykorzystuje algorytmy programów *RNAfold* i *Pfold* [136, 137].

Najpopularniejszą metodą przewidywania struktur drugorzędowych jest metoda minimalizacji energii swobodnej, która wykorzystuje założenie, że struktura o najniższej energii swobodnej, jako struktura najtrwalsza termodynamicznie, jest najbardziej prawdopodobną. Na całkowitą energię swobodną cząsteczki składa się suma energii swobodnych określonych dla pojedynczych motywów strukturalnych. Metoda minimalizacji energii wykorzystuje eksperymentalnie opracowany model najbliższego sąsiedztwa [138, 139]. Model ten zakłada, że na całkowitą stabilność struktury drugorzędowej mają wpływ: sekwencja nukleotydowa motywu (np.: pary zasad, niesparowania, pętli) oraz jego najbliższe sąsiedztwo. Parametry modelu najbliższego sąsiedztwa zostały wyznaczone dzięki eksperymentom topnień UV, przeprowadzonych na modelowych cząsteczkach RNA: dupleksach, a także takich motywach strukturalnych jak: spinki i wewnętrzne wybrzuszenia, niesparowane końce. W generowaniu struktur drugorzędowych w oparciu o model najbliższego sąsiedztwa wykorzystywane jest między innymi programowanie dynamiczne.

Algorytm ten pozwala znaleźć strukturę o najniższej energii, nie generując przy tym wszystkich możliwych struktur - co przyspiesza znacznie czas prowadzenia obliczeń. Większość programów wykorzystuje właśnie to podejście. Przykładem mogą być *mfold* oraz *RNAstructure*. Korzystając z analizy w programie *mfold*, prócz przewidywania optymalnej struktury drugorzędowej (o najniższej energii), również istnieje możliwość generowania struktur suboptymalnych, a także uwzględnienie w analizie, stężenia soli oraz temperatury. Użytkownicy mają także możliwość wprowadzenia danych z eksperymentów mapowań struktury RNA [140, 141].

Największą uwagę poświęcono w tym rozdziale programowi *RNAstructure*, gdyż został wykorzystany do opisanych w pracy doktorskiej badań. *RNAstructure* to program powstały w laboratorium Douglasa Turner'a i Davida Mathews'a (University of Rochester, Rochester, USA). Modelowanie struktur drugorzędowych odbywa się w oparciu o minimalizację energii swobodnej. Program posiada także możliwość przewidywania struktur suboptymalnych oraz pseudowęzłów. Szczególnie ta pierwsza funkcjonalność ma duże zastosowanie, ponieważ nie zawsze struktura o najniższej energii jest strukturą pełniącą biologiczne funkcje. Niekiedy struktury suboptymalne, mimo, że nie posiadają najniższej energii, mogą mieć równie wysokie prawdopodobieństwo występowania, co struktura optymalna [140].

Większość z popularnych programów do przewidywania struktury drugorzędowej nie posiada możliwości przewidywania pseudowęzłów. Aby rozwiązać ten problem stworzono całą serię dedykowanych temu problemowi programów. Należy do nich, na przykład, *HotKnots* [142], który wykorzystuje algorytm heurystyczny, *Ipknot* [143] wykorzystujący programowanie całkowitoliczbowe i pozwalający na wykorzystanie wielu sekwencji jednocześnie, *McGenus* wykorzystujący algorytm Monte Carlo [144] oraz program *ProbKnot* [145] wykorzystujący prawdopodobieństwo tworzenia par zasad do modelowania struktur drugorzędowych. Ze względu na to, że *ProbKnot* jest w ścisłej czołówce programów przewidujących pseudowęzły, jeżeli chodzi o średnią dokładność predykcji, został on wykorzystany podczas badań autorki tej rozprawy doktorskiej. *ProbKnot* został wykorzystany w programie *RNAstructure*. Dodatkowo, program *RNAstructure* posiada wbudowany moduł *Dynalign*, który wykorzystuje w analizie podejście stosujące porównanie sekwencji. Dzięki temu, program *RNAstructure* stanowi kompletny pakiet, pozwalający na przeprowadzenie zawansowanej analizy różnymi metodami [135, 140].

Żaden program nie jest w stanie wygenerować rzeczywistej struktury drugorzędowej na podstawie jedynie sekwencji z prawdopodobieństwem wynoszącym 100%. Przykładowo,

program *RNAstructure* przewiduje poprawnie średnio 73% par zasad dla sekwencji krótszych niż 700 reszt nukleotydowych, stąd najlepszym rozwiązaniem jest wprowadzanie do programu wyznaczników uzyskanych dzięki eksperymentom w postaci mapowań chemicznych, mapowań z użyciem rybonukleaz, wykorzystanie wolnych rodników czy hydrolizy z użyciem mononukleotydu flawinowego lub jonów ołowiu. Dodatkowo, model najbliższego sąsiedztwa nie zawsze opisuje wystarczająco stabilność struktur drugorzędowych. Przykładowo, obserwowane są efekty w wybrzuszeniach jednostronnych czy pojedynczych niesparowaniach, które nie są związane z najbliższym sąsiedztwem. Poza tym, parametry najbliższego sąsiedztwa pierwotnie były ustalone w roztworze 1 M NaCl, które różnią się od warunków występujących w komórkach. Dodatkowo, obecność białek i innych cząsteczek w środowisku komórki, może mieć wpływ na strukturę drugorzędową.

## 8.2. Przewidywanie struktury trzeciorzędowej RNA

Intensywny rozwój badań naukowych, sprzyjający odkrywaniu nowych interesujących RNA oraz długi czas potrzebny na przeprowadzenie eksperymentów takich jak NMR czy badania krystalograficzne, powodują, że niemożliwe jest doświadczalne zbadanie w krótkim czasie struktur 3D wszystkich interesujących cząsteczek RNA. W tej sytuacji konieczny jest rozwój metod komputerowej predykcji struktur trzeciorzędowych kwasów nukleinowych. Istnieją różne programy służące do modelowania struktury trzeciorzędowej i każdy z nich ma zalety, jak i pewne ograniczenia. Z drugiej strony, coraz szybszy w ostatnich latach rozwój metod bioinformatycznych powoduje, że struktury RNA modelowane są z coraz większą dokładnością. Do powszechnie stosowanych programów przewidywania struktur 3D można wyróżnić: programy symulujące fałdowanie, wykorzystujące analizę porównawczą czy składanie fragmentów RNA.

Programy symulujące zwijanie się pozwalają nie tylko generować struktury 2D i 3D, ale także mogą służyć do badania mechanizmów procesu zwijania się cząsteczek RNA.

Do programów symulujących zwijanie się RNA możemy zaliczyć między innymi NAST (*Nucleic Acid Simulation Tool*). Program wykorzystuje dynamikę molekularną dla uproszczonego modelu cząsteczki RNA oraz pole siłowe wyznaczone na podstawie danych doświadczalnych. Dzięki zastosowaniu programu NAST udało się z powodzeniem wygenerować 388 nukleotydowy fragment domeny intronu grupy I z *Tetrahymena thermophila* [146].

*Vfold* to program, który przewiduje struktury trzeciorzędowe wykorzystując znane motywy z rozwiązanych struktur z bazy PDB. Dodatkowo, struktura jest oceniana pod kątem

energii swobodnej i dąży się do jej minimalizacji. Oprócz możliwości predykcji struktury drugo- i trzeciorzędowej, program w opcji *VfoldThermal* może generować krzywe topnień w oparciu o zadaną sekwencję RNA [147]. *iFoldRNA* jest webserwerem, który stosuje uproszczony model cząsteczki kwasu nukleinowego opierający się o obecność 3 pseudoatomów na resztę (ang. *three-beads residue*) [148]. Pierwotnie stworzony dla krótkich cząsteczek, dzięki zastosowanym uproszczeniom może z powodzeniem przewidywać struktury trzeciorzędowe dla RNA o długości do 300 nukleotydów. Zaletą programu jest możliwość wprowadzenia, jako wyznaczników wyników eksperymentalnych uzyskanych, na przykład z mapowania struktury z zastosowaniem wolnych rodników tlenowych.

Kolejnym podejściem stosowanym w przewidywaniu struktur trzeciorzędowych jest modelowanie homologiczne (ang. *comparing modeling*). Modelowanie homologiczne polega na porównaniu sekwencji i znalezieniu homologów a następnie tworzeniu struktury 3D w oparciu o strukturę homologa. Podstawowym założeniem jest, że cząsteczki, które mogą mieć wspólne pochodzenie będą miały podobną strukturę. Przykładowym programem stosującym modelowanie homologiczne jest *ModeRNA*. Zaletą programu jest możliwość uwzględnienia aż 115 naturalnych modyfikacji RNA. Konieczne jest uprzednie porównanie sekwencji, co jest możliwe dzięki korzystaniu z pozostałych pakietów umieszczonych na serwerze *ModeRNA* [149, 150]. Składanie fragmentów (ang. *fragment assembly*) wykorzystuje pakiet programów, *MC-Fold/MC-Sym*. Możliwe jest przewidywanie struktur drugo- i trzeciorzędowych. W procesie generowania struktur drugorzędowych uwzględniane są zarówno pary kanoniczne jak i niekanoniczne. Struktury drugorzędowe wygenerowane w *MC-Fold*, są następnie używane przez program *MC-Sym* do przewidywania struktur 3D. *MC-Sym* przeszukuje przestrzeń konformacyjną dla cząsteczek RNA i wybiera struktury, które spełniają zadane więzy [151].

Podejście składania fragmentów RNA zostało zaimplementowane między innymi w *RNAComposer* i pakiecie *Rosetta*. Pakiet *Rosetta RNA Denovo* korzysta z algorytmu FARNA (*Automated de novo prediction of native-like RNA tertiary structures*), który polega na składaniu struktury z krótkich, maksymalnie trójnukleotydowych fragmentów, pochodzących ze struktur zdeponowanych w PDB. Stosowaną w programie metodę przewidywania struktur trzeciorzędowych stworzono pierwotnie dla białek. Program znajduje zastosowanie do modelowania niewielkich motywów RNA, jak i dużych (300 nt) cząsteczek [152]. Stosowany może być w przypadkach, kiedy dla badanych cząsteczek znalezienie homologów jest niemożliwe.

W badaniach naukowych prowadzonych w ramach pracy doktorskiej wykorzystano *RNAComposer*, dlatego programowi poświęcono w niniejszej pracy więcej uwagi. *RNAComposer* to program do modelowania struktury trzeciorzędowej, stworzony przez grupę profesora Ryszarda Adamiaka z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN. Do modelowania struktury trzeciorzędowej w *RNAComposer* wykorzystywana jest struktura drugorzędowa badanego RNA. Badana cząsteczka dzielona jest na mniejsze fragmenty, które stanowią znane motywy strukturalne. Każdemu takiemu wyodrębnionemu motywowi struktury drugorzędowej będzie odpowiadała struktura przestrzenna. Jeżeli w różnych cząsteczkach mamy motyw o identycznej sekwencji i strukturze drugorzędowej to również struktury trzeciorzędowe tego motywu będą identyczne lub bardzo podobne. Struktura 3D całej cząsteczki będzie więc generowana fragment po fragmencie z pojedynczych motywów struktur 3D, które są już rozwiązane i zdeponowane w bazie danych, jaką stanowią struktury trzeciorzędowe, pochodzące z RNA FRABASE. RNA FRABASE to narzędzie służące, między innymi, do znajdowania motywów strukturalnych ze struktur cząsteczek zdeponowanych w bazie PDB. Z wybranych motywów struktury trzeciorzędowej najpierw jest tworzony wstępny model struktury. Następnie stosowany jest proces minimalizacji energii w przestrzeni kątów torsyjnych w kartezyjskim układzie współrzędnych. Wykonywanych jest około 1000 cykli minimalizacji energii, zanim otrzymany zostanie wynik. Ostatnim etapem jest udokładnianie modelu z wykorzystaniem pola siłowego CHARMM. Oprócz generowania struktur w oparciu o struktury 3D z RNAFRABASE program ma możliwość tworzenia struktur *de novo*. Jest to bardzo pomocne w przypadku, jeśli dany motyw obecny w strukturze drugorzędowej nie został jeszcze zdeponowany w bazie danych. Analizę można prowadzić w dwóch opcjach – *Interactive mode* oraz *Batch mode*. Opcja *Interactive mode* jest przewidziana dla użytkowników niezarejestrowanych i polega na szybkiej, poglądowej analizie krótkich cząsteczek. Natomiast do analizy dłuższych cząsteczek polecany jest *Batch mode*, który pozwala wygenerować do 1000 struktur 3D jednocześnie. Tryb *Interactive mode* pozwala wymodelować tylko strukturę o najniższej energii. Natomiast *Batch mode* pozwala wprowadzić dane eksperymentalne uzyskane z spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR), spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), analizy rezonansowego przeniesienia energii w mechanizmie Förstera (*FRET*) czy z sieciowania RNA (ang. *RNA crosslinking*). W efekcie analizy przeprowadzonej zarówno w *Batch mode*, jak i *Interactive mode* zostaną wygenerowane pliki w formacie log i pdb. Pliki log zawierają między innymi wartości energii udokładnionej struktury, jak i etapów pośrednich. Jest też podany procent podobieństwa



każdego analizowanego fragmentu struktury do struktur z PDB, ponieważ im większa jest homologia badanych fragmentów, tym wyższa dokładność przewidywania. Wypisane są także motywy strukturalne, które były generowane *de novo*, na co warto zwrócić szczególną uwagę, gdyż takie struktury zazwyczaj są o mniejszej dokładności. Model wygenerowanej struktury trzeciorzędowej może zostać zwizualizowany i przeanalizowany za pomocą programu *PyMOL* [153, 154].

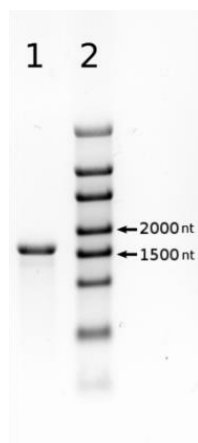
### III. WYNIKI I DYSKUSJA

#### 1. Badania struktury drugorzędowej vRNA5

##### 1.1. Otrzymanie i fałdowanie vRNA5

Do badań *in vitro* prowadzonych w Zakładzie Genomiki Strukturalnej RNA wykorzystano RNA wirusa grypy szczep A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Badania zostały przeprowadzone dla segmentu 5 wirusowego RNA (vRNA5). Plazmid pHH21, zawierający DNA odpowiadające sekwencji segmentu piątego, został udostępniony przez profesora Beck Kim'a z Univeristy of Rochester (Rochester NY, USA). W celu uzyskania matrycy niezbędnej do transkrypcji *in vitro* vRNA5 konieczne było przeprowadzenie reakcji PCR. Zaprojektowane zostały dwa startery PR1 i PR2, z których pierwszy zawierał promotor polimerazy T7 niezbędny do przeprowadzenia reakcji transkrypcji *in vitro*. Sekwencje starterów zostały przedstawione w rozdziale *Materiały i Metody*. Otrzymane vRNA5 miało długość 1565 nt, a jego homogenność sprawdzono na 1% żelu agarozowym (rysunek 9).

Przed właściwymi eksperymentami vRNA5 było poddawane fałdowaniu w celu uzyskania monomerycznej formy cząsteczki. Sam proces fałdowania, jak i skład buforu, zostały dokładnie opisane w części *Materiały i Metody*. Kluczowe w procesie fałdowania vRNA5 było zastosowanie denaturacji w 65°C przez 5 minut, a następnie powolne schładzanie próbki do temperatury pokojowej. W opisanych warunkach vRNA5 występowało, jako monomer, co było warunkiem koniecznym dla przeprowadzenia dalszych badań. W przypadku vRNA5 niepoddawanemu wcześniejszemu fałdowaniu tworzył się dimer, który stanowił około 20% całkowitej ilości RNA w próbce. Ustalenie warunków fałdowania zostało wykonane podczas pracy magisterskiej autorki tej rozprawy doktorskiej.



**Rysunek 9.** Przykładowy rozdział vRNA5 na 1% żelu agarozowym. 1) vRNA5 - długość 1565 nt, 2) marker wielkości *RiboRuler* RNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

## 1.2. Mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej vRNA5

Mapowania chemiczne struktury drugorzędowej RNA polegają na zastosowaniu odczynników chemicznych, które powodują specyficzną modyfikację RNA. Obecność modyfikacji w określonym nukleotydzie stanowi informację o dostępności tego nukleotydu dla użytego odczynnika chemicznego. W metodach mapowania stosowanych podczas wykonywania pracy doktorskiej modyfikacji ulegają jednoniciowe i labilne rejony RNA, natomiast rejony dwuniciowe są dla użytych odczynników chemicznych niedostępne, nie ulegają one mapowaniu chemicznemu.

W pracy zastosowano mapowanie chemiczne struktury drugorzędowej z użyciem siarczanu dimetylu, CMCT, ketoksalu, oraz NMIA. Stężenia odczynników zostały dobrane tak, aby średnio na jedną cząsteczkę vRNA5 przypadała jedna modyfikacja.

DMS jest odczynnikiem, który powoduje modyfikację (metylację) adenozyiny (A) w pozycji N1, cytydyny (C) w pozycji N3 oraz guanozyiny (G) w pozycji N7. Modyfikacje w A i C w łatwy sposób można zidentyfikować stosując reakcję odwrotnej transkrypcji, gdyż w wyniku metylacji reakcja zostaje zahamowana. W przypadku G, aby wykryć metylację przy azocie N7 należy zastosować hydrolizę RNA w obecności borowodoru sodu i aniliny. Guanozyna sporadycznie może ulegać również metylacji przy azocie N1, wówczas taką modyfikację można zidentyfikować w reakcji odwrotnej transkrypcji [155-157]. W badaniach stosowano 1,6 mM stężenie DMS.

CMCT to odczynnik, który odpowiada za modyfikacje reszty nukleotydowej urydyny przy azocie N3. Możliwe jest także występowanie modyfikacji przy azocie N1 guanozyiny [157]. Reakcja modyfikacji zachodzi optymalnie w pH 8, stąd w celu zatrzymania reakcji

dodaje się kwas borowy, co powoduje obniżenie pH. Stężenie CMCT w reakcji mapowania vRNA5 wynosiło 9,5 mM.

Ketoksal jest odczynnikiem, który modyfikuje niesparowane reszty guanozyny przy azocie N1 oraz N2. W wiązaniu biorą udział dwie grupy karbonyłowe ketoksalu, a powstały addukt może rozpadać się w środowisku zasadowym [158, 159]. Końcowe stężenie ketoksalu stosowane w reakcji modyfikacji vRNA5 wyniosło 1,5 mM.

Metoda SHAPE (ang. *selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*) pozwala na badanie lokalnej labilności łańcucha badanego RNA. Metoda SHAPE polega na ataku nukleofilowym grupy 2'-hydroksylowej rybozy na grupę funkcyjną niskocząsteczkowego związku, w wyniku, którego powstaje addukt powodujący zatrzymanie odwrotnej transkryptazy. W metodzie wykorzystuje się zwiększoną reaktywność grupy 2'-hydroksylowej rybozy niesparowanego nukleotydu. Nukleotydy biorące udział w tworzeniu par zasad, reagują słabiej z odczynnikiem stosowanym w metodzie SHAPE, gdyż przyjmują mniejszą liczbę konformacji, niż nukleotydy, które nie są zaangażowane w tworzenie struktur drugorzędowych. W niniejszych badaniach stosowano odczynnik NMIA (bezwodnik kwasu N-metyloizatoinowego, ang. *N-Methylisatoic anhydride*), który reagując z grupą hydroksylową formuje 2'-O-addukt (ester kwasu 2'-metyloaminobenzoesowego) [155]. Zoptymalizowane stężenie NMIA w próbie dla cząsteczki vRNA5 wynosiło 3,3 mM.

### 1.3. Optymalizacja reakcji odwrotnej transkrypcji

Informację o położeniu określonej modyfikacji w badanym RNA uzyskiwano za pomocą reakcji wydłużania starterów (ang. *primer extension*) z udziałem odwrotnej transkryptazy. Obecność modyfikacji powoduje zahamowanie odwrotnej transkryptazy, w wyniku czego powstaje produkt o skróconej długości. Rozdział produktów reakcji za pomocą elektroforezy kapilarnej pozwala określić miejsce, w którym doszło do zatrzymania reakcji i tym samym zidentyfikować z dokładnością do jednego nukleotydu położenie modyfikowanego nukleotydu w badanym RNA.

W reakcjach odwrotnej transkrypcji (RT, ang. *reverse transcription*), stosowano startery DNA (Tabela 2), z których każdy był znakowany czterema barwnikami fluorescencyjnymi w zależności od przeznaczenia. Barwnikami JOE i FAM znakowano, odpowiednio, startery przeznaczone dla odczytu reakcji mapowania i kontrolnej. Natomiast barwniki TAMRA i ROX służyły do znakowania starterów wykorzystywanych w utworzeniu wzorcowych drabinek dideoksy, z użyciem dideoksynukleotydów. Zastosowanie czterech różnych barwników pozwoliło na rozdział wszystkich produktów RT w jednej kapilarze

elektroforetycznej, co ułatwiało przypisanie sekwencji rozdzielanym fragmentom oraz niwelowało błędy mogące wynikać z różnej mobilności elektroforetycznej produktów reakcji odwrotnej transkrypcji.

Zoptymalizowane startery DNA: P1, 2L, 3L, P4, P5 oraz P6, zostały zaprojektowane tak, aby zapewnić odczyt mapowań całego badanego RNA (Tabela 2). Wybrane startery DNA wiązały się do vRNA5 średnio co 300 nt. Podczas optymalizacji zaprojektowano również startery P2, P3, P7 oraz P8, które nie zostały ostatecznie wykorzystane do analizy reaktywności cząsteczki vRNA5, ze względu na niską wydajność lub przedwczesną terminację reakcji odwrotnej transkrypcji (Tabela 2).

**Tabela 2.** Sekwencje oraz rejony wiązania wybranych starterów komplementarnych do vRNA5 wirusa grypy typu A/Vietnam/1203/2004 (kolor czerwony w sekwencji starterów oznacza nukleotydy typu LNA). Wszystkie startery były znakowane na 5'-końcu znacznikiem fluorescencyjnym (JOE, FAM, TAMRA lub ROX).

Nazwa startera	Rejon wiązania startera do vRNA5 (nt)	Sekwencja startera	Komentarz
P1	1541-1565	AGCAAAAGCAGGGTAGATAATCAC	Reakcja odwrotnej transkrypcji ulegała terminacji przy około 1140 nt. Terminacja nie zaburzała procesu analizy miejsc modyfikacji.
P2	1306-1331	GAGAGAATGGTACTCTCTGCATTTG	Reakcja odwrotnej transkrypcji ulegała terminacji przy około 1140 nt oraz w rejonie 1074-1115 nt. Reakcja przebiegała z małą wydajnością, a uzyskany odczyt był krótki i wynosił 190 nt.
2L	1306-1331	GAGAGAATGGTACTCTCTGCATTTG	Sygnal przedwczesnej terminacji nadal pojawia się w rejonie 1074 – 1115 nt, jednak jest wyraźnie słabszy. Powstaje właściwy produkt końcowy.
P3	1043-1063	CTCTCGTGCGTACTGGAATG	Reakcja odwrotnej transkrypcji ulegała terminacji przy około 860 nt. Reakcja przebiegała z małą wydajnością. Uzyskany odczyt wynosił ok 200 nt.
3L	1043-1063	CTCTCGTGCGTACTGGAATG	Reakcja odwrotnej transkrypcji przebiegała bez

			problemów.
<b>P4</b>	784-803-	GATCAAGTGCGAGAGAGCAG	Reakcja odwrotnej transkrypcji przebiegała bez problemów.
<b>P5</b>	522-544	GTCAATTAGTGTGGATGGCATG	Reakcja odwrotnej transkrypcji przebiegała bez problemów.
<b>P6</b>	263-282	GGTCCAGAGAAACCTTCCC	Reakcja odwrotnej transkrypcji przebiegała bez problemów
<b>P7</b>	1269-1287	CCTGGAAGAACACCCCAG	Reakcja odwrotnej transkrypcji ulegała częstej terminacji. Całkowite zahamowanie RT w rejonie 1074 do 1115 nt.
<b>P8</b>	1092-1116	CCTGATGATATGGCATTCCAATCTA	Starter nie wiązał się. Brak produktu RT.

Warto wspomnieć, że dwa z zaprojektowanych starterów, 2L i 3L, posiadały nukleotydy typu LNA w celu zwiększenia stabilności termodynamicznej dupletu utworzonego przez badany RNA i starter DNA (duplet RNA/DNA). Startery 2L i 3L zastąpiły, wcześniej zaprojektowane startery P2, P3, P7 oraz P8. Wprowadzenie nukleotydów typu LNA do sekwencji problematycznych starterów P2 oraz P3, pozwoliło na silniejsze wiązanie startera do vRNA5. W konsekwencji dwuniciowe fragmenty vRNA5, do których wiązały się startery ulegały rozpleceniu i umożliwiały wydajniejszą reakcję odwrotnej transkrypcji. Dodatkowo, w przypadku reakcji ze starterami P1, 2L oraz 3L stosowano dwukrotnie większą ilość enzymu (0,5 µL/reakcję) niż standardowo (0,25 µL/reakcję). Większa ilość enzymu, pozwoliła na zmniejszenie terminacji występującej w rejonie spinki 1074 – 1115 nt. Szczegółowy opis składu mieszanin reakcyjnych został przedstawiony w rozdziale *Materiały i Metody (strona)*.

Wnioski z przebiegu reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem starterów zestawionych w tabeli 2 są następujące: (a) podczas reakcji odwrotnej transkrypcji dochodziło do przedwczesnej terminacji w reakcjach prowadzonych z użyciem starterów P1, P2, P3, P7 oraz 2L. W przypadku startera P1 zatrzymanie reakcji nie miało wpływu na odczyt wyniku rozdzielania elektroforetycznego, gdyż nukleotyd 1140 znajdował się poza analizowanym rejonem, (b) dla startera P2 również obserwowano silny sygnał około 1140 nt, jednak silniejszy sygnał występował w rejonie 1100 nt, co prowadziło do całkowitego zatrzymania odwrotnej transkrypcji, (c) do terminacji RT dochodziło także dla reakcji prowadzonych z zastosowaniem starterów P7 i 2L. W rejonie 1074-1115 nt formuje się (jak stwierdzono w toku późniejszych badań) bardzo stabilna struktura spinki, której obecność

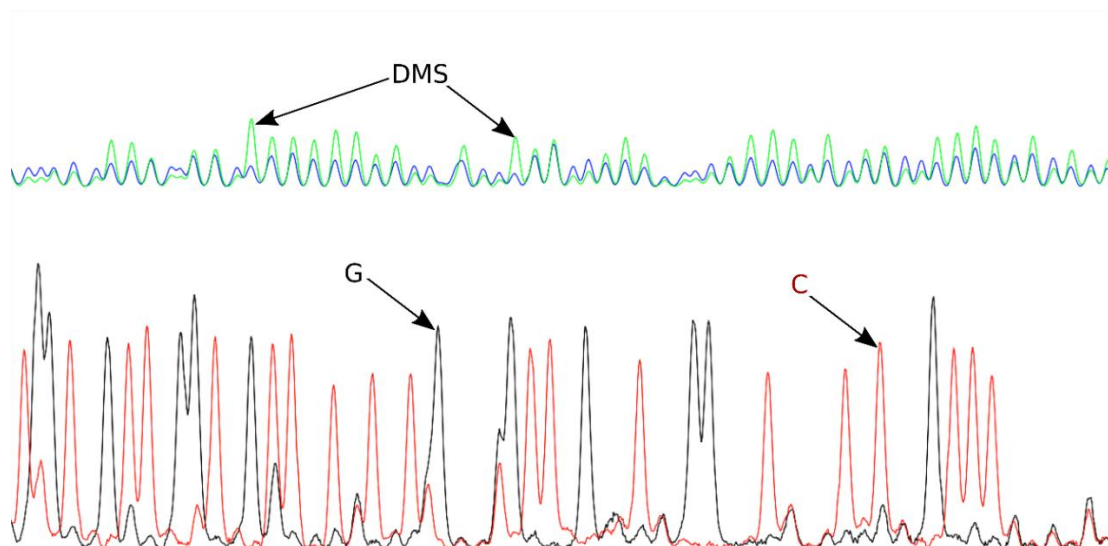
najprawdopodobniej skutkowało oddysocjowaniem enzymu i przedwczesnym zatrzymaniem odwrotnej transkrypcji, co uniemożliwiało dalszy odczyt. O niedostępności tego rejonu dla oligonukleotydów może świadczyć również fakt niezwiązania się w rejonie 1092-1116 nt startera P8. Dzięki wprowadzonym modyfikacjom startera - starter 2L (posiada trzy nukleotydy typu LNA) oraz zastosowaniu większego stężenia enzymu w reakcji RT problem przedwczesnej terminacji w tym rejonie w dużej mierze uległ eliminacji, (d) w przypadku startera P3 prawdopodobnie głównym problemem niemożności odczytania wyników rozdzielania elektroforetycznego było zbyt słabe jego wiązanie się do dwuniciowego rejonu 1043-1063 nt (co stwierdzono po określeniu struktury drugorzędowej vRNA5), co prowadziło do niskiej wydajności reakcji RT i w efekcie wcześniejszej terminacji. Wprowadzenie modyfikacji LNA zniwelowało problem i pozwoliło na zanalizowanie danych. Starter 3L był stosowany zamiast starterów P3 oraz P8.

RNA po modyfikacji oraz odwrotnej transkrypcji było rozdzielane za pomocą elektroforezy kapilarnej w pracowni genomowej Centrum Badań DNA w Poznaniu. Ze względu na wiązanie się startera P1 do końca 3' vRNA oraz zmniejszoną rozdzielczość kilkunastu początkowych pików w obrazie elektroforetycznym, nie ma możliwości określenia reaktywności 50 końcowych nukleotydów vRNA5.

Analiza wyników uzyskanych z elektroforezy kapilarnej została przeprowadzona w programie *ShapeFinder* [160]. Bezpośrednio przed analizą wykonano kalibrację (ang. *mobility shift*), która uwzględniała różnice w ruchliwości elektroforetycznej produktów wyznakowanych różnymi barwnikami fluorescencyjnymi. W tym celu dla starterów znakowanych FAM oraz JOE przeprowadzono reakcje odwrotnej transkrypcji z niemodyfikowanym vRNA5 w obecności wybranego dideoksynukleotydu (ddG). Z tym samym dideoksynukleotydem (ddG) równolegle przeprowadzono PCR dla starterów znakowanych TAMRA lub ROX. Produkty reakcji przeprowadzonych dla każdego ze starterów zostały połączone, a następnie rozdzielone z pomocą elektroforezy kapilarnej. W programie *ShapeFinder*, korzystając z opcji *mobility shift cubic*, wyznaczono różnice w migracji produktów. Wartości te zapisano w postaci pliku *mobility shift* i zawsze uwzględniano podczas wykonywanej analizy. Dla każdego zestawu starterów było konieczne wykonanie oddzielnej reakcji kalibracji gdyż w zależności od sekwencji i długości startera DNA występowały różnice w migracji produktów, znakowanych różnymi barwnikami fluorescencyjnymi.

Analiza reaktywności nukleotydów została przeprowadzona w programie *ShapeFinder* w następujący sposób: najpierw przyrównano rozdzielone produkty do linii bazowej

za pomocą funkcji *fitted baseline adjust*. Następnie zastosowano kalibrację poprzez wprowadzenie wybranego, wcześniej utworzonego pliku *mobility shift*. Analizowano fragmenty cDNA o długości około 300-350 nt poprzez zaznaczenie wybranego zakresu elektroforegramu a następnie zastosowanie funkcji, *signal decay correction*. Funkcja miała na celu zniwelować efekt wygasania sygnału, który jest obserwowany wraz ze wzrostem długości analizowanego produktu. Następnie stosowano *scale factor*, co pozwalało między innymi na powiększenie poziomu sygnału dla kontroli wzorcowych zawierających dideoksynukleotydy. Etap ten miał na celu ułatwienie, odczytania sekwencji analizowanych fragmentów przez program, co zachodziło po zastosowaniu opcji *align and integrate*, Program przypisywał sekwencję vRNA5 do analizowanych pików, obliczał różnice między powierzchnią pików próbki z reakcji pozytywnej i kontroli, oraz tworzył plik z wynikami.



**Rysunek 10.** Przykładowy rozdzielanie kapilarny produktów reakcji odwrotnej transkrypcji po modyfikacji DMS. Odczyt reakcji kontrolnej (oznaczona na niebiesko) posiadała znacznik fluorescencyjny FAM, natomiast reakcji modyfikacji DMS posiadała znacznik JOE i jest oznaczona na zielono. Strzałkami zaznaczono przykładowe produkty zatrzymania reakcji odwrotnej transkrypcji w wyniku obecności modyfikacji odczynnikiem DMS. Dolna część wykresu przedstawia drabinkę dideoksy dla cytydyny (oznaczona kolorem czerwonym) i guanozyny (oznaczona kolorem czarnym), które umożliwiły przyporządkowanie miejsca modyfikacji do sekwencji vRNA5. Strzałkami oznaczono przykładowe produkty.

Przykładowy rozdzielanie elektroforetyczny cDNA analizowany w programie *ShapeFinder* [160] został zaprezentowany na rysunku 10.

Wygenerowany plik był następnie analizowany w programie *Microsoft Excel*. Przeprowadzono normalizację danych i obliczono 2% najwyższych reaktywności (pików), następnie z 8% pozostałych najwyższych wyników obliczono średnią. Znormalizowane reaktywności uzyskano dzieląc uzyskane dane przez wartość średnią. Wartości reaktywności

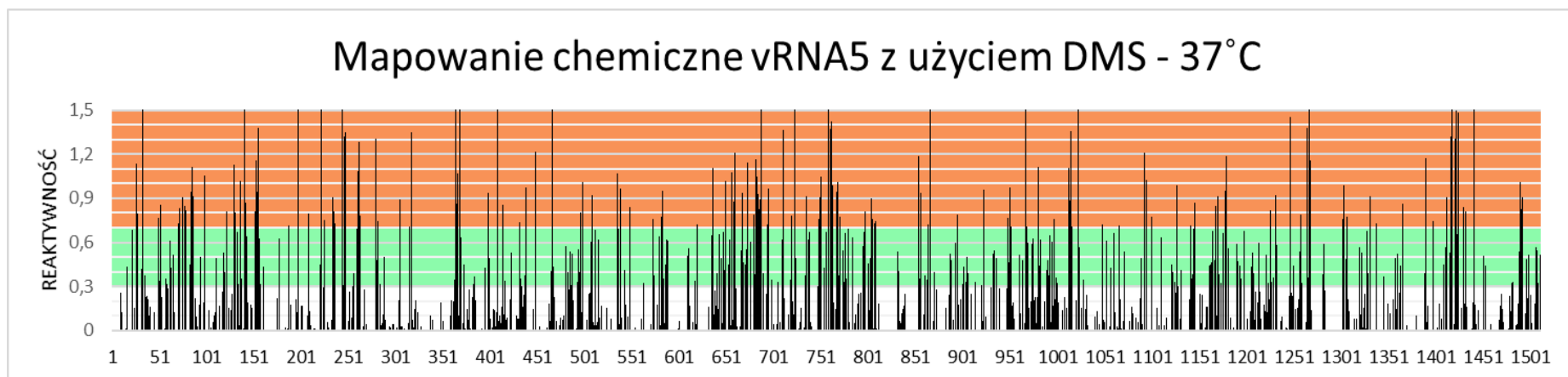
podzielono na niskie (wartość poniżej 0,3), średnie (wartości między 0,3 a 0,7) oraz wysokie (powyżej 0,7).

#### **1.4. Reaktywność vRNA5 wobec odczynników mapujących**

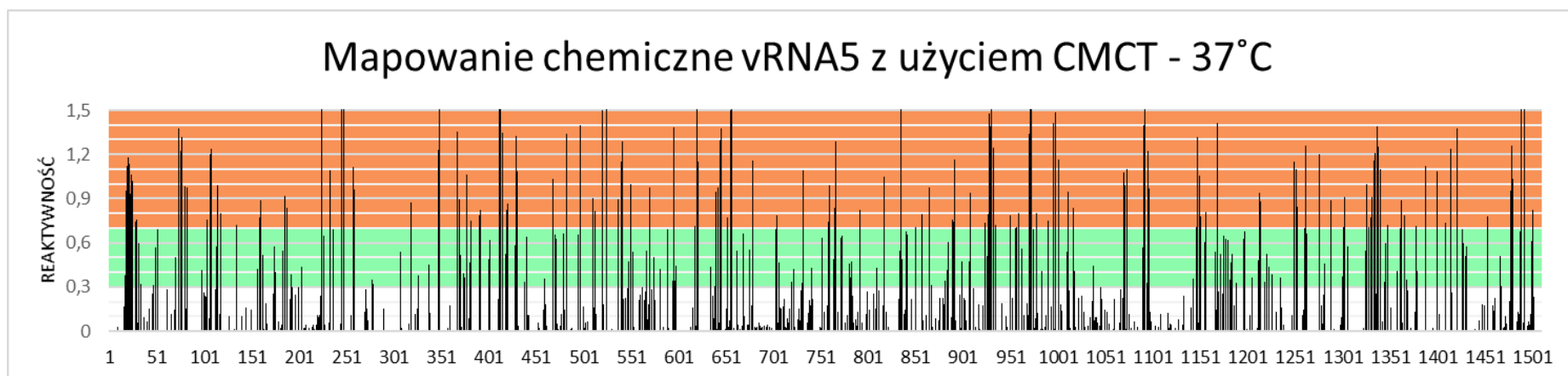
Przeprowadzone reakcje mapowania struktury drugorzędowej vRNA5 z użyciem kilku odczynników chemicznych pozwoliło na uzyskanie profilu reaktywności poszczególnych nukleotydów badanego RNA. Zidentyfikowano 134 nukleotydów o wysokiej reaktywności względem DMS, co razem stanowi 18,4% wszystkich adenozyń i cytydyn w vRNA5 (rysunek 11). Zaobserwowano łącznie 288 zmodyfikowanych zasad działając CMCT, co stanowi 18,4% wszystkich nukleotydów w vRNA5 (rysunek 12). Na 493 obecnych w cząsteczce vRNA5 urydyn stwierdzono, że 282 (57%) z nich cechuje się wysoką lub średnią reaktywnością. Wykryto, także 6 modyfikacji reszty guanozyny o średniej reaktywności. W reakcji z ketoksalem stwierdzono 101 wysokich i 51 średnich reaktywności dla guanozyny (rysunek 13). Łącznie modyfikacjom uległo 48,1% wszystkich reszt guanozyny obecnych w vRNA5. Wysoką i średnią reaktywność w obecności ketoksalu wykazał średnio, co dziesiąty nukleotyd w vRNA5. W metodzie SHAPE silnej modyfikacji z użyciem NMIA uległo 169 nukleotydów, natomiast średnią reaktywność wykazano dla 274 nukleotydów (rysunek 14). Reaktywność vRNA5 względem NMIA jest stosunkowo równomiernie rozłożona w całej cząsteczce. Można jednak wyróżnić rejony bardziej reaktywne takie jak: 18–30 nt, 70–85 nt, 635–690 nt, 758–771 nt, 1326–1341 nt czy 1409–1425 nt. Natomiast zmniejszoną liczbę modyfikacji w vRNA5 obserwowano dla rejonów 1090-1200 nt oraz w 590-610 nt.

Wyniki uzyskane metodą SHAPE były zgodne z wynikami mapowania chemicznego DMS, CMCT oraz ketoksalem.



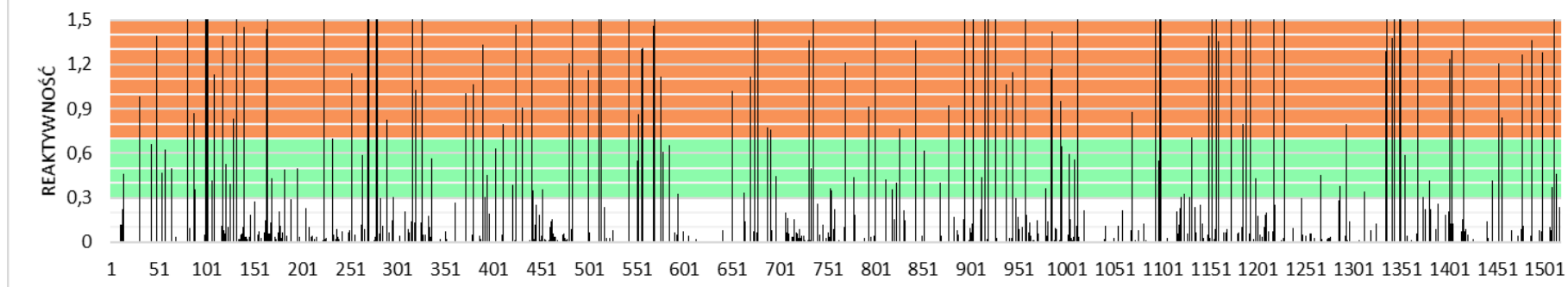


**Rysunek 11.** Reaktywność nukleotydów w vRNA5 względem DMS: 0-0,3 niska, 0,3-0,7 średnia, powyżej 0,7 wysoka.



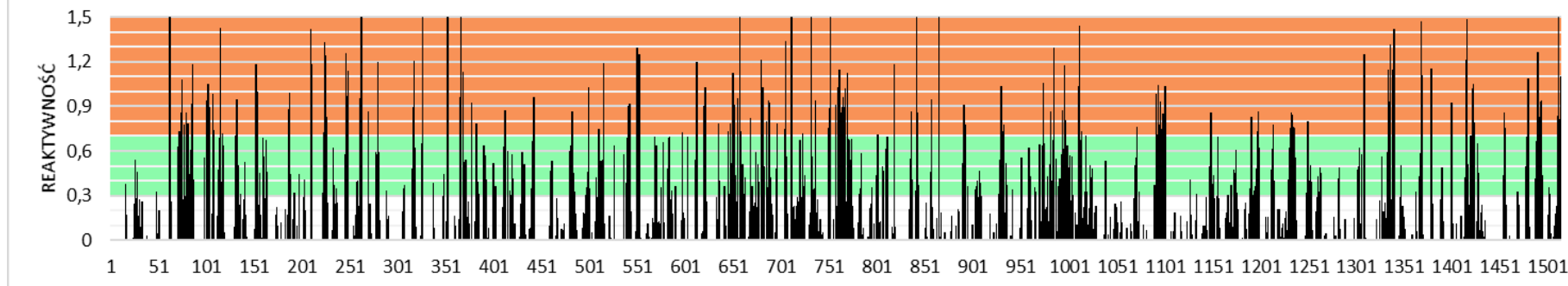
**Rysunek 12.** Reaktywność nukleotydów w vRNA5 względem CMCT: 0-0,3 niska, 0,3-0,7 średnia, powyżej 0,7 wysoka.

### Mapowanie chemiczne vRNA5 z użyciem ketoksalu - 37°C



**Rysunek 13.** Reaktywność nukleotydów w vRNA5 względem ketoksalu: 0-0,3 niska, 0,3-0,7 średnia, powyżej 0,7 wysoka.

### Mapowanie chemiczne vRNA5 metodą SHAPE - 37°C

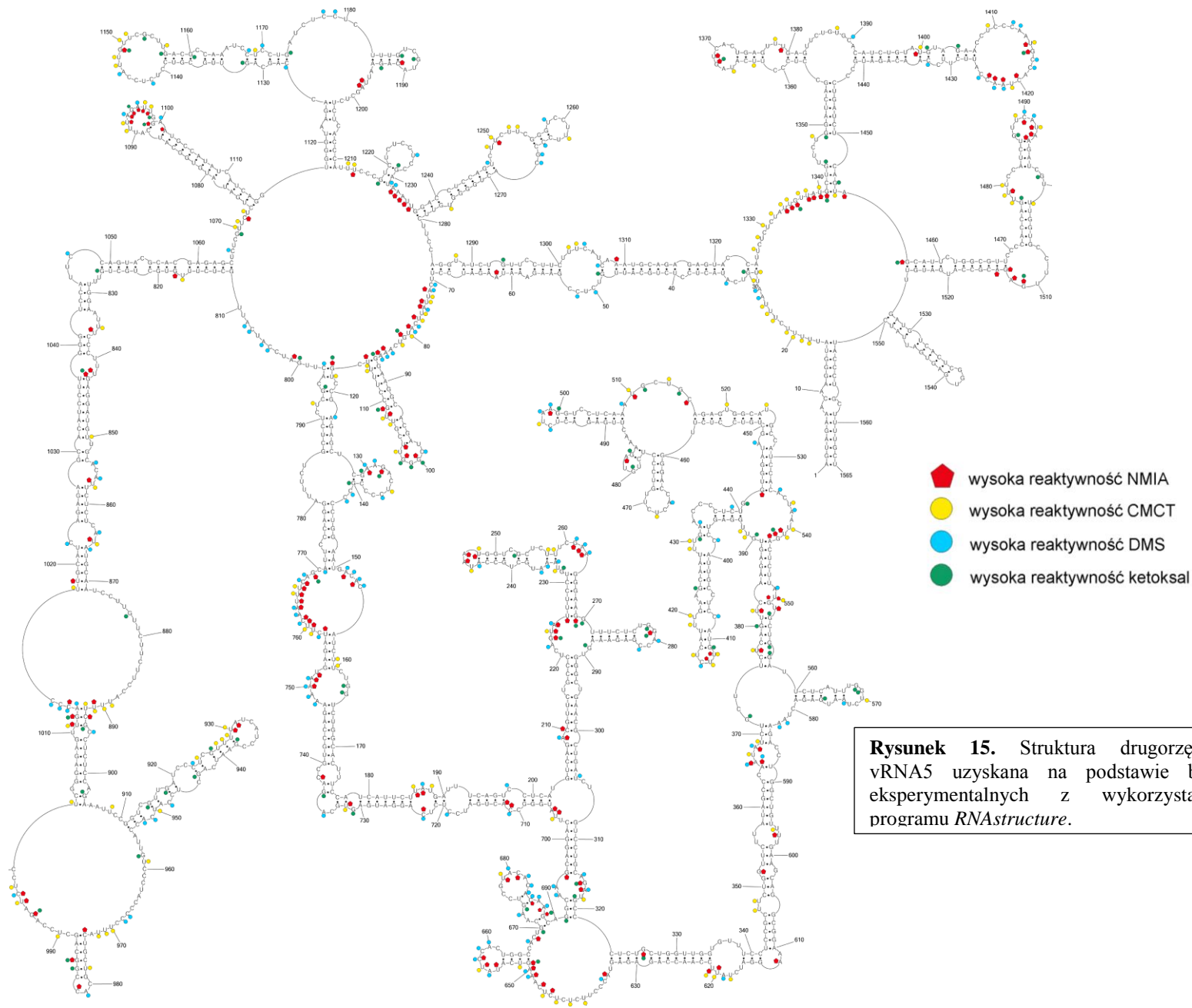


**Rysunek 14.** Reaktywność nukleotydów w vRNA5 w metodzie SHAPE: 0-0,3 niska, 0,3-0,7 średnia, powyżej 0,7 wysoka.

### 1.5. Model struktury drugorzędowej vRNA5

Wyniki uzyskane dzięki mapowaniom chemicznym posłużyły, jako wyznaczniki (ang. *constraints*) do przewidywania struktury drugorzędowej vRNA5 z wykorzystaniem programu *RNAstructure*. W tym celu sporządzono listę wszystkich reszt nukleotydowych, które wykazywały wysoką reaktywność w mapowaniu chemicznym za pomocą DMS, CMCT i ketoksalu. Dane zostały wprowadzone za pomocą opcji *chemical modification*. Natomiast dane uzyskane metodą SHAPE wprowadzono korzystając z funkcji *Read SHAPE Reactivity*, jako tak zwane *Pseudo Energy Constraints*. Wartości parametrów *slope* i *intercept* dostosowano uwzględniając wielkość cząsteczki vRNA5. Parametry te ustalono na 1,8 dla *slope* i -0,6 dla *intercept*. Po wprowadzeniu danych zostały wygenerowane struktury drugorzędowe vRNA5 zgodne z danymi eksperymentalnymi, które zapisano w formacie *dot-bracket* i zwizualizowano za pomocą aplikacji *pseudoviewer*. Jako optymalny model wybrano strukturę drugorzędową vRNA5 o najniższej energii swobodnej wynoszącej -996,5 kcal/mol (rysunek 15). Pozostałe modele struktury drugorzędowej vRNA5 charakteryzowały się mniej korzystnymi termodynamicznie wartościami energii swobodnych. Dodatkowym aspektem przemawiającym za wyborem określonej struktury drugorzędowej był fakt, że posiadała ona szeroko opisany w literaturze motyw *panhandle*, którego strukturę rozwiązano z wykorzystaniem metod NMR [115]. Należy podkreślić, że struktura drugorzędowa całego segmentu vRNA5 wirusa grypy typu A w oparciu o dane doświadczalne została określona po raz pierwszy.

Cząsteczka vRNA5 jest silnie ustrukturyzowana, w jej obrębie występuje szereg rejonów dwuniciowych. W strukturze drugorzędowej vRNA5, począwszy od końca 5' wyróżniono trzy główne domeny. Domena I składa się z dwóch fragmentów cząsteczki RNA, zlokalizowanych między 1 i 69 nt oraz 1285 i 1565 nt. W skład domeny II wchodzi RNA pomiędzy 70 i 797 nt, natomiast domena III obejmuje vRNA5 od 798 do 1284 nt. W obrębie każdej z domen występują takie motywy strukturalne jak: motyw spinki do włosów, pętle wieloramienne oraz wybrzuszenia jedno- i dwustronne. Najdłuższa helisa występuje w domenie III i jest to najbardziej ustrukturyzowana domena, co jest spójne najmniejszą liczbą zidentyfikowanych reaktywnych reszt nukleotydowych w tym rejonie. Natomiast domena II jest najbogatsza w motywy typu spinki (posiada 11 takich motywów), a także zawiera w sobie najbardziej reaktywne rejony vRNA5 obejmujące fragmenty: 70-85 nt, 635-690 nt oraz 758-771 nt.

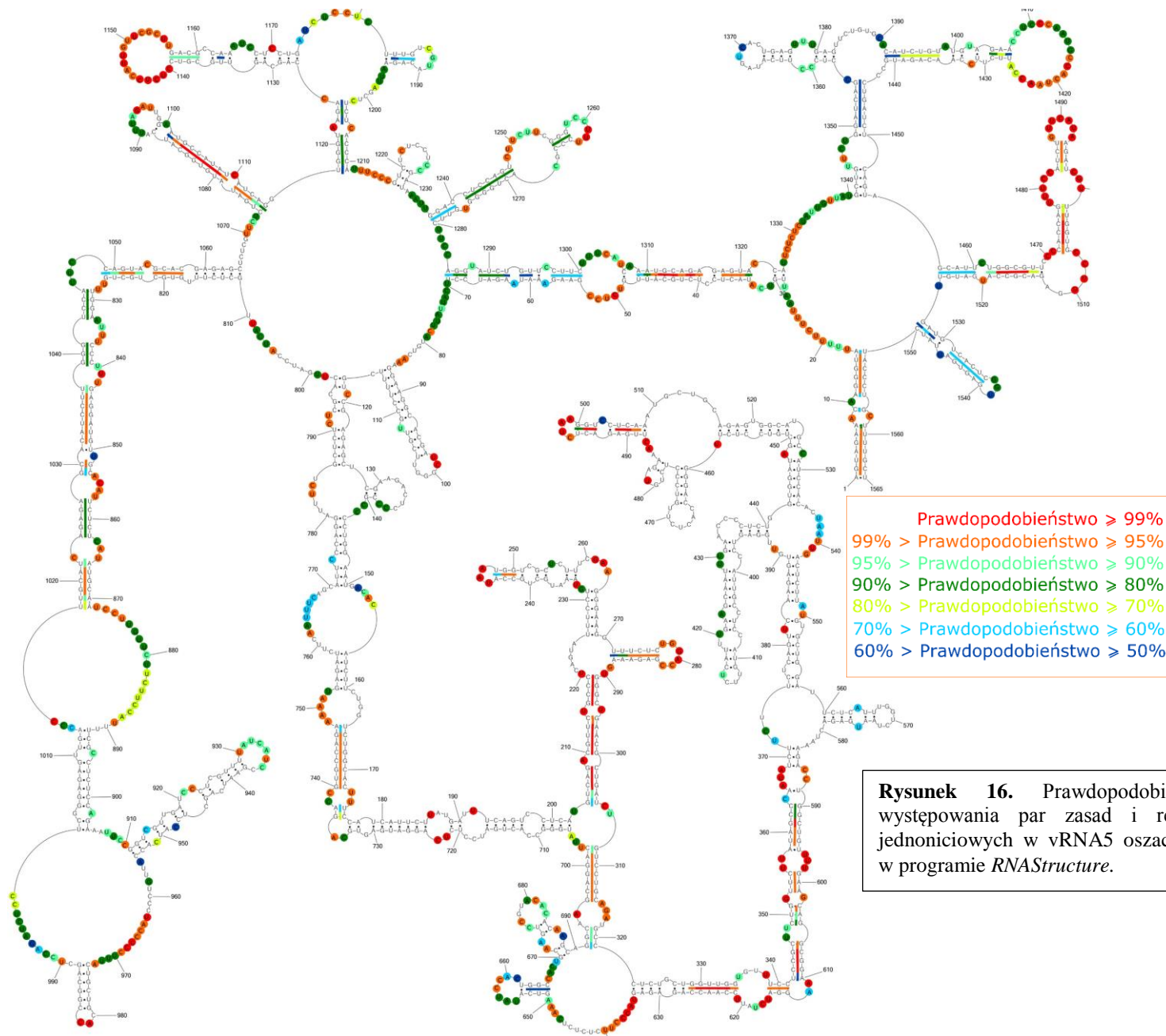


**Rysunek 15.** Struktura drugorzędową vRNA5 uzyskana na podstawie badań eksperymentalnych z wykorzystaniem programu *RNAstructure*.

### **1.6. Prawdopodobieństwo występowania par zasad i niesparowań w strukturze drugorzędowej vRNA5 wirusa grypy typu A**

Prawdopodobieństwo występowania par zasad i niesparowań w strukturze drugorzędowej vRNA5 wirusa grypy typu A obliczono za pomocą modułu *partition function RNA* w programie *RNAstructure*. Obliczenia uwzględniają dane eksperymentalne uzyskane z mapowań chemicznych vRNA5. Wynik analizy stanowiła macierz, która w graficzny sposób opisuje prawdopodobieństwo występowania par zasad lub rejonów jednoniciowych w przewidzianej strukturze drugorzędowej vRNA5 w stosunku do innych struktur wygenerowanych przez użyty program komputerowy. Uzyskane wyniki zostały naniesione na strukturę drugorzędową vRNA5. Prawdopodobieństwo występujących par zasad i niesparowań oznaczono odpowiednimi kolorami i przedstawiono na rysunku 16.

Do rejonów o najwyższym prawdopodobieństwie występowania w strukturze drugorzędowej vRNA5 zaliczamy motyw w rejonie 1470-1510 nt oraz spinkę 1079-1110 nt. Największą liczbę motywów, z blisko 100% prawdopodobieństwem występowania, można zaobserwować w domenie II. Znaczna część par zasad została przewidziana z prawdopodobieństwem występowania w strukturze drugorzędowej vRNA5 mniejszym niż 50%. Oznacza to, że w tych rejonach struktury vRNA5 istnieje możliwość występowania alternatywnych motywów strukturalnych, innych niż te zaprezentowane na rysunkach 14, 15 i 16, o mniejszej stabilności termodynamicznej.



### 1.7. Analiza dostępności struktury vRNA5 do wiązania sond mikromacierzy izoenergetycznych

Mikromacierze izoenergetyczne RNA zostały stworzone w zespole badawczym, w którym były realizowane niniejsze badania. Stanowią je sondy oligonukleotydowe związane do szklanych płytek pokrytych agarozą. Mogą być wykorzystane do określania w cząsteczce RNA miejsc dostępnych do hybrydyzacji sond oligonukleotydowych. Zasada działania mikromacierzy izoenergetycznych opiera się na obserwacji, że dla natywnych RNA rejony dwuniciowe nie mogą wiązać sondy oligonukleotydowej, natomiast fragmenty jednoniciowe mogą tworzyć z sondą duplekisy. Podczas drukowania mikromacierzy, każda sonda ma ściśle określone położenie, jeżeli więc badany RNA zostanie wyznakowany, na przykład radioaktywnie to po jego hybrydyzacji, będzie można zidentyfikować utworzone duplekisy, a tym samym określić rejony jednoniciowe w badanym RNA. Mikromacierze są izoenergetyczne, co oznacza, że tworzenie duplexu RNA/sonda, odbywa się ze zbliżoną energią swobodną. Stworzenie sond izoenergetycznych było możliwe dzięki zastosowaniu w nich modyfikacji takich, jak: 2'-O-metyloRNA, LNA czy 2,6-diaminopurynorybozydu, których odpowiednie rozmieszczenie w sekwencji sondy pozwalają precyzyjnie kontrolować energię swobodną tworzonego przez sondę duplexu z docelowym RNA. Dodatkowo, obecność modyfikowanych nukleotydów chroni sondy oligonukleotydowe przed ich enzymatyczną degradacją.

Z mapowaniem mikromacierzowym, wykorzystującym mikromacierze izoenergetyczne, wiążą się pojęcia: miejsce wiązania, miejsce alternatywnego wiązania oraz prawdopodobnego miejsca wiązania. Miejsce wiązania sondy określa środkowy nukleotyd w rejonie RNA komplementarny do danej sondy. Jeżeli sonda może wiązać się do dwóch lub więcej miejsc (poprzez oddziaływania komplementarne lub zawierające trwałe termodynamicznie niesparowania), to nazywamy je miejscami alternatywnymi. Miejsca alternatywne zostały przewidziane z wykorzystaniem programu *RNAstructure*. Szczegóły analizy miejsc alternatywnych z udziałem programu *RNAstructure* zostały przedstawione w rozdziale *Materiały i Metody*. Prawdopodobne miejsca wiązania, to miejsca wiązania, które znajdują się w uprzywilejowanym rejonie strukturalnym, to znaczy w rejonie jednoniciowym lub w parze zasad graniczącą z fragmentem niesparowanym.

W eksperymentach stosowano mikromacierze uniwersalne, na których łącznie nadrukowano 877 różnych penta- i heksanukleotydowych sond. Każda z sond była nadrukowana w trzech powtórzeniach. Zaletą mikromacierzy uniwersalnych jest możliwość stosowania zestawu jedynie dwóch płytek, zawierających wszystkie sondy biblioteki

izoenergetycznej, do badania struktury (hybrydyzacji) dowolnego RNA. Oprócz sond oligonukleotydowych, na każdej z macierzy znajdowały się różnorodne kontrole. Kontrolami negatywnymi były określone sondy oligonukleotydowe oraz bufony. Dla przykładu, sonda o sekwencji UUUUU potencjalnie może formować dupleks z badanym RNA, którego jednak w związku z niską stabilnością termodynamiczną nie można zaobserwować. Na macierz nanoszono także bufor do drukowania mikromacierzy, który również stanowił kontrolę negatywną.

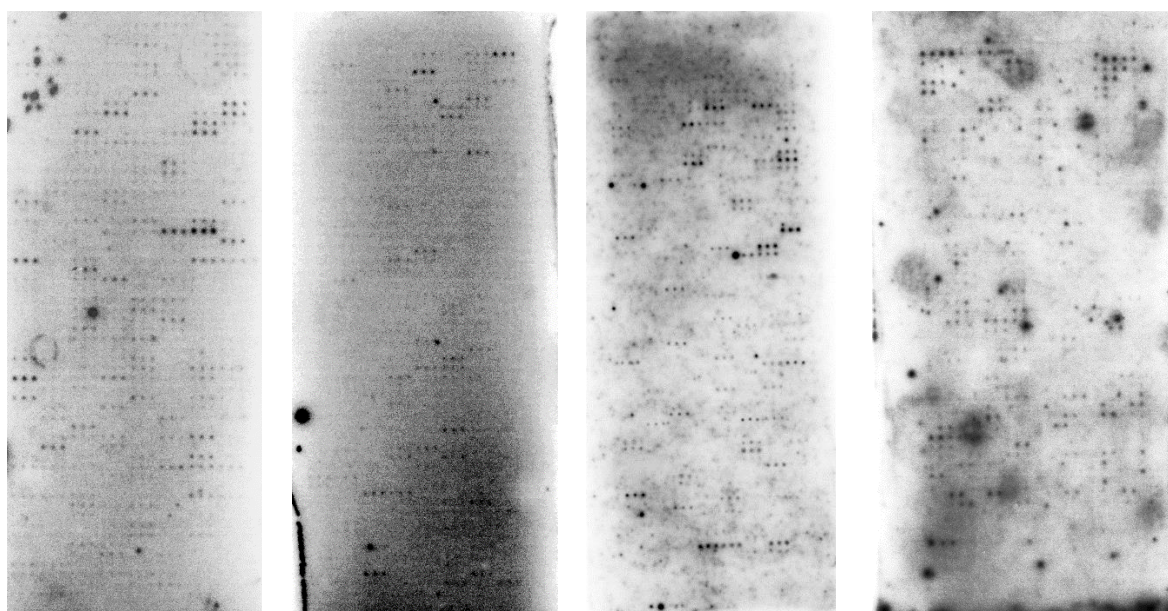
Aplikacja *Probepicker* (stworzona przez Waltera N. Moss'a, z Iowa State University, (Ames, USA) pozwoliła określić pulę sond uniwersalnej mikromacierzy izoenergetycznej komplementarnych do vRNA5. Dla vRNA5 o długości 1565 nt istnieje 1561 miejsc wiązań. Jednak uwzględniając fakt, że do przygotowania mikromacierzy izoenergetycznych stosowano krótkie, pięcionukleotydowe sondy to w konsekwencji niektóre sondy są komplementarne do więcej niż jednego miejsca. Sumarycznie, do vRNA5 teoretycznie mogło związać się 686 różnych sond oligonukleotydowych mikromacierzy izoenergetycznej. Ponad połowa z nich posiadała przynajmniej dwa miejsca wiązania. Eksperymenty z użyciem mikromacierzy izoenergetycznych zostały już szerzej opisane w pracy magisterskiej autorki tej pracy doktorskiej. W pracy doktorskiej zostaną przedstawione wyniki uzyskane dla hybrydyzacji cząsteczki vRNA5 do mikromacierzy izoenergetycznych w buforze sodowym (bufor 1) oraz zostaną porównane z wynikami uzyskanymi podczas hybrydyzacji w buforze potasowym (bufor 2). Pełen skład buforów został podany w rozdziale *Materiały i Metody*. W obu przypadkach hybrydyzacje były prowadzone w temperaturze 37°C.

Badany vRNA5 był znakowany podczas transkrypcji *in vitro* przy użyciu [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] ATP. Homogenność otrzymanego RNA oceniano na żelu agarozowym. Średnia wartość radioaktywności vRNA5, które nakładano na pojedynczą mikromacierz izoenergetyczną wynosiła 300 000 cpm.

Wyraźny sygnał dla wiązania vRNA5 na mikromacierzy uzyskiwano w wyniku hybrydyzacji vRNA5 do sond przez 18 godzin. Wyniki hybrydyzacji z mikromacierzami izoenergetycznymi wizualizowano za pomocą aparatu *Fuji Phosphoimager*. Dalszą analizę przeprowadzono w programie *ArrayGauge V2.0*, który obliczał liczbę pikseli w specjalnie zaprojektowanej siatce składającej się z pól o identycznej powierzchni. Uzyskane w ten sposób wartości liczbowe zostały wyeksportowane do programu *Microsoft Excel*. Następnie policzono średnie wartości z trzech powtórzeń dla każdej sondy i podzielono przez najwyższą wartość sygnału uzyskaną dla każdej mikromacierzy. Dzięki temu można było ocenić względną intensywność sygnałów wiązania sondy. Sonda wiązała się silnie do vRNA5, gdy



uzyskana wartość mieściła się w przedziale od 1 do 3, natomiast, kiedy wartość ta mieściła się w przedziale od 3 do 9, to dana sonda wiązała się z średnią siłą.



**Macierz 1  
bufor 1**

**Macierz 2  
bufor 1**

**Macierz 1  
bufor 2**

**Macierz 2  
bufor 2**

**Rysunek 17.** Przykładowe wyniki hybrydyzacji vRNA5 w 37°C. Mikromacierze izoenergetyczne stosowane do badań hybrydyzacyjnych w buforze 2 zostały wydrukowane z uwzględnieniem innej konfiguracji sond niż te pokazane dla buforu 1, stąd ich obrazy się różnią. Mikromacierze 1 oraz 2 są uniwersalnymi mikromacierzami izoenergetycznymi, które mogą być stosowane do badania struktury dowolnej cząsteczki RNA. Więcej informacji zostało przedstawionych w rozdziale *Materiały i Metody*.

Dla wiązań oznaczonych, jako silne obliczono energie swobodne poszczególnych dupleksów hybrydyzacyjnych. Określono także alternatywne miejsca wiązania się sond mikromacierzy do vRNA5 za pomocą programu *RNAStructure*. Wyniki uzyskane dla warunków hybrydyzacji w 37°C w buforze 1 zostały umieszczone w poniższej tabeli (tabela 3). Wyniki uzyskane dzięki mapowaniom mikromacierzowym przeprowadzonym w 37°C w buforze 2 są bardzo zbliżone do wyników uzyskanych w buforze sodowym (bufor 1), z tego względu dalsze analizy (eksperymenty z rybonukleazą H) prowadzono dla warunków z buforu 1. Zestawienie tych dwóch warunków zostało przedstawione w tabeli w rozdziale *Materiały i Metody*.

Wiązania sond mikromacierzy izoenergetycznych występują w każdej z trzech domen vRNA5. W niektórych rejonach są obserwowane tylko prawdopodobne miejsca silnego wiązania sondy, alternatywne miejsca wiązania sondy lub brak jakiegokolwiek wiązania. Do takich rejonów należą helisa 40-69 nt/1285-1324 nt w domenie I lub helisa 811-862

nt/1024-1064 nt w domenie III. Nie obserwuje się wiązania sond w rejonie 1074-1179 nt (domena III).

**Tabela 3.** Analiza miejsc wiązania sond mikromacierzy izoenergetycznych do vRNA5 (37°C, bufor 1). W nazwach sond małymi literami oznaczono nukleotydy typu LNA, dużymi literami nukleotydy typu 2'-O-metyloRNA. Literą d oraz D oznaczono odpowiednio 2,6-diaminopurynorybozyd LNA oraz 2'O-metylo-2,6- diaminopurynorybozyd.  $\Delta G^{\circ}_{37}$  obliczono na podstawie opublikowanych parametrów termodynamicznych z publikacji [161].

Miejsce wiązania sondy w vRNA5	Nazwa sondy	Sekwencja sondy	Wyniki hybrydyzacji, (bufor 1, 37°C)	Obliczona $\Delta G^{\circ}_{37}$ kcal/mol dla dupleksu hybrydyzacyjnego	Miejsce wiązania wyszukane przez program <i>RNAstructure</i>
22 / 184 / 355 / 880 / 883 / 1251 / 1280 / 1300 / 1429	33	UdUgDg	s	-9,24	1300 i 1299
					883 i 882
					1250 i 1251
					355
					184
256 / 457 / 469 / 546 / 814 / 1181	35	dDgDgg	s	-10,03	457 i 456
					1181 i 1180
					469
					546
					677
677	105	DcGgDg	s	-10,81	910 i 909
					677
275 / 642 / 644 / 790 / 860 / 1073 / 1203 / 1221 / 1328 / 1330	137	dGdGdg	s	-10,71	1330 i 1329
					1203 i 1202
					790 i 789
					644 i 643
					275
					1073
					275 i 274
860					
535	188	DgUgUg	s	-9,67	535 i 534
					683
909	417	CgGdAg	s	-9,74	909
					677 i 676
308 / 452	531	GdCdGg	s	-9,41	308
					452
36	557	GdGUdg	m/s	-9,20	36
1018	579	GcDdGg	s	-12,45	1018 i 1017
534 / 683	751	gUgUgg	s	-12,70	534 i 533
					683
377 / 415 / 562 / 646 / 722 / 862 / 1205 / 1450	905	uGdGdg	s	-10,09	722 i 721
					646 i 645
					862 i 861
					1205 i 1204
					377
					562
					415
1450					

Dla sond mikromacierzy izoenergetycznych na pewno nie jest dostępny rejon od 1331 do 1447nt oraz od 1454 do 1565nt w domenie I. Najwięcej miejsc wiązań do sond jest obserwowanych w rejonie od 643 do 683 nt. W tym rejonie występuje pięć miejsc silnego wiązania sond mikromacierzy.

Wyniki uzyskane z mapowania mikromacierzami izoenergetycznymi, zostały naniesione na strukturę drugorzędową vRNA5. Na strukturze drugorzędowej zaznaczono potwierdzone poprzez eksperymenty z udziałem rybonukleazy H (*omówione poniżej*), alternatywne oraz prawdopodobne miejsca silnego wiązania sond mikromacierzy izoenergetycznej (Rysunek 19).

### **1.8. Analiza dostępności rejonów jednoniciowych cząsteczki vRNA5 dla hybrydyzacji oligonukleotydów z wykorzystaniem rybonukleazy H**

Rybonukleaza H z *Escherichia coli* jest enzymem, który rozpoznaje duplekсы RNA/DNA, w wyniku, czego dochodzi do cięcia hydrolytycznego RNA [162]. Stanowi to podstawę metody badawczej, która pozwala w sposób alternatywny określić dostępność rejonów w RNA dla wiązania komplementarnych oligonukleotydów. W tym celu zaprojektowano krótkie oligonukleotydy DNA, które następnie użyto do weryfikacji struktury drugorzędowej vRNA5 z użyciem RNazy H. Weryfikacja miejsca cięcia enzymu odbyła się poprzez przeprowadzenie reakcji odwrotnej transkrypcji vRNA5 poddanego działaniu RNazy H, a następnie rozdzieleniu produktów za pomocą elektroforezy kapilarnej. Dokładne warunki reakcji hydrolyzy vRNA5 za pomocą rybonukleazy H w obecności oligonukleotydów DNA zostały przedstawione w rozdziale *Materiały i Metody*.

Łącznie zaprojektowano 14 oligonukleotydów DNA. Eksperymenty przeprowadzone z wykorzystaniem rybonukleazy H miały na celu potwierdzenie miejsc wiązania sond mikromacierzy izoenergetycznych i rejonów jednoniciowych w vRNA5. Poza tym, cztery oligonukleotydy DNA posiadały sekwencje odpowiadające stosowanym antysensowym 2'O-metylo RNA (*wyniki opisane w dalszej części*), dzięki czemu możliwa była weryfikacja rejonu vRNA5, który mogłoby być dostępny i wiązać zaprojektowane antysensowe oligonukleotydy.

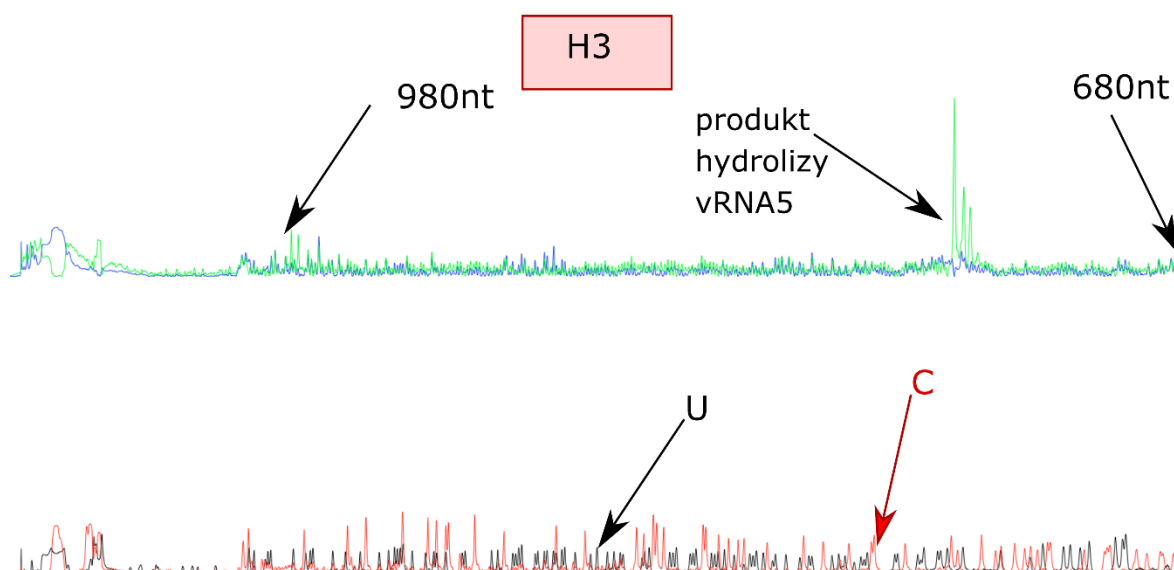
Obserwowane cięcia hydrolytyczne pogrupowano na cięcia słabe, oznaczone jako *w* i silne, oznaczone jako *s*. Cięcia hydrolytyczne silne to takie, dla których wysokość piku w rozdziale na kapilarach świadczącego o wydajność hydrolyzy był porównywalny wysokością do sygnału produktu końcowego reakcji. Wszystkie pozostałe obserwowane produkty hydrolyzy opisano, jako słabe cięcia.

**Tabela 4.** Tabela przedstawia wyniki uzyskane w eksperymencie wykorzystującym rybonukleazę H. Oznaczenia: *w* - słaba hydroliza, *s* - silna hydroliza, *x* - brak wiązania.

Nazwa	Sekwencja oligonukleotydu DNA	Badany rejon w vRNA5 (nt)	Hydroliza RNAzą H (po wymienionym nukleotydzie)
H1	CATGAATAAT	72-83	71 ( <i>w</i> ) 76 ( <i>w</i> ) 78 ( <i>w</i> ) 82 ( <i>w</i> )
H2	AAGAGTGG	464-472	681-683 ( <i>s</i> )
			471-472 ( <i>w</i> )
H3	TTCATAAGAGGAAAGAAAGT	466-485	750 ( <i>w</i> ) 751-754 ( <i>s</i> ) 755 ( <i>w</i> )
			470-484 ( <i>s</i> )
H4	CTTTGAGAGAG	643-651	647 ( <i>s</i> ) 649-650 ( <i>s</i> )
H5	GTGTACGG	676-684	676-684 ( <i>s</i> )
H6	TGGACGAAGGA	878-888	880-882 ( <i>w</i> ) 883 ( <i>s</i> )
H7	GCGAAAATGG	886-895	890-891 ( <i>s</i> ) 893 ( <i>s</i> ) 895 ( <i>s</i> )
H8	AGAACGAGA	1065-1073	1067-1071 ( <i>s</i> ) 1073 ( <i>s</i> )
H9	ATATGGCA	1102-1109	<i>x</i>
H10	GGACCCTAAGAAA	1248-1260	1250-1253 ( <i>w</i> ) 1254-1260 ( <i>s</i> ) 1261 ( <i>w</i> )
H11	GAAAGGAC	1257-1264	1261-1262 ( <i>w</i> ) 1264 ( <i>w</i> )
H12	CAATAGAGAG	1336-1327	1331-1332 ( <i>s</i> ) 1334 ( <i>s</i> )
H13	TGGTTAGTGG	1425-1416	1421-1425 ( <i>s</i> ) 1426 ( <i>w</i> )
H14	ATGGTTAGTGGCA	1415-1427	1421-1427 ( <i>s</i> ) 1428 ( <i>w</i> )

Oligonukleotyd H9 został zaprojektowany tak, aby wiązał się w miejscu, w którym obserwowano zatrzymanie reakcji odwrotnej transkrypcji. W tym przypadku nie zaobserwowano hydrolizy z udziałem rybonukleazy H, co stanowi dodatkowe potwierdzenie, że rejon ten jest niedostępny dla oligonukleotydów.

Jak wspomniano wcześniej, wyniki uzyskane dzięki eksperymentom z rybonukleazą H miały za zadanie zweryfikować dostępność miejsc w vRNA5 określonych dzięki eksperymentom wykorzystującym mikromacierze izoenergetyczne. Część alternatywnych miejsc wiązania sond mikromacierzy zostało potwierdzonych, co zostało zaprezentowane w tabeli 3.



**Rysunek 18.** Rozdział kapilarny produktów hydrolizy vRNA5 z udziałem RNazy H w obecności oligonukleotydu H3. Zielonym kolorem oznaczono reakcję (znakowaną JOE), natomiast kolorem niebieskim kontrolę, znakowaną FAM. Dolny rozdział przedstawia drabinki dideoksy U i C. Zaprezentowane cięcia hydrolityczne znajdują w rejonie 751-755nt vRNA5.

Wykazane cięcia hydrolityczne występują po nukleotydach 71, 76, 78 oraz 82. Są to cięcia słabe i występują w dużej pętli, w której dodatkowo istnieją mapowania NMIA, DMS, CMCT oraz ketoksalem (rysunek 19). Nukleotyd 71 to miejsce wiązania o średniej intensywności dla sondy mikromacierzy izoenergetycznych (patrz *Materiały i Metody*), zarówno dla buforu 1, jak i buforu 2. Kolejne cięcia hydrolityczne zidentyfikowano w rejonie 470-484 nt. Nie było natomiast cięcia w rejonie 464-469 nt, co może świadczyć o tym, że jest on niedostępny.

**Tabela 5.** Potwierdzone za pomocą eksperymentów wykorzystujących rybonukleazę H miejsca wiązania sond mikromacierzy izoenergetycznych. Po prawej stronie tabeli umieszczono nazwę oligonukleotydu DNA, za pomocą, którego potwierdzono miejsce wiązania w vRNA5.

Potwierdzone miejsca wiązania sond mikromacierzy (nt)	Nazwa oligonukleotydu
469	H2, H3
646	H4
683	H5
883	H6
1073	H8
1251	H10
1330	H12

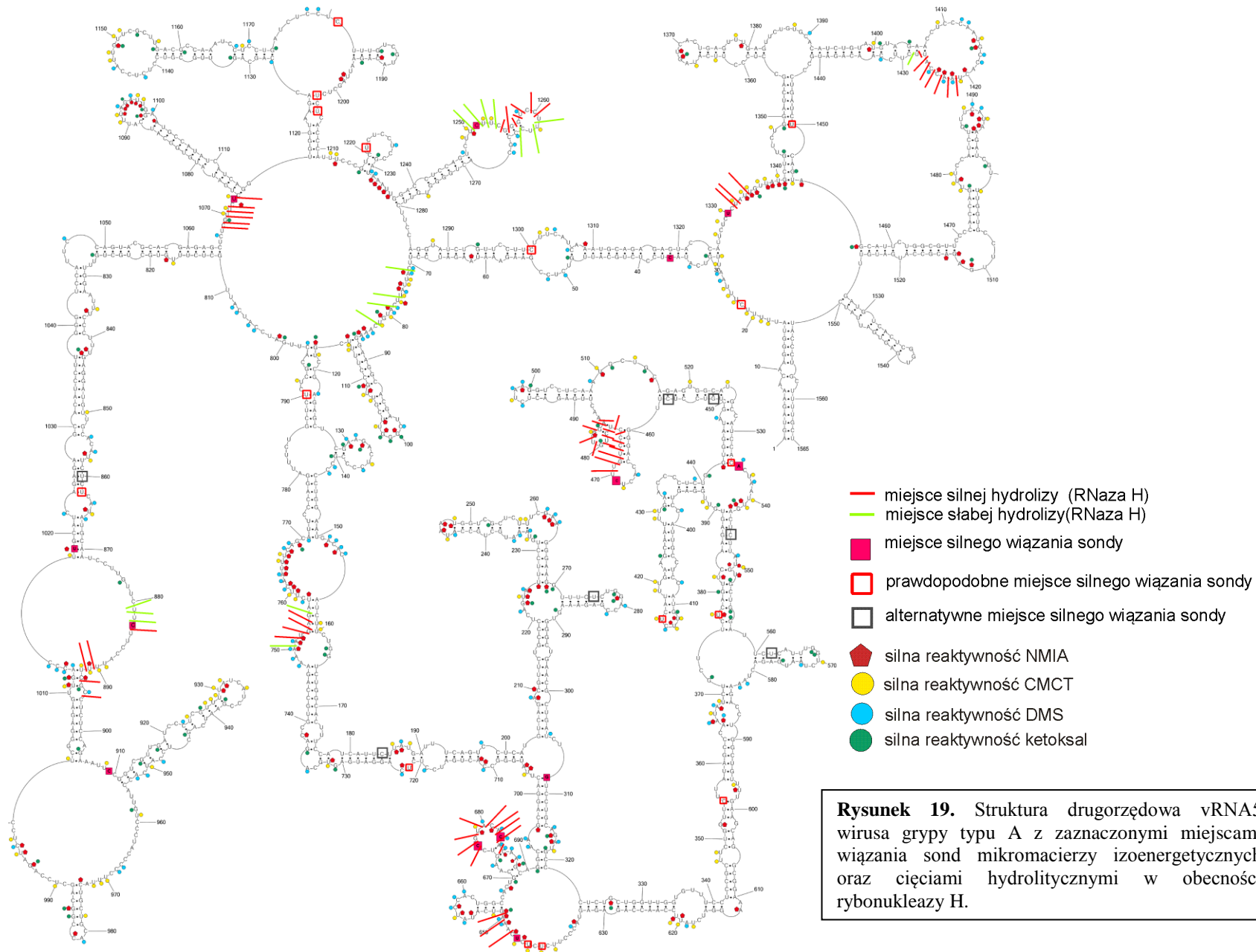
W obecności oligonukleotydu H3 można zaobserwować wiele sygnałów dla cięć hydrolytycznych, zlokalizowanych w helisie. Przepuszczalnie struktura drugorzędowa vRNA5 w tym rejonie jest inna lub może dochodzić do tymczasowego rozplecenia helisy (struktura jest termodynamicznie labilna). Dzięki eksperymentom wykorzystującym rybonukleazę H, potwierdzono wiązanie sondy komplementarnej do miejsca 469. Oligonukleotyd H3 posiada dodatkowe miejsce wiązania, o czym świadczą cięcia w obecności rybonukleazy H za nukleotydami 751-754, niektóre w rejonie helisy.

Zaobserwowano także silne sygnały cięcia hydrolytycznego występującego za nukleotydami 647 oraz 649-650. Cięcia hydrolytyczne pozwoliły na potwierdzenie miejsca 646 wiązania sondy mikromacierzy. Kolejne cięcia hydrolytyczne zaobserwowano za każdym nukleotydem w rejonie 676-684. Miejsca wiązania 677 i 683 sond mikromacierzy izoenergetycznych są dostępne. Kolejno za nukleotydami 880-882 obserwowano słabe cięcia hydrolytyczne, natomiast za nukleotydem 883 występowało silne cięcie hydrolytyczne. Hydrolyza występuje w rejonie łatwo dostępnej pętli i potwierdza to miejsce wiązania sondy 883. Silne cięcia zaobserwowano także za rejonem 890-891 nt oraz 893 i 895 nt. Cięcia hydrolytyczne częściowo zachodzą w rejonie, w którym występuje helisa. W tym rejonie znajdują się także silne modyfikacje NMIA, CMCT oraz DMS. Kolejne silne cięcia pojawiły się kolejno za nukleotydami w rejonie 1067-1071 nt oraz 1073 nt. Wyniki te pozwoliły potwierdzić silne wiązanie sondy mikromacierzy izoenergetycznych w miejscu 1073.

Natomiast H9 jest oligonukleotydem kontrolnym i został zaprojektowany, aby wiązać się w miejscu, w którym zaobserwowano przedwczesną terminację odwrotnej transkrypcji. Wyniki uzyskane dzięki użyciu RNazy H potwierdzają niedostępność rejonu 1102-1109 nt. W tym rejonie nie występowały ani silne wiązania sond mikromacierzy ani mapowania chemiczne.

Słabe cięcia rybonukleazą H uzyskano po nukleotydzie 1261, 1262 i 1264. Silną hydrolyzę natomiast w rejonie 1254-1260 nt. Tutaj również niektóre cięcia występują w obrębie helisy. Nie obserwuje się natomiast silnego sygnału w przypadku użycia krótszego oligonukleotydu H11. Może to oznaczać, że wiązanie dłuższego, 13-nukleotydowego oligonukleotydu (H10), może powodować zmiany w strukturze vRNA5, co w efekcie skutkuje rozpleceniem helisy. Zaobserwowano silne cięcia hydrolytyczne w obecności rybonukleazy H po nukleotydach 1331, 1332 oraz 1334. Potwierdza to miejsce wiązania 1330 sondy mikromacierzy izoenergetycznych. Dodatkowo, w badanej pętli obecne są także silne modyfikacje odczynnikami CMCT oraz NMIA. Silna hydrolyza rybonukleazą H występuje

także w rejonie 1421-1427, a słaba za 1428 nt. W większości obejmuje ona fragment pętli, potwierdzonej również modyfikacjami DMS, NMIA oraz CMCT.





## **2. Badania inhibicji namnażania wirusa grypy w obecności oligonukleotydów antysensowych**

### **2.1. Projektowanie oligonukleotydów antysensowych w oparciu o strukturę drugorzędową vRNA5**

W strukturze drugorzędowej vRNA5 można wyróżnić rejony jednoniciowe oraz dwuniciowe. Rejony jednoniciowe mogą być bardziej dostępne do wiązania niektórych potencjalnych terapeutyków, jak np. związki niskocząsteczkowe lub oligonukleotydy. Znajomość struktury drugorzędowej RNA może posłużyć do zaprojektowania terapeutyków naceLOWanych na ten RNA. Dodatkowo, pomocne przy projektowaniu mogą być wyniki mapowań chemicznych, enzymatycznych czy mikromacierzowych. Wyniki te potwierdzają dostępność nukleotydów do oddziaływania z oligonukleotydami.

Struktura drugorzędowa vRNA5 została wykorzystana do zaprojektowania oligonukleotydów antysensowych (ASO ang. *antisense oligonucleotide*). Docelowym wirusem grypy był szczep A/California/04/2009 (H1N1). Jakkolwiek należy przypuszczać, że dla różnych szczepów wirusa grypy, pomimo różnic w sekwencji, powinny zostać zachowywane istotne motywy strukturalne ich struktury drugorzędowej.

Projektując oligonukleotydy antysensowe metodą krok za krokiem dla badanej cząsteczki tworzy się pulę oligonukleotydów, z których każdy różni się od poprzedniego pojedynczym nukleotydem. W przypadku vRNA5 konieczne byłoby zaprojektowanie i synteza przeszło 1500 oligonukleotydów antysensowych. Podejście uwzględniające strukturę drugorzędową pozwala na znaczne zmniejszenie puli badanych oligonukleotydów. Istotnym aspektem przy projektowaniu oligonukleotydów antysensowych były wyniki uzyskane podczas hybrydyzacji vRNA5 do mikromacierzy izoenergetycznych. W procesie projektowania była także brana pod uwagę długość jednoniciowego docelowego fragmentu RNA dostępnego dla hybrydyzacji oligonukleotydów antysensowych. Kolejnym kryterium wyboru regionów docelowych były potencjalne rejony oddziaływania pomiędzy segmentami wirusa. W obrębie wszystkich ośmiu vRNA tworzących genom wirusa grypy istnieje możliwość występowania oddziaływań, które mogą mieć znaczenie dla cyklu replikacyjnego wirusa, na przykład, w pakowaniu wirionów. Przeanalizowano sekwencje wszystkich ośmiu segmentów szczepu A/California/04/2009 (H1N1) pod kątem obecności rejonów do siebie komplementarnych. Zastosowano autorski skrypt stworzony do tego celu we współpracy z doktorem Tomaszem Woźniakiem. Analiza pozwoliła znaleźć w sekwencjach segmentów fragmenty RNA o ustalonej długości większej lub równej 10- i 11-nukleotydów, które mogą

potencjalnie tworzyć komplementarne pary zasad pomiędzy sobą. Wśród nich były także rejony w 100% komplementarne do docelowego vRNA5 (tabela 6).

**Tabela 6.** Rejony potencjalnego oddziaływania pomiędzy segmentami wirusa A/California/04/2009 (H1N1). Na czerwono zaznaczono oddziaływanie pomiędzy segmentami, które mogą zostać zaburzone poprzez oligonukleotydy 7.5 i 7.5L.

Oddziaływanie segmentów	Rejon (nt) vRNA5	Sekwencja segment piąty	Rejon (nt) potencjalnie oddziaływującego vRNA	Sekwencja potencjalnie oddziaływującego vRNA
vRNA5/vRNA1	256-266	CUUUCAAAAGG	1319-1329	CCUUUUGAAAG
	357-366	UAUGGCCCCAG	196-205	CUGGGCCAUA
	721-730	CUCAGAAUGA	2173-2182	UCAUUCUGAG
vRNA5/vRNA2	6-16	AAACAAGGGUA	1961-1971	UACCCUUGUUU
	388-397	GUAUUGGAGU	738-747	ACUCCAAUAC
	605-614	AUUUGAAUGG	2314-2323	CCAUUCAAAU
	<b>874-883</b>	<b>CUUGUCCUUC</b>	<b>25-34</b>	<b>GAAGGACAAG</b>
	1368-1377	AUCACUGAGU	1106-1115	ACUCAGUGAU
vRNA5/vRNA3	413-422	UCUCAUUUGA	676-685	UCAAUUGAGA
	420-429	UGAAGCAAUC	140-149	GAUUGCUUCA
	1390-1399	CACAUUUGGA	2082-2091	UCCAAAUGUG
	1400-1409	UGAAGCAAUC	2015-2024	AGAUUCUACA
	1438-1447	GAUGCUCUGA	1345-1354	UCAGAGCAUC
vRNA5/vRNA4	59-68	AAUAAGACCC	1043-1052	GGGUCUUAUU
	730-739	AGUGCUGACC	1135-1144	GGUCAGCACU
vRNA5/vRNA6	425-434	CAAUCUGGAC	126-135	GUCCAGAUUG
	556-566	GGGUUUUCAUU	387-397	AAUGAAAACCC
	1182-1191	UUUGUCAUAA	1087-1096	UUAUGACAAA
vRNA5/vRNA7	512-521	CAGCAGAGUG	68-77	CACUCUGCUG
vRNA5/vRNA8	BRAK REJONÓW KOMPLEMENTARNYCH O DŁUGOŚCI $\geq 10$ NT			

Zaprojektowano łącznie 16 modyfikowanych antysensowych oligonukleotydów, które zawierały modyfikowane nukleotydy mające na celu zwiększenie trwałości termodynamicznej dupleksu utworzonego przez vRNA i oligonukleotyd antysensowy. Dodatkowo, obecność modyfikacji w antysensowych oligonukleotydach chroni je przed

degradacją rybonukleazami obecnymi w komórkach. Oligonukleotydy antysensowe zbudowane były w całości z 2'-O-metyloRNA lub zawierały dodatkowe reszty nukleotydowe typu LNA. Oligonukleotydy typu gapmer, które w centralnej części sekwencji zawierały reszty deoksynukleotydowe.

Oligonukleotydy 7.5 i 7.5L zostały zaprojektowane w rejonie potencjalnego oddziaływania vRNA5 z vRNA2. Analiza obecności rejonów komplementarnych wykazała, że rejon 874-883nt w vRNA5 jest komplementarny do fragmentu 25-34 nt vRNA2.

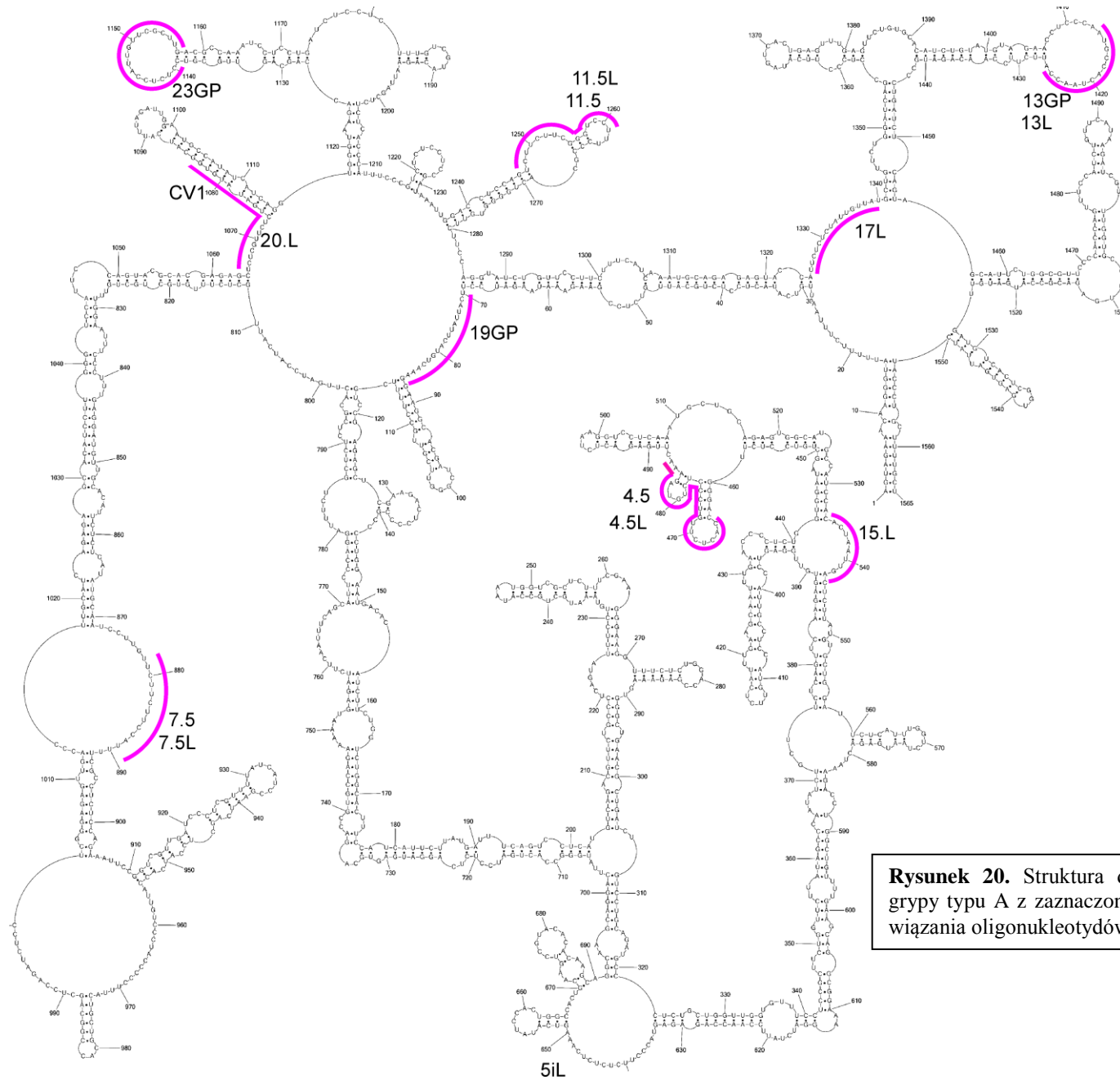
Antysensowe oligonukleotydy mogą działać na vRNA wirusa grypy na trzy różne sposoby. Jeden ze sposobów działania 2'-OMeRNA i 2'-OMeRNA-LNA może polegać na powstaniu zawady przestrzennej dla polimerazy wirusowej. W wyniku tego powstałby skrócony wirusowy RNA, niezdolny do pełnienia swojej biologicznej funkcji. Inny mechanizm może polegać na zablokowaniu dostępności motywu strukturalnego istotnego dla cyklu replikacyjnego wirusa. Przykładowo, może dojść do zaburzenia oddziaływań między segmentami, które mają znaczenie podczas pakowania vRNP do potomnych wirionów. Kolejnym sposobem działania oligonukleotydów typu gapmer, może być aktywowanie rybonukleazy H. W tym celu zostały zaprojektowane ASO typu gapmer, które są zbudowane z fragmentu DNA umiejscowionego centralnie oraz modyfikowanych reszt nukleotydowych (typu 2'-OMeRNA lub LNA) na końcach 5'- i 3'-oligonukleotydu. Rybonukleaza H rozpoznaje heterodupleks vRNA/DNA i powoduje hydrolizę vRNA w takim duplesie.

Jako kontrolę negatywną wybrano oligonukleotyd, który nie jest sekwencyjnie specyficzny do vRNA5 (oligonukleotyd NEG) oraz oligonukleotyd komplementarny do fragmentu, który w strukturze drugorzędowej vRNA5 występuje w regionie dwuniciowym (oligonukleotyd CV1). Sekwencja oligonukleotydu NEG została wybrana w oparciu o dane literaturowe 12. Dodatkową kontrolę stanowił oligonukleotyd *scrambled* - MX, którego sekwencja była przypadkową mieszaniną nukleotydów, obecnych w sekwencji oligonukleotydu 4.5.

Sekwencje oligonukleotydów antysensowych zaprojektowanych w oparciu o model struktury drugorzędowej vRNA5 zostały przedstawione w tabeli 7, natomiast na rysunku 20 zaznaczono miejsca wiązania oligonukleotydów antysensowych w strukturze drugorzędowej vRNA5

**Tabela 7.** Zaprojektowane oligonukleotydy antysensowe. Czerwonym kolorem zaznaczono nukleotydy typu LNA, czarnym 2'O-metyloRNA, dN oznaczają reszty deoksyrybonukleotydowe.

Nazwa oligonukleotydu	Rejon komplementarny w vRNA5 (nt)	Sekwencja oligonukleotydu 5'→3'	Rodzaj oligonukleotydu antysensowego
19GP	70-87	CUU <u>U</u> dGdAdCdAdUdGdAdGdUdAA <u>U</u> G <u>A</u>	gapmer
4.5	465-485	UUCAUAAGAGGAAAGAAAGU	2'OMeRNA
4.5L	465-485	UUC <u>A</u> UAAGAGGAAAGAAAGU	2'OMeRNA-LNA
15.L	534-543	UC <u>A</u> AUUGGUG	2'OMeRNA-LNA
7.5	878-888	UGGACGAAGGA	2'OMeRNA-LNA
7.5L	878-888	UG <u>G</u> AC <u>G</u> AAGGA	2'OMeRNA-LNA
20L	1065-1074	GAG <u>A</u> AC <u>A</u> AGA	2'OMeRNA-LNA
23GP	1140-1157	<u>C</u> A <u>A</u> GdCdAdAdAdCdAdAdUdGdG <u>C</u> G <u>A</u>	gapmer
11.5	1248-1260	GGACCCUAAGAAA	2'OMeRNA
11.5L	1248-1260	GGACCCUAAGAAA	2'OMeRNA
17L	1326-1341	CA <u>U</u> AAC <u>A</u> UAGAGAGG	2'OMeRNA-LNA
13L	1415-1427	<u>A</u> U <u>G</u> AUUGGUGG <u>A</u>	2'OMeRNA-LNA
13GP	1415-1427	<u>A</u> U <u>G</u> dAdUdUdGdGdUdGG <u>A</u>	gapmer
MX	brak	GUUAAGUAAUACAGAGAAGA	2'OMeRNA typu <i>scrambled</i>
NEG	brak	AGACCUCUAUAGCAGCU	2'OMeRNA kontrola negatywna
CV1	1074-1085	GCCACAU <u>A</u> UCAG	2'OMeRNA kontrola

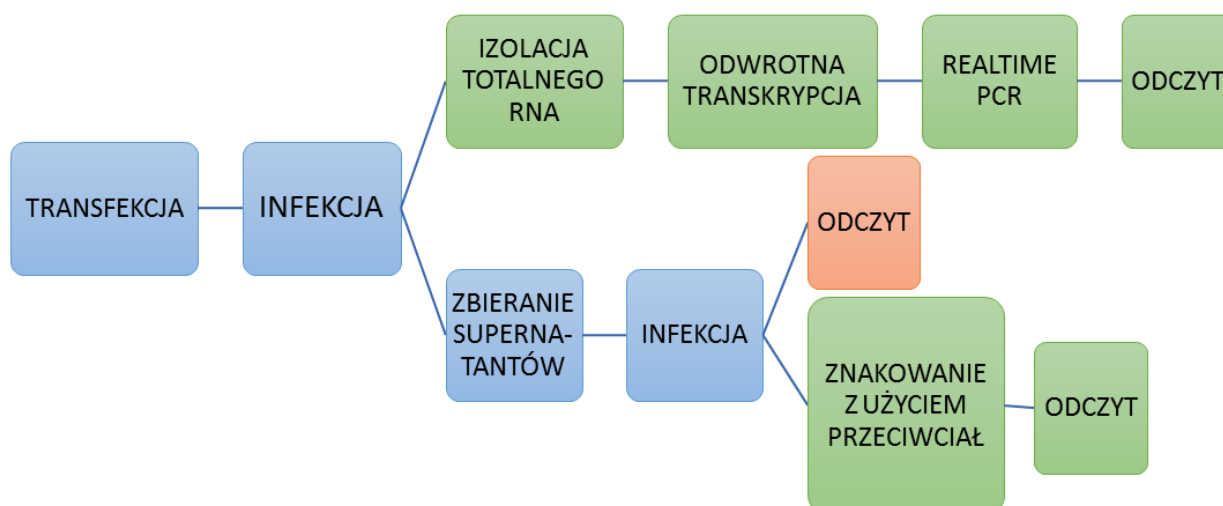


**Rysunek 20.** Struktura drugorzędowa vRNA5 wirusa grypy typu A z zaznaczonymi rejonami docelowymi dla wiązania oligonukleotydów antysensownych.

## 2.2. Wpływ oligonukleotydów antysensowych na namnażanie wirusa grypy

Oligonukleotydy antysensowe zostały przetestowane pod kątem potencjalnej inhibicji namnażania wirusa grypy typu A. W tym celu przeprowadzono doświadczenia wykorzystujące dwa różne modele badawcze, a mianowicie z zastosowaniem wirusa modyfikowanego oraz wirusa typu dzikiego (ang. *wild type*, WT). Wirus typu dzikiego był badany w linii MDCK (ang. *Madin-Darby Canine Kidney*), wyizolowanej z komórki nerki psa. Wirus modyfikowanym był wirus grypy scIAV single-cycle Influenza A virus, A/California/04/2009 (H1N1). Namnażany on był w specjalnie wyprowadzonej do tego celu linii komórkowej MDCK-HA, w której stałej ekspresji ulegało wirusowe białko hemaglutynina [163]. Wirus scIAV A/California/04/2009 (H1N1) jest modyfikowanym wirusem, który zamiast genu kodującego hemaglutyninę (w segmencie czwartym) posiada gen kodujący białko zielonej fluorescencji (*green fluorescent protein*, GFP). Genom tego wirusa, poza segmentem czwartym, ma identyczną sekwencję z sekwencją genomu wirusa A/California/04/2009 (H1N1). Cząstki wirusa scIAV powstałe w cyklu replikacyjnym w modyfikowanych komórkach MDCK-HA, posiadają w swojej otoczce białko hemaglutyniny. Dzięki temu wirus scIAV jest zdolny do infekcji kolejnych komórek. Jeżeli zainfekowane zostaną komórki niemodyfikowane, wówczas wynikiem takiego cyklu namnażania będzie wirus niezdolny do kolejnych infekcji z powodu braku w otoczce białka hemaglutyniny. Stąd w komórkach niemodyfikowanych wirus scIAV może przeprowadzić tylko jeden cykl namnażania. Zaletą takiego wirusa scIAV jest więc brak zdolności do namnażania się w naturalnym środowisku [164]. Wirus scIAV oraz komórki MDCK-HA zostały udostępnione do badań Zakładowi Genomiki Strukturalnej RNA przez profesora Luisa Martinez-Sobrido z Univeristy of Rochester (Rochester NY, USA).

Modyfikowanego wirusa wykorzystano w badaniach wstępnych, natomiast do pozostałych eksperymentów stosowano wirus grypy A/California/04/2009 (H1N1) typu dzikiego oraz standardową linię komórkową MDCK. Poniższy schemat prezentuje poszczególne etapy eksperymentów wykonanych w ramach badań inhibicji namnażania wirusa grypy (Rysunek 21).



**Rysunek 21.** Uproszczony schemat badania wpływu oligonukleotydów antysensowych na namnażanie wirusa grypy typu A. Kolorem niebieskim zaznaczono etapy, które występowały w eksperymentach inhibicji namnażania wirusa grypy typu A z udziałem wirusa sciIAV, jak i również wirusa typu dzikiego. Kolorem zielonym oznaczono etapy wykorzystywane wyłącznie w modelu badań z zastosowaniem wirusa typu dzikiego. Czerwonym kolorem oznaczono etap analizy wyniku po infekcji komórek MDCK-HA wirusem sciIAV.

Pierwszym etapem dla wszystkich eksperymentów była transfekcja komórek MDCK lub MDCK-HA oligonukleotydami antysensowymi. Warunki transfekcji były identyczne zarówno dla linii komórkowej MDCK, jak i linii MDCK-HA i zostały szczegółowo opisane w rozdziale *Materiały i Metody*.

Następnie monowarstwa komórek była poddawana infekcji odpowiednio wirusem grypy typu dzikiego lub wirusem sciIAV. Po zakończeniu trzech cykli infekcyjnych dla obu wirusów zbierano roztwór z nad komórek, który zawierał wiriony (CCS, ang. *Cell Culture Supernatant*). Zebrany roztwór służył do oznaczenia miana wirusa w próbce. W przypadku wirusa sciIAV, zebrane roztwory służyły do infekcji kolejnej monowarstwy komórek, a po jednym cyklu dokonywano bezpośredniej analizy miana wirusa w próbce. Roztwory zawierające wirusa typu dzikiego były również wykorzystywane do infekcji monowarstwy komórek, jednakże po 8 godzinach (jednym cyklu) infekcję zatrzymywano, a miano wirusa oznaczano metodą immunofluorescencji pośredniej (IFA ang. *Indirect Immunofluorescence Assay*). Ilość wirusa wyrażano w jednostkach FFU/ml (*focus forming unit per milliliter*), które określają liczbę obserwowanych ognisk wykazujących fluorescencję w przeliczeniu na mililitry stosowanego medium. Dane prezentowano zarówno, jako wartości względne (wynik w postaci procentowej) oraz jako bezwzględne wartości FFU/ml przedstawione w skali logarytmicznej. W pierwszym przypadku dane normalizowano względem kontroli L, którą stanowią komórki hodowane w obecności lipofektaminy a następnie zakażane wirusem. W eksperymentach uwzględniano także dodatkowe kontrole oznaczone, jako: kontrola K,

NEG oraz CV1. Kontrolę K stanowią dane uzyskane dla komórek traktowanych wirusem z pominięciem etapu transfekcji. Znaczenie takiej kontroli polegało na monitorowaniu stanu komórek na poszczególnych etapach doświadczenia oraz prawidłowego namnażania wirusa. Wyniki pojedynczego eksperymentu nie były brane pod uwagę, jeśli wartość procentowa namnażania wirusa dla kontroli L była niższa niż 75% wartości namnażania wirusa dla kontroli K. Oznaczało to zbyt dużą śmiertelność komórek podczas transfekcji lub/i komórki były na tyle osłabione podczas transfekcji, że wpływało to negatywnie na infekcję. Pozostałe kontrole NEG, CV1, MX wskazują na miano wirusa grypy uzyskane po transfekcji odpowiednimi oligonukleotydami kontrolnymi (NEG, CV1 i MX).

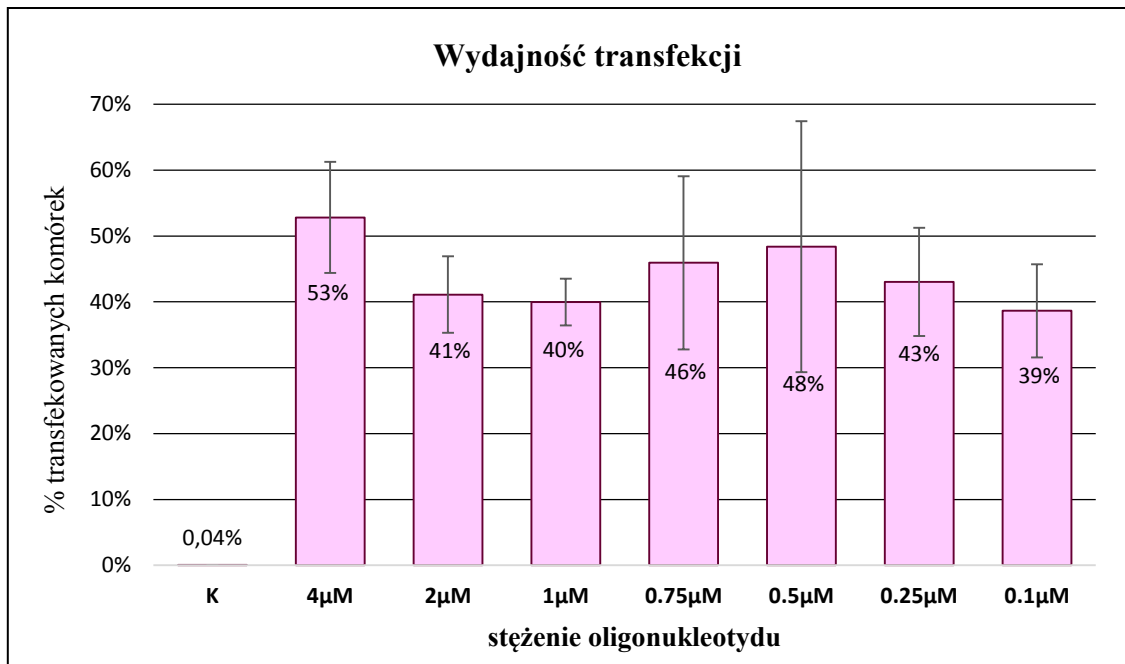
Izolację totalnego RNA przeprowadzano tylko w przypadku wirusa grypy typu dzikiego po 3 cyklach (24 godzinach) od pierwszej infekcji. Wyizolowane RNA było matrycą w reakcji odwrotnej transkrypcji, a otrzymane cDNA wykorzystano w reakcji *real time* PCR.

Na wszystkich etapach eksperymentów wykonanych z wykorzystaniem linii komórkowych prowadzono obserwację mikroskopową komórek. W przypadku oznak choroby a mianowicie: apoptozy, opóźnionego wzrostu czy odklejania komórek z płytki hodowlanej eksperyment przerywano. Szczegóły dotyczące warunków hodowli linii komórkowych, procesu transfekcji oraz infekcji opisano w rozdziale *Materiały i Metody*.

### **2.3. Określenie wydajności transfekcji komórek MDCK oligonukleotydami antysensowymi**

Pierwszym etapem eksperymentów, który wymagał optymalizacji była transfekcja komórek oligonukleotydami antysensowymi. W celu określenia wydajności transfekcji oligonukleotydami badano pomiar fluorescencji komórek MDCK, które uprzednio transfekowano oligonukleotydem wyznakowanym znacznikiem fluorescencyjnym (TAMRA lub FAM). Eksperymenty miały na celu optymalizację stężeń stosowanych w transfekcji oligonukleotydów antysensowych. Analizie poddano oligonukleotydy antysensowe w zakresie stężeń od 4  $\mu$ M do 0,1  $\mu$ M. W badaniach zastosowano cytometr przepływowy *Accuri C6 Flow Cytometer*. Pomiarów dokonała doktor Dorota Gurda z Pracowni Analiz Struktur Subkomórkowych IChB PAN. Eksperyment miał na celu określenie całkowitej wydajności transfekcji wszystkich komórek.



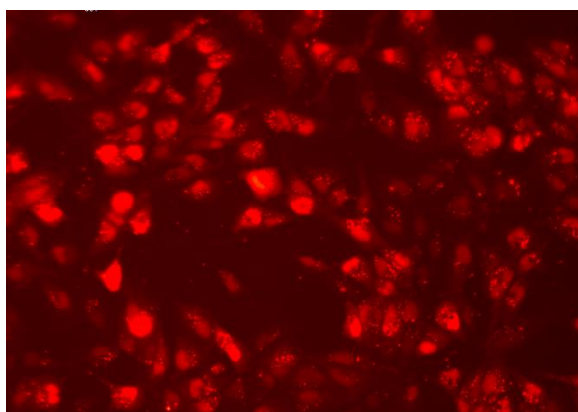


**Rysunek 22.** Wydajność transfekcji oligonukleotydem znakowanym na 5'-końcu barwnikiem TAMRA. Wyniki uzyskane dzięki pomiarom z użyciem cytometru przepływowego. K – kontrola eksperymentu, którą stanowią nietransfekowane komórki.

Wydajność transfekcji jest rozumiana, jako procent komórek wykazujących fluorescencję, co odpowiada procentowi komórek, do których został dostarczony oligonukleotyd. Linia komórkowa MDCK była transfekowana oligonukleotydami, znakowanymi na 5'-końcu barwnikami TAMRA lub FAM, mającymi maksymalną długość fali emisji odpowiednio przy 575 nm oraz 521 nm. Dla oligonukleotydu znakowanego TAMRA uzyskano silniejszy sygnał, stąd dalsze eksperymenty przeprowadzono tylko z użyciem tego oligonukleotydu. Kontrolę K stanowiła pula komórek, które nie były traktowane oligonukleotydem i reprezentowały autofluorescencję komórek. Eksperyment prowadzono w zakresie stężeń oligonukleotydu od 4 µM do 0,1 µM, czyli skrajne stężenia różniły się 40-krotnie (Rysunek 22). Obliczono średnie wydajności procentowe dla poszczególnych stężeń. Uzyskane dane przedstawiono na wykresie i zaznaczono odchylenia standardowe. Fluorescencja komórek wynosiła od 53% do 39% odpowiednio dla stężeń oligonukleotydu od 4 µM do 0,1 µM. Najwyższą wartość wydajności transfekcji w linii komórkowej MDCK zaobserwowano dla najwyższego stężenia oligonukleotydu, następnie wartość ta nieznacznie spadała wraz z obniżeniem stężenia oligonukleotydu. Najniższą wydajność zaobserwowano dla najniższego (0,1 µM) stężenia dostarczanego oligonukleotydu. Dla stężeń 0,75 µM i 0,5 µM uzyskano średnie wydajności transfekcji równe odpowiednio 46% i 48%. Stężenia te stanowią kompromis między zużyciem oligonukleotydu a zadowalającą wydajnością transfekcji. Można zauważyć, że największe stosowane

w eksperymencie stężenie (4  $\mu\text{M}$ ) jest 8-krotnie wyższe niż stężenie 0,5  $\mu\text{M}$ , natomiast nie obserwuje się aż tak znacznie zwiększonej wydajności transfekcji. Wynika to najprawdopodobniej z faktu, że doszło do wysycenia komórek oligomerem. Przy danych warunkach transfekcji nie jest możliwe wejście do komórek większej ilości oligonukleotydu i przy bardzo dużym zwiększeniu stężenia następuje tylko niewielki procentowy wzrost stężenia oligonukleotydu antysensowego w komórkach. W przeprowadzonych badaniach nie określono stężenia, które byłoby stężeniem ograniczającym, to znaczy stężeniem, poniżej którego następowalby znaczny spadek wydajności transfekcji.

Transfekcja następowała przed infekcją. W celu potwierdzenia obecności oligonukleotydów w komórce dokonywano obserwacji mikroskopowej komórek transfekowanych wyznakowanymi oligonukleotydami. Były to oligonukleotydy NEG oraz 4.5 znakowane TAMRA, ROX lub FAM na 5'-końcu. Czas między transfekcją a infekcją był taki sam dla komórek MDCK, jak i komórek MDCK-HA i wynosił 18 godzin (Rysunek 23).



**Rysunek 23.** Kontrola procesu transfekcji. Obraz mikroskopowy komórek MDCK 18 godzin po transfekcji oligonukleotydem znakowanym TAMRA. Zdjęcie transfekowanej linii komórkowej MDCK po zastosowaniu lampy UV i filtra N2.1 Leica. Obraz powiększony 400-krotnie.

#### 2.4. Optymalizacja infekcji

MOI (ang. *Multiplicity of Infection*) określa stosunek liczby cząstek wirusa do liczby infekowanych komórek. W eksperymentach stosowano MOI wynoszące 0,001 lub 0,01. Zbyt wysokie MOI może powodować śmierć komórek przed zakończeniem eksperymentu. Zbyt niskie miano powoduje niską wydajność infekcji i wymaga wydłużenia czasu inkubacji w celu zauważenia zmian w morfologii komórek i dalszych analiz.. Infekcję można umownie podzielić na etap adhezji wirusów (ok. 1 godziny) oraz etap wnikania i namnażania. Pierwszy etap infekcji przeprowadzano w temperaturze pokojowej w medium infekcyjnym stosując kołysanie i obracanie płytki w celu równomiernej infekcji komórek.

Po pierwszym etapie infekcji dodawano medium zawierające trypsynę z trzustki wołowej traktowaną TPCK (*N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone*) w stężeniu 1 µg/ml.

Długość jednego cyklu namnażania wirusa sciIAV wynosił około 22 godzin, natomiast wirusa typu dzikiego około 8 godzin. Długość cyklu weryfikowano przez prowadzenie obserwacji mikroskopowej infekowanych komórek. Dłuższy czas infekcji powodował skupienie na niewielkim obszarze wielu zakażonych komórek, co wynikało z rozpoczęcia kolejnego cyklu infekcyjnego przez wirusa i infekowania sąsiadujących ze sobą komórek.

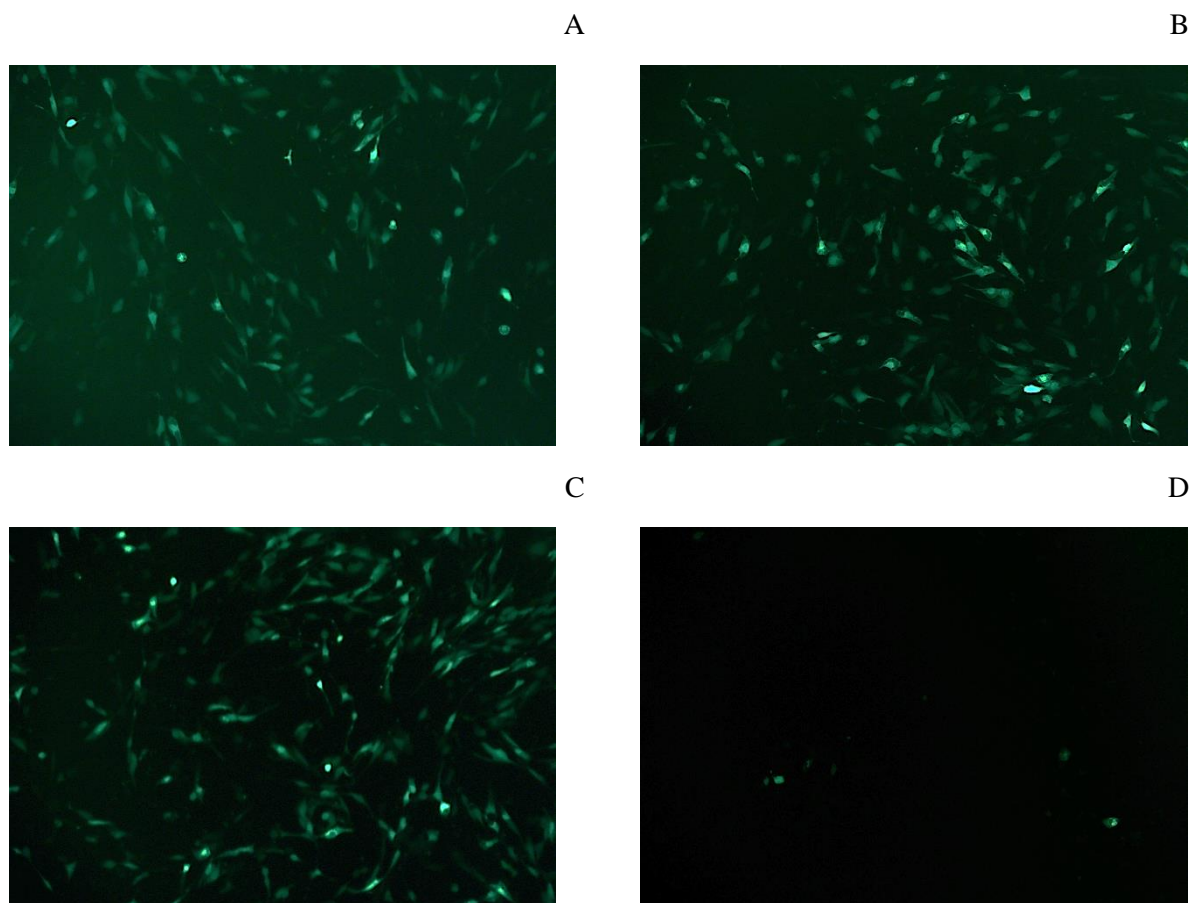
W pierwszej infekcji komórki MDCK inkubowano przez 24 godziny, natomiast w przypadku komórek MDCK-HA czas inkubacji wynosił 66 godzin. W obu przypadkach stanowiło to około trzy cykle replikacji wirusa. Następnie zbierano roztwory z infekowanej monowarstwy komórek. W roztworze znajdowały się uwolnione na drodze pączkowania z komórek MDCK nowo powstałe wirusy. Supernatant użyto w szeregu 10-krotnych rozcieńczeń do oznaczenia miana wirusa, a inkubacja trwała 22 godziny w przypadku sciIAV i 8 godzin w przypadku wirusa typu dzikiego.

W celu oznaczenia poziomu wirusowego RNA przeprowadzano infekcję wirusem typu dzikiego, a następnie po 24 inkubacji izolowano całkowite RNA. Wyizolowane RNA analizowano stosując reakcję *real time* PCR.

Wszystkie eksperymenty zostały wykonane w przynajmniej trzech powtórzeniach technicznych i biologicznych.

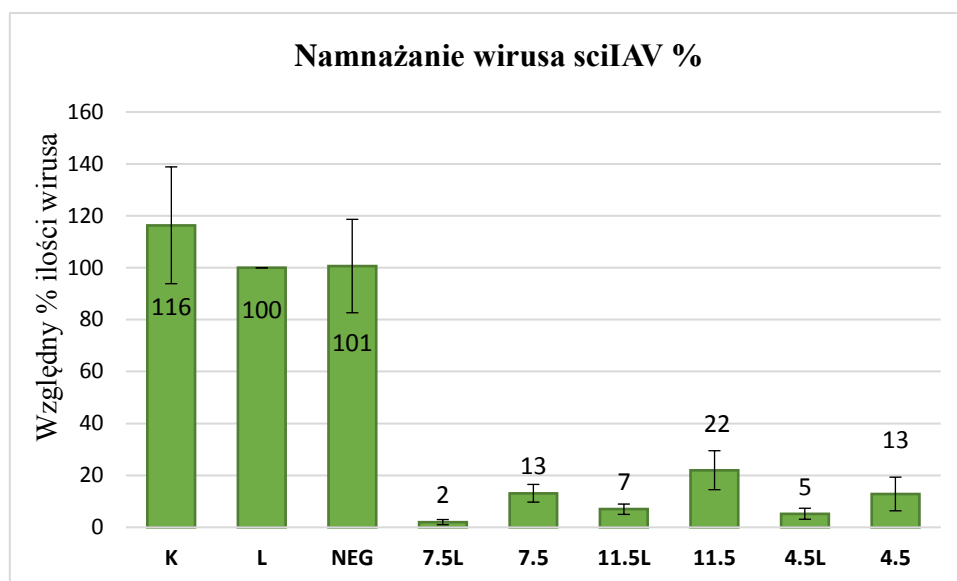
## **2.5. Inhibicja namnażania wirusa sciIAV**

Z wykorzystaniem modelu badawczego złożonego z linii komórkowej MDCK HA oraz wirusa sciIAV wykonano badania wstępne inhibicji namnażania wirusa grypy typu A. Badania zostały wykonane dla oligonukleotydów 4.5, 4.5L, 7.5, 7.5L, 11.5 i 11.5L w stężeniu 4 µM. Oligonukleotydy antysensowe zostały wstępnie wyselekcjonowane podczas badań przeprowadzonym przez profesorów Elżbietę Kierzek oraz Ryszarda Kierzka, podczas ich stażu na uniwersytecie w Rochester, NY. Następnie autorka tej rozprawy doktorskiej kontynuowała badania w macierzystej jednostce badawczej. Przykładowe zdjęcia mikroskopowe obrazujące eksperyment namnażania wirusa sciIAV w obecności oligonukleotydów antysensowych w linii komórkowej MDCK-HA zostały przedstawione na rysunku 24.



**Rysunek 24** Wynik eksperymentu monitorującego namnażanie wirusa sciIAV w obecności oligonukleotydów antysensowych. Zdjęcia prezentują obrazy mikroskopowe komórek MDCK-HA zakażonych wirusem sciIAV: A) komórki zakażone, ale niepoddane transfekcji (kontrola K), B) zainfekowane komórki traktowane lipofektaminą (kontrola L), C) zainfekowane komórki transfekowane oligonukleotydem kontrolnym NEG, D) zainfekowane komórki transfekowane oligonukleotydem 7.5L. Wszystkie komórki były infekowane wirusem sciIAV z MOI wynoszącym 0,001. Zdjęcie wykonano w powiększeniu 100-krotnym z zastosowaniem lampy UV i filtru A Leica.

Zaletą wirusa sciIAV był brak potrzeby stosowania przeciwciał podczas oznaczania miana wirusa. Dzięki ekspresji białka GFP, możliwa była bezpośrednia obserwacja wirusa w linii komórkowej w wyniku wzbudzenia światłem w zakresie ultrafioletu. Komórki wykazujące fluorescencję były zliczane oraz porównywane z kontrolą, jaką stanowiła próba traktowana lipofektaminą. Na tej podstawie obliczano miano wirusa przedstawiając je w jednostkach FFU/ml. Wyniki dla namnażania wirusa sciIAV w obecności wybranych oligonukleotydów antysensowych zostały przedstawione na poniższym wykresie (rysunek 25). Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych eksperymentów z zaznaczeniem odchyłeń standardowych.



**Rysunek 25.** Wyniki uzyskane z eksperymentów namnażania wirusa grypy sciAV w obecności oligonukleotydów antysensowych. Słupki prezentują średnie wartości procentowe namnażania wirusa sciAV. K oznacza kontrole namnażania wirusa sciAV w linii MDCK-HA, a L względną ilość namnożonego wirusa sciAV w linii komórkowej MDCK-HA traktowanej lipofektaminą.

Dla wszystkich sześciu oligonukleotydów antysensowych można zaobserwować znaczną (od 4- do 50-krotną) inhibicję namnażania wirusa sciAV. Największe wartości namnażania (najmniejszą inhibicję) wirusa sciAV uzyskano dla eksperymentów prowadzonych w obecności oligonukleotydu antysensowego 11.5. Największą inhibicję namnażania wirusa grypy zaobserwowano dla oligonukleotydu 7.5L. Namnażanie wirusa sciAV było na poziomie 2% w stosunku do kontroli L, którą była ilość namnożonego wirusa sciAV w linii komórkowej MDCK traktowanej lipofektaminą. Stwierdzono, że najwyższą aktywność inhibicyjną wykazywały oligonukleotydy posiadające modyfikacje typu LNA, co można tłumaczyć większą trwałością wiązania modyfikowanego oligonukleotydu do vRNA5.

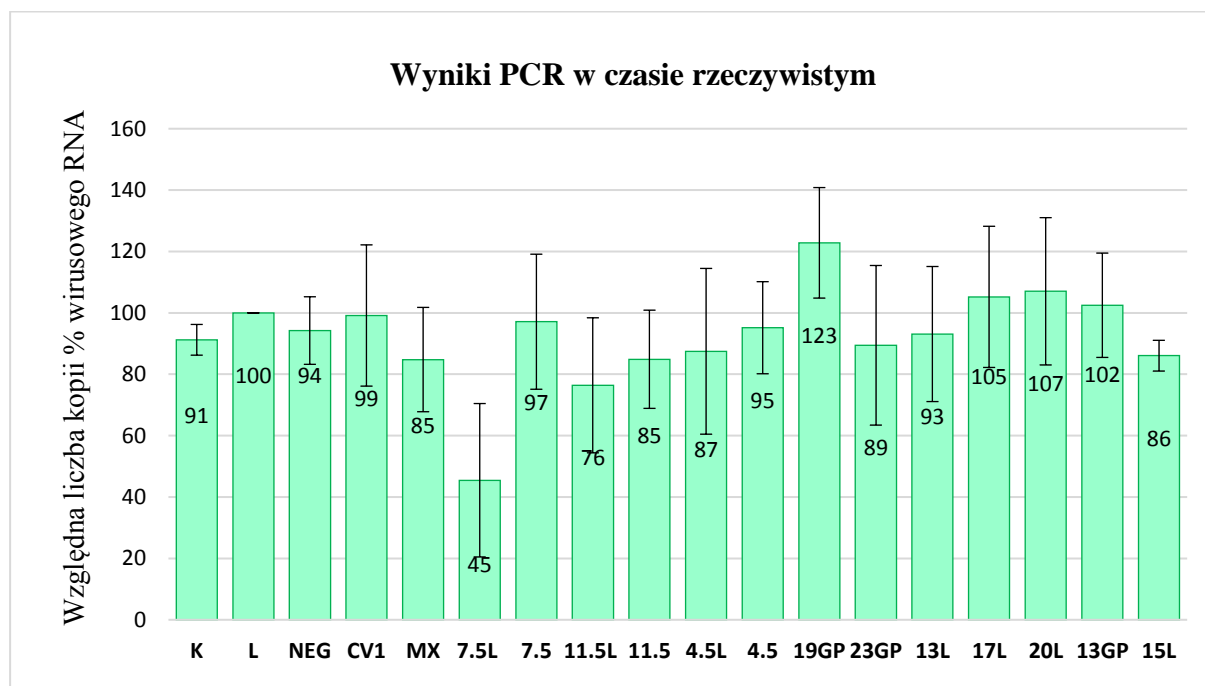
## 2.6. Inhibicja namnażania wirusa A/California/04/2009 (H1N1) typu dzikiego.

Badania wstępne inhibicji namnażania wirusa grypy z wykorzystaniem oligonukleotydów zostały przeprowadzone w układzie modelowym, jakim jest wirus sciAV i komórki MDCK-HA, które zostały opisane powyżej. Docelowo inhibitorowe działanie zaprojektowanych oligonukleotydy antysensowych zaplanowano sprawdzić stosując wirus grypy A/California/04/2009 (H1N1) typu dzikiego.

Jedną z metod, jaką zastosowano do zbadania wpływu oligonukleotydów antysensowych na namnażanie A/California/04/2009 (H1N1) w komórkach MDCK była reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR, ang. *quantitative PCR*). Użycie metody qPCR miało na celu weryfikację, w jakim stopniu obecne w hodowli

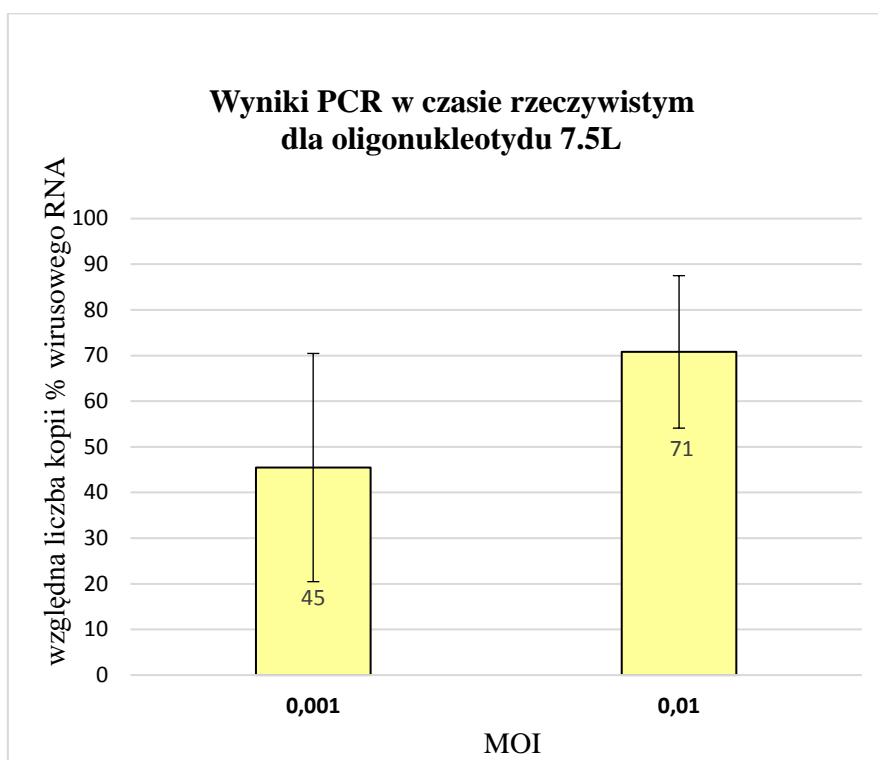
komórkowej ASO wpływały na replikację wirusowego materiału genetycznego. W tym celu linia komórkowa MDCK była transfekowana oligonukleotydami antysensowymi o końcowym stężeniu wynoszącym 0,5  $\mu\text{M}$ , a następnie infekowana wirusem grypy. Po 24 godzinach od infekcji przeprowadzano izolację totalnego RNA z hodowli komórkowej. Następnie, przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji w celu pozyskania cDNA i przeprowadzano reakcję qPCR, który pozwala określić ilość materiału na początku amplifikacji. Reakcje odwrotnej transkrypcji oraz qPCR zostały wykonane we współpracy z doktor Ewą Białą z macierzystej grupy badawczej.

Wyniki były porównywane ze sporządzoną krzywą standardową, dzięki czemu została obliczona bezwzględna liczba kopii wybranego segmentu wirusa grypy typu A. Wyniki przeliczano na wartości procentowe i sporządzono wykresy, na których umieszczono średnie wartości procentowe względnej liczby kopii wirusowego RNA oraz odchylenia standardowe. Średnie zostały policzone z trzech powtórzeń biologicznych. Badania wykonano stosując podczas infekcji początkowe MOI wynoszące 0,001 lub 0,01. Więcej informacji zostało przedstawionych w rozdziale *Materiały i Metody*. Poniższy wykres (rysunek 26) przedstawia uśrednione wyniki względnej liczby kopii RNA wirusowego dla MOI 0,001.



**Rysunek 26.** Względna liczba kopii wirusowego RNA podczas badania wpływu oligonukleotydów antysensowych na namnażanie wirusa grypy A/California/04/2009. Słupki przedstawiają średnie wartości procentowe obliczone z przynajmniej trzech powtórzeń biologicznych. K oznacza kontrolę dla wirusowego RNA w komórkach MDCK, które nie były traktowane lipofektaminą i były infekowane wirusem grypy. L oznacza wirusowe RNA w komórkach MDCK traktowanych lipofektaminą i zakażanych wirusem grypy. W analizie danych wykorzystano test t-Student dla zmiennych niezależnych na poziomie istotności  $p < 0,05$ . Szczegóły dotyczące przebiegu eksperymentu zostały opisane w rozdziale *Materiały i Metody*.

Dodatkowo przeprowadzono analizę mającą na celu określenie wpływu MOI podczas infekcji na obserwowane wyniki inhibicji namnażania wirusa grypy typu A. W tym celu wykorzystano test t-Student. Analiza została przeprowadzona na poziomie istotności wynoszącym  $p < 0,05$ . Istotne różnice pomiędzy wynikami w dwóch różnych warunkach zaobserwowano dla oligonukleotydu 7.5L. Wyniki średnich wartości procentowych poziomu RNA wirusowego w obecności tego oligonukleotydu w linii komórkowej MDCK zostały przedstawione na rysunku 27. Dla wyższego początkowego stężenia wirusa w infekcji obserwuje się zmniejszenie zdolności oligonukleotydu 7.5L do obniżania poziomu wirusowego RNA w komórkach. Dla pozostałych badanych oligonukleotydów antysensowych nie zaobserwowano różnic w poziomie wirusowego RNA pomiędzy stosowanymi MOI 0,01 lub 0,001.

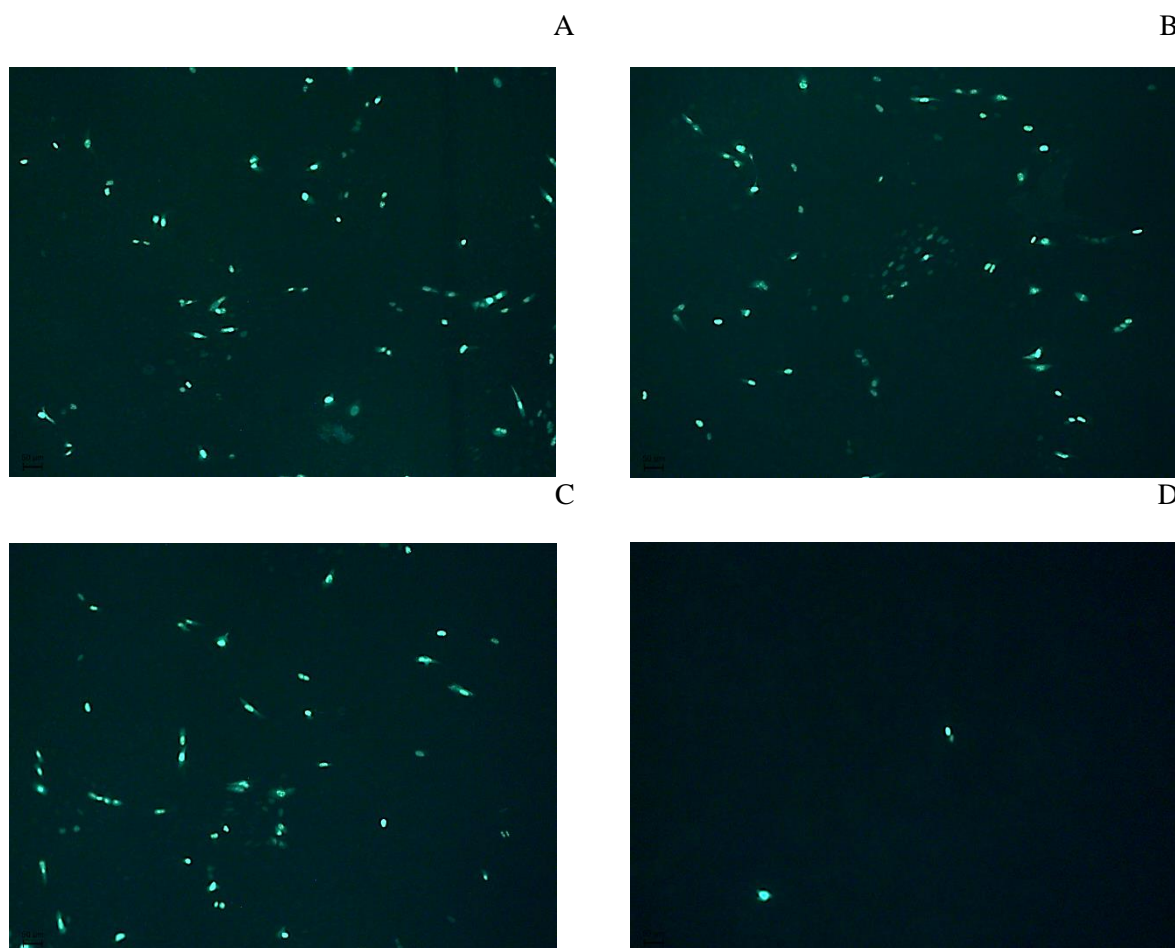


**Rysunek 27.** Względna liczba kopii RNA wirusa grypy typu A w komórkach MDCK w obecności oligonukleotydu 7.5L. Średnie porównano za pomocą testu równości średnich t-Student przy poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Równoległe do badań poziomu wirusowego RNA zostały wykonane badania oznaczające ilość namnożonego wirusa grypy typu A za pomocą przeciwciał monoklonalnych. W celu określenia miana wirusa w eksperymentach, konieczne było stosowanie testu immunofluorescencji pośredniej IFA. Oznaczanie ilości cząstek wirusa w metodzie IFA ma tę zaletę, że jest bezpośrednim obrazem, poprzez identyfikację białka NP, skutecznej infekcji dokonanej przez wirusa.

Zainfekowane komórki po 10 godzinnym czasie inkubacji utrwalano przez 15 minut w mieszaninie zawierającej Triton X-100 oraz formaldehyd. Następnie preparat inkubowano z przeciwciałami. Przeciwciało pierwszorzędowe było króliczym przeciwciałem monoklonalnym i było skierowane przeciwko białku NP. Przeciwciało drugorzędowe, skierowane przeciw króliczemu, było wyznakowane fluoresceiną, co pozwalało na łatwą identyfikację obecności wirusa w komórce.

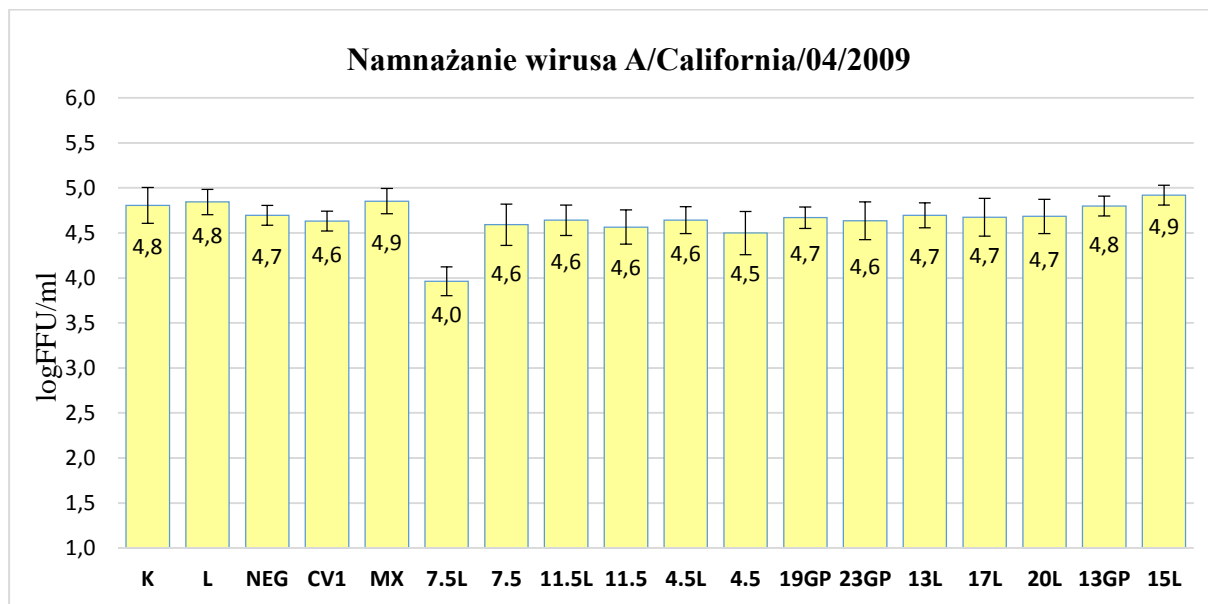
Liczbę wyznakowanych komórek zliczano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego, a następnie obliczano miano wirusa podając jest w jednostkach FFU/ml. Poniżej zostały przedstawione zdjęcia mikroskopowe komórek MDCK zakażonych wirusem A/California/04/2009 (H1N1), w których białko NP zostało wyznakowane odpowiednimi przeciwciałami (Rysunek 28).



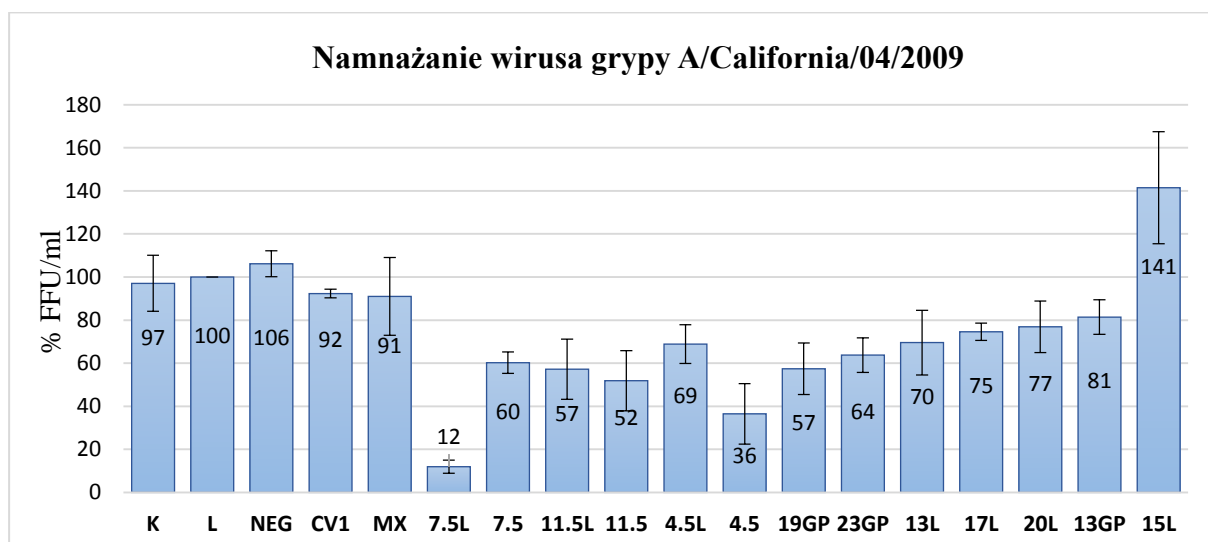
**Rysunek 28** Wyniki eksperymentu monitorującego namnażanie wirusa A/California/04/2009 (H1N1) w obecności oligonukleotydów antysensowych. Zdjęcia prezentują obrazy mikroskopowe komórek MDCK zakażonych wirusem, A) nietransfekowane komórki (kontrola K), B) komórki traktowane lipofektaminą (kontrola L), C) komórki transfekowane oligonukleotydem NEG, D) komórki transfekowane oligonukleotydem 7.5L. Wszystkie komórki były poddawane infekcji wirusem grypy A/California/04/2009 (H1N1) z MOI=0,001. Zastosowano powiększenie 100-krotne oraz filtr I3 Leica.



Sporządzono wykresy bezwzględnej ilości namnażanego wirusa (wykres w skali logarytmicznej) (rysunek 29), jak i wykres procentowej ilości wirusa (rysunek 30), gdzie procent obliczano względem kontrolnej zainfekowanej próby (kontrola L), traktowanej jedynie lipofektaminą.



**Rysunek 29.** Bezwzględne wyniki namnażania wirusa grypy A/California/04/2009(H1N1) przedstawione w skali logarytmicznej. Stosowane końcowe stężenie ASO wynosiło 0,5  $\mu$ M. Komórki zakażano wirusem grypy typu A z zastosowaniem MOI 0,001. Wyniki uzyskano za pomocą metody IFA (opisana szerzej w *Materiałach i Metodach*). W analizie wykorzystano test t-Student dla zmiennych niezależnych. Poziom istotności wynosił  $p < 0,05$ .



**Rysunek 30.** Wyniki namnażania wirusa grypy A/California/04/2009 (H1N1) w obecności oligonukleotydów antysensowych. Wyniki zostały uzyskane za pomocą metody IFA. Stosowane końcowe stężenie ASO wynosiło 0,5  $\mu$ M. Komórki zakażano wirusem grypy typu A z zastosowaniem MOI 0,001. Przebieg eksperymentu został opisany w sekcji Materiały i Metody. W analizie wykorzystano test t-Student dla zmiennych niezależnych. Poziom istotności wynosił  $p < 0,05$ .

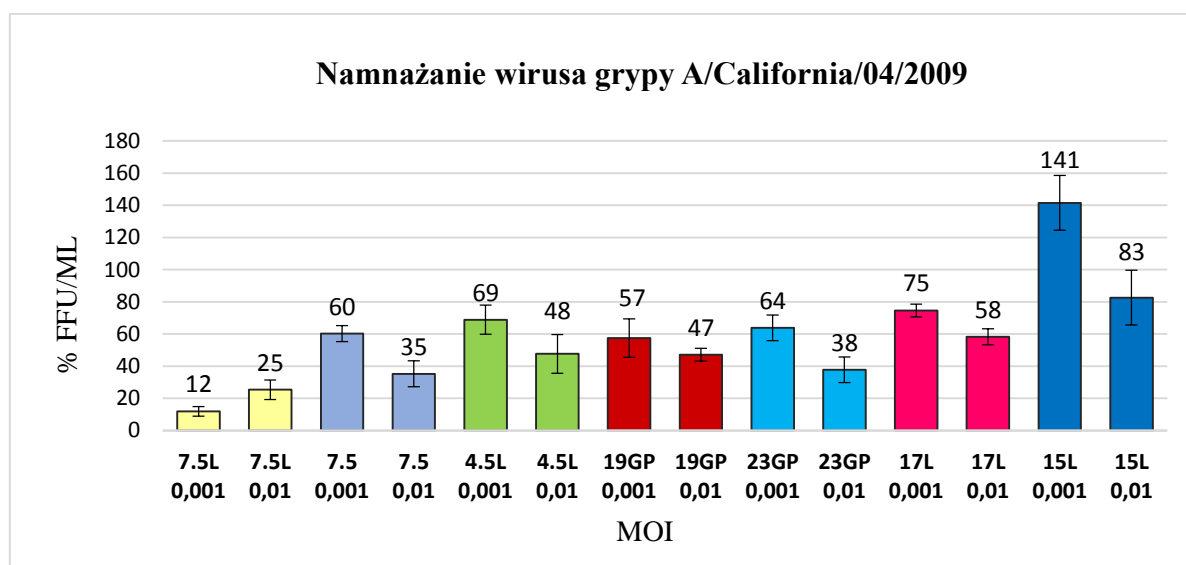
Pięć oligonukleotydów antysensowych (7.5L, 4.5, 11.5, 11.5L, 19GP) powodowało inhibicję namnażania wirusa grypy typu A na poziomie powyżej 40%. Największą inhibicję namnażania wirusa zaobserwowano dla oligonukleotydu antysensowego 7.5L. Poziom namnażania wirusa grypy był niższy w obecności oligonukleotydu o prawie jeden logarytm w stosunku do kontroli L. Istotną statystycznie inhibicję namnażania wirusa grypy typu A wykazano również dla oligonukleotydów 19GP, 23GP, 17L, 20L, wynoszącą od 19 do 64%. Tylko jeden z wszystkich zaprojektowanych oligonukleotydów (15L) nie wpływał na namnażanie wirusa. Drugim, co do kolejności oligonukleotydem powodującym największą inhibicję namnażania wirusa grypy typu A jest oligonukleotyd 4.5. Średnia procentowa wartość namnażania wirusa w obecności tego oligonukleotydu wynosi 36% i jest ponad trzy razy większa niż w przypadku oligonukleotydu 7.5L. Warto zaznaczyć, że dla oligonukleotydu 4.5 uzyskano znacznie większy poziom inhibicji niż dla oligonukleotydu 4.5L. Natomiast, dla pary oligonukleotydów 7.5 i 7.5L ten drugi oligonukleotyd daje większy efekt inhibicji. Uzyskane wyniki mogą świadczyć, że nie istnieje prosta zależność między liczbą obecnych modyfikacji LNA, a działaniem inhibitorowym oligonukleotydu antysensowego. Wprowadzenie do ASO dodatkowego nukleotydu typu LNA niekoniecznie będzie powodowało, że będzie on wykazywał większy efekt inhibitorowy. Możliwe, że obserwowany efekt ma związek z częściowo ustrukturalizowanym miejscem docelowym w RNA.

W przypadku pary oligonukleotydów 7.5L i 7.5, w metodzie IFA zaobserwowano 5-krotnie większy efekt inhibitorowy dla 7.5L niż dla 7.5. Rejon wiązania antysensowych oligonukleotydów obejmuje potencjalny rejon oddziaływania vRNA5 i vRNA2. Oba oligonukleotydy wiążą się w rejonie dużej pętli vRNA5 co jest widoczne na rysunku 20. Oligonukleotydy zawierające LNA, tworzą stabilniejsze duplekisy z RNA niż duplekisy powstające między dwoma RNA. Być może wytłumaczeniem większej inhibicji namnażania wirusa przez 7.5L może być jego stabilniejsze wiązanie do pętli (niż to ma miejsce w przypadku oligonukleotydu 7.5). Oligonukleotyd 7.5L mógłby konkurować z vRNA2 o oddziaływanie z vRNA5. Aby tą hipotezę jednak zweryfikować konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych badań.

Wprowadzenie modyfikacji LNA ma na celu zwiększenie stabilności termodynamicznej powstającego dupleksu między docelowym RNA a oligonukleotydem antysensowym. Wprowadzenie czterech nukleotydów LNA do oligonukleotydu 4.5 nie poprawiło zdolności cząsteczki oligonukleotydu do inhibicji namnażania wirusa grypy. Może to być spowodowane tym, że modyfikacje LNA umiejscowione w oligomerze 4.5L, oprócz

wiązania się z docelowym fragmentem vRNA5, sprzyja także oddziaływaniom typu *off target*, co powoduje zmniejszenie puli dostępnych 4.5L do wiązania z miejscem docelowym w vRNA5.

Podobnie jak eksperymenty qPCR, eksperymenty IFA zostały przeprowadzone dla dwóch warunków różniących się początkową wartością MOI (0,01 i 0,001) podczas etapu infekcji. W celu sprawdzenia istotnych różnic pomiędzy warunkami porównano średnie wartości namnażania wirusa uzyskane dla MOI 0,01 oraz MOI 0,001. Do analizy wykorzystano test t-Student równości średnich dla zmiennych niezależnych, na poziomie istotności  $p < 0,05$  (rysunek 31). Istotnie statystycznie różnice między średnimi wartościami namnażania wirusa grypy typu A w warunkach MOI 0,01 i 0,001 stwierdzono dla oligonukleotydów 4.5L, 7.5, 7.5L, 15L, 17L, 19GP oraz 23GP. Wyniki zostały przedstawione na rysunku 32. Dla pozostałych oligonukleotydów różnice między warunkami 0,01 a 0,001 nie są istotne statystycznie, co wynika prawdopodobnie z nieznacznego ich wpływu na namnażanie wirusa.



**Rysunek 31.** Namnażanie wirusa grypy w obecności oligonukleotydów antysensowych w komórkach MDCK dla różnych warunków infekcji (MOI 0,001 lub 0,01). Przedstawiono tylko wyniki, dla których wykazano istotnie różnice w namnażaniu wirusa grypy typu A. Miano wirusa uzyskano za pomocą metody IFA. W analizie wykorzystano test równości średnich t-Student dla zmiennych niezależnych. Poziom istotności wynosi  $p < 0,05$ .

Nie obserwuje się znaczących różnic w wynikach namnażania wirusa grypy typu A dla różnych warunków infekcji. Zarówno dla zastosowanego w infekcji MOI 0,01 jak i 0,001 oligonukleotyd 7.5L wykazuje największą inhibicję namnażania wirusa spośród wszystkich zaprojektowanych oligonukleotydów antysensowych.

## 2.7. Określenie cytotoksyczności oligonukleotydów antysensowych.

Badania cytotoksyczności oligonukleotydów antysensowych są istotnym zagadnieniem, gdyż dla oligonukleotydów, jako potencjalnych terapeutyków, ich szkodliwość dla chorego powinna być jak najniższa. Poza tym, dla laboratoryjnych badań porównawczych znaczna cytotoksyczność oligonukleotydów, której rezultatem jest śmierć komórki, powoduje, że wirus nie będzie mógł się namnażać. Może to generować błędne wnioski dotyczące inhibicji namnażania wirusa przez oligonukleotydy.

Do badań cytotoksyczności wykorzystano powszechnie stosowany test MTT (*MTT assay*). W metodzie MTT wykorzystuje się fakt, że w wyniku działania NADPH zależnej reduktazy cytochromowej MTT jest metabolizowany do fioletowego formazanu. Miara zdolności do przeprowadzenia tej reakcji jest związana z przeżywalnością komórek. W wyniku reakcji MTT dochodzi do przesunięcia widma absorpcji z 570 nm do 650 nm, co może być monitorowane za pomocą spektrofotometru [165].

W doświadczeniach mających na celu określenie cytotoksyczności oligonukleotydów antysensowych badano trzy ich różne stężenia, a mianowicie 4  $\mu\text{M}$ , 0,75  $\mu\text{M}$  i 0,5  $\mu\text{M}$ . Do eksperymentów wykorzystano oligonukleotydy antysensowe, które wykazywały największy stopień inhibicji namnażania wirusa grypy. Są to oligonukleotydy 7.5L, 7.5, 4.5, 4.5L, 11.5, 11.5L, 19GP, 23GP, 13L, 20L, 23GP oraz 13GP. Wartość referencyjną dla testu badania cytotoksyczności oligonukleotydów stanowiły komórki z linii MDCK traktowane tylko lipofektaminą (kontrola L). Dane zostały przeanalizowane za pomocą testu równości średnich t-Studenta z poziomem istotności  $p < 0,005$ . Wyniki z trzech biologicznych powtórzeń zostały przeliczone na wartości procentowe względem kontroli L i został sporządzony wykres dla uśrednionych wyników (rysunek 32). Na wykresie zaznaczono odchylenia standardowe. Kontrola K stanowi miarę przeżywalności komórek, które nie były traktowane ani lipofektaminą ani ASO. Dokładny opis eksperymentu został przedstawiony w rozdziale *Materiały i Metody*.

Dla badanych ASO w różnych stężeniach zaobserwowano takie efekty jak: brak cytotoksyczności, cytotoksyczność lub znoszenie toksyczności powodowanej przez lipofektaminę. Dla niektórych oligonukleotydów wraz ze wzrostem stężenia oligonukleotydu użytego do transfekcji, jego toksyczność rosła. Taką zależność zaobserwowano dla oligonukleotydów 7.5L, 13GP oraz 19GP. Za oligonukleotydy wykazujące nieznaczną cytotoksyczność, w badanym stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$ , można uznać oligonukleotydy 4.5 oraz 19GP, które powodują obniżenie przeżywalności o odpowiednio 13% i 10% w stosunku do kontroli L. Pozostałe testowane oligonukleotydy antysensowe nie wykazują cytotoksyczności

w stosowanych w badaniach na liniach komórkowych MDCK stężeniach oligonukleotydu (stężenia 0,5  $\mu$ M).

Oligonukleotydem antysensowym w obecności, którego obserwowano najniższą przeżywalność komórek MDCK w stężeniu 4  $\mu$ M, a więc 8-krotnie wyższym niż stosowanym w testach inhibicji namnażania wirusa typu dzikiego, jest oligonukleotyd 7.5L. Oligonukleotyd 7.5L wpływa na przeżywalność komórek w tym stężeniu bardziej niż oligonukleotyd 7.5. W przypadku dwóch pozostałych par oligonukleotydów antysensowych (11.5L i 11.5 oraz 4.5L i 4.5L), nie zaobserwowano mniejszej przeżywalności komórek w obecności oligonukleotydów zawierających LNA.

Dla oligonukleotydów 11.5L (stężenia 4  $\mu$ M i 0,5  $\mu$ M), 11.5 (stężenia 4  $\mu$ M i 0,5  $\mu$ M), 4.5L (stężenie 0,5  $\mu$ M), 4.5 (stężenie 4  $\mu$ M), 13L (stężenia 4  $\mu$ M i 0,5  $\mu$ M), 20L (stężenie 0,75 $\mu$ M) oraz 13GP (stężenie 0,5  $\mu$ M) zaobserwowano nieznaczne zmniejszenie cytotoksyczności lipofektaminy, co oznacza, że te oligonukleotydy w wybranych stężeniach mogą wykazywać korzystne działanie na linię komórkową MDCK.

### 3. Oligonukleotydy antysensowe w badaniach namnażania wirusa grypy typu A- wyniki innych grup badawczych

Oligonukleotydy antysensowe są stosowane w badaniach inhibicji namnażania wirusów grypy od lat 90 ubiegłego wieku. vRNA5 jest interesującym celem dla antysensowych oligonukleotydów, gdyż koduje białko NP, które pełni kluczowe funkcje w cyklu namnażania wirusa, a także odpowiada za strukturę vRNP [166].

W literaturze pojawiają się przykłady zastosowania oligonukleotydów antysensowych nakierowanych na vRNA5, jednak nie ma ich zbyt wiele. Od lat wiadomo, że końce 3' i 5' są silnie konserwatywne. Zachowawcza jest nie tylko struktura, ale także sekwencja, dlatego też pojawiły się pomysły, aby projektować nukleotydy antysensowe, nakierowane na te konserwatywne końce [167].

Takie podejście zastosował między innymi Qing Ge wraz z współpracownikami. Zaprojektowali łącznie dwa oligonukleotydy PMO nakierowane na vRNA5. Oligonukleotydy swoją sekwencją zachodziły na 12- i 13-nukleotydowe zachowawcze końce. Poniżej została przedstawiona sekwencja zaprojektowanych oligonukleotydów antysensowych (tabela 8) [168].

**Tabela 8.** Oligonukleotydy antysensowe, stosowane przez Qing Ge i współpracowników [168].

Nazwa oligonukleotydu	Seqwencja oligonukleotydu	Rejon komplementarny w vRNA5
NP-v3'	AGCAAAGCAGGGTAGATAATC	1544-1565
NP-v5'	GAAAAATACCCTTGTTTCTACT	1-22

Oligonukleotyd NP-v5' był PMO nakierowanym na 5' koniec vRNA5 i mógł częściowo wiązać się w jednoniciowym rejonie 16-29 nt. Oligonukleotyd NP-v3' był nakierowany na koniec 3' vRNA5. Co ciekawe, jego rejon wiązania zachodził na konserwatywną spinkę 1527-1550 nt (opisana poniżej w rozdziale *Konserwatywność struktury drugorzędowej vRNA5*). Działanie oligonukleotydów testowano w linii komórkowej Vero, zakażonej wirusem A/PR/8/34 (H1N1). Przy stosowanym stężeniu 10  $\mu$ M oligonukleotyd nakierowany na konserwatywny 3' koniec vRNA5 (NP-v3') wykazywał inhibicję rzędu  $3\log_{10}$  (PFU/ml) w teście łyśinkowym w stosunku do kontroli. W przypadku oligonukleotydu NP-v5' zaobserwowano inhibicję o  $2,5\log_{10}$ . Oligonukleotyd NP-v3' został dodatkowo przetestowany pod kątem inhibicji różnych szczepów wirusa, między innymi wirusa A/Thailand/1(KAN-1)/04 (H5N1). Stwierdzono, że inhibicja namnażania

A/Thailand/1(KAN-1)/04 (H5N1) przez oligonukleotyd NP-v3' związana jest z 88% zmniejszeniem poziomu białka NP. Oba oligonukleotydy poprzez wiązanie się do konserwatywnych końców mogły zaburzać pracę polimerazy wirusowej. Dodatkowo, oligonukleotyd NP-v3' mógł wpływać na pakowanie vRNA do wirionów, poprzez wiązanie się do konserwatywnej spinki 1527-1550 nt. W badaniach stosowano bardzo wysokie stężenia oligonukleotydów antysensowych; najniższe stężenie wynosiło 5  $\mu\text{M}$ . Przy tym stężeniu stosowane oligonukleotydy nie powodowały istotnej inhibicji namnażania wirusa w porównaniu do kontroli. [168].

Grupa Minga Duana również zaprojektowała oligonukleotyd antysensowy nakierowany na konserwatywny 5'-koniec vRNA5. Oligonukleotyd był 13-merem i posiadał modyfikacje tiofosforanowe (PS). Badania inhibicji prowadzono na wirusie H5N1. Stosowano stężenia oligonukleotydu między 4,4  $\mu\text{M}$  a 2,2  $\mu\text{M}$ . Dla tych stężeń zaobserwowano obniżenie cytotoxyczności w zakażonej wirusem linii komórkowej w obecności oligonukleotydu. Oprócz badań przeprowadzonych na linii komórkowej MDCK, wykonano także testy *in vivo* na modelu mysim. W badaniach na myszach stosowano donosowo dawki od 40-60 mg/kg/dzień i uzyskano zwiększoną do 60% przeżywalność myszy w stosunku do kontroli. Zaprojektowany oligonukleotyd mógł działać na wszystkie osiem segmentów wirusa grypy typu A [169].

Levina i współpracownicy stosowali DNA oligomer, który był nakierowany na konserwatywny 3'-koniec w vRNA5 (tabela 9). Stężenie antysensowego oligonukleotydu wynosiło 0,1  $\mu\text{M}$  i stosowano nanocząstki jak nośniki. Badania inhibicji zostały przeprowadzone na wirusach H5N1, H3N2, H1N1. Obserwowano inhibicję namnażania wirusa grypy typu A do 4log<sub>10</sub> PFU/ml w teście lysinkowym [170].

**Tabela 9.** Oligonukleotyd antysensowy stosowane przez Levinę i współpracowników [170].

Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja oligonukleotydu	Rejon komplementarny w vRNA5 (nt)
DNAv3'	GCAAAAGCAGGGTAGATAATC	1544-1564

Podsumowując dotychczas opisane badania, dotyczą one oligonukleotydów antysensowych nakierowanych na konserwatywne końce 3' i 5' vRNA5. Celem takiego podejścia było zaprojektowanie uniwersalnego oligonukleotydu, który wykazywałby inhibicję namnażania większości szczepów grypy typu A. Struktura *panhandle*, która jest tworzona przez konserwatywne końce, może ulegać rozplataniu i tworzyć inne bardziej dostępne motywy (np. *corkscrew*) podczas trwania cyklu. Być może właśnie na tym etapie dochodzi do

przyłączenia antysensowych oligonukleotydów opisanych w literaturze. Opisane przykłady dowodzą, że możliwe jest zastosowanie oligonukleotydów antysensowych nakierowanych na vRNA5 oraz uzyskanie znaczącego efektu inhibitorowego. Nie ulega jednak wątpliwości, że uwzględnienie struktury vRNA może przyczynić się do projektowania bardziej efektywnych antysensowych oligonukleotydów.

Do stosowanych dotychczas modyfikacji w antysensowych oligonukleotydów nakierowanych na vRNA5 należą ich analogii morfolinowe (PMO) czy zawierające tiofosforany, (PS), jak analogii DNA [168-170]. W pracy doktorskiej zostały po raz pierwszy przedstawione wyniki badań wykorzystujące antysensowe oligonukleotydy typu 2'OMeRNA-LNA oraz gapmery nakierowane na strukturalnie dostępne rejony vRNA5. Po raz pierwszy także wykorzystano antysensowe oligonukleotydy zaprojektowane na inne rejony niż konserwatywne sekwencyjne końce segmentu 5 vRNA.

#### 4. Model struktury trzeciorzędowej vRNA5 wirusa grypy typu A

W oparciu o strukturę drugorzędową vRNA5 wirusa grypy A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) został stworzony model struktury trzeciorzędowej. Model struktury trzeciorzędowej został wygenerowany w programie *RNAComposer* [153] we współpracy z doktorem Mariuszem Popeną z Zakładu Bioinformatyki IChB PAN. Ze względu na wielkość vRNA5 i ograniczenia, co do wielkości modelowanego RNA programu *RNAComposer* struktura drugorzędowa vRNA5 została podzielona na mniejsze motywy o długości całkowitej nie przekraczającej 400 nt (tabela 10).

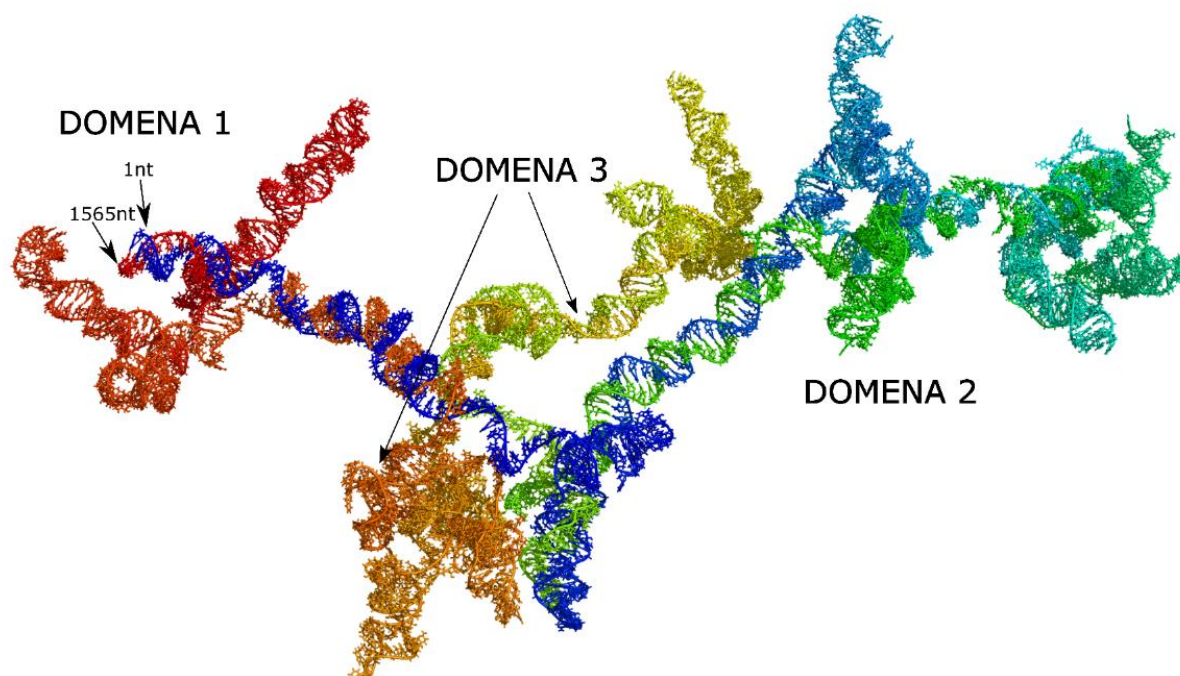
**Tabela 10.** Długości (nt) motywów struktury drugorzędowej vRNA5 analizowanej w *RNAComposer*. W kolumnie domena zaznaczono z jakiej domeny pochodził badany motyw strukturalny.

Nazwa motywu	Rejon motywu	Domena	Długość motywu (nt)
ND1	1-69, 1285-1565	I	349
ND2	631-324	II	308
ND3	117-323, 632-797	II	369
ND4	812-1062	III	250
ND5	67-118, 796-812, 1063-1287	II, III	302

Motywy struktury drugorzędowej: ND1, ND2, ND3, ND4, ND5 następnie wykorzystano do analizy przeprowadzonej w programie *RNAComposer*. W przypadku motywu ND5 obszar analizy zachodził na motyw ND1. Było to spowodowane koniecznością połączenia wolnych końców 3' i 5' pętli wieloraminowej motywem helisy. W przeciwnym



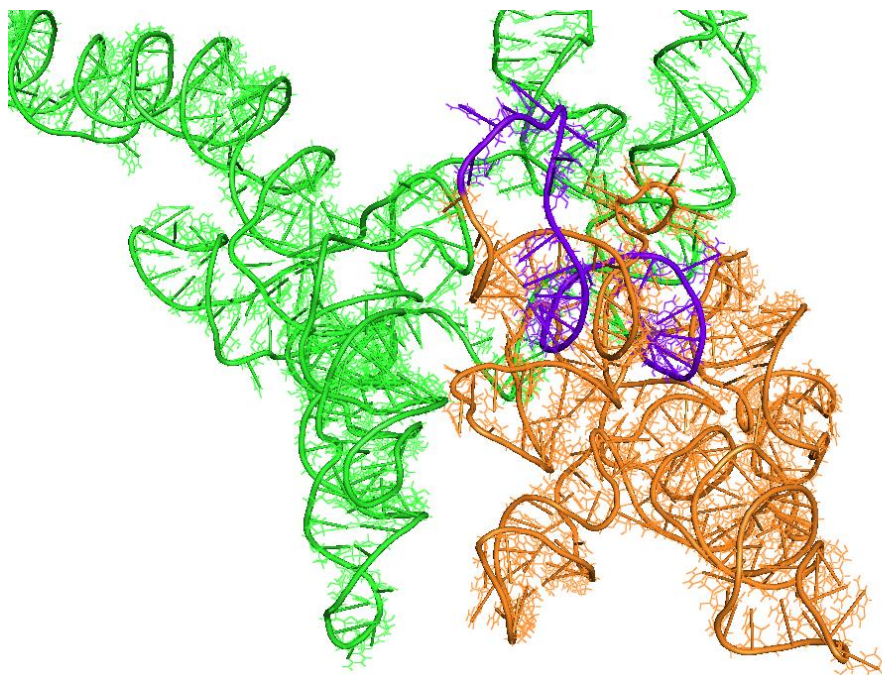
razie długie wolne końce dużego jednoniciowego motywu łączącego wszystkie 3 domeny, mógłby zakłócać analizę w *RNAComposer*. Po wygenerowaniu modelu strukturalnego dla każdego z motywów, zduplikowane, zachodzące, na siebie pary zasad usunięto. Powstałe motywy struktury trzeciorzędowej zostały ocenione pod kątem ich energii swobodnej. Analiza wygenerowanych przez *RNAComposer* plików log, pozwoliła wyodrębnić motywy spinek przewidziane *de novo* przez program *RNAComposer*. Motywy te zostały zastąpione przez inne motywy strukturalne RNA, wyszukane w bazie PDB (*Protein Data Bank*). Motywy struktury trzeciorzędowej ND1, ND2, ND3, ND4, ND5 zostały połączone, a energia swobodna całej struktury zminimalizowana w programie X-PLOR. Końcowa energia modelu struktury trzeciorzędowej vRNA5 (rysunek 33) wynosiła -35132,569 kcal/mol.



**Rysunek 33.** Model struktury trzeciorzędowej vRNA5 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Kolorami czerwonym oraz niebieskim i pomarańczowym została przedstawiona domena I. Domenę II oznaczono kolorami zielonym i niebieskim. Kolorami pomarańczowym i żółtym oznaczono domenę III. Rysunek modelu powstał w programie PyMOL. Motyw *panhandle* jest tworzony przez niebiesko-czerwoną helisę.

Model struktury trzeciorzędowej może wyjaśnić niektóre obserwacje eksperymentalne. Rejon od 1065 do 1281 nt występujący w obrębie domeny III jest wysoce ustrukturyzowany. W modelu struktury przestrzennej poszczególne pętle i spinki znajdują się w niedużej odległości od siebie tworząc trudno dostępny zwój (rysunek 34). W tym właśnie rejonie dochodziło do terminacji odwrotnej transkrypcji. Terminację transkrypcji obserwowano na 1140 nukleotydzie oraz w spince, w rejonie 1074-1115 nt. Najsilniejszy sygnał terminacji obserwowano w sąsiedztwie 1100 nukleotydu. Jednym z pierwszych testowanych DNA starterów przy optymalizacji reakcji odwrotnej transkrypcji był starter P3,

który okazał się nieskuteczny, brak było produktów wydłużania startera. Prawdopodobnie P3 nie wiązał się w docelowym rejonie (1092-1116 nt). Natomiast, w obecności oligonukleotydu H9, którego rejon wiązania przypada na 1102-1109 nt, nie dochodziło do hydrolizy vRNA5 indukowanej przez rybonukleazę H. Stabilna struktura spinki i trzeciorzędowe stłoczenie strukturalne prawdopodobnie zapobiega hybrydyzacji H9 i ogólnie wpływa na niedostępność tego rejonu dla różnego typu oligonukleotydów.

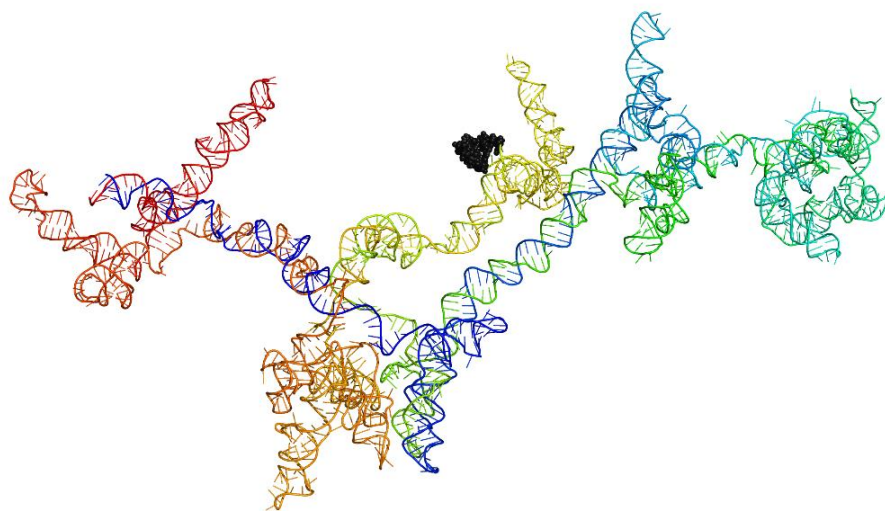


**Rysunek 34.** Fragment modelu struktury trzeciorzędowej vRNA5 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Kolorem pomarańczowym zaznaczono potencjalnie trudno dostępny dla oligonukleotydów rejon od 1065 do 1281nt. Kolorem fioletowym zaznaczono rejon docelowy dla wiązania testowanego startera dla odwrotnej transkrypcji P3.

Struktura trzeciorzędowa ukazuje rejon docelowy oligonukleotydu antysensowego 7.5L, jako łatwo dostępny, znajdujący się na zewnątrz pofałdowanego RNA (rysunki 35 i 36). Oligonukleotyd 7.5L powodował największą inhibicję namnażania wirusa A/California/04/2009 (H1N1) wynoszącą 88%. Oligonukleotyd 7.5L ma sekwencję oraz miejsce wiązania identyczne jak oligonukleotyd 7.5 i jest to w rejonie 878-888 nt vRNA5. Miejsce to na strukturze drugorzędowej znajduje się w rejonie jednoniciowym. W modelu struktury trzeciorzędowej w tym rejonie można zaobserwować tworzenie bardziej złożonej struktury. Według modelu 3D tworzy się niekanoniczna para zasad między U881 a C887 oraz kanoniczna para zasad między A888 oraz U879, która wchodzi w oddziaływanie warstwowe z C880. Ze względu na występowanie tylko nielicznych par zasad w modelu struktury przestrzennej, można wnioskować, że struktura ta jest najprawdopodobniej mało stabilna

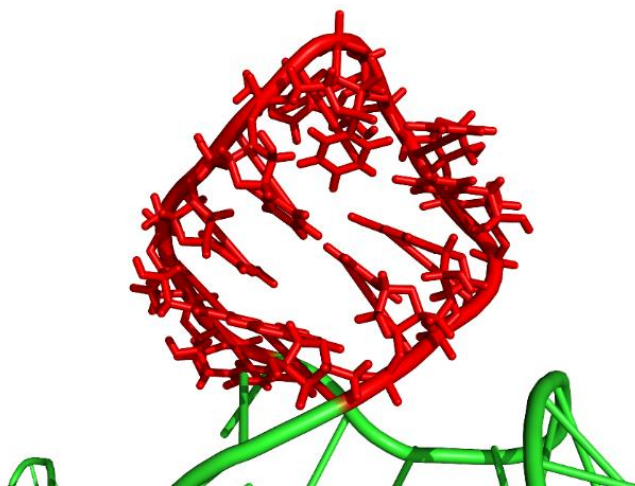
i może bez trudności pozwalać na wiązanie się do tego miejsca antysensowych oligonukleotydów 7.5L oraz 7.5. Oligonukleotyd 7.5 powodował znacznie mniejszą inhibicję namnażania wirusa grypy typu A niż jego sekwencyjny analog (7.5L). Obecne w 7.5L modyfikacje LNA mogą powodować efektywniejsze rozerwanie wiązań wodorowych (parowań) tworzących się w dużej pętli. Na rysunkach 35 i 36 zaznaczono prawdopodobne miejsce wiązania oligonukleotydów 7.5 i 7.5L.

Powodem, dla którego oligonukleotyd 7.5L wykazywał największą inhibicję namnażania wirusa grypy może być także położenie miejsca docelowego w rejonie potencjalnego oddziaływania segmentów. Miejsce wiązania oligonukleotydów 7.5 i 7.5L zostało zaprojektowane w rejonie oddziaływania segmentu vRNA5 z segmentem vRNA2. Trzeciorzędowe ułożenie tego rejonu w vRNA5 jest korzystne dla oddziaływań międzycząsteczkowych. Oligonukleotyd 7.5L tworzy silniejszy kompleks z vRNA5 niż może zostać utworzony pomiędzy vRNA a vRNA2. Mógłby, więc zapobiegać oddziaływaniu między segmentami skuteczniej niż 7.5.



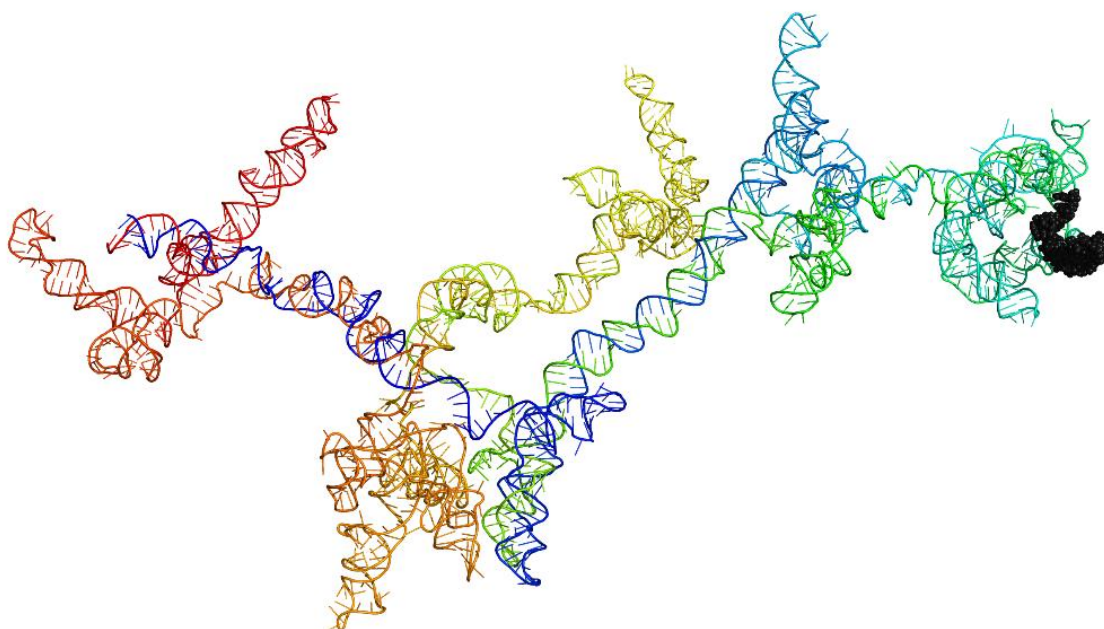
**Rysunek 35.** Model struktury trzeciorzędowej vRNA5. Czarnym kolorem zaznaczono rejon wiązania oligonukleotydów antysensowych 7.5 i 7.5L.

Kolejnym oligonukleotydem, który wykazywał znaczną inhibicję namnażania wirusa grypy typu A jest oligonukleotyd 4.5, który obniżał namnażanie wirusa grypy A/California/04/2009 (H1N1) o 36%. Oligonukleotyd 4.5 posiada to samo miejsce wiązania jak antysensowy oligonukleotyd 4.5L. Ze względu na ustrukturyzowanie rejonu 464-485nt można sądzić, że wiązanie oligonukleotydu antysensowego mogłoby być utrudnione.

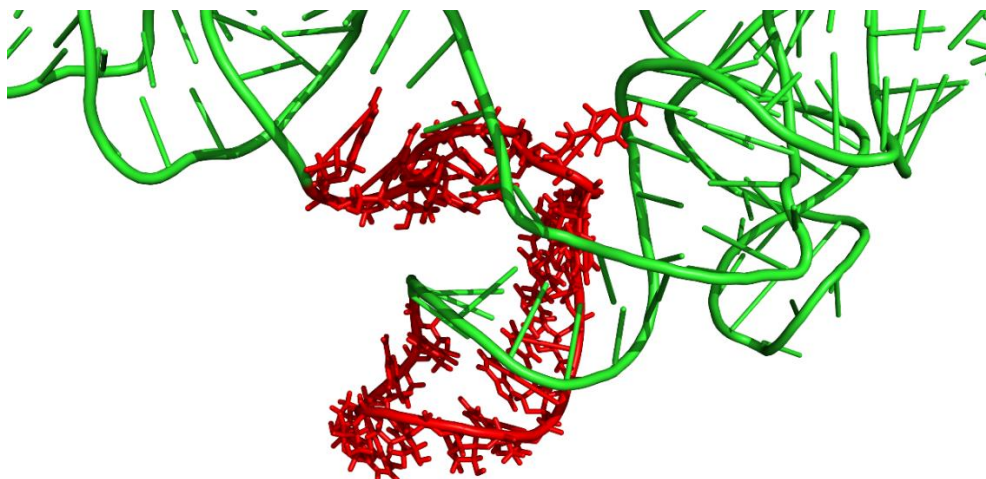


**Rysunek 36.** Zbliżenie fragmentu 878-888 nt vRNA5 (zaznaczony na czerwono) będącego rejonem wiązania oligonukleotydów antysensowych 7.5 i 7.5L.

Oprócz oddziaływań drugorzędowych w tym rejonie A485 i A484 oddziałują trzeciorzędowo odpowiednio z nukleotydami G511 i U513. W rejonie tym występują jednak pętle, które mogłyby stanowić miejsce ułatwiające inicjację wiązania. W tym wypadku fragment oligonukleotydu wiążący się do pętli mógłby spowodować rozplatanie stosunkowo słabych termodynamicznie helis. Na rysunkach 37 i 38 zostało zaznaczone miejsce wiązania oligonukleotydów 4.5 i 4.5L.

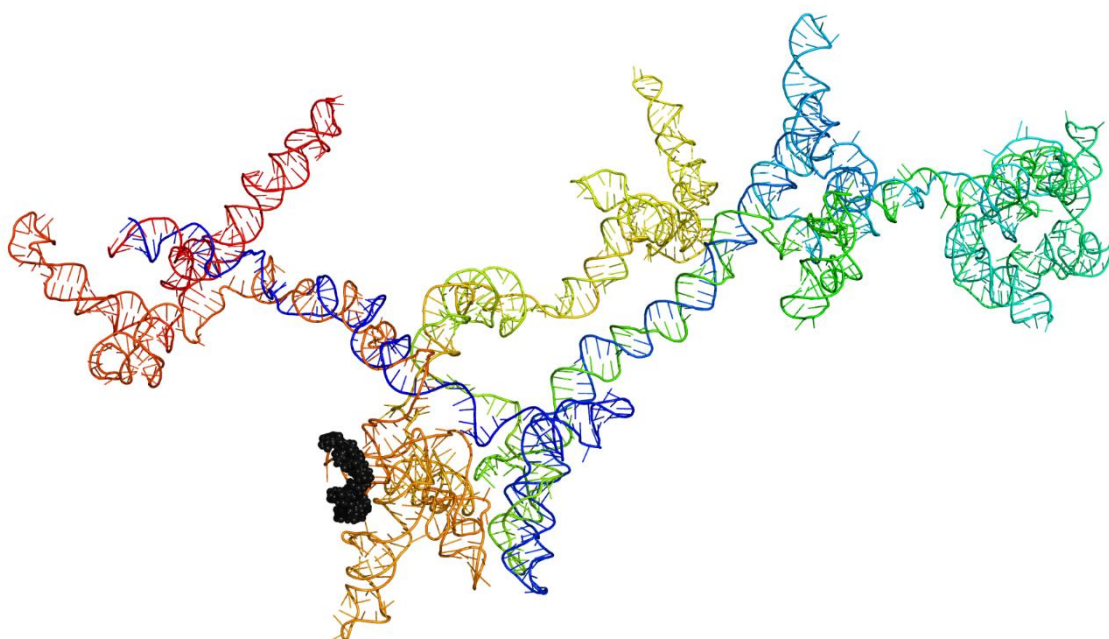


**Rysunek 37.** Model struktury trzeciorzędowej vRNA5. Czarnym kolorem zaznaczono rejon wiązania oligonukleotydów 4.5 i 4.5L.

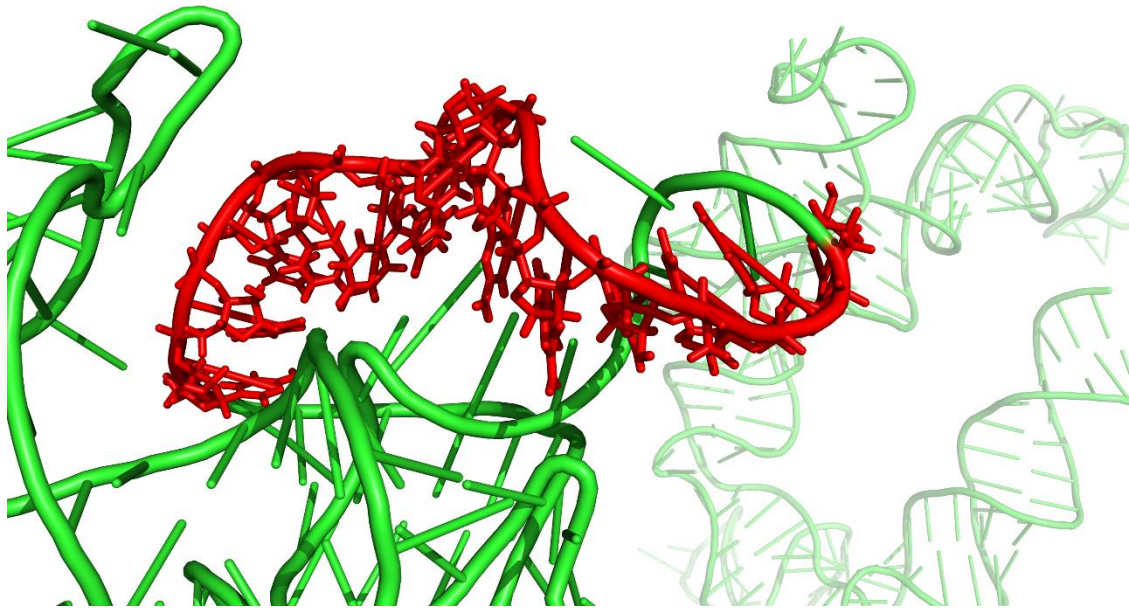


**Rysunek 38.** Zbliżenie fragmentu 464-485nt vRNA5 (zaznaczony na czerwono) będącego rejonem wiązania oligonukleotydów antysensowych 4.5 i 4.5L.

W wysoce ustrukturyzowanym rejonie 1065-1281 nt (rysunek 39) znajdują się fragmenty docelowe dla trzech oligonukleotydów antysensowych: 23GP (1140-1157 nt), 20L (1065-1074 nt) oraz 11.5 i 11.5L (1248-1261 nt). Spośród wymienionych największą inhibicję namnażania wirusa grypy powodowały oligonukleotydy 11.5L oraz 11.5. Jest to zgodne ze strukturą trzeciorzędową vRNA5, w której miejsce ich wiązania jest wyeksponowane na zewnątrz zwoju tworzonego przez stłoczone helisy i pętle (rysunek 39 i 40).



**Rysunek 39.** Model struktury trzeciorzędowej vRNA5. Kolorem czarnym oznaczono miejsce wiązania oligonukleotydów 11.5 i 11.5L.



**Rysunek 40.** Zbliżenie fragmentu 1248-1261nt vRNA5 (zaznaczony na czerwono) będącego rejonem wiązania oligonukleotydów antysensowych 11.5 i 11.5L.

## 5. Konserwatywność struktury drugorzędowej vRNA5

Konserwatywność zdeterminowanej struktury drugorzędowej vRNA5 wirusa grypy typu A została przeanalizowana we współpracy z profesorem Walterem Moss'em z Iowa State University (Ames, USA). Analiza została wykonana na prawie 18500 szczepach wirusa grypy typu A. Taka analiza jest istotna, ponieważ weryfikuje zaproponowaną strukturę drugorzędową vRNA5, a także wskazuje na uniwersalnie występujące motywy strukturalne, które mogą pełnić ważną funkcję w cyklu namnażania wirusa grypy.

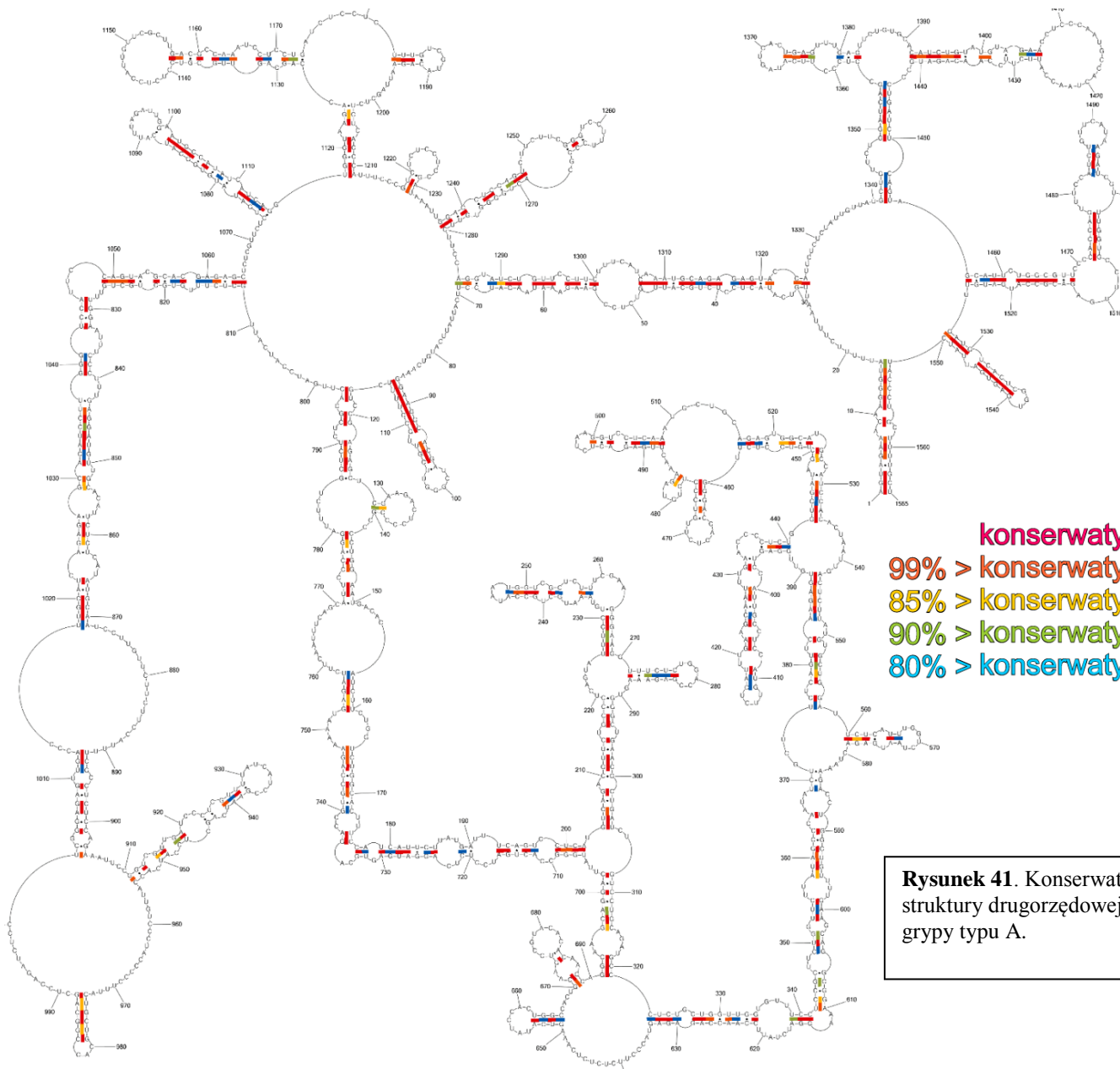
Pierwszym etapem było przeanalizowanie wszystkich pełnej długości sekwencji RNA segmentu 5 dostępnych w bazie danych NCBI. Następnie odrzucono sekwencje powtarzające się oraz sekwencje zawierające niezidentyfikowane nukleotydy. W bazie danych umieszczone są sekwencje antygenomowe (+)RNA, dlatego w kolejnym etapie przekształcano je do sekwencji genomowych (vRNA). Ostatecznie zbiór zawierał unikalne sekwencje, które zawierały 3'- i 5'-końce oraz nie zawierały niezidentyfikowanych nukleotydów. Następnie, wyselekcjonowane sekwencje wirusowego RNA zestawiono w programie *MAFFT* stosując algorytm *FFT-NS-1* [171]. 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. W programie *RNAfold* przewidziano struktury drugorzędowe dla wszystkich wyselekcjonowanych sekwencji. Otrzymane struktury drugorzędowe zestawiono w programie *Microsoft Excel*

w postaci *dot-bracket* wraz z ich sekwencjami. Obliczono procent występowania poszczególnych par zasad, przyjmując, że częstość parowania powyżej 50% determinuje określona parę zasad, jako zachowawczą. Zwrócono uwagę na występowanie mutacji zachowujących pary zasad. Takie mutacje świadczą o konserwatywności danej struktury drugorzędowej.

Średnia konserwatywność struktury drugorzędowej vRNA5 wynosi 87% (rysunek 41). Do najbardziej zachowawczych motywów należy między innymi motyw *panhandle*, którego konserwatywność wynosi 98%. Analiza pozwoliła także wyodrębnić inne interesujące motywy, które mogą brać udział w składaniu wirionów lub w etapie replikacji wirusa.

Konserwatywność struktury drugorzędowej wirusowego RNA może być istotna dla upakowania wszystkich ośmiu segmentów vRNA w biologicznie aktywny wirion. Składanie wirionów jest skomplikowanym procesem, za które odpowiedzialne są, między innymi, oddziaływania występujące pomiędzy poszczególnymi segmentami vRNA. Wiadomo, że dla składania segmentów vRNA w wirion istotne są fragmenty na 3'- i 5'-końcu vRNA, a więc możliwe, że nie tylko sekwencja tego rejonu, lecz również motywy strukturalne tam występujące. Dla każdego segmentu długość oraz sekwencja RNA uczestnicząca w składaniu poszczególnych segmentów może być różna [172]. Dotychczasowe badania wskazują, że w przypadku vRNA5 wirusa grypy typu A do efektywnego pakowania potrzebne są rejon 105-nukleotydowy z końca 3' oraz 135-nukleotydowy z końca 5'. Oznacza to, że w pakowaniu vRNA5 mogą uczestniczyć motywy spinkowe: 87-115 nt, 1483 -1497 nt oraz 1527-1550 nt [14, 16, 173]. Co istotne, motyw spinki 87-115 nt wykazuje zachowawczość par zasad bliską 100%. Znaczenie sekwencji 87-115 nt oraz tworzona przez nią struktura zostaną przedyskutowane w następnym podrozdziale („*Motyw pseudowęzła w vRNA5*”). W przypadku spinki 1527-1550 nt przewidywana konserwatywność par zasad wynosi 99,5%, a dla spinki 1483 -1497 nt wynosi ona 87,2%.

Poza motywami, w rejonach istotnych dla pakowania vRNA do wirionów istnieją wysoce konserwatywne motywy strukturalne o nieznannej funkcji. Należy do nich, między innymi, motyw spinki 974-989 nt. Konserwatywność tej spinki jest wysoka i wynosi 96,9%. Do innych interesujących motywów zaliczają się także spinki ustrukturyzowanego rejonu 1065-1281 nt.



**konserwatywność  $\geq 99\%$**   
**99% > konserwatywność  $\geq 95\%$**   
**85% > konserwatywność  $\geq 90\%$**   
**90% > konserwatywność  $\geq 80\%$**   
**80% > konserwatywność  $\geq 70\%$**

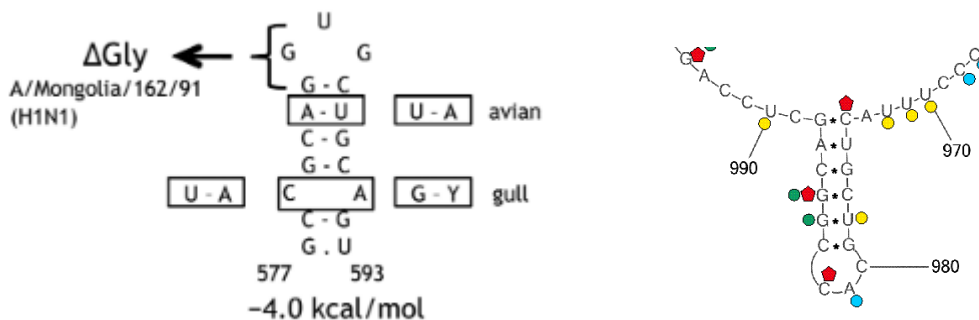
**Rysunek 41.** Konserwatywność par zasad struktury drugorzędowej vRNA5 wirusa grypy typu A.



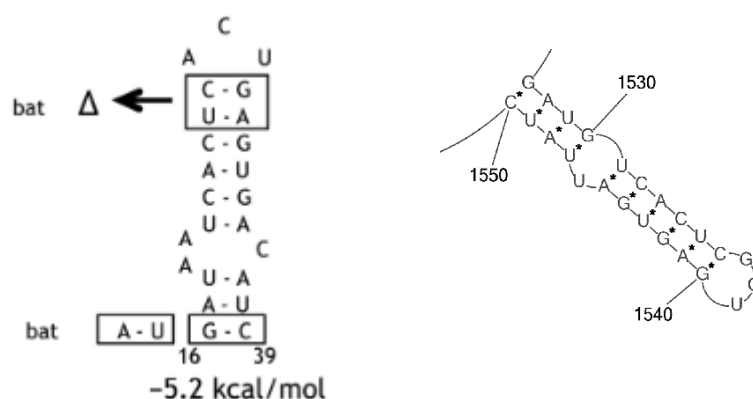
Zachowawczość par zasad w rejonie 1065-1281 nt mogłaby stanowić przesłankę, że silnie ustrukturyzowany, trzeciorzędowo zwarty rejon, nie jest cechą charakterystyczną tylko dla szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), ale może stanowić ogólną cechę vRNA5 wirusów grypy typu A. Średnia zachowawczość par zasad tego motywu wynosi 83,5%. Konserwatywność par zasad w trzonie helisy jednak różni się dla poszczególnych par zasad. Zaobserwowano znacznie niższą konserwatywność dla par zasad utworzonych w trzonie helisy od 1080 do 1083nt. Natomiast pary zasad w fragmentach od 1084/1114 nt do 1088/1099nt mogą powstawać u prawie 100% szczepów. Wysoką 86,8% zachowawczość posiadają pary zasad w rejonie od 1117/1211 do 1125/1203 nt, natomiast pary zasad w motywie strukturalnym 1127-1173 nt cechuje 84,4% zachowawczość. Konserwatywność par zasad motywu spinki 460-476 nt wynosi 83,0%, a spinki 477-484 nt wynosi 95,6%. Do tego rejonu vRNA5 były zaprojektowane komplementarne i skuteczne w inhibicji namnażania wirusa oligonukleotydy antysensowe 4.5 i 4.5L.

W zaproponowanej strukturze drugorzędowej vRNA5 istnieje kilka konserwatywnych dla wirusów grypy typu A motywów strukturalnych zidentyfikowanych w równoległej analizie wykonanej przez grupę profesora Gultyaev'a [173]. Zastosowano w niej program *RNAalifold* i reprezentacyjną, wybraną grupę szczepów wirusa grypy typu A. Szczepy zostały pogrupowane w klastry, a następnie przewidziano strukturę drugorzędową dla sekwencji konsensusowej. Takie podejście pozwoliło wyodrębnić sześć konserwatywnych motywów, z których dwa są obecne także w określonej w niniejszej pracy doktorskiej strukturze drugorzędowej vRNA5 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Autorzy stwierdzili, że pięć z przewidzianych motywów jest możliwych zarówno dla nici (-) (vRNA), jak i (+), jako ich „lustrzana wersja”. Motywy spinkowe zaprezentowane dla sekwencji nici (+) są przedstawione na rysunkach 42-46.

Rysunek 42 prezentuje strukturę konserwatywnej spinki 974-989 nt na przykładzie badanego szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) i analogiczną z publikacji Gultyaeva [173], przewidzianą dla konsensusowej sekwencji nici (+). Struktura drugorzędowa obu spinek jest identyczna mimo różnic w sekwencji.



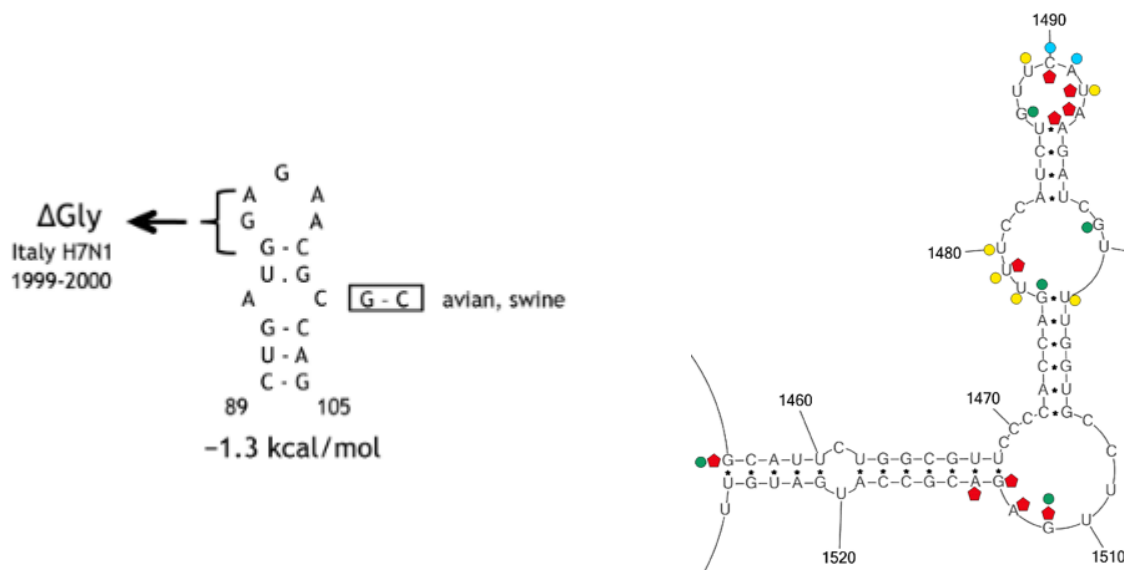
**Rysunek 42.** Po lewej stronie znajduje się motyw konserwatywnej spinki 973-989nt vRNA5 zidentyfikowany przez grupę Gultyaev'a [173] na przykładzie sekwencji szczepu A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) nici (+), numeracja dla nici (+). Po prawej stronie fragment struktury drugorzędowej vRNA5 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), w którym jest obecna analogiczna spinka w nici (-).



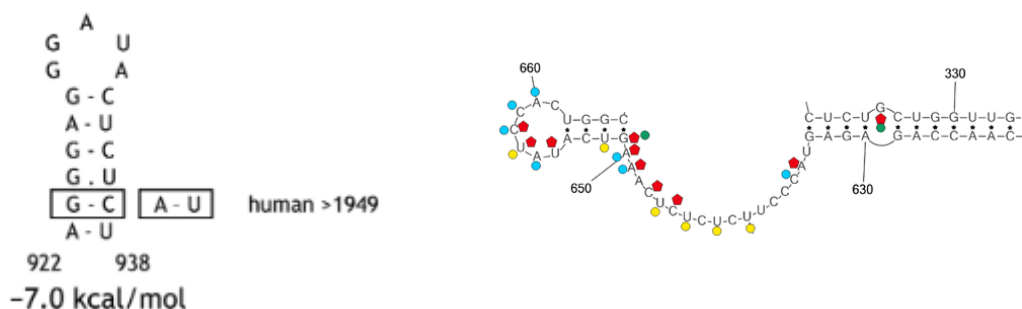
**Rysunek 43.** Po lewej stronie znajduje się struktura drugorzędowa zaproponowana przez Gultyaev'a [173] na przykładzie sekwencji szczepu A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) nici (+), numeracja dla nici (+), po prawej stronie struktura zidentyfikowana w modelu struktury drugorzędowej vRNA5 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) dla tego rejonu nici (-).

Spinka 1527-1550 nt znajduje się w rejonie vRNA5 odpowiedzialnym za pakowanie vRNA do wirionów (rysunek 43). Gultyaev dla tego rejonu sekwencji komplementarnej (mRNA5) przewidział istnienie podobnej spinki. Prawdopodobnie motyw spinki z zachowawczymi parami zasad może się tworzyć zarówno w nici (+), jak i nici (-).

Dla rejonu 1462-1476 nt struktury drugorzędowej vRNA5, będącej obiektem prezentowanych badań, Gultyaev i współpracownicy przewidzieli istnienie spinki (rysunek 44) [173]. Pomimo możliwości utworzenia stabilnego trzonu spinki wynikającej z sekwencji vRNA5 szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), struktura drugorzędowa dla tego rejonu jest inna, a profil mapowań wyraźnie wyklucza utworzenie takiej spinki. Prawdopodobnie struktura drugorzędowa nici (+) i (-) jest odmienna dla tego rejonu.



**Rysunek 44.** Po lewej stronie znajduje się struktura drugorzędowa zaproponowana przez Gultyaev'a [173] na przykładzie sekwencji szczepu A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) nici (+), numeracja nici (+), po prawej stronie struktura zidentyfikowana w modelu struktury drugorzędowej vRNA5 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) dla odpowiedniego rejonu nici (-) (rejon 1462-1476nt).



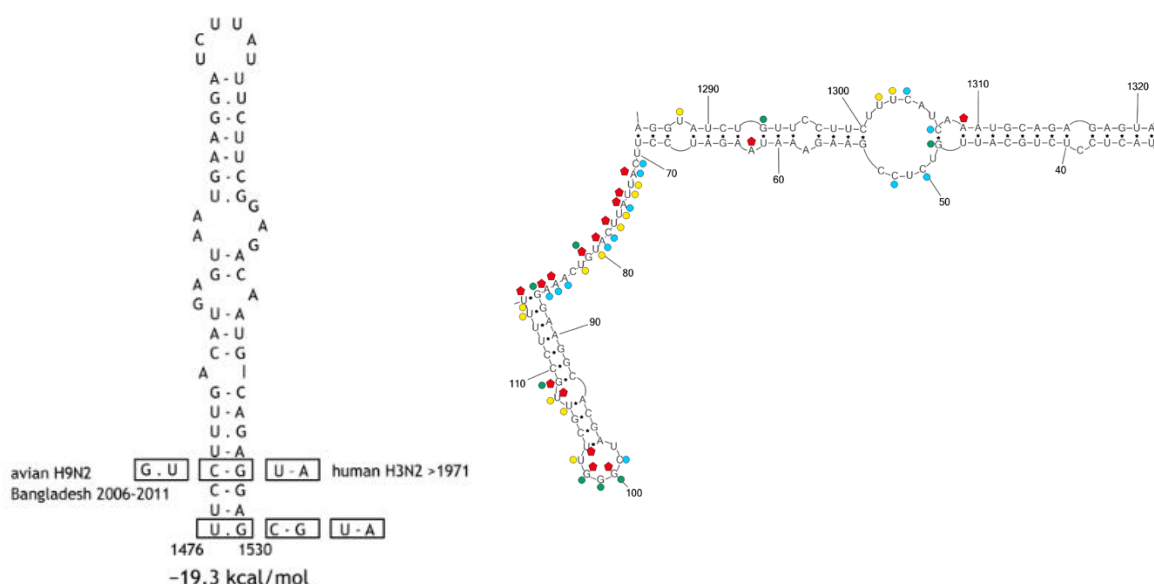
**Rysunek 45.** Po lewej stronie znajduje się struktura drugorzędowa zaproponowana przez Gultyaev'a [173] na przykładzie sekwencji szczepu A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) nici (+), numeracja nici (+), po prawej stronie struktura zidentyfikowana w modelu struktury drugorzędowej vRNA5 A/VietNam/1203/2004 (H5N1) dla odpowiedniego rejonu nici (-) (rejon 626-643nt).

Konserwatywny motyw spinki przewidziany przez grupę Gultyaev'a dla uśrednionej sekwencji nici (+) w rejonie 922-938 (numeracja nici (+)) nie ma również swojego strukturalnego odzwierciedlenia vRNA5 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) (Rysunek 45). Odpowiedni rejon (626-643nt) tworzy w dużej mierze jednoniciowy rejon pętli wieloramiennej, który jest potwierdzony reaktywnością nukleotydów i dostępnością dla oligonukleotydów.

Gultyaev proponuje również w vRNA5 obecność motywu spinki w rejonie 36-90 nt (Rysunek 46). Taka spinka nie istnieje w strukturze drugorzędowej vRNA5 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), a dane z mapowań chemicznych ją wykluczają. Należy podkreślić, że struktury drugorzędowe przewidziane przez Gultyaev'a powstały w oparciu

o analizy bioinformatyczne, natomiast zdeterminowana w tej pracy doktorskiej struktura drugorzędowa vRNA5 jest oparta o dane eksperymentalne i wsparta analizą bioinformatyczną.

O tym, że rzeczywiście taki motyw w rejonie 36-90 nt nie ma znaczenia dla wirusa grypy świadczą badania, w których wprowadzono mutacje w pozycjach 39 nt i 87 nt oraz 85 nt i 43 nt. Mutacje te miały za cel zmienić strukturę spinki i tym samym zaburzać pakowanie wirionów. Wprowadzone mutacje nie wpływały jednak na namnażanie wirusa A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) i najprawdopodobniej jego pakowanie [173]. Opisanie nukleotydy, które zostały zmutowane występują w strukturze drugorzędowej vRNA5 w pojedynczym wybrzuszeniu (nukleotyd 39) i w pętli (nukleotydy 87 i 85). Wprowadzenie mutacji w tych pozycjach nie zaburzałoby, więc struktury drugorzędowej i pośrednio taki wynik eksperymentu potwierdza zaproponowaną strukturę dla tego rejonu vRNA5.



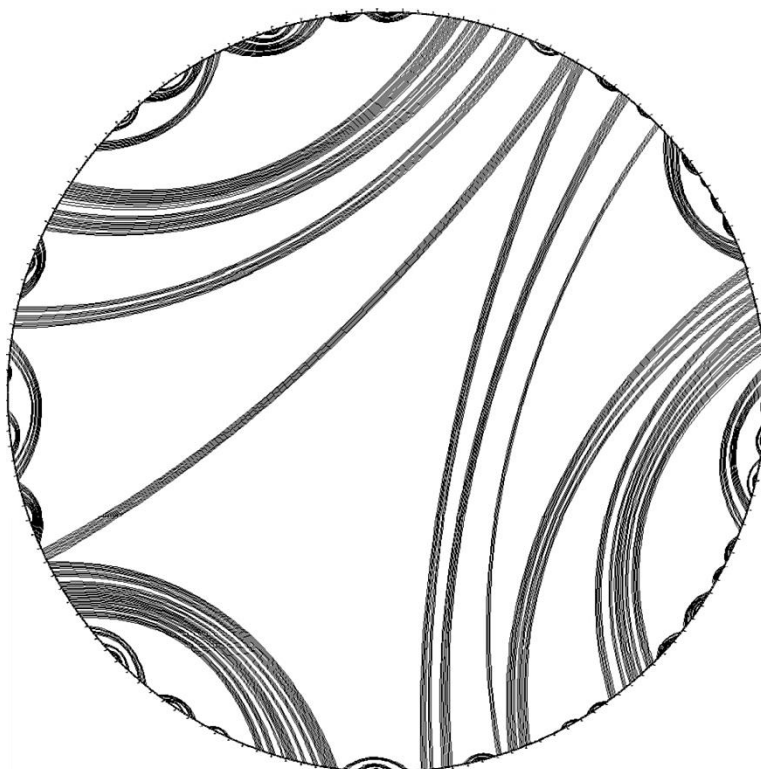
**Rysunek 46.** Motywy w rejonie 36-90nt. Po lewej, struktura spinki 30-90nt proponowanej przez grypę Gultyaev'a [173] na przykładzie sekwencji szczepu A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) nie (+) numeracja nici (+). Po prawej, fragment struktury drugorzędowej vRNA5 wirusa grypy A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) obejmujący rejon nici 36-90nt.

## 6. Motyw pseudowężła w vRNA5

Pseudowężły występują powszechnie u wirusów i mogą pełnić istotne funkcje takie jak regulacja translacji czy replikacji [174]. Pseudowężły mogą występować również u wirusów grypy typu A, B oraz C. W przypadku wirusa grypy typu A pseudowężel może się tworzyć, na przykład w vRNA7 [175, 176].

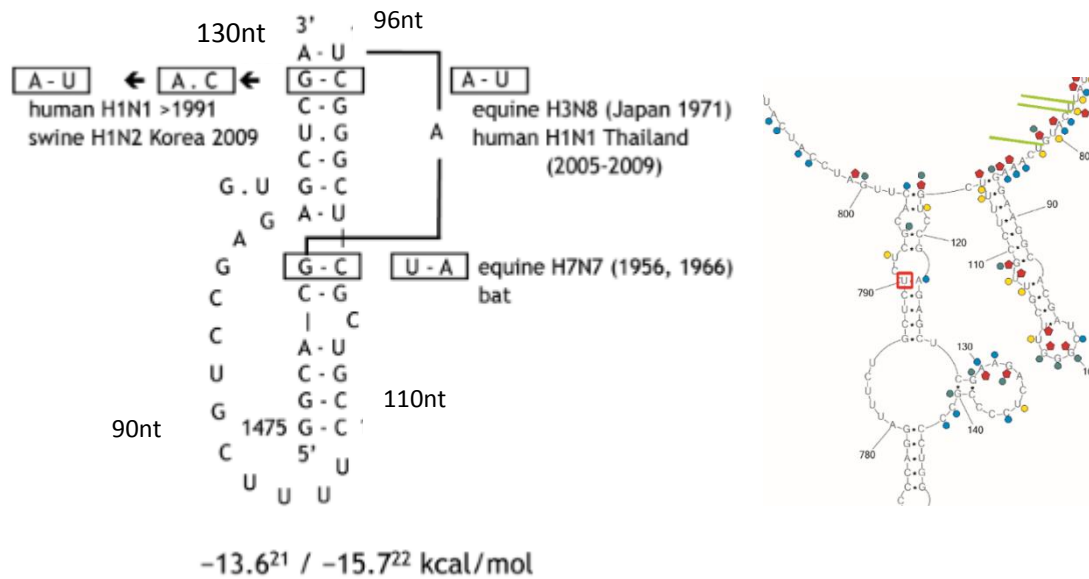
Powszechnie zastosowane programy komputerowe nie pozwalają na przewidywanie struktur drugorzędowych RNA zawierających pseudowężły. Aby to zrobić należy zastosować

specjalne algorytmy, które będą umożliwiały znalezienie pseudowęzłów. Cząsteczka vRNA5 jest bardzo długa, dlatego stanowi znaczny problem przy generowaniu pseudowęzłów. Cząsteczkę w całości udało się przeanalizować tylko w programie *ProbKnot*, który jest zaimplementowany w pakiecie *RNAstructure* [140]. Z przeprowadzonej analizy wynika, że vRNA5 nie tworzy pseudowęzłów. Na strukturze kolistej linie łączące poszczególne nukleotydy nie krzyżują się, co świadczy o tym, że program nie wykrył pseudowęzłów (Rysunek 47).



**Rysunek 47.** Rysunek przedstawia w graficzny sposób strukturę drugorzędową vRNA5 wygenerowaną z użyciem algorytmu *ProbKnot* [145].

Inne podejścia sugerują, że nie można wykluczyć ich tworzenia. Obecność pseudowęzłów w vRNA5 postulował, między innymi, Gultyaev [173], który zidentyfikował pseudowęzeł w vRNA5 w rejonie 90-130 nt (Rysunek 48).



**Rysunek 48.** Po lewej, struktura pseudowęzła zaproponowanego przez grupę Gultyaev'a [173] na przykładzie sekwencji szczepu A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) nic (-). Po prawej, motywy struktury drugorzędowej vRNA5 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), które miałyby uczestniczyć w tworzeniu motywu pseudowęzła.

Stwierdzono, że wprowadzenie mutacji A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) zaburzających strukturę pseudowęzła skutkuje obniżeniem namnażania wirusa [173]. Obserwowany efekt inhibicji namnażania był na poziomie około  $1,5 \log_{10}$  PFU/ml w teście łyśinkowym. Sugeruje się, że pseudowęzeł najprawdopodobniej bierze udział w procesie składania wirionu. W przypadku vRNA5 szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) opisany pseudowęzeł nie może się utworzyć, choć istnieje pozwalająca na takie oddziaływanie spinka. Obecność silnych mapowań chemicznych w rejonie potencjalnych oddziaływań świadczy, że nie tworzy się helisa 124-130 nt/96-102 nt. Być może brak pseudowęzła w vRNA A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) jest cechą charakterystyczną dla tego szczepu lub dla całego podtypu H5N1. Mogą jednak istnieć inne oddziaływania stabilizujące strukturę tego rejonu. Na przykład, dla szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), w oparciu o analizę sekwencji możliwe jest tworzenie trypleksu pomiędzy helisą 87-92/109-105 a rejonem jednoniciowym 781-785 nt. Brak mapowań chemicznych fragmentu jednoniciowego 781-785 nt czyni tą hipotezę prawdopodobną, choć potrzebne są dodatkowe badania eksperymentalne, aby ją potwierdzić.

## **7. Potencjalne funkcje elementów strukturalnych vRNA5 wirusa grypy typu A**

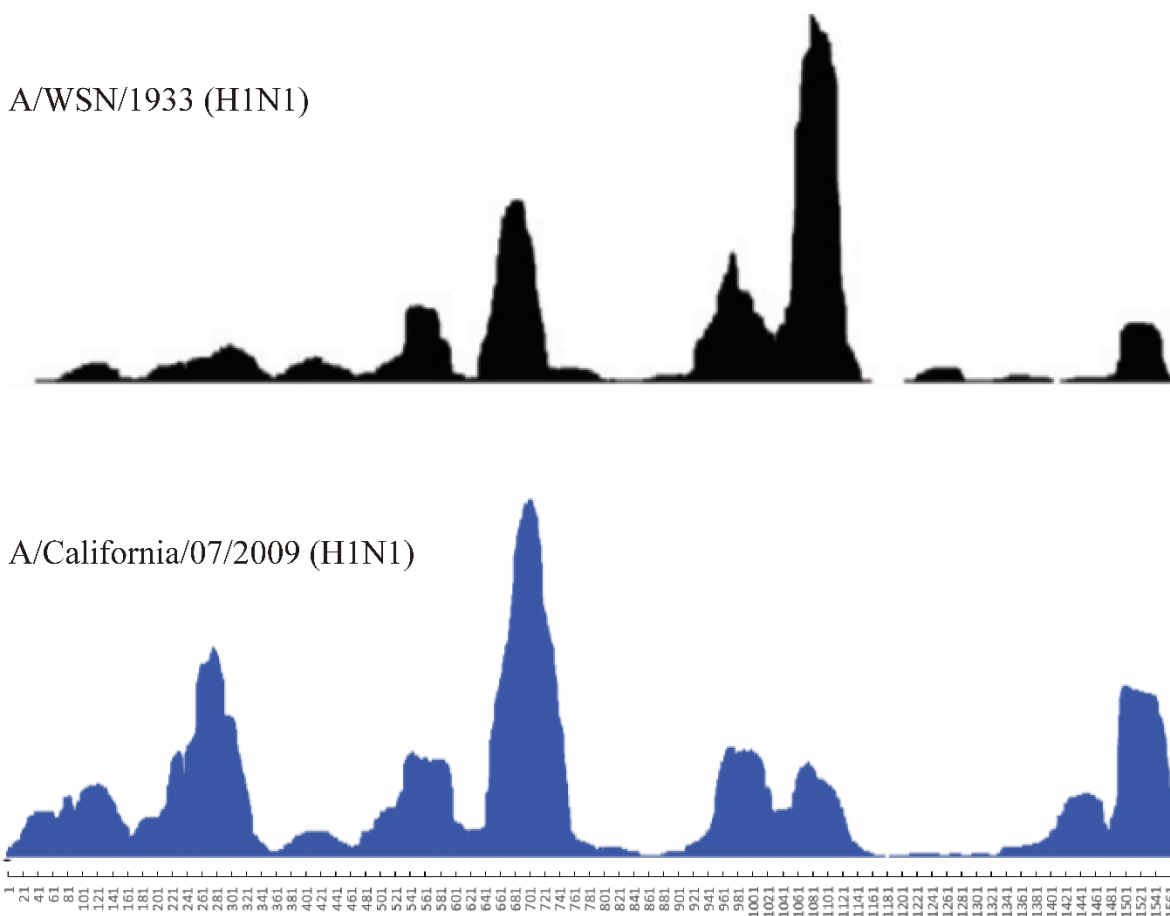
Określona w tej pracy doktorskiej struktura drugorzędowa vRNA5, a także jej trzeciorzędowy model zawiera niewątpliwie motywy strukturalne mające znaczenie w cyklu replikacyjnym wirusa grypy. Rejony określone, jako dostępne dla oddziaływań z oligonukleotydami w mapowaniu mikromacierzami izoenergetycznymi lub w eksperymentach z rybonukleazą H mogą należeć do motywów strukturalnych bezpośrednio oddziałujących z innymi vRNA podczas pakowania wirusów potomnych.

Wirusowe vRNA nie tylko występuje w wirionie w kompleksie ośmiu vRNP, ale podczas cyklu wirusowego w komórce mamy do czynienia z pojedynczymi vRNP w jądrze ulegającymi replikacji lub przepisaniu na mRNA. Kompleks vRNP jest dynamiczny i stabilne termodynamicznie motywy wirusowego RNA mogą powstawać i mieć znaczenie na określonym etapie cyklu wirusowego. Tworzenie kompleksu ośmiu vRNP ma miejsce w cytoplazmie [15] i ich wzajemne prawidłowe rozpoznawanie oraz transport najprawdopodobniej również zależy od struktury vRNA. Nie należy także wykluczyć, że niektóre konserwatywne strukturalnie motywy RNA mogą być elementem rozpoznawalnym przez dane białko wirusowe lub komórkowe gospodarza.

Najnowsze doniesienia literaturowe zrewidowały poprzedni model kompleksu vRNP, w którym monomery białka NP stosunkowo równomiernie, co 24-32 nt wiązały się do vRNA [177]. Obserwowaną hydrolizę vRNA w obecności rybonukleaz interpretowano, jako wyłącznie efekt rozplatania vRNA przez białko NP. Najnowszy model, oparty na badaniach vRNP w wirionach, kładzie nacisk na wypętlenie fragmentów vRNA, które tworzą najprawdopodobniej specyficzne struktury wirusowego RNA [18]. Badania przeprowadzono na dwóch szczepach wirusa grypy, a mianowicie A/WSN/1933 (H1N1) (górny wykres, rysunek 49) oraz A/California/07/2009 (H1N1). Dla obu szczepów zauważono duże podobieństwa w zaangażowaniu podobnych rejonów vRNA w oddziaływanie z białkiem NP. (rysunek 49). Pewne cechy są specyficzne dla obu szczepów wirusa grypy, a „ilościowe” zaangażowanie poszczególnych rejonów vRNA w tworzenie kompleksu z NP jest indywidualną cechą danego szczepu wirusa.

Co ciekawe, przedstawiony przez autorów profil wiązania NP do vRNA5 jest w dużej części zbieżny z modelem struktury trzeciorzędowej vRNA5 zaprezentowanym w tej pracy doktorskiej i opisanymi badaniami inhibicji namnażania wirusa na linii komórkowej. Rejonami praktycznie wolnymi od oddziaływań z NP są fragmenty 760-920 nt i 1140-1340 nt. Miejsce wiązania się oligonukleotydów antysensowych 7.5 i 7.5L, które najmocniej

inhibują namnażanie wirusa przypada właśnie w tym fragmencie (rejon 878-888 nt). Z kolei miejsce wiązania antysensowych oligonukleotydów 4.5 i 4.5L (rejon 465-485 nt) znajduje się pomiędzy dwoma rejonami oddziałującymi z NP.



**Rysunek 49.** Profil wiązania białka NP w wirionie określony metodą HITS-CLIP dla dwóch szczepów: A/WSN/1933 (H1N1) (górny wykres) oraz A/California/07/2009 (H1N1) (dolny wykres). Częstotliwość występowania kompleksów vRNA/NP w danym rejonie vRNA jest znormalizowana w stosunku do najwyższej wartości, którą jest najwyższy pik profilu. Na osi Y umieszczono numeracje nukleotydów vRNA5 od 5'-końca.

Najdłuższy niezwiązany z NP rejon w vRNA5, a mianowicie rejon 1140-1340 nt to fragment, który w dużej części obejmuje wysoce ustrukturyzowany w modelu trzeciorzędowym vRNA5 obszar od 1065 do 1281 nt, który występuje w obrębie domeny III (rysunek 34). Zwraca również uwagę rejon silnego wiązania białka NP, fragment 640-760 nt. Podczas mapowania struktury drugorzędowej vRNA5 fragment ten najsilniej wiązał się do sond mikromacierzy izoenergetycznej oraz był dostępny dla RNazy H i podczas mapowań chemicznych (należy pamiętać, że w badaniach opisanych w pracy doktorskiej określono strukturę vRNA5 w warunkach *in vitro*). Białko NP wiąże się również w rejonach końców 5' i 3' vRNA5, a więc w rejonach wpływających na pakowanie wirionów. Konserwatywne motywy strukturalne tych fragmentów mają więc prawdopodobnie też znaczenie w oddziaływaniu vRNA z białkiem NP.



Zauważono również pewną preferencje sekwencyjną, a mianowicie rejony vRNA uwikłane w wiązanie NP są bogate w guanozyny i ubogie w urydyny [18]. Można przypuszczać, że struktura vRNA również determinuje oddziaływania z NP a wzajemne relacje obu cząsteczek są kluczowe na różnych etapach cyklu namnażania wirusa grypy.

## **IV. MATERIAŁY I METODY**

### **1. Wykaz stosowanego sprzętu laboratoryjnego**

1. Wirówka 5430R – Eppendorf.
2. Wirówka Eppendorf, Mini Spin – Eppendorf.
3. Wytrząsarka do hodowli komórek bakteryjnych – Eppendorf.
4. Syntezator oligonukleotydów MerMade 12 – Bioautomation Corporation.
5. Nanodrop – ThermoFisher Scientific.
6. Lampa UV.
7. Aparat do PCR – BioRad.
8. Termoblok, termomikser – Eppendorf.
9. Aparaty do elektroforezy – na zamówienie.
10. pH – metr – Mettler Toledo.
11. Waga – Denver Instruments.
12. Kołyska laboratoryjna Ultra Rocker – BioRad.
13. Inkubator do hodowli komórek – Memmert.
14. Płytki do liczenia komórek – BioRad.
15. Licznik komórek TC20 –BioRad.
16. Komora laminarna – Holten.
17. Łaźnia wodna – Polyscience.
18. Aparat do Real Time PCR–CFX96 Real-Time System C1000 Touch Thermal Cycler – BioRad.
19. Mikroskop – Leica.
20. Pompa Vacusafe – Integra.
21. Czytnik absorbancji płytek xMark Microplate Spectrophotometer –BioRad.
22. Aparat do obrazowania mikromacierzy FLA5100 Phosphoimager- FUJI.
23. Maszyna do drukowania mikromacierzy izoenergetycznych Nanoprint – Arrayit.
24. Fosfoimager FLA 5100 Fuji
25. Licznik scyntylicyjny L55000TA Beckman

## 2. Materiały

### 2.1. Badania struktury RNA

#### 2.1.1. Enzymy

- a. Inhibitor Rybonukleaz – RNasin , Odwrotna transkryptaza – SSIII, Thermo Fisher Scientific.
- b. Rybonukleaza H, rybonukleaza A, polimeraza DNA z *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*), EURx.
- c. Dezoksyrybonukleaza – DNAza I- Thermo Fisher Scientific (Ambion).

#### 2.1.2. Komercyjne zestawy

- a. Komercyjny zestawy do transkrypcji: Epicentre: AmpliScribe T7 – Flash Kit.
- b. Komercyjny zestaw do sekwencjonowania USB Kit – Thermo Fisher Scientific.

#### 2.1.3. Zestawy do oczyszczania kwasów nukleinowych

- a. RNeasy MinElute Cleanup Kit (50) – Qiagen.
- b. NucAway Spin Columns – Thermo Fisher Scientific (Ambion).
- c. PCR Mini Kit – Syngen.

#### 2.1.4. Antybiotyki do hodowli komórek bakterii

Ampicylina – Sigma–Aldrich.

#### 2.1.5. Bufory

- a. Bufor ALM (do lizy komórek bakteryjnych).
  - 50 mM D- glukoza
  - 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
  - 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA
- b. Bufor do znakowania oligonukleotydów barwnikami fluorescencyjnymi – 0,1M tetraboran sodu, pH 8.5
- c. Bufor 1.
  - 300 mM NaCl
  - 50 mM HEPES pH 7.5
  - 5 mM MgCl<sub>2</sub>

d. Bufor 2.

300 mM NaCl  
50 mM HEPES pH 7.5  
5 mM MgCl<sub>2</sub>

e. Bufor do drukowania mikromacierzy izoenergetycznych.

3x SSC  
0,05% SDS  
0,001% CHAPS

f. Bufor SSC (3x stężony).

450 mM NaCl  
45 mM cytrynian sodu pH 7.0

g. Bufor redukujący płytki mikromacierzy izoenergetycznych.

37 mM NaBH<sub>4</sub>  
72 % bufor PBS  
28 % etanol

### 2.1.6. *Pożywki*

a. Pożywka stała LB

1,25 g NaCl  
3,75 g agar  
1,25 g wyciąg drożdżowy  
2 g pepton  
do 250 ml woda

Pożywkę wysterylizowano w autoklawie, po obniżeniu temperatury roztworu do 55°C, dodano 500µl ampicyliny, następnie pożywkę wylewano na szalki Petiego pod komorą laminarną.

b. Pożywka płynna LB – pożywka była autoklawowana

5 g NaCl  
3,75g agar  
5 g wyciąg drożdżowy  
10 g pepton  
do 1000 ml woda

### 2.1.7. *Elektroforeza*

a. Żel poliakrylamidowy – 12% roztwór akrylamidu i N,N'- metylenobis-akrylamidu (BioShop, Kanada) zmieszanych w stosunku 29 :1. Stosowano żel denaturujący z 8M mocznikiem. Skład buforu do elektroforezy przedstawiał się następująco:

- bufor TBE (1x stężony) pH 8,3

50 mM kwas borowy

50 mM Tris

0,5 mM Na<sub>2</sub>EDTA

-bufor obciążający (2x stężony).

8 M mocznik

2 x TBE pH 8,3

0,2% w/v barwnik (BB lub XC)

b. Żel agarozowy – standardowy (Bioshop, Kanada). Do analiz wykorzystano 1% żel agarozowy. Buforem do elektroforezy w żelu agarozowym był 1xTBE pH 8,3.

### 2.1.8. *Markery wielkości kwasów nukleinowych*

a. DNA – Perfect Plus 2 kb DNA Ladder – EURx.

b. RNA – RiboRuler – Fermentas.

### 2.1.9. *Odczynniki do modyfikacji RNA*

a. NMIA (*N-methylsatoic anhydride*)– Applied Biosystem

b. DMS (siarczan dimetylu), CMCT (*N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho-p-toluenesulfonate*)– Sigma–Aldrich

c. Ketoksal (*3-ethoxy-1,1-dihydroxy-2-butanone*) – MP Biomedicals

### **2.1.10. Pozostałe odczynniki**

- a. CH<sub>3</sub>COONa, Na<sub>2</sub>EDTA, MgCl<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, SDS, agar, HEPES, mocznik, IPTG, pepton, Xgal, Tris-HCl, octan amonu, octan sodu, wyciąg drożdżowy – BioShop.
- b. Bromek etydyny, glicerol, NaCl, KCl, NaIO<sub>4</sub>, NaBH<sub>4</sub>, glukoza, CHAPS, bezwodny DMSO, cytrynian sodu, NaClO<sub>4</sub>, TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine) – Sigma–Aldrich.
- c. H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, NaOH, KOH, amoniak, etanol, HCl - Polskie Odczynniki Chemiczne
- d. FAM, ROX, JOE, TAMRA – AnaSpec.
- e. HiDi Formamide –Thermo Fisher Scientific.

### **2.1.11. Akcesoria**

- a. Płytki do mikromacierzy- Silane-Prep Slides – Sigma–Aldrich.
- b. Komory hybrydyzacyjne – na zamówienie.
- c. Szkiełka nakrywkowe – HybriSlip.
- d. Ekran (ang. *imaging plate*, IP) – FujiFilm.

## **2.2. Hodowla linii komórkowej MDCK**

### **2.2.1. Linie komórkowe**

- a. MDCK (ang. *Madin Darby Canine Kidney*) – Sigma Aldrich.
- b. Linia komórkowa MDCK - HA – dzięki uprzejmości prof. Luis’a Martineza-Sobrido z Uniwersytetu Rochester.

### **2.2.2. Odczynniki do hodowli komórkowej**

- a. Bufor PBS pH 7.4 (10x stężony) – BioShop.
- b. FBS, OptiMEM, DMEM – Gibco.
- c. BSA 35%, penicylina/streptomycyna (100x), tripsyna z trzustki wołowej, roztwór tripsyny z trzustki wołowej (100x) traktowanej TPCK, glutamina – Sigma–Aldrich.
- d. Czynniki transfekcyjne – Lipofectamine® 2000 – ThermoFisher Scientific.

### **2.2.3. Plastik do hodowli komórkowej**

- a. Szalki 10 cm<sup>2</sup>, butelki T-kształtne – Greiner Bio – One.
- b. Pipety serologiczne 5 ml, 10 ml, 25 ml – HTL.

#### 2.2.4. *Media hodowlane*

- a. Medium hodowlane dla linii komórkowej MDCK.

10% FBS  
20 mM L-glutamina  
100 u Penicylina  
100 µg/ml Streptomycyna  
do 50 ml DMEM

### 2.3. **Namnażanie wirusa grypy typu A**

#### 2.3.1. *Stosowane szczepy wirusa grypy typu A*

- a. Wirus sciIAV A/California/04/2009 (H1N1).  
b. Wirus WT (ang. *wild type*) A/California/04/2009 (H1N1).

#### 2.3.2. *Media stosowane podczas infekcji*

- a. Medium infekcyjne.

0,3% BSA  
100 u Penicylina  
100 µg/ml Streptomycyna  
do 50 ml PBS 1X

- b. Medium postinfekcyjne.

0,3% BSA  
1 µg/ml Trypsyna  
2 mM L-glutamina  
100 u Penicylina  
100 µg/ml Streptomycyna  
do 50 ml DMEM

- c. Roztwór utrwalający komórki (test immunofluorescencji pośredniej).

1x PBS  
0,5% Tryton-X-100  
4% Formaldehyd  
do 50 ml 1x PBS

- d. Roztwór blokujący (test immunofluorescencji pośredniej).

3% BSA  
do 50 ml 1x PBS

### 2.3.3. *Odczynniki do izolacji RNA*

- a. Trizol.
- b. Na<sub>2</sub>EDTA – BioShop.
- c. n-laurylosarkozynian sodu – Sigma–Aldrich.

### 2.3.4. *Przeciwciała-Merck Millipore*

- a. Przeciwciało pierwszorzędowe – mysie monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko białku NP (*anti-influenza A antibody nucleoprotein, clone a1*).
- b. Przeciwciało drugorzędowe - przeciwciało znakowane fluoresceiną, skierowane przeciwko białku mysiemu (*rabbit anti mouse IgG antibody, FITC*).

### 2.3.5. *Pozostałe odczynniki*

- a. Fenol - Roti Aqua Phenol – Carl Roth.
- b. chloroform/alkohol izoamyłowy (24:1 v/v), MTT – Sigma–Aldrich.
- c. Hoechst 33342, DAPI – ThermoFisher Scientific.
- d. Tryton-X-100 – BioShop.
- e. Formaldehyd – Polyscience.

### 2.3.6. *Akcesoria*

- a. filtry do sterylizacji 0,4 μM – Millipore.
- b. strzykawki LUER LOCK, 50 ml – Polfa.

## 3. Metody

### 3.1. **Badania struktury RNA**

#### 3.1.1. *Transformacja komórek oraz izolacja plazmidów*

Celem transformacji komórek było namnożenie materiału potrzebnego do transkrypcji *in vitro*, niezbędnej do otrzymania vRNA5. Do transformacji wykorzystano bakterie – *Escherichia coli* DH5Ga. Po rozmrożeniu do bakterii dodano 10 ng plazmidu z sekwencją segmentu piątego A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Bakterie i plazmid zawierający interesujący insert inkubowano przez 45 minut na lodzie. Następnie próby przez 45 sekund ogrzewano w 42°C, a później schłodzono na lodzie. Dodano 1ml pożywki LB (bez ampicyliny) i wytrząsano 45 minut w 37°C, po czym dodano XGal (końcowe stężenie 13 mM) i IPTG (końcowe stężenie 6 mM). Roztwory naniesiono na płytki Petriego z pożywką stałą LB.

Płytki inkubowano przez noc w 37°C. Do 2ml pożywki LB z ampicyliną dodano pojedynczą białą kolonię i inkubowano przez noc w 37°C, wytrząsając (1 400 rpm). Stężenie ampicyliny w pożywce LB wynosiło 0,1 g/ml. Odwirowano zawiesinę bakteryjną (1000 rpm, 1 minuta), a do osadu dodano buforu do lizy (ALM). Inkubację prowadzono przez 5 minut, po czym dodano roztwór 1% SDS w 0,2 M NaOH (200 µl) i mieszano przez kolejne 5 minut. Następnie dodawano 7,5 M octan amonu (150 µl) i zostawiono na lodzie przez 20 minut, po czym zwirowano (11000 rpm, 15 minut, 4°C). Zebrano supernatant i strącono w etanolu. Osad wysuszone, rozpuszczono w wodzie i dodano RNazy A (2,5ng/µl). W celu potwierdzenia obecności plazmidów wykonano elektroforezę w żelu agarozowym. Przed wykorzystaniem materiału w dalszych etapach badań przeprowadzono sekwencjonowanie obecnego w plazmidzie insertu.

### **3.1.2. Synteza oligonukleotydów**

Syntezę wszystkich oligonukleotydów przeprowadzono na synteźatorze MerMade12 metodą amidofosforynową na podłożu stałym. Synteza oligonukleotydów została wykonana w Zakładzie Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych (Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN).

### **3.1.3. Odblokowywanie oligonukleotydów**

Odblokowywano oligonukleotydy DNA, DNA-LNA, 2'OMeRNA, 2'OMeRNA-LNA, gapmery oraz DNA i DNA z C6-aminolinkerami.

Do silikażelu dodano 1,5 ml wodnego roztworu amoniaku (32%) i inkubowano 12 godzin w temperaturze 55°C, a następnie schłodzono w zamrażarce (-25°C). Roztwór z nadłoża przeniesiono do falkonów i odparowano.

W przypadku oligonukleotydów posiadających na 5'-końcu C6-aminolinker, dodatkowo stosowano 3 godzinną inkubację z 900 µl 80% kwasem octowym w temperaturze pokojowej. Następnie roztwory oligonukleotydów odparowywano do sucha na suszarce próżniowej i po rozpuszczeniu w wodzie (200 µl) strącano w 10 ml 1% nadchloranu sodu w acetonie. Wirowano przy 4 000 rpm 15 minut. Osad przepłukano 2x 3 ml acetonu (-20°C), a następnie wysuszone i rozpuszczono w 500 µl H<sub>2</sub>O. Tak przygotowane oligonukleotydy z aminolinkerem były gotowe do znakowania.

Pozostałe oligonukleotydy oczyszczano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (ang. *thin-layer chromatography*, TLC) lub za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym.



### **3.1.4. Znakowanie starterów barwnikami fluorescencyjnymi**

Startery DNA posiadające C6-aminolinker na 5'-końcu były znakowane barwnikami FAM, JOE, TAMRA oraz ROX. Odparowano roztwór danego oligonukleotydu (300 µg). Następnie, osad rozpuszczono w 11 µl wody, dodano 75 µl buforu do znakowania (0,1M tetraboran sodu, pH 8.5). Barwniki rozpuszczono w bezwodnym DMSO. Na 140 µl DMSO dodawano 2 mg barwnika FAM lub TAMRA oraz 2,5 mg JOE lub ROX. Do próbówki ze znakowanym oligonukleotydem dodano 14 µl roztworu barwnika. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze pokojowej przez 18 godzin, lekko wytrząsając (150 rpm) i chroniąc przed światłem. Następnie oligonukleotydy strącano w etanolu. Precypitat rozpuszczano w wodzie i oczyszczano stosując elektroforezę w żelu poliakrylamidowym.

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

Roztwór oligonukleotydów (150 µl) наносono na płytkę z żel krzemionkowym 60 F<sub>254</sub>. Płytkę wysuszone a następnie rozwijano w układzie n-propanol/amoniak/woda (52/35/13). Prążek z interesującym oligonukleotydem był z izolowany z płytki, po czym dokonywano jego elucji z żelu krzemionkowego, przez przemycie 2 ml wody MQ. Przemycie wodą powtórzono dwukrotnie, a roztwór oligonukleotydu odparowano do sucha.

### **3.1.6. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (PAGE)**

Procentowość żelu była dostosowana do długości oczyszczanych oligonukleotydów. Najczęściej stosowano preparatywny 12% żel poliakrylamidowy (PAA) z 8 M mocznikiem. Do żelu dodawano TEMED (0,04% v/v) i APS (0,7% v/v). Elektroforezę prowadzono przy 50W w buforze 1xTBE, przez minimum 3,5 godziny. Elektroforezę przerywano, gdy barwnik doszedł do 4/5 długości szyby 40-centymetrowej. Oligonukleotydy wycinano z żelu wcześniej wizualizując je pod lampą UV (254 nm) i eluowano roztworem 0,3 M octanu sodu pH 5.5.

### **3.1.7. Strącanie**

Do przygotowanego wodnego roztworu RNA zawierającego 0,3M octanu sodu pH 5.5 dodano 96% etanol (3 objętości uzyskanej mieszaniny). Strącanie prowadzono, co najmniej 2 godziny lub przez noc w temperaturze (-20°C). Następnie próby wirowano przez 30 minut przy 12 000 rpm. Supernatant usuwano, a osad suszono, rozpuszczano w autoklawowanej wodzie MQ i dokonywano pomiaru stężeń.

### 3.1.8. Spektrometria mas

Masy atomowe oligonukleotydów oznaczano za pomocą spektrometrii mas (MALDI-TOF). Wyniki porównano z obliczonymi wartościami mas cząsteczkowych.

### 3.1.9. PCR – otrzymanie matrycy do transkrypcji *in vitro* vRNA5

W PCR stosowano enzym *Pfu*. Matrycę do reakcji stanowił wyizolowany we wcześniejszych etapach plazmid z insertem badanego segmentu. Profil PCR przedstawiał się następująco: denaturację wstępną prowadzono w temperaturze 95°C przez 2 minuty, natomiast w każdym cyklu reakcji denaturacja trwała przez 30 sekund. Wiązanie starterów następowało w temperaturze 50°C przez 30 sekund. Synteza produktu była prowadzona przez 3 minuty w 72°C. Łącznie prowadzono 40 cykli reakcji, po czym zachodziła synteza końcowa przez 7 minut.

Reagenty	Stężenie
Bufor <i>Pfu</i>	1x
dNTP	0,2 mM
Startery do PCR	15 pmol (każdego)
Matryca (plazmid)	100 ng
Polimeraza <i>Pfu</i>	2,5 U
woda	Do 50 µl

Startery użyte do PCR w celu otrzymania matrycy do transkrypcji *in vitro* vRNA5 zestawione są w tabeli 11. Produkt PCR oczyszczano z pomocą zestawu do frakcjonowania Syngen PCR Mini Kit zgodnie z procedurą producenta. Produkt PCR oceniano na żelu agarozowym.

### 3.1.10. Elektroforeza w żelu agarozowym

Do elektroforezy stosowano standardowy 1% natywny żel agarozowy z bromkiem etydyny (0,5 µg/ml). Bromku etydyny dodawano do agarozy przed zestaleniem. Żel zalewano buforem 1xTBE. Do prób dodawano buforu obciążającego i nanoszono na żel (końcowa objętość próby wynosiła 10 lub 12 µl). Elektroforezę dla DNA prowadzono przy napięciu 130V. W przypadku RNA napięcie wyniosło 70V. Produkt oceniano stosując odpowiednie drabinki (DNA lub RNA). Żel obrazowano za pomocą lampy UV (254nm). W przypadku RNA znakowanego radioaktywnie, żel agarozowy suszono w suszarce do żeli, pod próżnią i obrazowano stosując fosfoimager 5100 FUJI.

### **3.1.11. Transkrypcja *in vitro***

vRNA5 szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) otrzymano drogą transkrypcji *in vitro*. Proces przeprowadzono stosując Epicentre®: AmpliScribe™ T7 – Flash™ Kit – zestaw do transkrypcji *in vitro*. Reakcję prowadzono zgodnie z protokołem przez dwie godziny. Stosowano przynajmniej 700 ng matrycy w pojedynczej reakcji transkrypcji *in vitro*. Matrycę stanowił produkt PCR, zawierający sekwencję DNA segmentu piątego A/Vietnam/1203/2004 (H5N1).

### **3.1.12. Znakowanie vRNA5 [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] ATP**

vRNA5 był znakowany [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] ATP podczas reakcji transkrypcji *in vitro*. W tym celu wprowadzono modyfikacje do standardowego protokołu transkrypcji *in vitro* dodając, jako dodatkowy substrat reakcji [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] ATP (5  $\mu\text{l}$ ). Jednocześnie zmniejszono stężenie ATP o 50% w stosunku do stężenia pozostałych rybonukleotydów.

### **3.1.13. Oczyszczanie RNA po transkrypcji**

W celu oczyszczenia vRNA5 szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) (1565nt) stosowano kolumnienki RNeasy® MinElute™ Cleanup Kit – Qiagen'u, zgodnie z protokołem producenta. Stężenie oznaczono za pomocą spektrofotometru Nanodrop.

### **3.1.14. Sekwencjonowanie oraz analiza kapilarna**

Sekwencjonowanie plazmidu z insertem przeprowadzono na wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej. Próby po odwrotnej transkrypcji zostały rozdzielane za pomocą elektroforezy kapilarnej w Centrum Badań DNA w Poznaniu oraz w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej (UAM).

### **3.1.15. Fałdowanie cząsteczki vRNA5**

Reakcja mapowania chemicznego oraz hybrydyzacja do mikromacierzy izoenergetycznych były poprzedzone fałdowaniem vRNA5. Próbkę ogrzewano przez pięć minut na bloku grzewczym w 65°C (bufor 1 lub 2). Następnie wolno schładzano (ok 1°C/min) do temperatury pokojowej. W przypadku nieznakowanego RNA, przed reakcją modyfikacji, stosowano 1 pmol RNA dla jednej próby. Fałdowanie przeprowadzono w buforze 1, a objętość przypadająca na 1 pmol vRNA5 wynosiła 5  $\mu\text{l}$ . Dla RNA znakowanego (do hybrydyzacji na mikromacierzach izoenergetycznych) pobierano ilość RNA, o radioaktywności równej 300 000 cpm. Fałdowanie prowadzono w buforze 1 oraz buforze 2 w objętości 250  $\mu\text{l}$ .

### **3.1.16. Reakcja mapowania chemicznego**

Przed reakcją mapowania chemicznego vRNA5 został poddany fałdowaniu. Następnie wykonano reakcję modyfikacji odpowiednim reagentem mapującym strukturę drugorzędową RNA. Wszystkie reakcje modyfikacji vRNA5 zostały przeprowadzone w temperaturze 37°C w buforze 1. Po reakcji modyfikacji próby strącano.

#### **DMS**

Przed dodaniem DMS do próby, rozcieńczano go w 96% etanolu do 16 mM. Do 4,5 µl próby dodano 0,5 µl roztworu DMS otrzymując końcowe stężenie DMS w próbce 1,6 mM. Reakcję prowadzono przez 15 minut.

#### **CMCT**

CMCT odważano, a następnie rozpuszczono w odpowiedniej ilości buforu do fałdowania aby otrzymać 19 mM roztwór. Do próby (5 µl) z vRNA5 dodawano 5 µl roztworu odczynnika modyfikującego. Stężenie CMCT w reakcji wynosiło 9,5 mM. Czas reakcji modyfikacji wynosił 30 minut.

#### **Ketoksal**

Próba była traktowana roztworem ketoksalu w 80% etanolu o stężeniu 15 mM. Do 4,5 µl próby dodano 0,5 µl roztworu ketoksalu, uzyskując końcowe stężenie 1,5 mM. Reakcja była przeprowadzana przez 20 minut, po czym do próby dodawano 1 µl 0,35 M boranu potasu dla stabilizacji produktu reakcji.

#### **SHAPE**

W reakcji SHAPE stosowano odczynnik NMIA. W tym celu sporządzano roztwór odczynnika w DMSO tak by końcowe stężenie w reakcji wynosiło 3,3 mM. Do próby (4,5 µl) dodawano 0,5 µl odczynnika modyfikującego. Modyfikację prowadzono 40 minut.

### **3.1.17. Reakcja odwrotnej transkrypcji**

Każda reakcja odwrotnej transkrypcji została przeprowadzona z odpowiednio wyznakowanymi starterami. Startery wyznakowane FAM były stosowane dla kontroli. Startery wyznakowane JOE stosowano dla reakcji. Aby odczytać reaktywność nukleotydów całego vRNA5 (1565nt) zastosowano sześć starterów komplementarnych do różnych rejonów vRNA5 (tabela 2). Każdy ze starterów był wyznakowany barwnikami JOE, FAM, TAMRA i ROX.

Pierwszym etapem odwrotnej transkrypcji było przyłączenie startera do RNA. W tym celu badane RNA (1 pmol/reakcję) po rozpuszczeniu, inkubowano przez 3 minuty w 90°C z 1 pmol wybranego startera w buforze FS (dołączony w zestawie do odwrotnej transkryptazy). Objętość reakcji na tym etapie wynosiła 5 µl/1 pmol RNA. Następnie próby inkubowano 10 minut w 55°C. Mieszaninę następnie chłodzono przez 3 minuty w 4°C i dodawano 5 ul mieszaniny MIX1 lub MIX2. Reakcję przeprowadzano przez 50 minut w 55°C. Poniżej przedstawiono składy mieszanin reakcyjnych:

- a. Mieszanina - MIX1 na jedną reakcję - stosowana dla reakcji ze starterami P4, P5, P6.

<b>Reagenty</b>	<b>Stężenie</b>
dNTP 8mM	1,5 µl
SuperScriptIII	50 u
bufor FS	1x
RNAsin	5u
DTT 100mM	0,6 µl
woda	1,4 µl
	5 µl

- b. Mieszanina- MIX2- stosowana dla reakcji ze starterami P1, 2L, 3L.

<b>Reagenty</b>	<b>Stężenie</b>
dNTP 8mM	1,75 µl
SuperScriptIII	100 u
bufor FS	1x
RNAsin	5 u
DTT 100mM	0,6 µl
woda	0,9 µl
	5 µl

Końcowa objętość dla jednej reakcji wynosiła 10 µl. Po zakończeniu reakcji odwrotnej transkrypcji łączono próbę kontroli z próbą reakcji, a następnie całość strącano. Po 12 godzinach próby wirowano i dwukrotnie przemywano 70% etanolem. Następnie suszono w suszarce próżniowej i rozpuszczano w formamidzie w objętości 15 µl

### **3.1.18. Przygotowanie płytek do drukowania mikromacierzy izoenergetycznych**

Przed nadrukowaniem sond przygotowano płytki. W tym celu aminoalkilosilanizowane płytki (7,5 x 2,5cm, Silane-Prep Slides - Sigma-Aldrich) pokryto 2,5

ml agarozy z 20 mM NaIO<sub>4</sub>. Po zastygnięciu agarozy (godzina) płytki trzykrotnie płukano w wodzie i pozostawiono do wyschnięcia.

### **3.1.19. Drukowanie mikromacierzy izoenergetycznych**

Drukowanie mikromacierzy izoenergetycznych przeprowadzono za pomocą drukarki Nanoprint. Sondy rozpuszczono w buforze do drukowania (patrz *Bufory*), tak, że stężenie każdej sondy wynosiło 0,1 mM. Roztwór każdej z sond został umieszczony w płytce wielodołkowej. W procesie drukowania wykorzystano cztery igły. Wilgotność powietrza w komorze drukarki wynosiła 50%, natomiast po wydrukowaniu mikromacierze zostały umieszczone w komorze o wysokiej (100%) wilgotności na 12 godzin w temperaturze 37 °C. Mikromacierze izoenergetyczne zostały wydrukowane w Europejskim Centrum Bioinformatyki i Genomiki (ECBIG).

### **3.1.20. Redukcja mikromacierzy izoenergetycznych**

Wydrukowane mikromacierze izoenergetycznych zostały poddane działaniu buforu redukującego, w celu stabilizacji wiązania sondy do agarozy. Redukcję wykonano w następujący sposób: każda z mikromacierzy została pokryta 1,5 ml buforu redukującego na 15 minut. Następnie mikromacierze płukano trzykrotnie przez 15 minut, w wodzie, po czym inkubowano godzinę w 1 % roztworze SDS w temperaturze 55°C. W celu wypłukania pozostałości SDS, mikromacierze ponownie płukano w wodzie MQ (3 razy przez 15 minut), a następnie wysuszono.

### **3.1.21. Hybrydyzacja vRNA5 do sond mikromacierzy izoenergetycznych**

Na pojedynczą mikromacierz наносzono 250 µl roztworu zawierającego vRNA5 (300 000 cpm) w odpowiednim buforze (bufor 1 lub bufor 2). Przed nałożeniem na mikromacierz vRNA5 był poddany procesowi fałdowania, zgodnie z procedurą opisaną wyżej (*Fałdowanie cząsteczki RNA*). Każda mikromacierz izoenergetyczna została następnie przykryta nakrywką HybriSlip i umieszczona w komorze hybrydyzacyjnej. Tak przygotowane mikromacierze inkubowano przez 18 godzin w 37°C, po czym mikromacierze płukano przez 3 minuty w 40 ml buforu o składzie identycznym jak bufor zastosowany do hybrydyzacji. W celu usunięcia pozostałości buforu, płytki wirowano przez 2 minuty (2 000 rpm) i zawijano w folię celofanową. Mikromacierze zostały ułożone na ekranie (ang. *imaging plate*, IP) wraz z markerem radioaktywności (0,1 µl [ $\alpha^{32}$ P] ATP), i po około 18 godzinach zobrazowane na aparacie FLA5100 Phosphoimager, FUJI.

### **3.1.22. Analiza wyników uzyskanych z mikromacierzy izoenergetycznych**

Analizę wyników hybrydyzacji vRNA5 do sond mikromacierzy izoenergetycznych przeprowadzono za pomocą programów *ArrayGauge V 2.0* oraz *MultiGauge V 3.0*. W programie *MultiGauge V 3.0* ustawiono odpowiedni kontrast i wyselekcjonowano pole przeznaczone do dalszej analizy. Natomiast za pomocą programu *ArrayGauge V 2.0* na obraz mikromacierzy została nałożona wcześniej przygotowana siatka. Siatka pozwalała na obliczenie zaciemnienia obszarów o identycznej powierzchni (w pikselach), co reprezentowało siłę wiązania vRNA5 do sondy. Marker radioaktywności oraz równomiernie rozmieszczone kontrolne bufory pozwoliły na precyzyjne ułożenie siatki na mikromacierzy. Plik wygenerowany przez *ArrayGauge*, był następnie analizowany w programie *Microsoft Excel*. Wyselekcjonowano sondy, dla których zidentyfikowano silne „s” (ang. *strong*) lub średnie „m” (ang. *medium*) sygnały. Normalizację wyników przeprowadzono względem najsilniejszego sygnału.

Za pomocą aplikacji *ProbePicker* ustalono kolejność wiązania się sond w cząsteczce vRNA5. Obliczono energie swobodne dupleksów modyfikowana sonda/vRNA5. Następnie, przy pomocy programu *RNAstructure* wykonano analizę, która pozwoliła dodatkowo porównać energię swobodną dla utworzonego wiązania vRNA5/sonda z energią swobodną dla ewentualnych wiązań alternatywnych. W tym celu skorzystano z funkcji *fold RNA bimolecular*, przy czym zaznaczono opcję *forbid unimolecular pairs* i wykonano wspólne fałdowanie cząsteczki vRNA5 wraz z sondą. Z wygenerowanego pliku wypisano wszystkie miejsca wiązania sond, dla których energia swobodna była korzystniejsza niż - 4 kcal/mol.

### **3.1.23. Hydroliza RNA rybonukleazą H**

vRNA5 został poddany fałdowaniu w buforze 1, następnie dodano oligonukleotyd w stosunku 3 pmol oligonukleotydu na 6 pmol RNA oraz rybonukleazę H (5U). Próba kontrolna nie zawierała oligonukleotydu. Reakcję prowadzono w całkowitej objętości reakcji 20  $\mu$ l przez 30 minut w 37°C. Następnie przez 10 minut próbę ogrzewano w 65°C, aby dezaktywować enzym i strącono. Po 12 godzinach próby zwirowano i osuszony osad RNA został użyty w reakcji odwrotnej transkrypcji.

### **3.1.24. Kontrole wzorcowe wielkości rozdzielanych w elektroforezie kapilarnej produktów**

Kontrole wzorcowe zawierające dideoksynukleotydy (ddNTP) (drabinki dideoksy) zostały wykonane z użyciem sekwenazy z komercyjnego zestawu USB Kit. W reakcji

stosowano 90 ng DNA (matrycy vRNA5) oraz 5 pmol startera znakowanego ROX lub TAMRA. Końcowa objętość mieszaniny wynosiła 40,5 µl. Produkt PCR strącano w etanolu, wirowano, dwukrotnie przemywano 70% etanolem i suszono na suszarce próżniowej, a następnie rozpuszczano w formamidzie w objętości 10 µl

Kontrole wzorcowe były dodawane do próby zawierającej produkty reakcji odwrotnej transkrypcji dla reakcji mapowania i kontroli, lub reakcji z RNazą H i kontroli. Po połączeniu tych produktów ich wyznakowanie czterema barwnikami umożliwiło rozdzielenie poprzez elektroforezę kapilarną i przypisanie sygnałów do odpowiednich miejsc w vRNA5.

### **3.1.25. Generowanie struktur drugorzędowych**

Do generowania struktur drugorzędowych posłużył program *RNAstructure*. W tym celu do programu wprowadzono sekwencję vRNA5, a w zakładce *RNA* zaznaczono opcję *Fold RNA Single Strand*. W celu wprowadzenia wyników z mapowań chemicznych zaznaczono zakładkę *force* i *restore constraints*, co pozwoliło na załadowanie pliku \*.txt z wypisanymi nukleotydami, które uległy modyfikacji. W przypadku wyników z NMIA w zakładce *force* wybierano opcję *read SHAPE-reactivity pseudo-energy constraints*. Parametry *slope* oraz *intercept* wynosiły odpowiednio 1,8 kcal/mol oraz -0,6 kcal/mol. Struktura drugorzędowa była wizualizowana za pomocą aplikacji *PseudoViewer 2.5*.

### **3.1.26. Określenie prawdopodobieństwa występowania par zasad oraz rejonów jednoniciowych w modelu struktury drugorzędowej vRNA5**

Prawdopodobieństwo występowania par zasad oraz rejonów jednoniciowych w modelu struktury drugorzędowej vRNA5 zostało określone dzięki wygenerowaniu macierzy *DotPlot* w programie *RNAstructure*. W analizie uwzględniono wyniki z mapowań chemicznych. Wyniki z macierzy ukazującej częstość występowania danych par zasad we wszystkich wygenerowanych strukturach (o najniższej i wyższej energii swobodnej, wciąż zgodnych z danymi eksperymentalnymi) zostały przypisane poszczególnym nukleotydom zdeterminowanej struktury vRNA5 poprzez zastosowanie opcji *add probability color adnotations*.

### **3.1.27. Przewidywanie obecności pseudowęzłów w vRNA5**

W celu przewidzenia potencjalnych pseudowęzłów w strukturze vRNA5 skorzystano z opcji dostępnej w programie *RNAstructure 5.6*. W pierwszej kolejności wygenerowano funkcję partycji dla vRNA5 uwzględniając mapowania chemiczne. W tym celu z zakładki



RNA wybrano *Partition Function RNA*. Następnie wybrano opcję *ProbKnot Predict RNA Structure Including Pseudoknots* i załadowano plik funkcji partycji. Wygenerowaną strukturę narysowano w postaci struktury kolistej poprzez zaznaczenie opcji *Draw: Render Circular Structure*.

### **3.2. Hodowla linii komórkowej MDCK**

#### **3.2.1. Hodowla linii komórkowej MDCK i MDCK-HA**

Linie komórkowe MDCK oraz MDCK-HA hodowano w 37°C w inkubatorze zawierającym 5% CO<sub>2</sub>. Wilgotność wynosiła 96%. Obie linie komórkowe hodowano na szalkach 10 cm<sup>2</sup> oraz w T-butelkach. Pasaże przeprowadzano przy konfluencji 70-95%. W tym celu komórki przemywano dwukrotnie roztworem PBS i dodawano 1 ml trypsyny (0,25% roztwór). Gdy doszło do odklejenia komórek (po czasie około 5 minut) dodawano medium hodowlane, komórki zbierano i wirowano (1000 rpm, 3 minuty). Supernatant wylewano, dodawano świeżej pożywki hodowlanej i po dokładnym zmieszaniu wysiewano komórki na nowe szalki. Przeprowadzano pasaże 1:10. W przypadku linii MDCK-HA co trzeci pasaż dodawano higromycynę, by konstytutywna ekspresja hemaglutyniny została zachowana. Eksperymenty na liniach komórkowych wykonywano do 20 pasaży.

#### **3.2.2. Transfekcja komórek MDCK WT oraz MDCK-HA**

24 godziny przed infekcją wysiewano komórki MDCK lub MDCK-HA na szalkę 10 cm<sup>2</sup> w ilości 2,5 mln. Następnego dnia przygotowano odpowiednią ilość oligonukleotydu antysensowego, odparowywano, a następnie rozpuszczano w pożywce OptiMEM. Przykładowo było to dla płytki 24-dołkowej 33,5µl/dołek. W międzyczasie przygotowano mieszaninę lipofektaminy 2000 i OptiMEM (dla dołka z płytki 24-dołkowej było to odpowiednio to 2 i 98µl), którą inkubowano 10 minut. Następnie łączono obie mieszaniny i inkubowano 25 minut. W tym czasie przygotowywano komórki MDCK. Komórki ściągano z szalki i po przemyciu PBS zawieszano w medium hodowlanym (10ml). Następnie mierzono ilość komórek i przygotowywano ich odpowiednie rozcieńczenie ( $2,5 \cdot 10^5$  komórek/ml). Po zakończeniu 25 minutowej inkubacji dodawano roztwór komórek do mieszaniny lipofektaminy i oligomeru (stosunek objętości w dołku 24-dołkowej płytki to 4/1 v/v). Następnie wysiewano komórki wraz z roztworem oligonukleotydu z lipofektaminą. W przypadku płytek 96-dołkowych wysiewano 20 000 komórek na dołek. Końcowe stężenie lipofektaminy wynosiło 0,4 µl/dołek. W przypadku płytek 24 dołkowych wysiewano 180 000 komórek na dołek i stosowano 2 µl lipofektaminy na dołek. Transfekowane komórki były

inkubowane przez 6 godzin. Następnie zmieniano pożywkę i komórki inkubowano przez następne 6 godzin, po czym dokonywano infekcji.

Przy badaniu wydajności transfekcji stosowano oligonukleotydy znakowane TAMRA na 5'-końcu. Stosowane stężenia oligonukleotydów były 0,1 $\mu$ M, 0,25 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M, 0,75 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 4 $\mu$ M. Transfekcję przeprowadzono na płytce 24 dołkowej. Po 6 godzinach transfekcji komórki przemyto i wymieniono pożywkę. Po następnych 6 godzinach na każdy dołek dodano po 300  $\mu$ l trypsyny, a następnie 600  $\mu$ l medium hodowlanego. Zawiesinę komórek przeniesiono do próbek typu eppendorf i następnie wirowano przy 1500 rpm przez 3 minuty. Dodano 800  $\mu$ l DPBS i ponownie zwirowano. Czynność powtórzono dwukrotnie. Następnie dodano 500  $\mu$ l DPBS. Analizę na cytometrze przepływowym została wykonana przez dr Dorotę Gurdę z Zakładu Epigenetyki, Pracowni Analiz Struktur Subkomórkowych.

### **3.3. Namnażanie wirusa grypy typu A**

#### **3.3.1. Infekcja wirusowa**

Komórki MDCK lub MDCK-HA przemyto roztworem PBS. Następnie zainfekowano, odpowiednio, wirusem typu dzikiego A/California/04/2009 (H1N1) lub wirusem jednocyklicznym scIAV A/California/04/2009 (H1N1) stosując MOI 0,001 lub 0,01. Infekcję prowadzono w medium infekcyjnym. Po 30 minutach płytkę obrócono o 90°. Po godzinie od infekcji roztwór wirusa odciągnięto z nad komórek, dodano medium postinfekcyjne i inkubowano w 33°C w inkubatorze z 5% CO<sub>2</sub>. Dla wirusa typu dzikiego czas inkubacji wynosił 24 godziny natomiast dla wirusa scIAV wynosił 66 godzin, co w obu przypadkach odpowiadało trzem cyklom namnażania wirusa. Następnie zebrano supernatanty z nad monowarstwy i zmrożono.

Ponownie wysiano komórki na płytkach 96-dołkowych w celu oznaczenia miana wirusa w teście immunofluorescencji pośredniej (ang. *indirect immunofluorescence assay*, *IFA*) w przypadku A/California/04/2009 (H1N1) lub bezpośrednio dla scIAV. Konfluentne komórki na płytce 96-dołkowej zainfekowano supernatantami w 10-krotnych rozcieńczeniach. Infekcja została zakończona po 1 cyklu, czyli 8 godzinach dla wirusa typu dzikiego i po 22 godzinach dla scIAV. W przypadku wirusa typu dzikiego dodano roztworu utrwalającego komórki. W przypadku wirusa scIAV przeprowadzono obserwację mikroskopową i obliczono foci GFP. Podczas obserwacji stosowano lampę UV i filtr Cube A firmy Leica. Następnie obliczono ilość wirusa w FFU/ml.

### **3.3.2. Znakowanie z użyciem przeciwciał**

W przypadku wirusa typu dzikiego po 8 godzinach od infekcji supernatantami w 10-krotnych rozcieńczeniach dodano roztworu utrwalającego komórki, który powodował zatrzymanie infekcji. Inkubację prowadzono w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Następnie, po przemyciu 1xPBS, dodawano roztworu blokującego i prowadzono inkubację przez 12 godzin w 4°C. Po aspiracji roztworu blokującego dodano 45 µl przeciwciała pierwszorzędowego, rozcieńczonego 1000 razy w roztworze blokującym. Przeprowadzono inkubację przez 2 godziny, po czym roztwór zdjęto i 3-krotnie przepłukano monowarstwę roztworem PBS. Sporządzono wyjściowy wodny roztwór przeciwciała drugorzędowego (1mg/ml). Dodano przeciwciała drugorzędowe (roztwór wyjściowy rozcieńczono 150 razy) oraz DAPI (końcowe stężenie 300 nM) i przeprowadzono inkubację przez godzinę, następnie 3-krotnie przepłukano 1xPBS i pozostawiono w 1xPBS. Wyznakowane jądra komórkowe policzono wyznaczając ilość wirusa w FFU/ml.

### **3.3.3. Izolacja RNA**

Przed izolacją przygotowano Trizol. W tym celu uwodniony fenol zalano taką samą objętością 100 mM octanu sodu pH 5.0, a następnie wytrząsano przy 100 rpm w temperaturze 4°C, w ciemnej butelce przez noc. Następnie fenol ogrzano do temperatury pokojowej i usunięto fazę wodną. Do 500ml roztworu dodano 50 µl β-merkaptoetanolu. Tak zbuforowany fenol (38 ml) wymieszano z 3M octanem sodu pH 5 (3,34 ml). W międzyczasie rozpuszczano w 50 ml wody 11,816 g tiocyjanianu guanidyny oraz 7,612 g tiocyjanianu amonowego. Następnie zmieszano ze sobą tak przygotowane roztwory i dodano 10 ml 50% glicerolu i dopełniono wodą do 100 ml. Trizol bezpośrednio przed użyciem aktywowano poprzez dodanie Na<sub>2</sub>EDTA (stężenie końcowe 5mM) oraz laurylosarkozynianu (stężenie końcowe 0,5%). Na każdy dołek płytki 24-dołkowej dawano 0,5ml Trizolu. Komórki zamrażano w -20°C. Po 12 godzinach komórki rozmrażano i przeprowadzano izolację totalnego RNA, zgodnie z metodą Chomczyńskiego [178].

### **3.3.4. qPCR**

Po izolacji totalnego RNA zdegradowano enzymatycznie DNA. W tym celu pobrano 500 ng RNA i inkubowano przez 30 minut w 37°C w obecności 2u DNazy I oraz buforu producenta. Następnie sprawdzano homogeniczność RNA poprzez wykonanie elektroforezy w żelu agarozowym. W kolejnym kroku przeprowadzono odwrotną transkrypcję. Do reakcji odwrotnej transkrypcji pobrano 2 µl mieszaniny otrzymanej po traktowaniu DNAzą I oraz

1 pmol startera RT (tabela 13). Odwrotną transkrypcję wykonano według procedury opisanej w protokole dla odwrotnej transkryptazy SSIII, Invitrogen. Końcowa objętość mieszaniny wynosiła 10  $\mu$ l. Po reakcji pobrano 1  $\mu$ l z produktu cDNA i wykonano qPCR. W celu przeprowadzenia qPCR zastosowano komercyjny zestaw do qPCR firmy BioRad. Reakcja została przeprowadzona z użyciem starterów QR i QF (tabela 13). Sondę TaqMan stanowił oligonukleotyd Q. Reakcję przeprowadzono zgodnie z protokołem firmowym. Jednocześnie wykonano reakcje dla standardów, którymi były 10 krotnie rozcieńczenia vRNA7, przepisane na cDNA.

### **3.4. Badanie cytotoksyczności antysensowych oligonukleotydów w linii komórkowej MDCK**

Cytotoksyczność oligonukleotydów antysensowych badano za pomocą testu MTT. Eksperyment przebiegał następująco: dzień przed transfekcją wysiano komórki na szalkę 10cm<sup>2</sup>. Następnego przeprowadzono transfekcję komórek oligonukleotydami (w różnych stężeniach) i wysiano je na płytkę 96-dółkową. Następnie, 6 godzin po transfekcji zmieniono pożywkę, i komórki ponownie inkubowano przez 6 godzin. Następnie dodano odczynnik MTT w stężeniu 5 mg/ml i inkubowano komórki przez kolejne 2 godziny. Po tym czasie odessano pożywkę z MTT i dodano 100  $\mu$ l DMSO. Płytki kołysano przez 15 minut, aby powstałe kryształy formazanu dobrze się rozpuściły. Następnie dokonano pomiaru absorbancji na czytniku absorbancji płytek przy długości fali  $\lambda=570$ nm. W eksperymentach badano stężenia 4 $\mu$ M, 0,75 $\mu$ M oraz 0,5 $\mu$ M. Kontrolę stanowiła próba traktowana lipofektaminą.

## **4. Wykaz sekwencji**

### **4.1. Sekwencja segmentu 5 vRNA wirusa grypy szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)**

```
5'AGUAGAAACAAGGGUAUUUUUCUUUAAUUGUCAUACUCCUCUGCAUUGUCUCCGAAGAAUA  
AGAUCUUCAUUAUUC AUGUCAAGGAAGGCACGAUCGGGUUCGUUGCCUUUUCGUCCGAGAG  
CUCGAAGACUCCCCGCCCGUGGAAUGACACAUCUUCUGGUCUGGCACUUCCAUCAUUCUUAUG  
AUUCAGUCCUCAUGUCAGACGUUCUGCCUCAGUAUUUCCUGUAAAUGCUGCCAUA AUGGUCG  
CUCUUUCGAAGGGAAGGUUCUCUGGACCGAGAAAGUGGGCUGAACGCUGAUCUGUCCUGCAG  
AUGCCUCUGCUGGUUGGUGUUUCCUCCGCUUCUGGUUCUUAUAGCCCAAUAUCUGCUUCUCAG  
UUCAAGAGUGUUGGAGUCCAUGCCUCAUGUUCUCAUUUGAAGCAAUUUGAACCCUCUGGU  
GGAUAGCUGUCCUCUUGGGACCACUCUUGUCCUCUGAUGAAACUUGAGACUCUAAGGUCCUCA  
AAUGCUGCAGAGUGGCAUGCCAUCCACACUAAUUGACUCUUAUGUGCUGGAUUCUCAUUUGGU  
CUAAUGAGACUAAAGACCUGGCUGUUUUGAAGCAGGCGGAAAGGAUCUAUCCAACCAGAGAG  
UACCCUUCUCUCUCAAGUCAUAUCCACUGGCCACUGCAAGUCCGUACACACAAGCAGGCAAGC  
AGGACUUAUGGGCCACUGAUCCUCUCAGGAUGAGUGCAGACCGUGCCAGAAAAAUGAGAUCU  
CAAUUUCAGCAUUC CAGGAUUUCUGCUCUCUCGCACUUGAUCCAUCAUUGCUCUUUGUGCUG  
UGUUUGGAAUUUCCUUUGAGGAUGUUGCACAUCUCAUAUGCAAUCCUUGUUCUUCUUC  
AUUUUCGCCUCUCCAGAAAUCCGGUCGUUGAUCCUCGUUUUAUCAUCCGAAUCAGCUCCAUC  
ACCAUUGUCCCUACCCCUUUACUGCUGCACCGGCAGCUCCAGAUCUCCUCGGGAGAGUUGACC
```

CUUGCAUCAGAGAGCACAUCCUUGGGUCCAUUCAGUACGCACGAGAGCUCUCGUUCUCUGAUA  
UGUGGCAUCAUUUAGAUUGGAAUGCCAUAUCAUCAGGUGGGUAAGACCAGCAGUUGCGUCCUC  
UCCAUUGUUCGUUGACGCCAAAUCCUCCUGAUCUCCUCUUUGUCGUACAGAAUUAGCUCUCUC  
ACCAUUUCCCGUCUCUCCUCCGAUAAAUUGGACCUCAGUCUUCUUCGGGUCCUUUCCCGCAC  
UGGGGUGUUCUUCAGGUAUCUGUUCUUCUUAUCAAAAUGCAGAGAGUACCAUUCUCUCUA  
UUGUUUAGCUGUUCUGGAUCAGCCUCCUUCUAGUCACUGAGUUUGAGUUCUGUGCACAUCU  
GUAUGUAGAACCUCCAAUGCCACUAACCAUUCUCCAACAGAUGCCCUGAUCUCAGUAGCAUU  
CUGGCGUUCGCCACCAGUUCCAUCUGUUCAUAAAGAUUCGUUUGGUGCCUUGAGACGCCAUGAUG  
UUGAUGUCACUCGGUGAGUGAUUAUCUACCCUGCUUUUGCU<sup>3</sup>

#### **4.2. Sekwencja segmentu 5 vRNA wirusa grypy szczepu A/California/04/2009 (H1N1)**

5'AGUAGAAACAAGGGUGUUUUUAUCAUUAAAUAAGCUGAAACGAGAAAGCUCUUAUCUCUUG  
UUCUACUUAAGCAGUAGUUGUAAGGCUUGCAUAAAUGUUUUUUGUUCGAAACUUAUUCUCUGU  
CGCUUUCAAUCUGUGCCGCAUUUCUCAAUUAACCACCUUAUUUCCUCAAUUUCUGUCCCAAU  
UGCUCUCGCCACUUUUAUUUCUGCUCUGGAGGUAGUGAAGGUCUCCAUUCUCAUCACAGUUU  
CUCCAAGCGAAUCUCUGUAUAAUUUCAGAGACUCGAACCGUGUUACCAUCCAUAAGUCCUC  
CGAUGAGGACCCCAACUGCAUUUUUGACAUCCUCAUAAGUAUGUCCUGGAAGAGAAGGUAUUG  
GUGAAAUUUCUCCAACUAUUGCUCUCCUCCAGUGAAAGCCCUAGUAGUAUCAAGGUCUCUAA  
UCGGUAAAAGAUUACACUGAAGUUCGUUUCAGUACUAUGUUCUUUUCCAUGAUCGCCUGGUC  
CAAUCGCACGCAAAGAGGGCCUAUUAUCUUUUUGCCUAGGCAUGAGCAUGAACAGUCUCGUGAC  
AUUUCUCGAGGGUCAUGUCAGAAAGGUAGCGCGAAGUAGGUACAGAUGCAAUUGUCAUUCUA  
AGUGUCUCGUGGAUUCUCUUUCAAGAUCUCCAUUCCACGAUUUGUUUCCCAACAAGAGUGGCUG  
UUUCGAUAUCGAGGCCAAGGGUGUUGCCUCUCCUUUUAAGGACUUUUGAUCUCGGCGGAGCC  
GAUCAAGGAAUGGGGCAUCACCCAAUCCAUGUCGCAAAUCGUUUGCGGAUAUGCCAAAGGA  
AACAGUCUACCUGAAAGCUUGACAUGGUGUUGGAGUCCAUAUGUUUUUGUCACCCUGCUUUU  
GCU<sup>3</sup>

#### **4.3. Sekwencja plazmidu– PHH21 (bez insertu)**

5'GGCGGCCAAAATGCCGACTCGGAGCGAAAGATATACCTCCCCGGGGCCGGGAGGTTCGCGTACCGACCA  
CGCCGCGGCCAGGCGACGCGGACACGGACACCTGTCCCCAAAACGCCACCATCGCAGCCACACACGGA  
GCGCCCGGGGCCCTCTGGTCAACCCAGGACACACGCGGGAGCAGCGCCGGGCCGGGGACGCCCTCCCCGGCC  
GCCCGTGCACACGAGGGGGCCGGCCGTGTCTCCAGAGCGGGAGCCGGAAGCATTTCGGCCGGCCCCCTCC  
TACGACCGGGACACACGAGGGACCGAAGGCCGGCCAGGCGCGACCTCTCGGGCCGCACGCGCGCTCAGGGAG  
CGCTCTCCGACTCCGCACGGGACTCGCCAGAAAGGATCGTGATCTGCATTAATGAATCAGGGGATAACGCAG  
GAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCC  
ATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC  
TATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCGACCCCTGCCGTTACCGGA  
TACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTG  
TAGGTGTTCCGCTCAAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAA  
CTATCGTCTTGAGTCAAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC  
AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAG  
TATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAA  
ACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAG  
ATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGA  
TTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGA  
GTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATC  
CATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAA  
TGATAACCGCAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCG  
CAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTATGT  
CGCCAGTAAATAGTTTTGCGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATG  
GTTTCATTCAAGTCCCGTTCCCAACGATCAAGGCGATTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAG  
CTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTATGTTGCCGCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGC  
ATAATTCTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAG  
AATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAC  
TTAAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCA

GTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAA  
 AAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCC  
 TTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTTAGAAAA  
 ATAAACAAAAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGGCCATCCGTCAGGATGGCCTTCTGCTTAATTTGATGCCTGG  
 CAGTTTATGGCGGGCGTCTGCCCGCCACCCTCCGGGCGCTTGCTTCGCAACGTTCAAATCCGCTCCCGGGCGGA  
 TTTGTCCTACTCAGGAGAGCGTTCACCGACAAACAACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTTCGACTGAGCCT  
 TTCGTTTTATTGATGCCTGGCAGTTCCTACTCTCGCATGGGGAGACCCACACTACCATCGGCGCTACGGCG  
 TTTCACTTCTGAGTTCGGCATGGGGTCAGGTGGGACCACCGCGCTACTGCCGCCAGGCAAATCTGTTTTATCA  
 GACCGCTTCTGCGTTCTGATTTAATCTGTATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTAG  
 CGGCCGATCCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGTCCAGAGTGGCCCCGCCGCTCCGCGCCGGGGGGGGGG  
 GGGGGGGGGGACACTTTCGGACATCTGGTCGACCTCCAGCATCGGGGGAACAAAAGTGTGCGCC  
 GGAGTACTGGTCGACCTCCGAAGTTGGGGGGGAGGAGACGGTACCGTCTCCAATAACCC3'

#### 4.4. Pozostałe sekwencje

**Tabela 11.** Sekwencje starterów wykorzystanych w PCR. Temperatury topnienia ( $T_m$ ) obliczono za pomocą OligoAnalyzer 3.1 [179].

Nazwa	Sekwencja	Liczba nukleotydów	$T_m$ [°C]
<b>Forward (PR1)</b>	GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGTAGAAACAAGGG TATTTTTC	45	62.8
<b>Reverse (PR2)</b>	AGCAAAAGCAGGGTAGATAATC	22	52.7

**Tabela 12.** Sekwencje starterów wykorzystanych do sekwencjonowania matrycy (DNA) piątego segmentu wirusa grypy typu A. Temperatury topnienia ( $T_m$ ) obliczono za pomocą OligoAnalyzer 3.1 [179].

Nazwa	Sekwencja	Liczba nukleotydów	$T_m$ [°C]
<b>AG1</b>	CCTCTTGGGACCACTCTTG	19	55
<b>AG3</b>	CCTTGCATCAGAGAGCACATCC	22	55,9
<b>Revseq5</b>	GACAGGTGTCCGTGTCG	17	55,6

**Tabela 13.** Sekwencje starterów wykorzystanych do qPCR. Temperatury topnienia ( $T_m$ ) obliczono za pomocą OligoAnalyzer 3.1 [179].

Nazwa	Sekwencja	Liczba nukleotydów	$T_m$ [°C]
<b>QF</b>	AGACCAATCTTGTCACCTCTGAC	23	56,4
<b>QR</b>	AGGGCATTGTTGGACAAAGCGTCTACG	26	61,4
<b>QP</b>	TCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCA	27	69,9
<b>RT</b>	ATGAGTCTTCTAACCGAGGTGCG	22	55,9

**Tabela 14.** Wyniki hybrydyzacji vRNA5 do sond mikromacierzy izoenergetycznych. Literą s oznaczono silne wiązanie, m - średnie wiązanie, A - oznacza adenozyne, d-LNA-2,6-diaminopurynorybozyd, C - cytydyne, c - cytydyne LNA, G - guanozyne, g - guanozyne LNA, m - dodatkową guanozyne-LNA, D- 2'O-metylo-2,6-diaminopurynorybozyd.

Miejsce w cząsteczce	Alternatywne miejsca wiązania	Nazwa sondy	Sekwencja sondy	$\Delta G^{\circ}_{37}$ (kcal/mol) dla dupletu modyfikowana sonda/RNA	Wynik hybrydyzacji Bufor 1, 37°C	Wynik hybrydyzacji Bufor 2, 37°C
20	20/114/891	513	GdDdDm	-7,79	m	
21	21/273/783	129	dGdDdm	-9,00		m
22	22/184/355/880/883/1251/1280/1300/1429	33	dDgDdm	-9,24	s	m
23	23/257/815/1182/1301	9	dDdGam	-8,39	m	s
30	30/48/472/958/1185	529	GdCdDm	-8,62	m	
33	33/654/864/1365/1491	825	UdUgDm	-8,47	m	
36		557	GdGUdm	-9,20	m	
37	37/135	652	GgDgUm	-10,82		m
38	38/999/1170/1178/1224	163	DgGdG	-9,46	m	
41	41/276/324/439/478/1074	291	CdGdGg	-12,44	m	m
48	30/48/472/958/1185	529	GdCdDm	-8,62	m	
50	50/1220	546	GdGdCm	-9,84	m	
51	51/899/998/1143/1177/1223	649	GgDgAm	-10,72	m	m
52	52/343/1227	419	CgGdG	-9,52	m	m
53	53/120/937/1228	873	UCgGdg	-12,36		m
54	54/938	987	uUcGgm	-9,28	m	
68	68/874/1036/1260/1297	41	dDgGdm	-10,59	m	m
69	69/639/1298/1362	523	GdAgGm	-9,41	m	m
70	70/760/1363	899	uGdDgg	-12,1		m
71	71/78/1304/1364/1490	225	dUgDdg	-11,24	m	m
78	71/78/1304/1364/1490	225	dUgDdm	-9,11	m	m
105	105/116	97	DcGdDm	-9,22		m
106	106/915/926/1069/1499	25	dDcGam	-9,03	m	m
112	112/840/970/1261	11	dDdGgm	-9,43	m	
113	113/1560	3	dDdDgg	-11,01		m
114	20/114/891	513	GdDdDg	-9,81	m	
116	105/116	97	DcGdDm	-9,22		m
117		537	GDCGDm	-8,80	m	
120	53/120/937/1228	873	UCgGdm	-10,23		m
135	37/135	652	GgDgUm	-10,82		m
136	136/1359/1410	675	GGgDg	-9,91		m
157	157/1394/1484	143	dGdUgm	-9,66	m	s
158	158/758	36	DdGdUg	-10,47	m	
159	159/759/881/884/1249/1252/1281/1430	521	GdDgDm	-9,74		m
160	160/348/375/640/882/1250/1299	131	DgDdGm	-9,61	m	m
161	161/214/349/784/1347/1385/1461	289	CdGdDg	-11,09	m	
171	171/796/1269	186	DgUgCm	-10,74	m	
172	172/797	47	dDgUgm	-9,44		m
174	174/258/1262/1302	515	GdDdGm	-8,58	m	m
175	175/228/339/836/1214/1263/1480	641	gGdDdg	-11,69		m
176	176/622/886/1048/1283/1432/1481	929	uGgDdm	-9,97		m
177	177/399/408/804/887/948/	233	dUgGdm	-10,46	m	s

	1044/1145/1482					
178	178/529/805/949/1483	571	GdUgGm	-10,04		m
179	179/806/950/1022/1087/ 1112/1306	911	uGdUgg	-11,97		m
184	22/184/355/880/883/1251/ 1280/1300/1429	33	dDgDdm	-9,24	s	m
185	185/356/547	777	uDdGdm	-8,78	m	
201	201/416/563/863	227	dUgDgg	-12,83		m
214	161/214/349/784/1347/1385/ 1461	289	CdGdDm	-9,07	m	
216	216/241	659	GGCdGm	-9,64	m	
218	218/321/1443	170	AgGgC	-10,01		m
220	200/220/505	907	UGdGgg	-12,92		m
221	221/378/723/1451	483	CuGdGg	-12,20	m	
228	175/228/339/836/1214/1263/ 1480	641	gGdDdm	-9,56		m
229	229/340/1296	161	DgGdDm	-10,17		m
230	230/311/171	297	CdGgAm	-10,05	m	m
241	216/241	659	GGCdGm	-9,64	m	
244	244/1106	827	UdUgGm	-8,90	m	
256	256/457/469/546/814/1181	35	dDgDgm	-10,03	s	m
257	23/257/815/1182/1301	9	dDdGag	-10,19		s
258	174/258/1262/1302	515	GdDdGm	-8,58	m	m
265		856	UcCcUm	-10,47		s
266		982	UUcCcm	-9,17		s
272	272/338/1479	514	GdDdCm	-8,13	m	
273	21/273/783	129	dGdDdm	-9,00		m
274	274/376/414/561/641/859/10 72/1327	545	GdGdDm	-9,50	m	m
275	275/642/644/790/860/1073/ 1203/1221/1328/1330	137	dGdGdm	-10,71	s	m
276	41/276/324/439/478/1074	291	CdGdGm	-9,86	m	m
291	291/1118	338	CCcDC	-7,72		m
307	307/1292/1386/1396/1486	73	dCdGdm	-9,83	m	
308	308/452	531	GdCdGm	-9,41	s	m
311	230/311/171	297	CdGgAm	-10,05	m	m
321	218/321/1443	170	AgGgC	-10,01		m
324	41/276/324/439/478/1074	291	CdGdGg	-12,44	m	m
338	272/338/1479	514	GdDdCm	-8,13	m	
339	175/228/339/836/1214/1263/ 1480	641	gGdDdm	-9,56		m
343	52/343/1227	419	CgGdG	-9,52	m	m
348	160/348/375/640/882/1250/ 1299	131	DgDdGm	-9,61	m	m
349	161/214/349/784/1347/1385/ 1461	289	CdGdDg	-11,09	m	
355	22/184/355/880/883/1251/12 80/1300/1429	33	dDgDdm	-9,24	s	m
356	185/356/547	777	uDdGdm	-8,78	m	
375	160/348/375/640/882/1250/ 1299	131	DgDdGm	-9,61	m	m
376	274/376/414/561/641/859/ 1072/1327	545	GdGdDg	-11,52	m	m
377	377/415/562/646/722/862/ 1205/1450	905	uGdGdm	-10,09	s	s
378	221/378/723/1451	483	CuGdGm	-9,62	m	
395		118	DcUcCm	-10,04		s



399	177/399/408/804/887/948/ 1044/1145/1482	233	dUgGdm	-10,46	m	s
400	400/888/955/1045/1146/ 1211/1324/1426	59	DdUgGm	-9,12		m
408	177/399/408/804/887/948/ 1044/1145/1482	233	dUgGdg	-12,59	m	s
411	411/849/1524	20	dDcDug	-10,3	m	
414	274/376/414/561/641/859/ 1072/1327	545	GdGdDm	-9,50		m
415	377/415/562/646/722/862/ 1205/1450	905	uGdGdm	-10,09	s	s
416	201/416/563/863	227	dUgDgm	-9,90		m
418	418/565/889/1090/1212	15	dDdUgm	-7,95		m
439	41/276/324/439/478/1074	291	CdGdGg	-12,44	m	m
452	308/452	531	GdCdGm	-9,41	s	m
457	256/457/469/546/814/1181	35	dDgDgg	-12,96	s	m
458	458/470	265	cDdGdg	-11,62	m	m
461		853	uCcCa	-8,86		s
468	468/495	140	DgDgUg	-12,2	m	m
469	256/457/469/546/814/1181	35	dDgDgm	-10,03	s	m
470	458/470	265	cDdGdg	-11,62	m	m
471	471/876	67	DcDdGm	-8,73	m	
472	30/48/472/958/1185	529	GdCdDg	-10,64	m	
478	41/276/324/439/478/1074	291	CdGdGg	-12,44	m	
492	492/578/1513	734	gUcUcG	-10,83	m	
493	133/493/580	184	DgUcUm	-9,59		
494	134/494/544	558	GdGUcm	-9,53		
495	468/495	140	DgDgUm	-10,26	m	m
496	496/1331	803	UdGdGm	-9,15		m
529	178/529/805/949/1483	571	GdUgGm	-10,04		m
530	530/935/1034	655	GGdUgg	-12,62		m
532	532/659	745	GUgGdm	-10,39	m	m
533		955	uGuGgm	-9,87		m
534	534/683	751	gUgUgg	-12,70	s	
535		188	DgUgUm	-9,67	s	
545		140	DgDgUm	-10,26	m	m
546	256/457/469/546/814/1181	35	dDgDgm	-10,03	s	m
547	185/356/547	777	uDdGdg	-10,91	m	
561	274/376/414/561/641/859/ 1072/1327	545	GdGdDm	-9,50	m	m
562	377/415/562/646/722/862/ 1205/1450	905	uGdGdm	-10,09	s	s
563	201/416/563/863	227	dUgDgm	-9,90		m
565	418/565/889/1090/1212	15	dDdUgm	-7,95		m
578	492/578/1513	734	gUcUcG	-10,83	m	
622	176/622/886/1048/1283/ 1432/1481	929	uGgDdm	-9,97		m
623	623/1433	1001	uUgGdm	-9,41		m
636	435/966/639/965/1553	685	GgGuAm	-9,79		m
637	637/1015/1554	172	AgGgUm	-10,44		
638	638/839/969/1016/1361	43	dDgGg	-9,52	m	
639	69/639/1298/1362	523	GdAgGg	-11,99	m	m
640	160/348/375/640/882/1250/ 1299	131	DgDdGg	-12,19	m	m
641	274/376/414/561/641/859/ 1072/1327	545	GdGdDg	-11,52	m	m
642	275/642/644/790/860/1073/	137	dGdGdm	-10,71	s	s

	1203/1221/1328/1330					
643	643/645/721/789/791/861/ 898/1066/1142/1202/1204/ 1222/1329	547	GdGdGm	-10,29	m	
644	275/642/644/790/860/1073/ 1203/1221/1328/1330/	137	dGdGdg	-12,84	s	s
645	643/645/721/789/791/861/ 898/1066/1142/1202/1204/ 1222/1329	547	GdGdGm	-10,29	m	
646	377/415/562/646/722/862/ 1205/1450	905	uGdGdg	-12,22	s	s
654	33/654/864/1365/1491	825	UdUgDm	-8,47	m	
657		653	gGdUdm	-9,83		m
659	532/659	745	GUgGdm	-10,39	m	m
669		588	GCdGug	-11,92	m	
677		105	DcGgDm	-10,81	s	s
679	679/1189	711	GUdCgg	-11,61	m	
683	534/683	751	gUgUgm	-9,77	m	
721	643/645/721/789/791/861/ 898/1066/1142/1202/1204/ 1222/1329	547	GdGdGg	-12,87	m	s
722	377/415/562/646/722/862/ 1205/1450	905	uGdGdg	-12,22	s	s
723	221/378/723/1451	483	CuGdGm	-9,62	m	
726	614/726/779/846	216	dUcCug	-11,82		m
758	158/758	36	DdGdUm	-8,53	m	
759	159/759/881/884/1249/1252/ 1281/1430	521	GdDgDm	-9,74		m
760	70/760/1364	899	uGdDgm	-9,17		m
775	775/1411	937	UgGgAm	-10,53		m
779	614/726/779/846	216	dUcCug	-11,82		m
783	21/273/783	129	dGdDdm	-9,00		m
784	161/214/349/784/1347/1385/ 1461	289	CdGdDm	-9,07	m	
785	42/215/325/371/785	585	GCdGdm	-10,44	m	
787	787/812	549	GdGCdg	-12,57	m	
789	643/645/721/789/791/861/ 898/1066/1142/1202/1204/ 1222/1329	547	GdGdGm	-10,29	m	s
790	275/642/644/790/860/1073/ 1203/1221/1328/1330	137	dGdGdg	-12,84	s	
791	643/645/721/789/791/861/ 898/1066/1142/1202/1204/ 1222/1329	547	GdGdGm	-10,29	m	
792	792/1067	393	CGdGdg	-12,37		m
796	171/796/1269/	186	DgUgCg	-12,82	m	
797	172/797	47	dDgUgm	-9,44		m
804	177/399/408/804/887/948/ 1044/1145/1482	233	dUgGdm	-10,46	m	s
805	178/529/805/949/1483	571	GdUgGm	-10,04		m
806	179/806/950/1022/1087/ 1112/1306	911	uGdUgg	-11,97		m
812	787/812	549	GdGCdm	-10,44	m	
814	256/457/469/546/814/1181	35	dDgDgm	-10,03	s	m
815	23/257/815/1182/1301	9	dDdGag	-10,19		s
816	816/841/1183	259	CdDdGm	-8,15	m	m
836	175/228/339/836/1214/1263/ 1480	641	gGdDdm	-9,56		m

840	112/840/970/1261	11	dDdGgg	-12,36	m	
841	816/841/1183	259	CdDdGg	-10,73	m	m
846	614/726/779/846	216	dUcCum	-8,74		m
859	274/376/414/561/641/859/ 1072/1327	545	GdGdDm	-9,50	m	m
860	275/642/644/790/860/1073/ 1203/1221/1328/1330/	137	dGdGdm	-10,71	s	
861	643/645/721/789/791/861/ 898/1066/1142/1202/1204/ 1222/1329	547	GdGdGm	-10,29	m	s
862	377/415/562/646/722/862/ 1205/1450/	905	uGdGdg	-12,22	s	s
864	33/654/864/1365/1491	825	UdUgDg	-10,49	m	
874	68/874/1036/1260/1297	41	dDgGdm	-10,59	m	m
875	875/1017/1037/1509	267	CDdGgm	-9,39	m	m
876	471/876	67	DcDdGg	-11,31	m	m
880	22/184/355/880/883/1251/ 1280/1300/1429	33	dDgDdm	-9,24	s	m
881	159/759/881/884/1249/1252/ 1281/1430	521	GdDgDm	-9,74		m
882	160/348/375/640/882/1250/ 1299	131	DgDdGm	-9,61		m
883	22/184/355/880/883/1251/ 1280/1300/1429	33	dDgDdg	-11,37	s	m
884	159/759/881/884/1249/1252/ 1281/1430	521	GdDgDm	-9,74		m
885	885/1282/1431	643	GgDdGm	-10,17		m
886	176/622/886/1048/1283/ 1432/1481	929	uGgDdg	-12,10		m
887	177/399/408/804/887/948/ 1044/1145/1482	233	dUgGdg	-12,59	m	s
888	400/888/955/1045/1146/ 1211/1324/1426	59	DdUgGm	-9,12		m
889	418/565/889/1090/1212	15	dDdUgg	-10,88		m
891	20/114/891	513	GdDdDm	-7,79	m	
898	643/645/721/789/791/861/ 898/1066/1142/1202/1204/ 1222/1329	547	GdGdGg	-12,87	m	s
899	51/899/998/1143/1177/1223/ 1244/1284	649	GgDgAg	-12,47	m	m
901	901/992/1049/1244/1284	489	CUgGdg	-12,50		m
909		417	CgGdAm	-9,74	s	
915	106/915/926/1069/1499	25	dDcGam	-9,03	m	m
920	66/717/802/920	654	GGdUcm	-9,63		m
924	924/1001	395	CgDgG	-9,76	m	
925	925/1068	99	DcGdGg	-12,59	m	m
926	106/915/926/1069/1499	25	dDcGag	-10,83	m	m
935	530/935/1034	655	GGdUgm	-9,69		m
936		420	CgGdUg	-12,12	m	
937	53/120/937/1228	873	UCgGdm	-10,23		m
938	54/938	987	uUcGgm	-9,28	m	
948	177/399/408/804/887/948/ 1044/1145/1482	233	dUgGdg	-12,59	m	s
949	178/529/805/949/1483	571	GdUgGm	-10,04		m
950	179/806/950/1022/1087/ 1112/1306	911	uGdUgg	-11,97		m
952	952/1207	697	GgUgDm	-10,74	m	
955	400/888/955/1045/1146/ 1211/1324/1426	59	DdUgGm	-9,12		m

958	30/48/472/958/1185	529	GdCdDm	-8,62	m	
961	475/838/922/961/1360	169	AgGgAm	-10,34		s
963		715	gUdGgg	-13,09		m
965	435/966/639/965/1553	685	GgGuAg	-11,54		m
970	112/840/970/1261	11	dDdGgg	-12,36	m	
975	975/1556	588	GCdGum	-8,84	m	
982		431	CgGuGm	-10,37		m
992	901/992/1049/1244/1284	489	CUgGdg	-12,50		m
998	51/899/998/1143/1177/1223	649	GgDgAm	-10,72	m	m
999	38/999/1170/1178/1224/	163	DgGdG	-9,46	m	
1001	924/1001	395	CgDgG	-9,76	m	
1013		693	GgUcDm	-10,25	m	
1017	875/1017/1037/1509	267	CDdGgg	-12,32	m	
1018		579	GcDdGg	-12,45	s	
1022	179/806/950/1022/1087/ 1112/1306	911	uGdUgm	-9,04		m
1034	530/935/1034	655	GGdUgm	-9,69		m
1036	68/874/1036/1260/1297	41	dDgGdm	-10,59	m	m
1037	875/1017/1037/1509	267	CDdGgm	-9,39	m	
1044	177/399/408/804/887/948/ 1044/1145/1482	233	dUgGdm	-10,46	m	s
1045	400/888/955/1045/1146/ 1211/1324/1426	59	DdUgGm	-9,12		m
1048	176/622/886/1048/1283/ 1432/1481	929	uGgDdm	-9,97		m
1049	901/992/1049/1244/1284	489	CUgGdm	-10,37		m
1066	643/645/721/789/791/861/89 8/1066/1142/1202/1204/ 1222/1329	547	GdGdGm	-10,29	m	s
1067	792/1067	393	CGdGdg	-12,37		m
1068	925/1068	99	DcGdGm	-10,01	m	m
1069	106/915/926/1069/1499	25	dDcGag	-10,83	m	m
1072	274/376/414/561/641/859/ 1072/1327	545	GdGdDm	-9,5	m	m
1073	275/642/644/790/860/1073/ 1203/1221/1328/1330	137	dGdGdm	-10,71	s	
1074	41/276/324/439/478/1074	291	CdGdGm	-9,86	m	m
1077		821	UdUcDg	-10,00		m
1087	179/806/950/1022/1087/ 1112/1306	911	uGdUgm	-9,04		m
1090	418/565/889/1090/1212	15	dDdUgm	-7,95		m
1106	244/1106	827	UdUgGm	-8,90	m	
1112	179/806/950/1022/1087/ 1112/1306	911	uGdUgm	-9,04		m
1118	291/1118	338	CCcDC	-7,72		m
1142	643/645/721/789/791/861/89 8/1066/1142/1202/1204/122 2/1329	547	GdGdGg	-12,87	m	s
1143	51/899/998/1143/1177/1223	649	GgDgAg	-12,47	m	m
1145	177/399/408/804/887/948/ 1044/1145/1482	233	dUgGdg	-12,59	m	s
1146	400/888/955/1045/1146/ 1211/1324/1426	59	DdUgGm	-9,12		m
1170	38/999/1170/1178/1224	163	DgGdG	-9,46	m	
1171	230/311/1171	297	CdGgAg	-11,80	m	m
1172	1172/1445	843	UCdGgm	-9,50		m
1177	51/899/998/1143/1177/1223	649	GgDgAm	-10,72	m	m

1178	38/999/1170/1178/1224	163	DgGdG	-9,46	m	
1181	256/457/469/546/814/1181	35	dDgDgg	-12,96	s	m
1182	23/257/815/1182/1301	9	dDdGag	-10,19		s
1183	816/841/1183	259	CdDdGm	-8,15	m	m
1185	30/48/472/958/1185	529	GdCdDm	-8,62	m	
1189	679/1189	711	GUdCgm	-8,68	m	
1202	643/645/721/789/791/861/ 898/1066/1142/1202/ 1204/1222/1329	547	GdGdGm	-10,29	m	s
1203	275/642/644/790/860/1073/ 1203/1221/1328/1330	137	dGdGdg	-12,84	s	s
1204	643/645/721/789/791/861/ 898/1066/1142/1202/1204/ 1222/1329	547	GdGdGm	-10,29	m	s
1205	377/415/562/646/722/862/12 05/1450	905	uGdGdm	-10,09	s	
1207	952/1207	697	GgUgDm	-10,74	m	
1212	418/565/889/1090/1212	15	dDdUgg	-10,88		m
1215	774/837/1215/1264/1469	673	GgGdAm	-10,24		m
1220	50/1220	546	GdGdCg	-11,92	m	
1221	275/642/644/790/860/1073/ 1203/1221/1328/1330	137	dGdGdm	-10,71	s	
1222	643/645/721/789/791/861/ 898/1066/1142/1202/1204/ 1222/1329	547	GdGdGm	-10,29	m	s
1223	51/899/998/1143/1177/1223	649	GgDgAg	-12,47	m	m
1224	38/999/1170/1178/1224	163	DgGdG	-9,46	m	
1227	52/343/1227	419	CgGdG	-9,52	m	m
1228	53/120/937/1228	873	UCgGdg	-12,36		m
1241	1241/1408	556	GDgGUm	-9,24	m	
1244	901/992/1049/1244/1284	489	CUgGdg	-12,5		m
1249	159/759/881/884/1249/1252/ 1281/1430	521	GdDgDm	-9,74		m
1250	160/348/375/640/882/1250/ 1299	131	DgDdGm	-9,61	m	m
1251	22/184/355/880/883/1251/ 1280/1300/1429	33	dDgDdg	-11,37	s	m
1252	159/759/881/884/1249/1252/ 1281/1430	521	GdDgDm	-9,74		m
1253		387	CGdDgm	-9,32		m
1260	68/874/1036/1260/1297	41	dDgGdm	-10,59	m	m
1261	112/840/970/1261	11	dDdGgm	-9,43	m	
1262	174/258/1262/1302	515	GdDdGg	-11,16	m	m
1263	175/228/339/836/1214/1263/ 1480	641	gGdDdg	-11,69		m
1268	795/1056/1270	743	gUgCg	-9,48	m	
1272		339	CCcDG	-8,17		m
1273		341	CcCcA	-9,88		m
1280	22/184/355/880/883/1251/ 1280/1300/1429	33	dDgDdm	-9,24	s	m
1281	159/759/881/884/1249/1252/ 1281/1430	521	GdDgDm	-9,74		m
1283	176/622/886/1048/1283/143 2/1481	929	uGgDdg	-12,10		m
1284	901/992/1049/1244/1284	489	CUgGdm	-10,37		m
1297	68/874/1036/1260/1297	41	dDgGdm	-10,59	m	m
1298	69/639/1298/1362	523	GdAgGm	-9,41	m	m
1299	160/348/375/640/882/1250/ 1299	131	DgDdGg	-12,19	m	m

	1299					
1300	22/184/355/880/883/1251/ 1280/1300/1429	33	dDgDdm	-9,24	s	m
1301	23/257/815/1182/1301	9	dDdGam	-8,39		s
1302	174/258/1262/1302	515	GdDdGm	-8,58	m	m
1304	71/78/1304/1364/1490	225	dUgDdm	-9,11	m	m
1306	179/806/950/1022/1087/ 1112/1306	911	uGdUgm	-9,04		m
1322		941	UgGUdm	-9,25	m	
1323	954/1323/1392	236	dUgGum	-8,86		w
1327	274/376/414/561/641/859/ 1072/1327	545	GdGdDm	-9,50	m	m
1328	275/642/644/790/860/1073/ 1203/1221/1328/1330/	137	dGdGdm	-10,71	s	
1329	643/645/721/789/791/861/ 898/1066/1142/1202/1204/ 1222/1329	547	GdGdGm	-10,29	m	s
1330	275/642/644/790/860/1073/ 1203/1221/1328/1330/	137	dGdGdg	-12,84	s	
1331	496/1331	803	UdGdGm	-9,15		m
1347	161/214/349/784/1347/1385/ 1461	289	CdGdDm	-9,07	m	
1359	136/1359/1410	675	GGgDg	-9,91		m
1362	69/639/1298/1362	523	GdAgGg	-11,99	m	m
1363	70/760/1365	899	uGdDgg	-12,10		m
1364	71/78/1304/1364/1490	225	dUgDdg	-11,24	m	m
1365	33/654/864/1365/1491	825	UdUgDm	-8,47	m	
1371	1371/1533	185	dGuGdm	-10,06	m	
1374		467	CUcDgm	-9,32	m	
1385	161/214/349/784/1347/1385/ 1461	289	CdGdDm	-9,07	m	
1386	307/1292/1386/1396/1486	73	dCdGdm	-9,83	m	
1394	157/1394/1484	143	dGdUgm	-9,66	m	s
1396	307/1292/1386/1396/1486	73	dCdGdm	-9,83	m	m
1408	1241/1408	556	GDgGUm	-9,24	m	
1410	136/1359/1410	675	GGgDg	-9,91		m
1411	775/1411	937	UgGgAg	-12,28		m
1420	536/ 1420	815	UdGuGg	-11,08		m
1426	400/888/955/1045/1146/ 1211/1324/1426	59	DdUgGm	-9,12		m
1429	22/184/355/880/883/1251/ 1280/1300/1429	33	dDgDdm	-9,24	s	m
1430	159/759/881/884/1249/1252/ 1281/1430	521	GdDgDm	-9,74		m
1431	885/1282/1431	643	GgDdGm	-10,17		m
1432	176/622/886/1048/1283/ 1432/1481	929	uGgDdg	-12,10		m
1433	623/1433	1001	uUgGdm	-9,41		m
1443	218/321/1443	170	AgGgC	-10,01		m
1445	1172/1445	843	UCdGgg	-12,43		m
1450	377/415/562/646/722/862/12 05/1450	905	uGdGdm	-10,09	s	s
1451	221/378/723/1451	483	CuGdGm	-9,62	m	
1461	161/214/349/784/1347/1385/ 1461	289	CdGdDm	-9,07	m	
1479	272/338/1479	514	GdDdCm	-8,13	m	
1480	175/228/339/836/1214/1263/ 1480	641	gGdDdm	-9,56		m

1481	176/622/886/1048/1283/ 1432/1481	929	uGgDdm	-9,97		m
1482	177/399/408/804/887/948/ 1044/1145/1482	233	dUgGdm	-10,46	m	s
1483	178/529/805/949/1483	571	GdUgGm	-10,04		m
1484	157/1394/1484	143	dGdUgg	-12,59	m	s
1486	307/1292/1386/1396/1486	73	dCdGdm	-9,83	m	m
1490	71/78/1304/1364/1490	225	dUgDdm	-9,11	m	m
1491	33/654/864/1365/1491	825	UdUgDm	-8,47	m	
1499	106/915/926/1069/1499	25	dDcGam	-9,03	m	m
1509	875/1017/1037/1509	267	CDdGgm	-9,39	m	
1513	492/578/1513	734	gUcUcG	-10,83	m	
1533		185	dGuGdm	-10,06	m	
1552	964/1552	691	GgUdGm	-9,98	m	
1553	435/966/639/965/1553	685	GgGuAg	-11,54		m
1560	113/1560	3	dDdDgm	-8,08		m

## IV. BIBLIOGRAFIA

- [1] Tansey, T. (2017) Influenza: A viral world war, *Nature* 546, 207.
- [2] Taubenberger, J. K., and Morens, D. M. (2010) Influenza: The once and future pandemic, *Public Health Reports* 125, 16-26.
- [3] Wikramaratna, P. S., Sandeman, M., Recker, M., and Gupta, S. (2013) The antigenic evolution of influenza: drift or thrift?, *Phil. Trans. Royal Society B: Biol. Sci.* 368, 20120200.
- [4] Neumann, G., Noda, T., and Kawaoka, Y. (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus, *Nature* 459, 931-939.
- [5] Nakatsu, S., Sagara, H., Sakai-Tagawa, Y., Sugaya, N., Noda, T., and Kawaoka, Y. (2016) Complete and incomplete genome packaging of influenza A and B viruses, *Mbio* 7.
- [6] Bouvier, N. M., and Palese, P. (2008) The biology of influenza viruses, *Vaccine* 26, D49-D53.
- [7] Keawcharoen, J., Oraveerakul, K., Kuiken, T., Fouchier, R. A. M., Amonsin, A., Payungporn, S., Noppornpanth, S., Wattanodorn, S., Theamboonlers, A., Tantilertcharoen, R., Pattanarangsarn, R., Arya, N., Ratanakorn, P., Osterhaus, A. D. M. E., and Poovorawan, Y. (2004) Avian influenza H5N1 in tigers and leopards, *Emerg. Infect. Dis.* 10, 2189-2191.
- [8] Freidl, G. S., Meijer, A., de Bruin, E., de Nardi, M., Munoz, O., Capua, I., Breed, A. C., Harris, K., Hill, A., Kosmider, R., Banks, J., von Dobschuetz, S., Stark, K., Wieland, B., Stevens, K., van der Werf, S., Enouf, V., van der Meulen, K., Van Reeth, K., Dauphin, G., Koopmans, M., and Consortium, F. (2014) Influenza at the animal-human interface: a review of the literature for virological evidence of human infection with swine or avian influenza viruses other than A(H5N1), *Eurosurveillance* 19, 20793.
- [9] Jiang, H., Wu, P., Uyeki, T. M., He, J. F., Deng, Z. H., Xu, W., Lv, Q., Zhang, J., Wu, Y., Tsang, T. K., Kang, M., Zheng, J. D., Wang, L. L., Yang, B. Y., Qin, Y., Feng, L. Z., Fang, V. J., Gao, G. F., Leung, G. M., Yu, H. J., and Cowling, B. J. (2017) Preliminary epidemiologic assessment of human infections with highly pathogenic avian influenza A(H5N6) virus, China, *Clin. Infect. Dis.* 65, 383-388.
- [10] Lai, S. J., Qin, Y., Cowling, B. J., Ren, X., Wardrop, N. A., Gilbert, M., Tsang, T. K., Wu, P., Feng, L. Z., Jiang, H., Peng, Z. B., Zheng, J. D., Liao, Q. H., Li, S., Horby, P. W., Farrar, J. J., Gao, G. F., Tatem, A. J., and Yu, H. J. (2016) Global epidemiology of

- avian influenza A H5N1 virus infection in humans, 1997-2015: a systematic review of individual case data, *Lancet Infect. Dis.* 16, E108-E118.
- [11] Pohl, M. O., Lanz, C., and Stertz, S. (2016) Late stages of the influenza A virus replication cycle—a tight interplay between virus and host, *J. Gen. Virol.* 97, 2058-2072.
- [12] Tong, S. X., Zhu, X. Y., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., Yang, H., Chen, X. F., Recuenco, S., Gomez, J., Chen, L. M., Johnson, A., Tao, Y., Dreyfus, C., Yu, W. L., McBride, R., Carney, P. J., Gilbert, A. T., Chang, J., Guo, Z., Davis, C. T., Paulson, J. C., Stevens, J., Rupprecht, C. E., Holmes, E. C., Wilson, I. A., and Donis, R. O. (2013) New world bats harbor diverse influenza A viruses, *Plos Pathog* 9, e1003119.
- [13] Shaw, M. L., Stone, K. L., Colangelo, C. M., Gulcicek, E. E., and Palese, P. (2008) Cellular proteins in influenza virus particles, *Plos Pathog* 4, e1000085.
- [14] 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.
- [15] Samji, T. (2009) Influenza A: understanding the viral life cycle, *Yale J. Biol. Med.* 82, 153-159.
- [16] Goto, H., Muramoto, Y., Noda, T., and Kawaoka, Y. (2013) The genome-packaging signal of the influenza A virus genome comprises a genome incorporation signal and a genome-bundling signal, *J. Virol.* 87, 11316-11322.
- [17] Brooke, C. B., Ince, W. L., Wrammert, J., Ahmed, R., Wilson, P. C., Bennink, J. R., and Yewdell, J. W. (2013) Most influenza A virions fail to express at least one essential viral protein, *J. Virol.* 87, 3155-3162.
- [18] Lee, N., Le Sage, V., Nanni, A. V., Snyder, D. J., Cooper, V. S., and Lakdawala, S. S. (2017) Genome-wide analysis of influenza viral RNA and nucleoprotein association, *Nucleic Acids Res.* 45, 8968-8977.
- [19] Gallagher, J. R., Torian, U., McCraw, D. M., and Harris, A. K. (2017) Structural studies of influenza virus RNPs by electron microscopy indicate molecular contortions within NP supra-structures, *J. Struct. Biol.* 197, 294-307.
- [20] 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.
- [21] Arranz, R., Coloma, R., Chichon, F. J., Conesa, J. 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.
- [22] Watanabe, T., Watanabe, S., and Kawaoka, Y. (2010) Cellular networks involved in the influenza virus life cycle, *Cell Host Microbe* 7, 427-439
- [23] Sriwilaijaroen, N., and Suzuki, Y. (2012) Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus, *P. Jpn. Acad. B-Phys.* 88, 226-249.
- [24] Jagger, B. W., Wise, H. M., Kash, J. C., Walters, K. A., Wills, N. M., Xiao, Y. L., Dunfee, R. L., Schwartzman, L. M., Ozinsky, A., Bell, G. L., Dalton, R. M., Lo, A., Efstathiou, S., Atkins, J. F., Firth, A. E., Taubenberger, J. K., and Digard, P. (2012) An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response, *Science* 337, 199-204.
- [25] Hayashi, T., MacDonald, L. A., and Takimoto, T. (2015) Influenza A virus protein PA-X contributes to viral growth and suppression of the host antiviral and immune responses, *J. Virol.* 89, 6442-6452.
- [26] Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R., and Kawaoka, Y. (2013) Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA, *J. Virol.* 87, 2455-2462.



- [27] Chutiwitoonchai, N., and Aida, Y. (2016) NXT1, a Novel influenza A NP binding protein, promotes the nuclear export of NP via a CRM1-dependent pathway, *Viruses-Basel* 8, 209-219.
- [28] Chaimayo, C., Hayashi, T., Underwood, A., Hodges, E., and Takimoto, T. (2017) Selective incorporation of vRNP into influenza A virions determined by its specific interaction with M1 protein, *Virology* 505, 23-32.
- [29] Tauber, S., Ligertwood, Y., Quigg-Nicol, M., Dutia, B. M., and Elliott, R. M. (2012) Behaviour of influenza A viruses differentially expressing segment 2 gene products in vitro and in vivo, *J. Gen. Virol.* 93, 840-849.
- [30] Selman, M., Dankar, S. K., Forbes, N. E., Jia, J. J., and Brown, E. G. (2012) Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing, *Emerg Microbes Infec* 1, e42.
- [31] Cohen, M., Zhang, X. Q., Senaati, H. P., Chen, H. W., Varki, N. M., Schooley, R. T., and Gagneux, P. (2013) Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase, *Virol J* 10, 321.
- [32] van Riel, D., Munster, V. J., de Wit, E., Rimmelzwaan, G. F., Fouchier, R. A. M., Osterhaus, A. D. M. E., and Kuiken, T. (2006) H5N1 virus attachment to lower respiratory tract, *Science* 312, 399-399.
- [33] Sikora, D., Rocheleau, L., Brown, E. G., and Pelchat, M. (2017) Influenza A virus cap-snatches host RNAs based on their abundance early after infection, *Virology* 509, 167-177.
- [34] Dubois, J., Terrier, O., and Rosa-Calatrava, M. (2014) Influenza viruses and mRNA splicing: doing more with less, *mBio* 5, e00070.
- [35] Winquist, E. B., 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.
- [36] Lakdawala, S. S., Wu, Y. C., 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, e1003971.
- [37] Rossman, J. S., Jing, X., Leser, G. P., and Lamb, R. A. (2010) Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission, *Cell* 142, 902-913.
- [38] Koutsakos, M., Nguyen, T. H., Barclay, W. S., and Kedzierska, K. (2016) Knowns and unknowns of influenza B viruses, *Future Microbiol.* 11, 119-135.
- [39] Tewawong, N., Suwannakarn, K., Prachayangprecha, S., Korkong, S., Vichiwattana, P., Vongpunsawad, S., and Poovorawan, Y. (2015) Molecular epidemiology and phylogenetic analyses of influenza B virus in Thailand during 2010 to 2014, *Plos One* 10, e0111432.
- [40] Moon, J. H., Na, J. Y., Kim, J. H., Yum, M. K., Oh, J. W., Kim, C. R., and Seol, I. J. (2013) Neurological and muscular manifestations associated with influenza B infection in children, *Pediatr. Neurol.* 49, 97-101.
- [41] Thabet, F. I., Khalil, S., Naz, F., and Dyme, I. Z. (2013) Cerebellar mutism and reversible cytotoxic edema in influenza B-associated encephalopathy, *Pediatr. Neurol.* 49, 489-492.
- [42] Wang, Q. H., Tian, X., Chen, X. R., and Ma, J. P. (2007) Structural basis for receptor specificity of influenza B virus hemagglutinin, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 16874-16879.
- [43] Narkpuk, J., Teeravechyan, S., Puthavathana, P., Jongkaewwattana, A., and Jaru-Ampornpan, P. (2017) Single nucleoprotein residue determines influenza A virus sensitivity to an intertypic suppression mechanism, *Virology* 506, 99-109.

- [44] Demers, A., Ran, Z. G., Deng, Q. J., Wang, D., Edman, B., Lu, W. X., and Li, F. (2014) Palmitoylation is required for intracellular trafficking of influenza B virus NB protein and efficient influenza B virus growth in vitro, *J. Gen. Virol.* *95*, 1211-1220.
- [45] Imai, M., Watanabe, S., Ninomiya, A., Obuchi, M., and Odagiri, T. (2004) Influenza B virus BM2 protein is a crucial component for incorporation of viral ribonucleoprotein complex into virions during virus assembly, *J. Virol.* *78*, 11007-11015.
- [46] Ran, Z. G., Shen, H. G., Lang, Y. K., Kolb, E. A., Turan, N., Zhu, L. H., Ma, J. J., Bawa, B., Liu, Q. F., Liu, H. X., Quast, M., Sexton, G., Krammer, F., Hause, B. M., Christopher-Hennings, J., Nelson, E. A., Richt, J., Li, F., and Ma, W. J. (2015) Domestic Pigs Are Susceptible to Infection with Influenza B Viruses, *J. Virol.* *89*, 4818-4826.
- [47] Nogales, A., Rodriguez-Sanchez, I., Monte, K., Lenschow, D. J., Perez, D. R., and Martinez-Sobrido, L. (2016) Replication-competent fluorescent-expressing influenza B virus, *Virus Res.* *213*, 69-81.
- [48] Matsuzaki, Y., Mizuta, K., Sugawara, K., Tsuchiya, E., Muraki, Y., Hongo, S., Suzuki, H., and Nishimura, H. (2003) Frequent reassortment among influenza C viruses, *J. Virol.* *77*, 871-881.
- [49] Su, S., Fu, X., Li, G., Kerlin, F., and Veit, M. (2017) Novel influenza D virus: epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics, *Virulence*, 1-12.
- [50] Goto, T., Shimotai, Y., Matsuzaki, Y., Muraki, Y., Sho, R., Sugawara, K., and Hongo, S. (2017) Effect of phosphorylation of CM2 protein on influenza C virus replication, *J. Virol.* *91*, e00773-17.
- [51] Kimura, H., Abiko, C., Peng, G., Muraki, Y., Sugawara, K., Hongo, S., Kitame, F., Mizuta, K., Numazaki, Y., Suzuki, H., and Nakamura, K. (1997) Interspecies transmission of influenza C virus between humans and pigs, *Virus Res.* *48*, 71-79.
- [52] Ducatez, M. F., Pelletier, C., and Meyer, G. (2015) Influenza D virus in cattle, France, 2011-2014, *Emerg. Infect. Dis.* *21*, 368-371.
- [53] Hause, B. M., Collin, E. A., Liu, R. X., Huang, B., Sheng, Z. Z., Lu, W. X., Wang, D., Nelson, E. A., and Li, F. (2014) Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the Orthomyxoviridae Family, *mBio* *5*, e00031-14.
- [54] Alame, M. M., Massaad, E., and Zaraket, H. (2016) Peramivir: A novel intravenous neuraminidase inhibitor for treatment of acute influenza infections, *Front Microbiol* *7*, 450.
- [55] Yamashita, M., Tomozawa, T., Kakuta, M., Tokumitsu, A., Nasu, H., and Kubo, S. (2009) CS-8958, a prodrug of the new neuraminidase inhibitor R-125489, shows long-acting anti-influenza virus activity, *Antimicrob. Agents. Ch.* *53*, 186-192.
- [56] Vavricka, C. J., Li, Q., Wu, Y., Qi, J. X., Wang, M. Y., Liu, Y., Gao, F., Liu, J., Feng, E. G., He, J. H., Wang, J. F., Liu, H., Jiang, H. L., and Gao, G. F. (2011) Structural and functional analysis of laninamivir and its octanoate prodrug reveals group specific mechanisms for influenza NA inhibition, *Plos Pathog* *7*, e1002249.
- [57] Leyva-Grado, V. H., and Palese, P. (2017) Aerosol administration increases the efficacy of oseltamivir for the treatment of mice infected with influenza viruses, *Antivir. Res.* *142*, 12-15.
- [58] Lin, Z. F., Li, Y. H., Guo, M., Xiao, M. S., Wang, C. B., Zhao, M. Q., Xu, T. T., Xia, Y., and Zhu, B. (2017) Inhibition of H1N1 influenza virus by selenium nanoparticles loaded with zanamivir through p38 and JNK signaling pathways, *RSC. Adv.* *7*, 35290-35296.

- [59] Dholakia, D., Goyal, S., Jamal, S., Singh, A., Das, A., and Grover, A. (2016) Molecular modeling and lead design of substituted zanamivir derivatives as potent anti-influenza drugs, *BMC Bioinformatics* 17, 240-295.
- [60] Marty, F. M., Vidal-Puigserver, J., Clark, C., Gupta, S. K., Merino, E., Garot, D., Chapman, M. J., Jacobs, F., Rodriguez-Noriega, E., Husa, P., Shortino, D., Watson, H. A., Yates, P. J., and Peppercorn, A. F. (2017) Intravenous zanamivir or oral oseltamivir for hospitalised patients with influenza: an international, randomised, double-blind, double-dummy, phase 3 trial, *Lancet Resp. Med.* 5, 135-146.
- [61] Ma, C. L., Zhang, J. T., and Wang, J. (2016) Pharmacological characterization of the spectrum of antiviral activity and genetic barrier to drug resistance of M2-S31N channel blockers, *Mol. Pharmacol.* 90, 188-198.
- [62] Bright, R. A., Medina, M. J., Xu, X. Y., Perez-Oronoz, G., Wallis, T. R., Davis, X. H. M., Povinelli, L., Cox, N. J., and Klimov, A. I. (2005) Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern, *Lancet* 366, 1175-1181.
- [63] Dawood, F. S., Jain, S., Finelli, L., Shaw, M. W., Lindstrom, S., Garten, R. J., Gubareva, L. V., Xu, X. Y., Bridges, C. B., and Uyeki, T. M. (2009) Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans novel swine-origin influenza A (H1N1) virus investigation team, *New Engl. J. Med.* 360, 2605-2615.
- [64] Hsieh, N. H., Lin, Y. J., Yang, Y. F., and Liao, C. M. (2017) Assessing the oseltamivir-induced resistance risk and implications for influenza infection control strategies, *Infect. Drug. Resist.* 10, 215-226.
- [65] Morita, M., Kuba, K., Ichikawa, A., Nakayama, M., Katahira, J., Iwamoto, R., Watanebe, T., Sakabe, S., Daidoji, T., Nakamura, S., Kadowaki, A., Ohto, T., Nakanishi, H., Taguchi, R., Nakaya, T., Murakami, M., Yoneda, Y., Arai, H., Kawaoka, Y., Penninger, J. M., Arita, M., and Imai, Y. (2013) The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza, *Cell* 153, 112-125.
- [66] Karlas, A., Machuy, N., Shin, Y., Pleissner, K. P., Artarini, A., Heuer, D., Becker, D., Khalil, H., Ogilvie, L. A., Hess, S., Maurer, A. P., Muller, E., Wolff, T., Rudel, T., and Meyer, T. F. (2010) Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication, *Nature* 463, 818-U132.
- [67] Shoji, M., Woo, S. Y., Masuda, A., Win, N. N., Ngwe, H., Takahashi, E., Kido, H., Morita, H., Ito, T., and Kuzuhara, T. (2017) Anti-influenza virus activity of extracts from the stems of *Jatropha multifida* Linn. collected in Myanmar, *BMC Complem. Altern. M* 17, 96.
- [68] Yadavalli, T., and Shukla, D. (2017) Role of metal and metal oxide nanoparticles as diagnostic and therapeutic tools for highly prevalent viral infections, *Nanomed. Nanotechnol.* 13, 219-230.
- [69] Lin, Z. F., Li, Y. H., Guo, M., Xu, T. T., Wang, C. B., Zhao, M. Q., Wang, H. Z., Chen, T. F., and Zhu, B. (2017) The inhibition of H1N1 influenza virus-induced apoptosis by silver nanoparticles functionalized with zanamivir, *RSC Adv.* 7, 742-750.
- [70] 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.
- [71] Sametband, M., Shukla, S., Meningher, T., Hirsh, S., Mendelson, E., Sarid, R., Gedanken, A., and Mandelboim, M. (2011) Effective multi-strain inhibition of influenza virus by anionic gold nanoparticles, *MedChemComm* 2, 421-423.
- [72] Juliano, R. L. (2016) The delivery of therapeutic oligonucleotides, *Nucleic Acids Res.* 44, 6518-6548.
- [73] Kabanov, A. V., Vinogradov, S. V., Ovcharenko, A. V., Krivonos, A. V., Meliknubarov, N. S., Kiselev, V. I., and Severin, E. S. (1990) A new class of antivirals antisense

- oligonucleotides combined with a hydrophobic substituent effectively inhibit influenza-virus reproduction and synthesis of virus-specific proteins in MDCK cells, *FEBS Lett.* 259, 327-330.
- [74] Mizuta, T., Fujiwara, M., Abe, T., Miyano-Kurosaki, N., Yokota, T., Shigeta, S., and Takaku, H. (2000) Inhibitory effects of an antisense oligonucleotide in an experimentally infected mouse model of influenza A virus, *Biochem. Bioph. Res. Comm.* 279, 158-161.
- [75] Martelli, F., Salata, C., Calistri, A., Parolin, C., Azzi, A., Palu, G., and Giannecchini, S. (2015) Small RNAs targeting the 5' end of the viral polymerase gene segments specifically interfere with influenza type A virus replication, *J. Biotechnol.* 210, 85-90.
- [76] Lenartowicz, E., Nogales, A., Kierzek, E., Kierzek, R., Martinez-Sobrido, L., and Turner, D. H. (2016) Antisense oligonucleotides targeting influenza A segment 8 genomic RNA inhibit viral replication, *Nucleic Acid Ther.* 26, 277-285.
- [77] Soszynska-Jozwiak, M., Michalak, P., Moss, W. N., Kierzek, R., and Kierzek, E. (2015) A conserved secondary structural element in the coding region of the influenza A virus nucleoprotein (NP) mRNA is important for the regulation of viral proliferation, *Plos One* 10, e0141132.
- [78] Wu, Y. H., Zhang, G. Z., 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. Bioph. Res. Comm.* 365, 369-374.
- [79] Beigel, J. H., Voell, J., Muñoz, P., Kumar, P., Brooks, K. M., Zhang, J., Iversen, P., Heald, A., Wong, M., and Davey, R. T. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of radavirsen (AVI-7100), an antisense oligonucleotide targeting influenza A M1/M2 translation, *Brith. J. Clinical Pharm.* bcp13405.
- [80] Dowdy, S. F. (2017) Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics, *Nat. Biotechnol* 35, 222-229.
- [81] Bennett, C. F., Baker, B. F., Pham, N., Swayze, E., and Geary, R. S. (2017) Pharmacology of antisense drugs, *Annu. Rev. Pharmacol.* 57, 81-105.
- [82] Takahashi, M., Contu, V. R., Kabuta, C., Hase, K., Fujiwara, Y., Wada, K., and Kabuta, T. (2017) SIDT2 mediates gymnosis, the uptake of naked single-stranded oligonucleotides into living cells, *RNA Biol*, 1-10.
- [83] Chan, J. H. P., Lim, S. H., and Wong, W. S. F. (2006) Antisense oligonucleotides: From design to therapeutic application, *Clin. Exp. Pharmacol. P* 33, 533-540.
- [84] Stein, C. A., Hansen, J. B., Lai, J., Wu, S. J., Voskresenskiy, A., Hog, A., Worm, J., Hedtjarn, M., Souleimanian, N., Miller, P., Soifer, H. S., Castanotto, D., Benimetskaya, L., Orum, H., and Koch, T. (2010) Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents, *Nucleic Acids Res.* 38, e3.
- [85] Sharma, V. K., Rungta, P., and Prasad, A. K. (2014) Nucleic acid therapeutics: basic concepts and recent developments, *Rsc Adv* 4, 16618-16631.
- [86] Levin, A. A. (2017) Targeting Therapeutic Oligonucleotides, *New Engl. J. Med.* 376, 86-88.
- [87] Laube, B. L. (2014) The expanding role of aerosols in systemic drug delivery, gene therapy and vaccination: an update, *Transl. Respiratory Med.* 2, 3.
- [88] Kjemis, J., and Howard, K. A. (2012) Oligonucleotide delivery to the lung: waiting to inhale, *Mol. Ther-Nucl. Acids* 1, e1.
- [89] Moschos, S. A., Frick, M., Taylor, B., Turnpenny, P., Graves, H., Spink, K. G., Brady, K., Lamb, D., Collins, D., Rockel, T. D., Weber, M., Lazari, O., Perez-Tosar, L., Fancy, S. A., Laphorn, C., Green, M. X., Evans, S., Selby, M., Jones, G., Jones, L.,

- Kearney, S., Mechiche, H., Gikunju, D., Subramanian, R., Uhlmann, E., Jurk, M., Vollmer, J., Ciaramella, G., and Yeadon, M. (2011) Uptake, efficacy, and systemic distribution of naked, inhaled short interfering RNA (siRNA) and locked Nucleic acid (LNA) antisense, *Mol. Ther.* *19*, 2163-2168.
- [90] Lorenz, P., Misteli, T., Baker, B. F., Bennett, C. F., and Spector, D. L. (2000) Nucleocytoplasmic shuttling: a novel in vivo property of antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides, *Nucleic Acids Res.* *28*, 582-592.
- [91] Influenza at the human-animal interface. Summary and assessment 25 July 2017 to 27 September 2017, pp 1-8, World Health Organization (WHO).
- [92] Questions and Answers. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the southern hemisphere 2018 influenza season and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness, In *WHO Global Influenza Programme*, pp 1-6, World Health Organization (WHO).
- [93] Kosoy, O. I., Lambert, A. J., Hawkinson, D. J., Pastula, D. M., Goldsmith, C. S., Hunt, D. C., and Staples, J. E. (2015) Novel thogotovirus associated with febrile illness and death, United States, 2014, *Emerg. Infect. Dis.* *21*, 760-764.
- [94] Moore, D. L., Causey, O. R., Carey, D. E., Reddy, S., Cooke, A. R., Akinkugbe, F. M., Davidwest, T. S., and Kemp, G. E. (1975) Arthropod-borne viral-infections of man in Nigeria, 1964-1970, *Ann. Trop. Med. Parasit.* *69*, 49-64.
- [95] Peng, R. C., Zhang, S. J., Cui, Y. Z., Shi, Y., Gao, G. F., and Qi, J. X. (2017) Structures of human-infecting Thogotovirus fusogens support a common ancestor with insect baculovirus, *P. Natl. Acad. Sci. USA* *114*, E8905-E8912.
- [96] Yoshii, K., Okamoto, N., Nakao, R., Hofstetter, R. K., Yabu, T., Masumoto, H., Someya, A., Kariwa, H., and Maeda, A. (2015) Isolation of the thogoto virus from a haemaphysalis longicornis in Kyoto City, Japan, *J. Gen. Virol.* *96*, 2099-2103.
- [97] Li, G. Y., Wang, N., Guzman, H., Sbrana, E., Yoshikawa, T., Tseng, C. T., Tesh, R. B., and Xiao, S. Y. (2008) Dhori virus (Orthomyxoviridae, Thogotovirus) infection of mice produces a disease and cytokine response pattern similar to that of highly virulent influenza A (H5N1) virus infection in humans, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *78*, 675-680.
- [98] Presti, R. M., Zhao, G. Y., Beatty, W. L., Mihindukulasuriya, K. A., da Rosa, A. P. A. T., Popov, V. L., Tesh, R. B., Virgin, H. W., and Wang, D. (2009) Quarantfil, Johnston Atoll, and Lake Chad viruses are novel members of the family orthomyxoviridae, *J. Virol.* *83*, 11599-11606.
- [99] Shearn-Bochsler, V., Ip, H. S., Ballmann, A., Hall, J. S., Allison, A. B., Ballard, J., Ellis, J. C., Cook, R., Gibbs, S. E. J., and Dwyer, C. (2017) Experimental infection of common eider ducklings with Wellfleet Bay virus, a newly characterized orthomyxovirus, *Emerg. Infect. Dis.* *23*, 1958-1965.
- [100] Kessell, A., Hyatt, A., Lehmann, D., Shan, S. H., Crameri, S., Holmes, C., Marsh, G., Williams, C., Tachedjian, M., Yu, M., Bingham, J., Payne, J., Lowther, S., Wang, J. N., Wang, L. F., and Smith, I. (2012) Cygnet River Virus, a novel orthomyxovirus from ducks, Australia, *Emerg. Infect. Dis.* *18*, 2044-2045.
- [101] Zeller, H. G., Karabatsos, N., Calisher, C. H., Digoutte, J. P., Murphy, F. A., and Shope, R. E. (1989) Electron-microscopy and antigenic studies of uncharacterized viruses 1. Evidence suggesting the placement of viruses in families arenaviridae, paramyxoviridae, or poxviridae, *Arch. Virol.* *108*, 191-209.
- [102] Cottet, L., Rivas-Aravena, A., Cortez-San Martin, M., Sandino, A. M., and Spencer, E. (2011) Infectious salmon anemia virus-genetics and pathogenesis, *Virus Res.* *155*, 10-19.

- [103] Eliassen, T. M., Froystad, M. K., Dannevig, B. H., Jankowska, M., Brech, A., Falk, K., Romoren, K., and Gjoen, T. (2000) Initial events in infectious salmon anemia virus infection: evidence for the requirement of a low-pH step, *J. Virol.* 74, 218-227.
- [104] Toennesen, R., Lauscher, A., and Rimstad, E. (2009) Comparative aspects of infectious salmon anemia virus, an orthomyxovirus of fish, to influenza viruses, *Indian J. Microbiol.* 49, 308-314.
- [105] Zhang, W. T., Cai, C. Z., Lin, L., Tao, Y. J., and Jin, M. L. (2017) Subcellular localization and interactions of infectious salmon anemia virus (ISAV) M1 and NEP as well as host Hsc70, *Virol. J.* 14, 30.
- [106] Caruffo, M., Maturana, C., Kambalapally, S., Larenas, J., and Tobar, J. A. (2016) Protective oral vaccination against infectious salmon anaemia virus in *Salmo salar*, *Fish Shellfish Immun.* 54, 54-59.
- [107] Kibenge, F. S. B., Kibenge, M. J. T., Groman, D., and McGeachy, S. (2006) In vivo correlates of infectious salmon anemia virus pathogenesis in fish, *J. Gen. Virol.* 87, 2645-2652.
- [108] Nylund, A., Hovland, T., Hodneland, K., Nilsen, F., and Lovik, P. (1994) Mechanisms for transmission of infectious salmon anemia (ISA), *Dis. Aquat. Organ.* 19, 95-100.
- [109] Cipriano, R. C. (2009) Antibody against infectious salmon anaemia virus among feral atlantic salmon (*Salmo salar*), *ICES J. Mar. Sci.* 66, 865-870.
- [110] (2011) Infectious salmon anemia. Hemorrhagic kidney syndrome., pp 1-7, The Center for Food Security & Public Health Iowa State University and Institute for International Cooperation in Animal Biologics Iowa State University College of Veterinary Medicine, Ames, Iowa.
- [111] Contreras-Gutierrez, M. A., Nunes, M. R. T., Guzman, H., Uribe, S., Gomez, J. C. G., Vasco, J. D. S., Cardoso, J. F., Popov, V. L., Widen, S. G., Wood, T. G., Vasilakis, N., and Tesh, R. B. (2017) Sinu virus, a novel and divergent orthomyxovirus related to members of the genus Thogotovirus isolated from mosquitoes in Colombia, *Virology* 501, 166-175.
- [112] Gulyaev, A. P., Fouchier, R. A. M., and Olsthoorn, R. C. L. (2010) Influenza virus RNA structure: unique and common features, *Inter. Rev. Immunol.* 29, 533-556.
- [113] Wang, J. F., Li, J. H., Zhao, L. L., Cao, M. M., and Deng, T. (2017) Dual roles of the hemagglutinin segment-specific noncoding nucleotides in the extended duplex region of the influenza A virus RNA promoter, *J. Virol.* 91, e01931-16.
- [114] Flick, R., and Hobom, G. (1999) Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew' conformation, *J. Gen. Virol.* 80, 2565-2572.
- [115] Cheong, H. K., Cheong, C., Lee, Y. S., Seong, B. L., and Choi, B. S. (1999) Structure of influenza virus panhandle RNA studied by NMR spectroscopy and molecular modeling, *Nucleic Acids Res.* 27, 1392-1397.
- [116] Fodor, E., Pritlove, D. C., and Brownlee, G. G. (1995) Characterization of the RNA-fork model of virion RNA in the initiation of transcription in influenza A virus, *J. Virol.* 69, 4012-4019.
- [117] Ruzkowska, A., Lenartowicz, E., Moss, W. N., Kierzek, R., and Kierzek, E. (2016) Secondary structure model of the naked segment 7 influenza A virus genomic RNA, *Biochem. J.* 473, 4327-4348.
- [118] Lenartowicz, E., Kesy, J., Ruzkowska, A., Soszynska-Jozwiak, M., Michalak, P., Moss, W. N., Turner, D. H., Kierzek, R., and Kierzek, E. (2016) Self-folding of naked segment 8 genomic RNA of influenza A virus, *Plos One* 11, e0148281.
- [119] 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, 353-357.

- [120] Pflug, A., Lukarska, M., Resa-Infante, P., Reich, S., and Cusack, S. (2017) Structural insights into RNA synthesis by the influenza virus transcription-replication machine, *Virus Res.* 234, 103-117.
- [121] Poon, L. L. M., Pritlove, D. C., Fodor, E., and Brownlee, G. G. (1999) Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template, *J. Virol.* 73, 3473-3476.
- [122] Reich, S., Guilligay, D., Pflug, A., Malet, H., Berger, I., Crepin, T., Hart, D., Lunardi, T., Nanao, M., Ruigrok, R. W. H., and Cusack, S. (2014) Structural insight into cap-snatching and RNA synthesis by influenza polymerase, *Nature* 516, 361-366.
- [123] Flick, R., and Hobom, G. (1999) Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew' conformation, *J. Gen. Virol.* 80, 2565-2572.
- [124] Dawson, W. K., Lazniewski, M., and Plewczynski, D. (2017) RNA structure interactions and ribonucleoprotein processes of the influenza A virus, *Brief. Funct. Genomics*, 1-13.
- [125] Kobayashi, Y., Dadonaite, B., van Doremalen, N., Suzuki, Y., Barclay, W. S., and Pybus, O. G. (2016) Computational and molecular analysis of conserved influenza A virus RNA secondary structures involved in infectious virion production, *RNA Biol* 13, 883-894.
- [126] Geis, M., Flamm, C., Wolfinger, M. T., Tanzer, A., Hofacker, I. L., Middendorf, M., Mandl, C., Stadler, P. F., and Thurner, C. (2008) Folding kinetics of large RNAs, *J. Mol. Biol.* 379, 160-173.
- [127] Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Res.* 31, 3406-3415.
- [128] Perriquet, O., Touzet, H., and Dauchet, M. (2003) Finding the common structure shared by two homologous RNAs, *Bioinformatics* 19, 108-116.
- [129] Touzet, H., and Perriquet, O. (2004) CARNAC: folding families of related RNAs, *Nucleic Acids Res.* 32, W142-W145.
- [130] Hamada, M., Sato, K., and Asai, K. (2011) Improving the accuracy of predicting secondary structure for aligned RNA sequences, *Nucleic Acids Res.* 39, 393-402.
- [131] Bernhart, S. H., Hofacker, I. L., Will, S., Gruber, A. R., and Stadler, P. F. (2008) RNAalifold: improved consensus structure prediction for RNA alignments, *BMC Bioinformatics* 9, 474.
- [132] Ge, P., and Zhang, S. J. (2013) Incorporating phylogenetic-based covarying mutations into RNAalifold for RNA consensus structure prediction, *BMC Bioinformatics* 14, 142.
- [133] Knudsen, B., and Hein, J. (2003) Pfold: RNA secondary structure prediction using stochastic context-free grammars, *Nucleic Acids Res.* 31, 3423-3428.
- [134] Sükösd, Z., Knudsen, B., Kjems, J., and Pedersen, C. N. S. (2012) PPfold 3.0: fast RNA secondary structure prediction using phylogeny and auxiliary data, *Bioinformatics* 28, 2691-2692.
- [135] Mathews, D. H., and Turner, D. H. (2002) Dynalign: An algorithm for finding the secondary structure common to two RNA sequences, *J. Mol. Biol.* 317, 191-203.
- [136] Seemann, S. E., Menzel, P., Backofen, R., and Gorodkin, J. (2011) The PETfold and PETcofold web servers for intra- and intermolecular structures of multiple RNA sequences, *Nucleic Acids Res.* 39, W107-W111.
- [137] Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R., and Hofacker, I. L. (2008) The Vienna RNA websuite, *Nucleic Acids Res.* 36, W70-W74.
- [138] Kierzek, E., Mathews, D. H., Ciesielska, A., Turner, D. H., and Kierzek, R. (2006) Nearest neighbor parameters for Watson–Crick complementary heteroduplexes

- formed between 2'-O-methyl RNA and RNA oligonucleotides, *Nucleic Acids Res.* *34*, 3609-3614.
- [139] Xia, T., SantaLucia, J., Burkard, M. E., Kierzek, R., Schroeder, S. J., Jiao, X., 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.
- [140] Mathews, D. H. (2002) RNA secondary structure analysis using RNAstructure, In *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, Inc., unit 12.6.
- [141] Schroeder, S. J. (2009) Advances in RNA structure prediction from sequence: new tools for generating hypotheses about viral RNA structure-function relationships, *J. Virol.* *83*, 6326-6334.
- [142] Ren, J. H., Rastegari, B., Condon, A., and Hoos, H. H. (2005) HotKnots: Heuristic prediction of RNA secondary structures including pseudoknots, *RNA* *11*, 1494-1504.
- [143] Sato, K., Kato, Y., Hamada, M., Akutsu, T., and Asai, K. (2011) IPknot: fast and accurate prediction of RNA secondary structures with pseudoknots using integer programming, *Bioinformatics* *27*, I85-I93.
- [144] Bon, M., Micheletti, C., and Orland, H. (2013) McGenus: a Monte Carlo algorithm to predict RNA secondary structures with pseudoknots, *Nucleic Acids Res.* *41*, 1895-1900.
- [145] Bellaousov, S., and Mathews, D. H. (2010) ProbKnot: Fast prediction of RNA secondary structure including pseudoknots, *RNA* *16*, 1870-1880.
- [146] Jonikas, M. A., Radmer, R. J., Laederach, A., Das, R., Pearlman, S., Herschlag, D., and Altman, R. B. (2009) Coarse-grained modeling of large RNA molecules with knowledge-based potentials and structural filters, *RNA* *15*, 189-199.
- [147] Krokhotin, A., Houlihan, K., and Dokholyan, N. V. (2015) iFoldRNA v2: folding RNA with constraints, *Bioinformatics* *31*, 2891-2893.
- [148] 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.
- [149] Rother, M., Rother, K., Puton, T., and Bujnicki, J. M. (2011) ModeRNA: a tool for comparative modeling of RNA 3D structure, *Nucleic Acids Res.* *39*, 4007-4022.
- [150] Rother, M., Milanowska, K., Puton, T., Jeleniewicz, J., Rother, K., and Bujnicki, J. M. (2011) ModeRNA server: an online tool for modeling RNA 3D structures, *Bioinformatics* *27*, 2441-2442.
- [151] Parisien, M., and Major, F. (2008) The MC-Fold and MC-Sym pipeline infers RNA structure from sequence data, *Nature* *452*, 51.
- [152] Cheng, C. Y., Chou, F.-C., and Das, R. (2015) Chapter Two-Modeling complex RNA tertiary folds with Rosetta, In *Methods in Enzymology* (Chen, S.-J., and Burke-Aguero, D. H., Eds.), pp 35-64, Academic Press.
- [153] Biesiada, M., Purzycka, K. J., Szachniuk, M., Blazewicz, J., and Adamiak, R. W. (2016) Automated RNA 3D Structure Prediction with RNAComposer, In *RNA Structure Determination: Methods and Protocols* (Turner, D. H., and Mathews, D. H., Eds.), pp 199-215, Springer New York, New York, NY.
- [154] Popena, M., Szachniuk, M., Antczak, M., Purzycka, K. J., Lukasiak, P., Bartol, N., Blazewicz, J., and Adamiak, R. W. (2012) Automated 3D structure composition for large RNAs, *Nucleic Acids Res.* *40*, e112.
- [155] Low, J. T., and Weeks, K. M. (2010) SHAPE-directed RNA secondary structure prediction, *Methods* *52*, 150-158.



- [156] Talkish, J., May, G., Lin, Y. Z., Woolford, J. L., and McManus, C. J. (2014) Mod-seq: high-throughput sequencing for chemical probing of RNA structure, *RNA* 20, 713-720.
- [157] Tijerina, P., Mohr, S., and Russell, R. (2007) DMS footprinting of structured RNAs and RNA-protein complexes, *Nature Prot.* 2, 2608-2623.
- [158] Gopinath, S. C. B. (2009) Mapping of RNA-protein interactions, *Anal. Chim. Acta* 636, 117-128.
- [159] Ziehler, W. A., and Engelke, D. R. (2001) Probing RNA Structure with Chemical Reagents and Enzymes, *Current protocols in nucleic acid chemistry/edited by Serge L. Beaucage*, Unit-6.1.
- [160] Vasa, S. M., Guex, N., Wilkinson, K. A., Weeks, K. M., and Giddings, M. C. (2008) ShapeFinder: A software system for high-throughput quantitative analysis of nucleic acid reactivity information resolved by capillary electrophoresis, *RNA* 14, 1979-1990.
- [161] 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.
- [162] Kanaya, E., and Kanaya, S. (1995) Kinetic analysis of Escherichia coli ribonuclease HI using oligomeric DNA/RNA substrates suggests an alternative mechanism for the interaction between the enzyme and the substrate, *Eur. J. Biochem.* 231, 557-562.
- [163] Martinez-Sobrido, L., Cadagan, R., Steel, J., Basler, C. F., Palese, P., Moran, T. M., and Garcia-Sastre, A. (2010) Hemagglutinin-pseudotyped green fluorescent protein-expressing influenza viruses for the detection of influenza virus neutralizing antibodies, *J. Virol.* 84, 2157-2163.
- [164] Nogales, A., Baker, S. F., Domm, W., and Martinez-Sobrido, L. (2016) Development and applications of single-cycle infectious influenza A virus (sciIAV), *Virus. Res.* 216, 26-40.
- [165] Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- [166] Portela, A. n., and Digard, P. (2002) The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication, *J. Gen. Virol.* 83, 723-734.
- [167] Desselberger, U., Racaniello, V. R., Zazra, J. J., and Palese, P. (1980) 3'-Terminal and 5'-terminal sequences of influenza-A, influenza-B and influenza-C virus-RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity, *Gene* 8, 315-328.
- [168] 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 Ch.* 50, 3724-3733.
- [169] 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.
- [170] Levina, A. S., Repkova, M. N., Mazurkova, N. A., Makarevich, E. V., Ismagilov, Z. R., and Zarytova, V. F. (2015) Knockdown of different influenza A virus subtypes in cell culture by a single antisense oligodeoxyribonucleotide, *Inter. J. Antimicrobial. Agents* 46, 125-128.

- [171] Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K.-i., and Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform, *Nucleic Acids Res.* *30*, 3059-3066.
- [172] Gavazzi, C., Yver, M., Isel, C., Smyth, R. P., Rosa-Calatrava, M., Lina, B., Moulès, V., and Marquet, R. (2013) A functional sequence-specific interaction between influenza A virus genomic RNA segments, *P. Natl. Acad. Sci. USA* *110*, 16604-16609.
- [173] Gultyaev, A. P., Tsyganov-Bodounov, A., Spronken, M. I. J., van der Kooij, S., Fouchier, R. A. M., and Olsthoorn, R. C. L. (2014) RNA structural constraints in the evolution of the influenza A virus genome NP segment, *RNA Biol* *11*, 942-952.
- [174] Brierley, I., Pennell, S., and Gilbert, R. J. C. (2007) Viral RNA pseudoknots: versatile motifs in gene expression and replication, *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 598-610.
- [175] Dela-Moss, L. I., Moss, W. N., and Turner, D. H. (2014) Identification of conserved RNA secondary structures at influenza B and C splice sites reveals similarities and differences between influenza A, B, and C, *BMC Res. Notes* *7*, 22.
- [176] Moss, W. N., Dela-Moss, L. I., Kierzek, E., Kierzek, R., Priore, S. F., and Turner, D. H. (2012) The 3'-splice site of influenza A segment 7 mRNA can exist in two conformations: a pseudoknot and a hairpin, *Plos One* *7*, e38323.
- [177] Pleschka, S., Ludwig, S., Planz, O., and Wolff, T. (2009) Signaling pathways induced by influenza viruses, In *RNA viruses* (Yang, D., Ed.), pp 109-129, World Scientific.
- [178] Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* *162*, 156-159.
- [179] OligoAnalyzer 3.1 Tool, Integrated DNA Technologies