Struktura drugorzędowa piątego segmentu vRNA wirusa grypy typu A i jej wykorzystanie w projektowaniu antysensowych oligonukleotydów

Paula Michalak

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 hybrydyzacyjne 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 wykonano na modyfikowanej linii komórkowej MDCK-HA oraz wirusie sciIAV 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 μM) 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.