

INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK W POZNANIU

Julita Piasecka

**INHIBICJA NAMNAŻANIA WIRUSA GRYPY TYPU A
Z ZASTOSOWANIEM STRATEGII NACELOWANYCH
NA RNA**

Praca doktorska została wykonana
w Zakładzie Genomiki Strukturalnej RNA

Promotor: prof. dr hab. Elżbieta Kierzek

POZNAŃ 2019

Składam serdeczne podziękowania wszystkim osobom, dzięki którym powstała niniejsza praca.

SPIS TREŚCI

CEL PRACY	6
STRESZCZENIE.....	8
ABSTRACT.....	10
WSTĘP LITERATUROWY	12
1. WPROWADZENIE	12
2. ROLA STRUKTURY RNA W CYKLU REPLIKACYJNYM WIRUSA GRYPY	16
3. STRATEGIE HAMOWANIA NAMNAŻANIA WIRUSÓW RNA OPARTE NA KWASACH NUKLEINOWYCH.....	26
3.1 <i>Antysensowe oligonukleotydy (ASO)</i>	27
3.2 <i>PNA formujące trypleksy</i>	30
3.3 <i>siRNA</i>	34
3.4 <i>Katalityczne kwasy nukleinowe</i>	37
3.5 <i>Aptamery</i>	40
3.6 <i>CRISPR</i>	41
WYNIKI I DYSKUSJA.....	44
1. PNA JAKO INHIBITORY NAMNAŻANIA WIRUSA GRYPY	44
1.1 <i>Projektowanie PNA</i>	44
1.2 <i>Charakterystyka tworzenia trypleksów</i>	48
1.3 <i>Wiązanie IR-1b-cf do segmentów RNA wirusa grypy oraz DNA</i>	56
1.4 <i>Przenikanie koniugatów PNA-neamina do komórek</i>	58
1.5 <i>Inhibicja namnażania wirusa grypy przez PNA</i>	59
2. siRNA JAKO INHIBITORY NAMNAŻANIA WIRUSA GRYPY	68
2.1 <i>Projektowanie siRNA i ASO nakierowanych na mRNA segmentu 5</i>	69
2.2 <i>Potencjał inhibitorowy niemodyfikowanych siRNA</i>	75
2.3 <i>Analiza konserwatywnych motywów struktury drugorzędowej jako celu dla strategii RNAi</i>	78
2.4 <i>Projektowanie modyfikowanych siRNA</i>	82
2.5 <i>Przeciwwirusowe właściwości modyfikowanych siRNA nakierowanych na rejony 183-201, 471-489 i 613-631 mRNA5</i>	83
2.6 <i>Region 613-631 jako cel dla interferencji DNA</i>	92
2.7 <i>Antysensowe oligonukleotydy celujące w rejon 613-631 i 682-700</i>	93
2.8 <i>Określenie cytotoksyczności wybranych siRNA o wysokim potencjale przeciwwirusowym</i>	94
2.9 <i>Ocena stabilności wybranych siRNA w surowicy</i>	95
2.10 <i>Rodzaj i rozmieszczenie modyfikacji siRNA wpływają na stabilność w surowicy</i>	96
3. RYBOZYMY JAKO INHIBITORY NAMNAŻANIA WIRUSA GRYPY	98
3.1 <i>Projektowanie rybozymów typu hammerhead</i>	99
3.2 <i>Porównanie stabilności rybozymu modyfikowanego i niemodyfikowanego w surowicy</i>	104
3.3 <i>Analiza zdolności cięcia RNA przez rybozomy w warunkach in vitro</i>	104
3.4 <i>Inhibicja wirusa grypy z użyciem rybozymów</i>	107

PODSUMOWANIE	111
MATERIAŁY I METODY	117
1. MATERIAŁY	117
1.2 <i>Oligonukleotydy</i>	<i>117</i>
1.3 <i>Plazmidy.....</i>	<i>118</i>
1.4 <i>Komercyjnie dostępne zestawy</i>	<i>118</i>
1.5 <i>Enzymy.....</i>	<i>118</i>
1.6 <i>Izotop promieniotwórczy.....</i>	<i>119</i>
1.7 <i>Barwniki fluorescencyjne.....</i>	<i>119</i>
1.8 <i>Wzorce wielkości.....</i>	<i>119</i>
1.9 <i>Przeciwciała.....</i>	<i>119</i>
1.10 <i>Odczynniki i roztwory</i>	<i>119</i>
1.11 <i>Bufory.....</i>	<i>119</i>
1.12 <i>Linia komórkowa</i>	<i>120</i>
1.13 <i>Szczep wirusa grypy.....</i>	<i>120</i>
1.14 <i>Media</i>	<i>121</i>
2. METODY	122
2.1 <i>Synteza oligonukleotydów</i>	<i>122</i>
2.2 <i>Synteza PNA.....</i>	<i>122</i>
2.3 <i>Odblokowanie oligonukleotydów DNA, modyfikowanych oligonukleotydów 2'OMe-RNA i 2'OMe-RNA-LNA</i>	<i>122</i>
2.4 <i>Odblokowanie oligonukleotydów RNA i częściowo modyfikowanych RNA</i>	<i>122</i>
2.5 <i>Znakowanie sondy typu TaqMan barwnikiem fluorescencyjnym</i>	<i>123</i>
2.6 <i>Chromatografia cienkowarstwowa (TLC).....</i>	<i>123</i>
2.7 <i>Spektrometria mas</i>	<i>123</i>
2.8 <i>Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących</i>	<i>124</i>
2.9 <i>Elucja kwasów nukleinowych z żeli poliakrylamidowych.....</i>	<i>124</i>
2.10 <i>Strącanie kwasów nukleinowych.....</i>	<i>124</i>
2.11 <i>Określenie stężenia oligonukleotydów.....</i>	<i>124</i>
2.12 <i>Znakowanie końca 5' RNA radioizotopem [γ-³²P]ATP</i>	<i>124</i>
2.13 <i>Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach agarozowych.....</i>	<i>125</i>
2.14 <i>Hodowla komórek MDCK.....</i>	<i>125</i>
2.15 <i>Propagacja wirusa i przygotowanie stężonych roztworów wirusa.....</i>	<i>125</i>
2.16 <i>Test lysinkowy</i>	<i>126</i>
2.17 <i>Transfekcja siRNA i oligonukleotydów</i>	<i>126</i>
2.18 <i>Infekcja hodowli komórkowej wirusem grypy.....</i>	<i>126</i>
2.19 <i>Testy PNA w hodowli komórkowej</i>	<i>127</i>
2.20 <i>Test immunofluorescencji pośredniej (IFA).....</i>	<i>127</i>
2.21 <i>Izolacja całkowitego RNA.....</i>	<i>128</i>
2.22 <i>Enzymatyczna degradacja DNA</i>	<i>128</i>
2.23 <i>Odwrotna transkrypcja</i>	<i>128</i>
2.24 <i>PCR w czasie rzeczywistym</i>	<i>128</i>
2.25 <i>Przygotowanie standardów do analizy PCR w czasie rzeczywistym</i>	<i>129</i>
2.26 <i>Transkrypcja in vitro.....</i>	<i>129</i>

2.27	<i>Otrzymywanie matrycy do transkrypcji in vitro pełnej długości segmentów (+)RNA5, vRNA5, vRNA7 i vRNA8.....</i>	130
2.28	<i>Otrzymywanie DNA segmentu 5</i>	130
2.29	<i>Otrzymywanie matrycy do transkrypcji in vitro motywu M1.....</i>	131
2.30	<i>Test cytotoksyczności</i>	131
2.31	<i>Test stabilności w surowicy</i>	131
2.32	<i>Analiza kinetyczna trypleksów PNA z zastosowaniem rozdziału w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących.....</i>	132
2.33	<i>Analiza oddziaływań PNA znakowanego karboksyfluoresceiną z długimi cząsteczkami RNA i DNA z zastosowaniem elektroforezy w żelu agarozowym</i>	132
2.34	<i>Mikroskopia konfokalna.....</i>	133
2.35	<i>Inkubacja (+)RNA5 w obecności rybozymów w warunkach in vitro.....</i>	133
2.36	<i>Drabinki dideoksynukleotyde do elektroforezy kapilarnej.....</i>	133
2.37	<i>Przygotowanie próbek do elektroforezy kapilarnej</i>	134
2.38	<i>Elektroforeza kapilarna</i>	134

DODATEK 135

1.	KONSERWATYWNE PARY ZASAD (+)RNA5 POŚRÓD SZCZEPÓW WIRUSA GRYPY TYPU A.	135
----	---	-----

BIBLIOGRAFIA 138

CEL PRACY

Wirus grypy typu A ze względu na dużą zmienność genetyczną oraz łatwą transmisję stanowi poważne zagrożenie epidemiologiczne. Sezonowa grypa jest odpowiedzialna za 290 000-650 000 zgonów rocznie według danych Światowej Organizacji Zdrowia. Najbardziej niebezpieczne są pandemie, które pojawiają się sporadycznie, gdy nowe szczepy grypy zyskują zdolność zakażenia ludzi. Taką pandemią była grypa „hiszpanka” w latach 1918-1920, która spowodowała śmierć większej ilości ludzi (50-100 milionów) niż I wojna światowa (około 10 milionów) i II wojna światowa (50-60 milionów) razem. Dotychczas opracowane metody zapobiegania i leczenia infekcji nie wykazują zadowalającej skuteczności w zwalczaniu patogenu. Szczepionki muszą być tworzone i podawane co roku. Pojawiają się też szczepy wirusa odporne na istniejące leki ukierunkowane na wirusowe białka powierzchniowe. W związku z tym, istnieje konieczność prowadzenia badań, które pozwolą na udoskonalenie istniejących i poszukiwanie nowych metod terapeutycznych.

W cyklu replikacyjnym wirusa grypy kluczową rolę pełni RNA. Genom wirusa tworzy osiem segmentów jednoniciowego RNA o ujemnej polarności (vRNA). W zakażonej komórce na matrycy vRNA dochodzi do syntezy wirusowych mRNA oraz komplementarnych RNA (cRNA), stanowiących z kolei matrycę do produkcji nowych cząsteczek vRNA wbudowywanych w wiriony potomne. Dotychczasowe badania pokazują, że struktura drugorzędowa poszczególnych rodzajów RNA wirusowego jest istotna dla jego funkcji, zapewnia prawidłowy przebieg cyklu replikacyjnego i wydajne namnożenie wirusa. Z tego powodu RNA oraz jego struktura drugorzędowa może stanowić dobry cel dla projektowania strategii inhibitorowych wymierzonych w wirusa grypy. Szczególnie interesującymi rejonami są konserwatywne strukturalnie motywy drugorzędowe, zachowawcze dla typu A wirusa grypy, pomimo zmienności sekwencji.

Głównym celem niniejszej pracy było zaprojektowanie efektywnych inhibitorów namnażania wirusa grypy typu A nakierowanych na wirusowe RNA z uwzględnieniem jego struktury drugorzędowej. Obiektem badań były segment 8 vRNA [(segment genomowy (-)] oraz segment 5 (+)RNA szczepu A/California/04/2009 (H1N1). Podstawę realizacji zamierzonego zadania stanowiła gruntowna analiza danych dotyczących struktury drugorzędowej RNA wybranych segmentów dla typu A wirusa grypy.

Szczegółowe cele badań były następujące:

1. Wyznaczenie docelowych, komplementarnych rejonów działania oligonukleotydów i oligomerów o potencjalnych właściwościach hamujących namnażanie wirusa grypy (takich jak: PNA, siRNA oraz rybozymów typu *hammerhead*) w strukturze drugorzędowej 8 segmentu vRNA lub 5 segmentu (+)RNA szczepu A/California/04/2009 (H1N1).
2. Zaprojektowanie narzędzi obejmujących cztery strategie inhibitorowe oparte na kwasach nukleinowych: oligomerów PNA tworzących trypleksy, siRNA, antysensowych oligonukleotydów oraz rybozymów typu *hammerhead*.
3. Wprowadzenie modyfikacji nukleotydów do cząsteczek inhibitorowych w celu poprawienia ich właściwości takich jak specyficzność wiązania do miejsca docelowego w RNA wirusa grypy, stabilność enzymatyczna czy zdolność wnikania do komórek.
4. Sprawdzenie potencjału przeciwwirusowego zaprojektowanych inhibitorów poprzez przeprowadzenie testów komórkowych na wybranym szczepie wirusa grypy typu A, A/California/04/2009 (H1N1), w linii komórkowej MDCK (Mandarin-Darby Canine Kidney).
5. Wyznaczenie motywów i domen strukturalnych wybranych RNA wirusa grypy stanowiących skuteczne cele zastosowanych strategii inhibitorowych jako istotnych w cyklu namnażania wirusa dla przyszłych zastosowań terapeutycznych. Określenie skuteczności zastosowania analizy struktury drugorzędowej RNA i wpływu na efektywność wybranych metod inhibicji.
6. Porównanie skuteczności poszczególnych strategii opartych na kwasach nukleinowych, a także podejść nakierowanych na te same rejony RNA w celu ujawnienia ich zalet oraz ograniczeń.

STRESZCZENIE

Wirus grypy typu A jest patogenem ludzi i zwierząt, zdolnym do wywoływania sezonowych epidemii i sporadycznych pandemii. Każdego roku Światowa Organizacja Zdrowia rejestruje 3-5 milionów przypadków ciężkich zachorowań u ludzi oraz 290 000-650 000 zgonów u pacjentów zakażonych wirusem. Przyczyniają się do tego duża zmienność genetyczna wirusa grypy oraz łatwość jego transmisji, które decydują o zmniejszonej skuteczności szczepień ochronnych oraz leków dedykowanych wirusowi grypy. Ze względu na poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego, jakie stanowi wirus istnieje konieczność poszukiwania nowych strategii pozwalających na ograniczenie jego rozprzestrzeniania.

Genom wirusa grypy składa się z ośmiu segmentów RNA o ujemnej polarności. Każdy z segmentów stanowi odrębną jednostkę replikacyjno-transkrypcyjną i koduje określone białka wirusowe. Dotychczas ustalono, że segmenty formują złożone struktury drugorzędowe, które wykazują zachowawczość pośród szczepów wirusa. Wykazano także, że konkretne motywy mogą pełnić istotne funkcje w cyklu replikacyjnym wirusa. Rola niektórych motywów strukturalnych RNA wirusowego została potwierdzona eksperymentalnie. Ze względu na swoje funkcjonalne znaczenie RNA stanowi dobry cel dla potencjalnych nowych strategii przeciwwirusowych.

W niniejszej pracy zaprojektowano szereg narzędzi oligonukleotydowych - PNA formujące trypleksy, siRNA, antysensowe oligonukleotydy oraz rybozomy typu *hammerhead*, których zadaniem było hamowanie namnażania wirusa grypy typu A. Podstawą projektowania strategii była dogłębna analiza danych strukturalnych dotyczących miejsc docelowego działania w RNA wirusowym. Strategie nakierowane zostały na wybrane konserwatywne motywy strukturalne i domeny vRNA segmentu 8 oraz (+)RNA segmentu 5 wirusa, które mogą mieć znaczenie funkcjonalne w jego cyklu replikacyjnym. Do narzędzi oligonukleotydowych wprowadzono również modyfikacje nukleotydów, aby poprawić właściwości takie jak specyficzność wiązania do miejsca docelowego, stabilność enzymatyczna czy zdolność wnikania do komórek. Aktywność przeciwwirusową zaprojektowanych cząsteczek zbadano na linii komórkowej MDCK infekowanej wirusem grypy szczepu A/California/04/2009 (H1N1). Wyniki wskazują, że wszystkie zastosowane strategie mają potencjał hamowania namnażania wirusa grypy poprzez celowanie w RNA wirusowe. Maksymalny efekt inhibicji na poziomie 90% został osiągnięty przez siRNA 613 i 682 w stosunkowo niskim stężeniu (8 nM).

Cząsteczki te były nakierowane na konserwatywne rejony struktury drugorzędowej mRNA5 wirusa grypy, odpowiednio 613-631 i 682-700. Najbardziej wydajne z testowanych rybozymów działały w obrębie tych samych domen co wymienione wyżej siRNA. RZ6A i RZ6C zahamowały namnażanie wirusa grypy o odpowiednio 43% i 49%. Natomiast, koniugat PNA-neamina IR-1b o największym potencjale inhibitorowym nakierowany był na rejon *panhandle*. W badaniach komórkowych hamował namnażanie wirusa grypy nawet do 70%. Wysoką aktywność przeciwwirusową uzyskały również modyfikowane warianty siRNA 613 zawierające 2'-fluororybonukleotydy oraz internukleotydowe tiofosforany.

Konserwatywne motywy strukturalne RNA wirusa stanowią dobry cel dla strategii przeciwwirusowych. Istotne znaczenie, dla aktywności cząsteczek inhibitorów ma jednak odpowiedni dobór sekwencji i strukturalnego kontekstu miejsca docelowego działania. Poszczególne podejścia wykazują odmienne zalety i ograniczenia, które muszą zostać uwzględnione w celu ich efektywnego zastosowania. Przeprowadzone badania wnoszą nowe informacje na temat biologii wirusa grypy oraz strukturalnych uwarunkowań jego inhibicji. Wskazują, że naruszenie struktury i funkcji RNA, a w szczególności konserwatywnych motywów strukturalnych ma istotny wpływ na replikację wirusa. Uzyskane rezultaty przyczyniają się także do tworzenia eksperymentalnych podstaw dla projektowania skutecznych i specyficznych strategii o potencjale terapeutycznym.

ABSTRACT

Influenza A virus is a human and animal pathogen, capable of causing seasonal epidemics and sporadic pandemics. Each year the World Health Organization registers 3-5 million severe cases and 290,000-650,000 deaths in patients infected with the virus. This is a result of high genetic variability of the influenza virus and the ease of its transmission, which contribute to the reduced effectiveness of protective vaccination and anti-influenza drugs. Due to the serious public health threat posed by the virus, there is a necessity to search for new strategies to limit the influenza spread.

The influenza virus genome consists of eight negative-sense RNA segments. Each segment is a separate replication-transcription unit and codes for specific viral proteins. To date, it has been found that segments form complex secondary structures that are conservative among viral strains. It has also been shown that specific motifs can perform important functions in the viral replication cycle. The role of some structural motifs of viral RNA has been confirmed experimentally. Due to its functional role, RNA serves as a good target for potential new antiviral strategies.

In this work, a number of oligonucleotide tools – triplex forming PNAs, siRNAs, antisense oligonucleotides and hammerhead ribozymes were designed to inhibit the proliferation of influenza A virus. Thorough analysis of the structural data on target sites in viral RNA served as a basis for design of listed approaches. The strategies were targeting selected conserved structural motifs and domains of influenza segment 8 vRNA and segment 5 (+)RNA, which may have functional meaning in viral replication cycle. Also, nucleotide modifications were introduced into the oligonucleotide tools to improve properties such as target-site binding specificity, enzymatic stability or the ability to penetrate into the cells. The antiviral activity of the designed molecules was tested on the MDCK cell line infected with the influenza virus strain A/California/04/2009 (H1N1). The results indicate that all applied strategies have the potential to inhibit proliferation of the influenza virus by targeting viral RNAs. The maximum inhibition effect of 90% was achieved by siRNA 613 and 682 at a relatively low concentration (8 nM). These molecules targeted the conserved secondary structure regions of influenza virus mRNA5, 613-631 and 682-700, respectively. The most efficient of the tested ribozymes targeted the same domains as the above-mentioned siRNAs. RZ6A and RZ6C inhibited influenza virus proliferation by 43% and 49%, respectively. While, the PNA-neamine conjugate IR-1b with the highest inhibitory potential was directed to the panhandle region. In the

cell culture studies, it inhibited the propagation of influenza virus by up to 70%. Also modified variants of siRNA 613 containing 2'-fluororibonucleotides and internucleotide thiophosphates presented high antiviral activity.

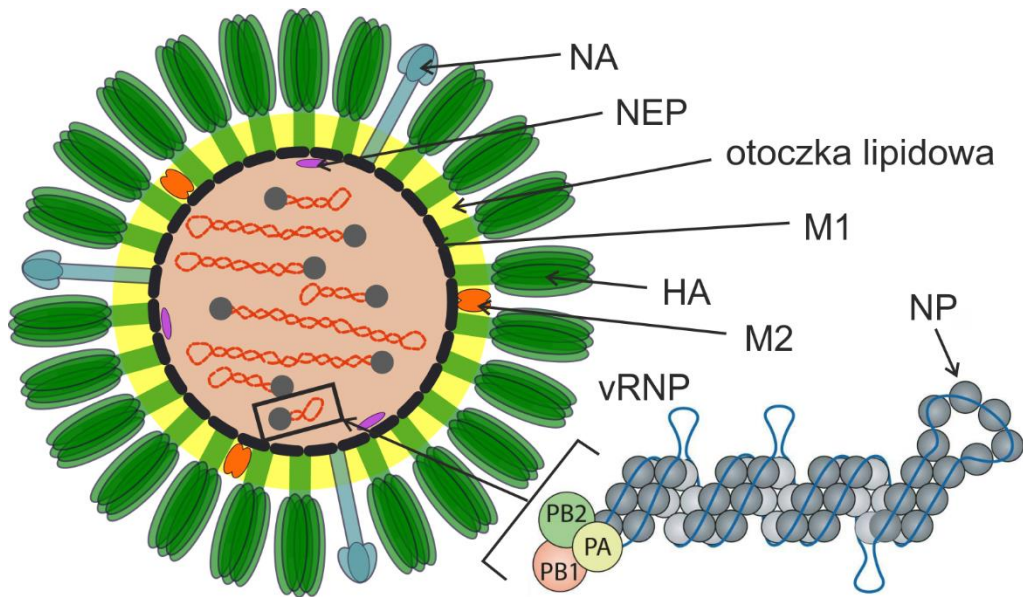
The conserved viral RNA structural motifs are a good target for antiviral strategies. However, the proper selection of the sequence and structural context of the target site is essential for the activity of the inhibitory molecules. Various approaches show different advantages and limitations that must be considered for their effective application. The conducted research brings new information on the biology of the influenza virus and structural determinants of its inhibition. It indicates that the disruption of structure and function of RNA, in particular conservative structural motifs, has a significant impact on viral replication. The obtained results also contribute to the development of experimental foundations for the design of effective and specific antiviral strategies with therapeutic potential.

WSTĘP LITERATUROWY

1. Wprowadzenie

Wirus grypy typu A to patogen ludzi i zwierząt będący przyczyną sezonowych epidemii oraz sporadycznych pandemii. Zgodnie z doniesieniami Światowej Organizacji Zdrowia na całym świecie rocznie odnotowuje się około 1 biliona przypadków zachorowań wśród ludzi, z czego 3-5 milionów stanowią ciężkie przypadki.¹ Szacuje się, że 290 000-650 000 pacjentów umiera w wyniku zakażenia wirusem grypy. Od lat patogen stanowi poważne wyzwanie dla zdrowia publicznego. Przyczyną jest łatwość rozprzestrzeniania i duża zmienność genetyczna wirusa, która powoduje, że dostępne szczepionki oraz leki nie są w pełni skuteczne.² Wirus grypy w toku ewolucji wykształcił szereg mechanizmów, które pozwoliły mu na ucieczkę przed mechanizmami obronnymi gospodarza oraz zwalczającymi strategiami terapeutycznymi.

Kluczowe znaczenie dla zdolności adaptacyjnych do niekorzystnych warunków środowiska ma genom wirusa. Składa się on z ośmiu segmentów jednoniciowego RNA o ujemnej polarności (vRNA), kodujących białka wirusowe.³⁻⁵ Segmenty 1-3 kodują podjednostki heterotrymerycznej polimerazy wirusowej (kolejno PB2, PB1, PA), która przyłącza się do częściowo parujących końców 5' i 3' każdego z segmentów. Polimeraza wraz z licznymi kopiami białka nukleoproteiny (NP), kodowanej przez segment 5, oraz vRNA tworzy kompleks rybonukleoproteinowy (vRNP). Każdy z nich stanowi odrębną i niezależną jednostkę replikacyjno-transkrypcyjną. Kompleksy w wirionie otoczone są przez białko strukturalne M1 powstające z segmentu 7. Zewnętrzną warstwę pokrywającą białkowy płaszcz stanowi otoczka lipidowa. Wirus wyposażony jest w antygeny powierzchniowe - hemaglutyninę (HA) i neuraminidazę (NA) - zakotwiczone w dwuwarstwie lipidowej, kodowane odpowiednio przez segment 4 i 6. Towarzyszy im kanał jonowy M2 powstający w wyniku alternatywnego składania transkryptów segmentu 7. W analogiczny sposób powstają dwa białka niestrukturalne NS1 oraz NS2/NEP kodowane przez segment 8. Do ich podstawowych funkcji należy odpowiednio hamowanie odpowiedzi interferonowej układu immunologicznego gospodarza oraz sygnalizacja eksportu jądrowego. Budowa wirionu i vRNP przedstawiona jest na Rycinie 1.



Rycina 1. Schemat budowy wirionu oraz vRNP wirusa grypy typu A.⁶

Segmentowana organizacja genomu wirusowego sprzyja procesowi wymiany poszczególnych cząsteczek RNA pomiędzy szczepami wirusa grypy.^{7, 8} Przetasowanie następuje pomiędzy wirusami infekującymi komórki tego samego gospodarza. Zjawisko to zwane skokiem antygenowym prowadzi do powstania nowych, potencjalnie niebezpiecznych szczepów wirusa. Mogą być to szczepy pandemiczne, które charakteryzują się zdolnością do wywoływania wysokiej zachorowalności i śmiertelności. Drugim źródłem zmienności genetycznej wirusa grypy jest przesunięcie antygenowe. Polega ono na akumulacji mutacji punktowych skutkujących zmianami antygenów wirusowych. Największą zmienność genetyczną wykazują antygeny powierzchniowe wirusa pod postacią HA i NA. Powstające nowe warianty białek utrudniają rozpoznawanie wirusa przez układ odpornościowy gospodarza. Przyczyniają się również do spadku skuteczności szczepień ochronnych oraz leków.

Z biologicznego punktu widzenia infekcja wirusowa to seria procesów, które umożliwiają namnożenie patogenu oraz jego dalszą transmisję.^{3-5, 9, 10} Wirus grypy przenosi się drogą kropelkową i osiada na powierzchni komórek potencjalnego gospodarza. Powierzchniowe białko wirusa HA wiąże się z kwasem sjałowym glikoprotein i glikolipidów błony komórkowej. Zakres infekowanych gospodarzy podyktowany jest różnicami w specyficzności wiązania przez HA należące do różnych szczepów. Szczepy infekujące człowieka wykazują preferencję rozpoznawania kwasu sjałowego połączonego z galaktozą wiązaniem $\alpha 2,6$ -glikozydowym obecnym na

powierzchni komórek górnego układu oddechowego. Szczepy ptasie preferują natomiast wiązanie α 2,3-glikozydowe, charakterystyczne dla komórek jelita, w których replikują. Wejście do wnętrza komórki gospodarza następuje poprzez endocytozę. W niskim pH późnego endosomu HA przechodzi nieodwracalną przemianę konformacyjną, dzięki której możliwa jest fuzja błony endosomu z otoczką wirusa. Funkcję wspierającą pełni osadzony w otoczce kanał jonowy M2. Przepływ protonów tą drogą zmniejsza pH wnętrza wirionu i powoduje dysocjację białka strukturalnego M1 i vRNP. W ten sposób vRNP uwalniane są do cytoplazmy, z której za pośrednictwem komórkowych importyn dostają się do jądra komórkowego. W tej części komórki zachodzą kluczowe dla wirusa procesy- replikacja i transkrypcja. Obie reakcje katalizowane są przez wirusową RNA-zależną polimerazę RNA. Po wnikięciu do jądra komórkowego rozpoczyna się transkrypcja vRNA z udziałem złożonej z trzech podjednostek polimerazy wirusowej. Reakcja prowadzi do powstania wirusowych mRNA, będących matrycą dla syntezy białek wirusowych. Proces inicjowany jest poprzez wiązanie podjednostki polimerazy PB2 do czapeczki 5' obecnej w RNA gospodarza. Endonukleazowa aktywność podjednostki PA pozwala na odcięcie czapeczki wraz z kilkunastoma przylegającymi nukleotydami (z ang. *cap-snatching*). Pozyskany fragment stanowi starter dla syntezy mRNA wirusowego przez podjednostkę PB1 o aktywności polimerazy. Na końcu 3' mRNA znajduje się ogon poli(A) powstający w wyniku przesuwania polimerazy po ciągu poli(U) ulokowanym kilkanaście nukleotydów przed końcem 3' vRNA. Obróbka posttranskrypcyjna odbywa się z wykorzystaniem maszynerii komórkowej gospodarza. Swój udział ma w niej także prawdopodobnie białko NS1, wiążąc się do czynników zaangażowanych w formowanie spliceosomu.

Następująca w kolejnej fazie cyklu biosynteza białek wymaga eksportu mRNA z jądra do cytoplazmy.^{3-5, 10} Na tym etapie wirus również wykorzystuje system gospodarza. Dotychczasowe badania wykazały, że w wyniku infekcji wirusowej produkcja białek komórkowych jest ograniczona. Przyczynia się do tego interakcja białek wirusowych - NS1 i polimerazy - z białkami komórkowymi związanymi z poliadenylacją, a także z komórkową polimerazą II, prowadząca do dysfunkcji. Dodatkowo, pozbawienie komórkowych RNA czapek przez wirusową polimerazę skutkuje gwałtowną degradacją powstałych już transkryptów. Blokowanie translacji białek komórkowych może następować także przez wiązanie NS1 do czynników translacyjnych. Niektóre nowozsyntetyzowane białka wirusowe są ponownie importowane do jądra dzięki

obecności w ich sekwencji sygnałów lokalizacji jądrowej. Podjednostki polimerazy wirusowej oraz NP pełnią tam funkcję katalizatorów replikacji i transkrypcji.

Replikacja genomowego vRNA jest procesem dwuetapowym i nie wymaga obecności startera.⁵ W jej wyniku powstają najpierw komplementarne cRNA. Są to kopie RNA o dodatniej polarności, stanowiące produkt pośredni i pełniące rolę matrycy do amplifikacji vRNA. W momencie terminacji syntezy cRNA polimeraza musi odłączyć się od miejsca wiązania na końcu 5' vRNA, aby zapewnić jego powielenie. Przebieg tego ostatniego etapu amplifikacji nie został jeszcze poznany. Pełnej długości cRNA formuje cRNP o budowie podobnej do vRNP łącząc się z polimerazą i białkiem NP. M1, NEP/NS2 oraz NS1 wraz z czynnikami komórkowymi biorą udział w eksporcie vRNP i mRNA z jądra komórkowego.

W kolejnym etapie elementy niezbędne do formowania wirionów potomnych gromadzą się w pobliżu błony komórkowej.^{3,4} Glikoproteiny powierzchniowe asocjują z obecnymi w błonie raftami lipidowymi będącymi miejscem tzw. pakowania wirionów. W każdym potomnym wirionie musi znaleźć się tylko jedna kopia każdego z ośmiu vRNP. Proces ten wymaga precyzyjnej regulacji i kontroli. Pełna gama zaangażowanych interakcji RNA-RNA oraz RNA-białko pozostaje nieznana, choć wiele takich interakcji zostało zdefiniowanych. Wyniki prowadzonych badań przemawiają za tzw. selektywnym modelem pakowania segmentów do wirionów potomnych.¹¹ Dotychczas udało się ustalić, że w procesie tym uczestniczą sygnały pakowania obecne w określonych rejonach sekwencji RNA. Dane eksperymentalne wskazują na zaangażowanie wielu takich sekwencji w składanie wirionów.¹¹⁻¹⁵ Znajdują się one zarówno w rejonach terminalnych segmentów jak i ich częściach wewnętrznych. Postuluje się występowanie różnic pomiędzy poszczególnymi szczepami. Podstawą tej hipotezy stała się identyfikacja mutacji, które zostały opisane jako krytyczne dla wirusa grypy określonego szczepu, jednak były tolerowane u innego. W drugim przypadku dopiero kombinacja kilku zmian prowadziła do zaburzenia replikacji i pakowania. Zarówno ta obserwacja, jak i sam fakt występowania zmienności genetycznej wirusów pokazuje, że sieć interakcji musi wykazywać pewien stopień elastyczności i prawdopodobnie podlega adaptacji.¹¹⁻¹⁵ W pakowaniu rolę odgrywa także białko NP. Wykazano, że substytucja siedmiu aminokwasów w domenie głowy wpływa na zakłócenie włączania do wirionów czterech segmentów.¹¹ Potencjalny mechanizm może opierać się na zmianie zdolności wiązania NP do RNA, ponieważ mutacje występują

blisko przewidywanego miejsca wiązania RNA. W konsekwencji, reorganizacji może ulegać funkcjonowanie wielu sekwencji pakujących oraz interakcje RNA-RNA lub pomiędzy vRNP. Postulowany jest również udział białka M1, które oddziałuje z błonami lipidowymi, vRNP oraz NS2/NEP. Niektóre doniesienia wskazują na rolę domeny cytoplazmatycznej M2 w pakowaniu vRNP.

Finalnie, dochodzi do uwypuklenia błony komórkowej na zewnątrz i odpączkowania wirionu.^{3, 4} Otoczka lipidowa, w której zakotwiczone są białka powierzchniowe wirusa wywodzi się z błony komórkowej gospodarza. Na początku wirus pozostaje związany swoimi glikoproteinami z kwasem sjałowym na powierzchni komórek gospodarza. Uruchomienie aktywności NA pozwala na rozcięcie tych połączeń, uwolnienie wirionów i jednoczesne powstrzymanie ich agregacji. Prawidłowo złożone, nowopowstałe wirusy są zdolne do dalszej ekspansji i zakażenia kolejnych komórek. Na wielu etapach cyklu replikacyjnego wirusa ważną funkcję spełniają czynniki komórkowe, które biorą udział w procesach sterowanych przez wirusa.

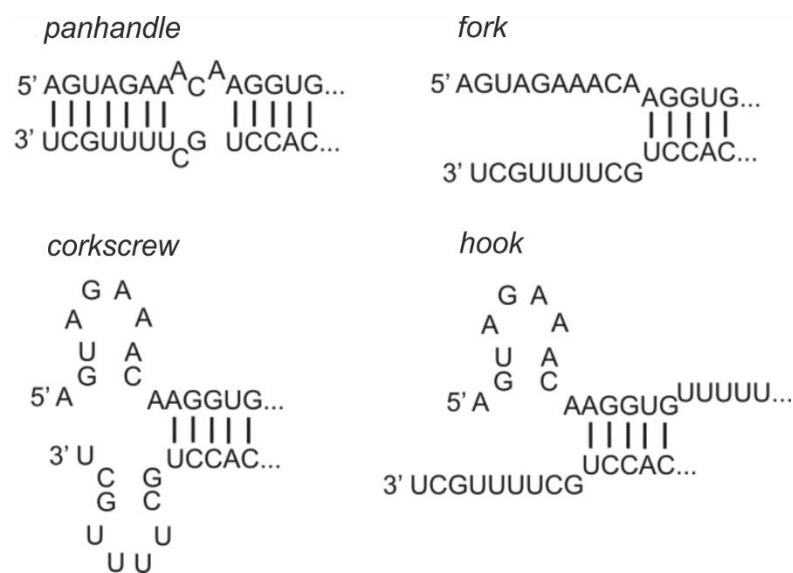
2. Rola struktury RNA w cyklu replikacyjnym wirusa grypy

W cyklu replikacyjnym wirusa grypy RNA jest jedynym nośnikiem informacji genetycznej. Korelacja pomiędzy jego strukturą a pełnioną funkcją od lat jest obiektem intensywnych badań, w których wykorzystuje się zarówno analizy bioinformatyczne, jak i podejścia eksperymentalne. Liczne doniesienia wykazują istotne znaczenie biologiczne struktury drugorzędowej wirusowego RNA dla kluczowych procesów w cyklu replikacyjnym patogenu.¹⁶ Przypisuje się jej rolę w interakcjach RNA-RNA (np. w trakcie pakowania wirionów potomnych), wiązaniu białek i rekrutacji enzymów modyfikujących nukleotydy (aby uniknąć mechanizmów obronnych gospodarza). Do zadań struktury może należeć także regulacja aktywności polimerazy, szybkości replikacji i transkrypcji, alternatywnego składania transkryptów i translacji.¹⁶ Interesującymi z punktu widzenia roli funkcjonalnej są zarówno elementy wspólne, czyli zachowawcze wśród segmentów i szczepów, jak i te ulegające zmianom konformacyjnym i rearanżacjom pod wpływem różnych czynników. Kluczową cechą pomagającą w rozróżnieniu tych dwóch grup jest ocena stabilności termodynamicznej poszczególnych motywów strukturalnych.

Najlepiej poznanym dotąd motywem struktury drugorzędowej RNA wirusa grypy jest region promotorowy powstający przez częściowe parowanie końców 5' i 3' każdego

z genomowych segmentów.¹⁶ Jest to rejon występowania wysoce konserwatywnych sekwencji o niepełnej komplementarności, determinujących cyrkularny charakter kompleksów RNP. Obejmuje on 13 nukleotydów końca 5' oraz 12 od strony 3', które są miejscem wiązania polimerazy wirusowej. Zostały zaproponowane aż cztery możliwe warianty struktury drugorzędowej promotora, które mają pewne cechy wspólne.¹⁷⁻²⁴ Charakterystyczna dla tego rejonu jest struktura znana pod nazwą *panhandle*.^{17, 18} Składa się z podwójnej helisy zawierającej niekanoniczne pary GU, wewnętrznego pojedynczego niesparowania oraz jednostronnego wybrzuszenia. Obecność motywu została potwierdzona w drugorzędowych strukturach segmentów otrzymanych w wyniku badań *in vitro*.²⁵⁻²⁷ Postuluje się, że *panhandle* ma charakter dynamiczny i ulega przemodelowaniu na różnych etapach cyklu replikacyjnego wirusa, w zależności od pełnionych funkcji (Rycina 2). Prawdopodobnie, motyw *panhandle* występuje gdy nieobecna jest wirusowa polimeraza. Natomiast, jest przez nią rozpoznawany i ulega reorganizacjom strukturalnym dopiero po przyłączeniu enzymu. Odpowiada to założeniom hierarchicznego modelu fałdowania RNA, w którym struktura drugorzędowa formuje się błyskawicznie, zanim utworzone zostaną vRNP. W konsekwencji motywy struktury drugorzędowej wykazujące dużą stabilność termodynamiczną mogą mieć wpływ na interakcję RNA z białkami. Kolejnym proponowanym modelem jest tzw. *fork*, w którym rozpleceniu ulega terminalna część helisy proponowana w *panhandle*.²⁰ Został on opisany jako wariant występujący w momencie inicjacji transkrypcji gdy częściowe rozplecenie końców 5' i 3' pozwala na przyłączenie polimerazy.²¹ Alternatywę stanowi model typu *corkscrew* zakładający, że końce 5' i 3' zawierają skrócony fragment helikalny oraz dwa symetryczne motywy spinkowe o krótkich trzonach.²² Obecność spinki na końcu 5' oraz dalszych parujących się zasad warunkuje aktywność endonukleazową polimerazy wirusowej.^{28, 29} Negatywny wpływ mutacji na końcu 3' na ten proces może wskazywać na obecność spinki w rejonie 3'. Struktura krystaliczna uzyskana dla kompleksu promotor-polimeraza wykazuje, że organizacja końców RNA przypomina model *corkscrew*.²⁴ Różnicę stanowi koniec 3', który jest jednoniciowy i łączy się z polimerazą dając podstawy do występowania modelu typu *hook*. Odpowiedniej organizacji strukturalnej promotora przypisuje się rolę w procesie przenoszenia czapeczki z końca 5' RNA pochodzenia komórkowego do syntezy transkryptów wirusowych. Parowanie końców segmentów jest również istotne dla poliadenylacji końca 3' mRNA wirusowego. Struktury znajdujące się w tym rejonie, w szczególności spinka na końcu 5', mogą stanowić zawadę sterczyną dla polimerazy

przesuwającej się po ciągu poli(U), jednocześnie nie pozwalając jej na odłączenie się od vRNA.^{30, 31} Postuluje się, że przełączenie funkcji polimerazy wirusowej pomiędzy transkrypcją a replikacją pokierowane jest zmianami strukturalnymi w rejonie promotorowym. Dodatkowo, na końcach 5' i 3' wykazano obecność istotnych sygnałów pakowania wirionów. Parujący się rejon promotora może być wydłużony w stronę wnętrza cząsteczki w zależności od segmentu. Eksperymenty z użyciem mutagenyzy wskazały, że pary te mogą mieć znaczenie dla pakowania segmentów do wirionów potomnych, transkrypcji i replikacji.³² Dotychczasowe badania nie pozwoliły jeszcze w pełni wyjaśnić funkcji wszystkich obserwowanych cech promotora. Występowanie podobnych terminalnych motywów strukturalnych zaobserwowano nie tylko dla wirusów z rodziny *Orthomyxoviridae*, do której należy wirus grypy, ale również dla innych wirusów posiadających genom RNA o ujemnej polarności.¹⁶



Rycina 2. Warianty strukturalne 5' i 3' terminalnych rejonów segmentów vRNA.

Terminalny promotor o częściowo dwuniciowej organizacji podobnej do vRNA jest obecny także w cRNA.³³ Jest on wymagany do syntezy vRNA wirionów potomnych. Ze względu na różnice sekwencyjno-strukturalne pomiędzy terminalnymi rejonami, *panhandle* cRNA jest mniej stabilny od vRNA. Cecha ta może być podstawą rozróżnienia dwóch populacji wirusowego RNA.^{22, 34} Ma to znaczenie z punktu widzenia działania polimerazy, a także selektywnego pakowania vRNP do wirionów potomnych. Podobnie do vRNA promotor cRNA może przyjmować różne struktury w obecności wirusowej

polimerazy. Wykazano, że jedynie motyw spinkowy na końcu 5' cRNA wymagany jest do aktywności polimerazy, jak w modelu *hook*.³⁵

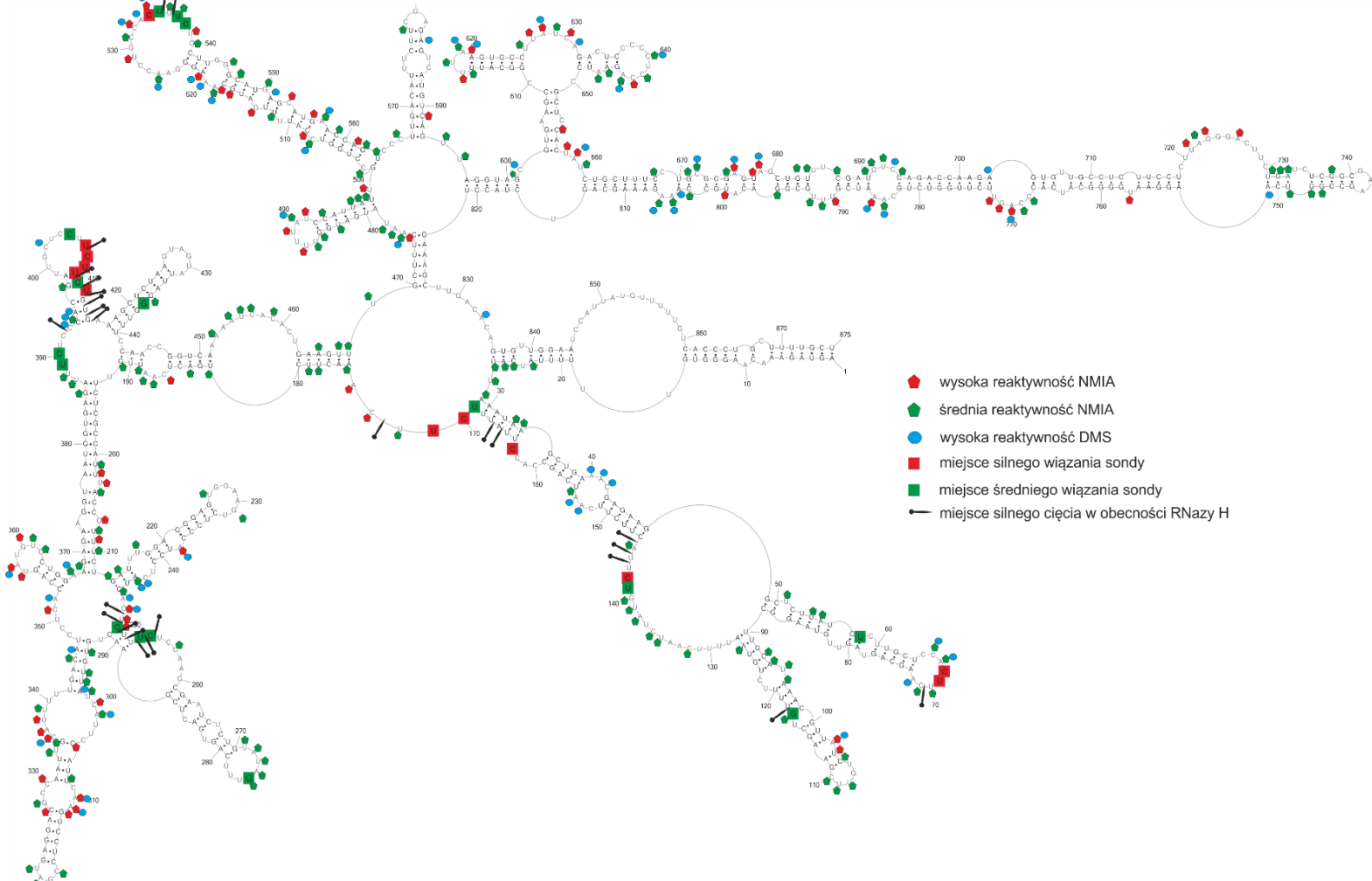
Rejon promotorowy to element istotny nie tylko dla działania komponentów wirusowych, ale także dla interakcji z gospodarzem. Jest to fragment RNA rozpoznawany przez receptor immunologiczny RIG-I aktywujący kaskadę sygnałową indukującą produkcję interferonu.³⁶ Wykazano, że obecność niesparowań w jego obrębie wpływa hamująco na odpowiedź odpornościową gospodarza. Struktura rejonu promotorowego jest zatem ewolucyjnie wykształconym przez wirusa kompromisem, który zapewnia prawidłowe wiązanie i działanie polimerazy wirusowej oraz jednocześnie uniknięcie gwałtownej reakcji obronnej infekowanego organizmu.³⁶

Wewnętrzne rejony segmentów należą do mniej poznanych strukturalnie obszarów RNA wirusowego. Dotychczas zaproponowane zostały modele struktur oparte na danych eksperymentalnych pochodzących z mapowań chemicznych, mapowań przy pomocy macierzy izoenergetycznych, badań miejsc dostępnych dla hybrydyzacji oligonukleotydów DNA z użyciem RNazy H oraz minimalizacji energii swobodnej w przewidywaniu struktury i analiz bioinformatycznych.^{25-27, 37-39} Badania *in vitro* niosą jednak pewne ograniczenia. Struktury drugorzędowe pozbawione są oddziaływań z białkami oraz innymi czynnikami, które mogą wpływać na ostateczną przestrzenną organizację RNA. Z drugiej jednak strony mapowania *in cellulo* lub *in vivo* przysparzają trudności w interpretacji wyników. Brak modyfikacji chemicznej lub dostępności nukleotydów może wynikać z istnienia dodatkowych interakcji, nie zaś zaangażowania w tworzenie struktury drugorzędowej. Wiele zadań w cyklu replikacyjnym wirusa znajduje się pod kontrolą złożonych interakcji pomiędzy elementami zakodowanymi w genomie wirusa i dostarczonymi przez zakażoną komórkę. Sondy mikromacierzowe i oligonukleotydy DNA aktywujące RNazę H uzupełniają informacje uzyskane w mapowaniach, ponieważ w przeciwieństwie do reagentów chemicznych mają zdolność zakłócania słabych interakcji trzeciorzędowych. Dzięki tej metodzie, występowanie potencjalnych oddziaływań międzycząsteczkowych w rejonach jednoniciowych lub dynamicznych strukturalnie zostaje uprawdopodobnione. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych na nagim vRNA wspierane są przez analizy bioinformatyczne o charakterze strukturalno-sekwencyjnym.^{25-27, 37-39}

Badania *in vitro* wykazały, że struktura drugorzędowa pełnej długości segmentów genomowych vRNA5, vRNA7, vRNA8 (Rycina 3) oraz (+)RNA5 jest złożona i ma

charakter domenowy.^{25, 26, 37, 38} Motywy struktury drugorzędowej mogą tworzyć się lokalnie lub obejmować oddziaływania dalekiego zasięgu. Obecne są liczne motywy spinkowe, które występują powszechnie w istotnych biologicznie RNA i mogą pełnić różnorodne funkcje. Rejony helikalne segmentów oddzielone są od siebie licznymi wybrzuszeniami i pętlami jednoniciowymi, które stanowią miejsca potencjalnych interakcji o znaczeniu funkcjonalnym. Analiza struktury w obrębie sygnałów pakowania zbadanych vRNA wykazała obecność konserwatywnych motywów strukturalnych. Jednoniciowe lub dynamiczne strukturalnie fragmenty vRNA mogą być zaangażowane w interakcje zapewniające specyficzne pakowanie segmentów do wirionów. Wiadomym jest, że sieci powiązań są specyficzne dla poszczególnych szczepów wirusa.¹¹⁻¹⁵

Za znaczeniem struktury drugorzędowej RNA wirusa grypy przemawia fakt, że pomimo dużej zmienności genetycznej wirusa większość motywów strukturalnych zostaje zachowana, zgodnie z wynikami analiz bioinformatycznych o charakterze sekwencyjno-strukturalnym.^{25, 26, 37-39} Obserwuje się występowanie mutacji kompensacyjnych, spójnych z przewidywaną strukturą. Mutacje pojawiające się w rejonach konserwatywnych zwykle pozwalają na zachowanie kanonicznych par zasad. Ponadto, odnotowano, że niektóre zmiany powstające w wyniku skoku antygenowego zachodzą z większą częstością od innych.⁴⁰ Jest to rezultat spójny z eksperymentami mutagenezy pokazującymi, że ściśle określone mutacje mogą wpływać na zdolność wirusa do namnażania.⁴¹ Efekt ten obserwowano po wprowadzeniu mutacji synonimicznych do vRNA7, które zaburzały strukturę drugorzędową konserwatywnych spinek.⁴¹ Dlatego, preferowane są zmiany, które pozwalają na zachowanie prawidłowych funkcji RNA i białek oraz ich interakcji. Badania struktury prowadzone w różnych warunkach temperaturowych pozwalają wskazać motywy lub rejony RNA o wysokiej stabilności termodynamicznej oraz takie, które są bardziej dynamiczne i mogą ulegać rearanżacjom.^{25, 26, 38} Zmiany te mogą mieć szczególne znaczenie, ponieważ szczepy wirusa grypy infekują szereg gospodarzy. W związku z tym namnażają się w różnym zakresie temperaturowym. Zmiany te mogą mieć znaczenie adaptacyjne, a ich dokładniejsze poznanie wpłynąć na zdolność przewidywania toru ewolucji szczepów.



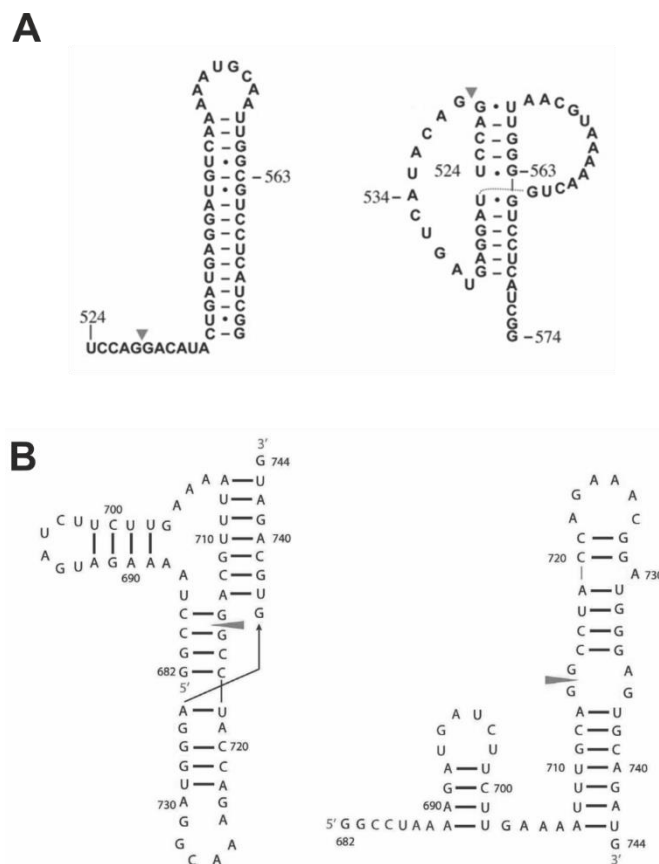
Rycina 3. Struktura drugorzędowa vRNA8 szczepu A/Vietnam/1203/2004.³⁷ Kolorami oznaczono miejsca występowania silnych lub średnich sygnałów mapowań chemicznych, wiązania sond mikromacierzowych oraz silnego cięcia w obecności RNazy H.

Odwrotna komplementarność vRNA i cRNA skutkuje możliwością występowania tzw. struktur lustrzanych. Różnice strukturalne są natomiast potencjalnymi czynnikami pozwalającymi na rozróżnienie nici RNA. Zgodnie z przewidywaniami, jedyne opublikowane dotąd pełnej długości modele struktur drugorzędowych (-)RNA5 i (+)RNA5 wykazują pewne podobieństwa.^{25, 38} Struktury lustrzane dotyczą w szczególności rejonów sekwencji pakowania. Los tych dwóch cząsteczek w komórce jest jednak całkowicie odmienny. Jedyne vRNA podlega pakowaniu do wirionów potomnych, podczas gdy cRNA ulega degradacji. Białko M1, które uczestniczy w pakowaniu rozpoznaje vRNP, nie zaś cRNP. Wnioskuje się zatem, że procesy te sterowane są przez zarówno sekwencję jak i strukturę pozwalające na właściwe rozróżnienie populacji RNA wirusowego.^{25, 38}

Istotne dla funkcji motywy struktury drugorzędowej są także obecne w wirusowym mRNA. Z użyciem metod bioinformatycznych zidentyfikowano w segmencie 8 rejon zachowawczy strukturalnie pośród szczepów wirusa grypy typu A, a także typu B. Nukleotydy 524-574 formują motyw spinki do włosów, która może przyjąć alternatywną konformację w postaci pseudowęzła (Rycina 4A).⁴² Lokalizacja motywu w pre-mRNA w pobliżu miejsca 3' splicingowego sugeruje, że może on pełnić funkcje regulatorowe w procesie alternatywnego składania transkryptów. Wprowadzenie mutacji zaburzających strukturę motywu wpłynęło na ograniczenie produkcji transkryptu NS2/NEP oraz replikacji wirusa. Podobne badania były prowadzone w rejonie końca 5' tegoż mRNA formującego pętle wieloramienne (Rycina 5A).⁴³ W tym wypadku zmiany struktury skutkowały zmniejszoną transkrypcją NS1. W tym samym rejonie zaproponowano alternatywną strukturę, w której pętla ulega rearanżacji.⁴⁴ Trzecia przewidywana struktura to pojedyncza, wydłużona spinka do włosów, której obecność została potwierdzona metodami chemicznego mapowania i macierzy izoenergetycznych w warunkach *in vitro* oraz analizami bioinformatycznymi.⁴⁵

W wyniku alternatywnego składania powstają także białka kodowane przez segment 7. W rejonie miejsca 3' alternatywnego składania zarejestrowano występowanie podobnej równowagi pomiędzy motywem dwóch spinek do włosów a pseudowęzłem jak w segmencie 8 (Rycina 4B).⁴⁴ Motywy te zostały przewidziane bioinformatycznie i potwierdzone metodami eksperymentalnymi. Rejon za miejscem składania 5' również został poddany badaniom i stwierdzono, że może przyjmować strukturę pętli wieloramiennej lub alternatywnej wydłużonej spinki do włosów (Rycina 5B).^{44, 46}

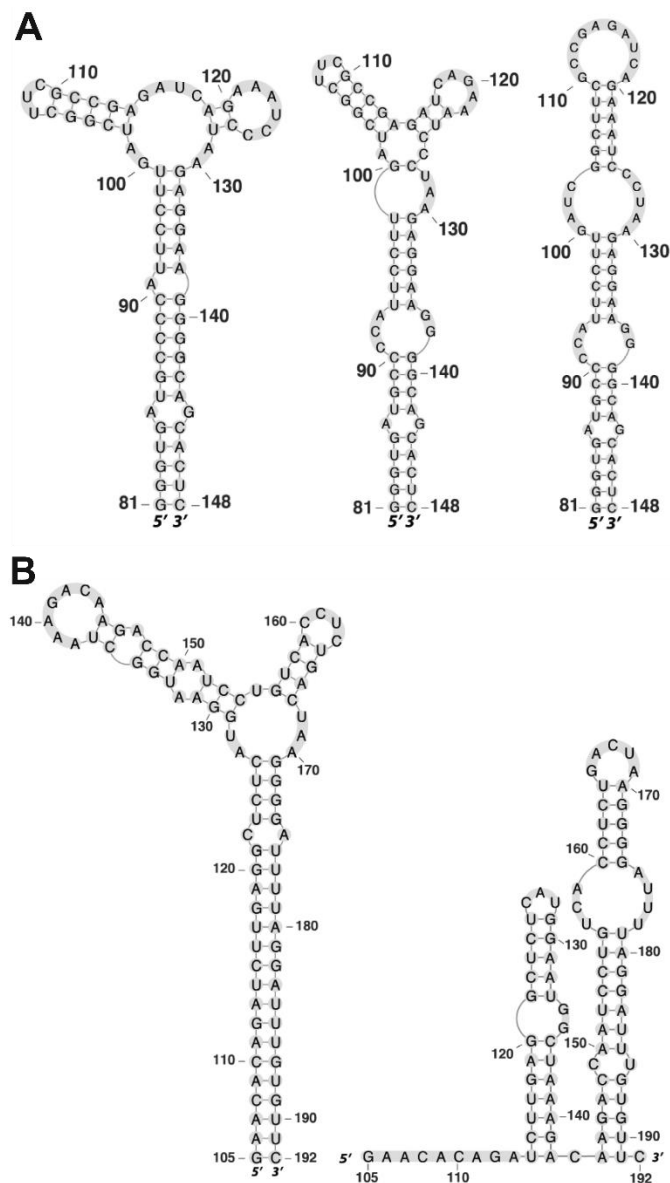
Mapowanie chemiczne i enzymatyczne, mutageniza oraz NMR przemawiają jednak za obecnością pętli wieloramiennej. Mutanty strukturalne rejonów w pobliżu miejsc składania 5' i 3' mają jednak niewielki wpływ na produkcję białek M1 oraz M2, pomimo, że wpływają na replikację wirusa.⁴⁷ Struktura pseudowężła została także przewidziana bioinformatycznie i eksperymentalnie dla mRNA2 w rejonie 65-126 zawierającym kodon start dla dwóch białek powstających dla tego segmentu- PB1-F2 oraz PB1-N40.⁴⁴ Alternatywna struktura tego rejonu to dwie spinki do włosów oddzielone rejonem jednoniciowym.⁴⁸ Rola tych struktur może być zbliżona do dwóch wcześniej opisanych pseudowężłów. Obecność stabilnych zachowawczych struktur drugorzędowych została odnotowana także w mRNA5, jednak ich rola nie jest w pełni poznana.



Rycina 4. Alternatywne struktury spinki do włosów i pseudowężła miejsca splicingowego 3' w mRNA8 (A)⁴² oraz mRNA7 (B)⁴⁴. Strzałką oznaczono miejsce splicingu.

Wciąż prowadzone są badania mające na celu ustalenie wzoru wiązania NP do RNA oraz wpływu białka na organizację strukturalną genomu. Obrazy z mikroskopii krioelektronowej pokazują, że struktura NP-RNA jest złożona.⁴⁹ Najnowsze badania bazujące na immunoprecypitacji prowadzone na szczepach A/Puerto Rico/08/1934

(H1N1), A/WSN/1933 (H1N1) i A/California/07/2009 (H1N1) wskazują, że białko NP nie wiąże się w sposób równomierny na całej nici vRNA.^{6, 50} Istnieją rejony, w obrębie których gęstość wiązania NP jest zmniejszona i stanowią one około 10% całego genomu. Miejsca wiązania NP nie wykazują natomiast wyraźnych zależności sekwencyjnych.



Rycina 5. Alternatywne struktury rejonu sąsiadującego z miejscem splicingowym 5' w mRNA8 (A)⁴³⁻⁴⁵ oraz mRNA7 (B)^{44, 46}.¹⁶

Struktura drugorzędowa RNA może mieć wpływ na sposób wiązania NP do genomu wirusa, co jest spójne ze wspomnianym wcześniej hierarchicznym modelem fałdowania RNA. Ponadto, w rejonach zmniejszonego wiązania białka NP przewidywane jest tworzenie struktur drugorzędowych o znaczeniu funkcjonalnym.^{6, 50} Doniesienia przemawiają za hipotezą, że pewne rejony RNA wirusowego są bardziej podatne na

tworzenie oddziaływań intermolekularnych z pozostałymi vRNA lub innymi cząsteczkami pochodzenia wirusowego lub komórkowego. Szereg eksperymentów pokazał, że naruszenie struktury motywów RNA w rejonach zmniejszonego wiązania białka NP skutkuje obniżeniem replikacji wirusa grypy.⁵⁰ Występuje wtedy wzmożona produkcja cząstek wirusa niezdolnych do infekcji, spowodowana zaburzeniem stechiometrii pakowania segmentów. Zmiany te obserwowane były dla kilku analizowanych szczepów o pochodzeniu ptasim i ludzkim. Dodatkowo, lokalizacja rejonów ubogich w białko NP wydaje się znacząca. Często występują one w obrębie lub w pobliżu części terminalnych segmentu, których rola w pakowaniu segmentów jest obiektem wieloletnich badań i pewne zależności zostały już opisane.^{6, 50} Rejony zmniejszonego wiązania NP zidentyfikowano również w części wewnętrznej segmentu oraz poza dotychczas znanymi rejonami o znaczeniu dla pakowania. Stabilne struktury RNA są zatem niezbędne dla wirusowej replikacji i pakowania genomu do wirionów potomnych. Niektóre z nich są uniwersalne wśród szczepów inne zaś specyficzne dla danego szczepu.¹¹⁻¹⁵ Dlatego też dystrybucja białka NP na nici RNA choć wydaje się podlegać niezdefiniowanym jeszcze regułom, jest w pewnym stopniu różna w zależności od testowanego szczepu.^{6, 50} Badania zachowawczych rejonów zmniejszonej gęstości wiązania NP mogą nie tylko wskazywać na oddziaływania RNA-RNA, ale także przewidywać potencjał wystąpienia wymiany konkretnych segmentów. Uwarunkowania NP-RNA mogą potencjalnie determinować efekty skoku antygenowego i kierunek jego przebiegu. Zaprezentowane wyniki wspierają wcześniejsze analizy bioinformatyczne oraz badania eksperymentalne pokazujące, że w vRNA istnieją struktury drugorzędowe, których naruszenie wpływa na zaburzenia pakowania i replikację wirusa.^{6, 50}

Wiedza na temat struktury drugorzędowej RNA w warunkach *in vivo* jest ograniczona i trudna do interpretacji. Niedawno, opublikowane zostało pierwsze doniesienie literaturowe dotyczące struktury mRNA wirusa grypy opierające się na materiale pochodzącym z zakażonej hodowli komórkowej.⁵¹ Dane eksperymentalne uzyskano poprzez przeprowadzenie mapowania chemicznego na poddanych głębokiemu mrożeniu (-80°C) osadach komórek MDCK, zainfekowanych uprzednio wirusem szczepu A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). Wyniki tych badań potwierdziły obecność kilku stabilnych, lokalnych motywów strukturalnych w mRNA5. Ujawniły również wiele rejonów nieustrukturalizowanych, w których zarejestrowano wysoką reaktywność nukleotydów RNA modyfikowanych DMS.⁵¹ Analiza przeprowadzona w omawianej

pracy nie uwzględniała żadnych oddziaływań dalekiego zasięgu. Wciąż jeszcze, eksperymentalne metody badania struktury RNA wirusa grypy narzucają poważne ograniczenia. Mapowanie chemiczne przeprowadza się na całkowitej puli mRNA obecnej w wielu komórkach znajdujących się na różnym etapie cyklu komórkowego oraz infekcji wirusowej. Wprowadzenie danych z mapowania wewnątrzkomórkowego do schematów modelowania skutkuje wygenerowaniem uśrednionej struktury bez wskazania jej możliwych wariantów. W konsekwencji, brakuje informacji o potencjalnej dynamice RNA na różnych etapach zakażenia i cyklu replikacji wirusa. Przejściowe struktury pozostają dla istniejących metod nieuchwytnie, chociaż mogą spełniać określone role regulatorowe w procesach, w których pośredniczą wirusowe motywy RNA. Obecność rejonów nieustrukturalizowanych może zatem stanowić niejako potwierdzenie istnienia dynamicznych motywów strukturalnych. Aby poszerzyć perspektywę kompleksowego fałdowania się mRNA w warunkach *in vivo*, w przyszłości należy przeprowadzić szeroko zakrojone badania uwzględniające analizy przy użyciu różnych odczynników mapujących oraz metod wspomagających przewidywanie struktury.

3. Strategie hamowania namnażania wirusów RNA oparte na kwasach nukleinowych

Kwasy nukleinowe mogą pełnić rolę cząsteczek o charakterze inhibitorowym, których aktywność wymierzona jest w RNA wirusowe.⁵² Dotyczy to zarówno występujących w naturze DNA oraz RNA, jak i analogów uzyskanych na drodze syntetycznej. Dotychczas poznanych zostało kilka strategii bazujących na odmiennych wewnątrzkomórkowych mechanizmach działania. Łączy je jednak nie tylko cel molekularny, ale również sposób wiązania do niego determinowany komplementarnością sekwencji miejsca docelowego i inhibitora. Cechą wspólną jest możliwość zaprojektowania i dostosowania cząsteczek hamujących tak, aby nakierować je na wybrany rejon docelowego RNA. Każda ze strategii indukuje szereg procesów komórkowych odpowiadających za wystąpienie efektu inhibitorowego. Niezależnie od przebiegu poszczególnych etapów finalnym mechanizmem efektorowym może być zablokowanie lub przecięcie miejsca docelowego wiązania. W ten sposób RNA wirusowy zostaje pozbawiony swojej biologicznej funkcji. Różne są jednak reguły oraz ograniczenia, którymi rządzą się poszczególne podejścia. Rozbieżności dotyczą w szczególności wymagań sekwencyjno-strukturalnych rejonów docelowego działania. Kwasy nukleinowe mają potencjał terapeutyczny. Warunkiem zastosowania strategii

w celach terapeutycznych jest posiadanie szeregu cech o znaczeniu aplikacyjnym. Należą do nich: stabilność termodynamiczna i enzymatyczna w środowisku komórkowym, efektywność, specyficzność, brak toksyczności, łatwe usuwanie z organizmu, precyzyjne dostarczanie i brak oddziaływań poza rejonem docelowego działania.⁵² Spełnienie wszystkich wymagań jest wyzwaniem oraz inspiracją do dogłębnych badań, poszukiwania nowych rozwiązań i ulepszeń. Najważniejsze aspekty dotyczące poszczególnych strategii zostały opisane poniżej.

3.1 Antysensowe oligonukleotydy (ASO)

Antysensowe oligonukleotydy (ASO) to jednoniciowe fragmenty DNA lub RNA o ograniczonej długości. Wiążą się specyficznie do komplementarnych sekwencji na zasadzie parowania zasad Watsona-Cricka. Pierwsze zastosowanie ASO jako potencjalnego czynnika przeciwwirusowego zostało opublikowane w roku 1978.⁵³ Badania dotyczyły obniżenia replikacji wirusa RSV przy użyciu 13-nukleotydowego oligomeru DNA. Od tego czasu w praktyce laboratoryjnej zastosowanie znalazło wiele modyfikacji, które pozwoliły nadać ASO nowe, korzystne z aplikacyjnego punktu widzenia cechy. Głównym celem było zwiększenie siły wiązania ASO do rejonów docelowych RNA, selektywności oraz stabilności enzymatycznej przy jednoczesnym braku toksyczności. Modyfikacje wprowadzane były do różnych elementów składowych ASO - heterocyklicznej zasady, pierścienia cukrowego, wiązania fosfodiesterowego i szkieletu fosfocukrowego - skutkując powstaniem kilku generacji analogów.⁵⁴ ASO wykazują preferencję wiązania względem dostępnych rejonów jednoniciowych. Efekty wywoływane przez hybrydyzację mogą się różnić w zależności od budowy ASO. Łącząc się z miejscami docelowymi mogą maskować miejsca potencjalnych interakcji trzeciorzędowych RNA-RNA oraz RNA-białko, uniemożliwiając prawidłowy przebieg procesów zależnych od RNA. Może także dochodzić do przecinania docelowego RNA za pośrednictwem RNaz. Dzieje się tak w przypadku gapmerów, czyli ASO zawierających ciąg deoksyrybonukleotydów, który tworzy z rejonem docelowym heterodupleks DNA:RNA będący substratem RNazy H.⁵⁴

Badania nad inhibicją wirusa grypy z użyciem tej strategii rozpoczęły się u schyłku lat 80-tych. Już wtedy pojawił się pierwszy zarys koncepcji zakładającej, że możliwe jest zaprojektowanie ASO, które zapewniłyby ochronę przed infekcją wieloma szczepami wirusa. Efekt ten miał zostać osiągnięty przez celowanie w 5' i 3' terminalne rejony RNA o zachowawczej sekwencji pośród segmentów i szczepów wirusa grypy.

Pierwsza z opublikowanych prac tego nurtu dotyczyła oligonukleotydów DNA selektywnie hamujących efekt cytopatyczny wywoływany przez wirusa grypy w komórkach MDCK.⁵⁵ ASO nakierowane były na 3' terminalny rejon sekwencji wspólnej dla wszystkich segmentów. Doświadczenia zostały przeprowadzone dla szczepów A/PR/8/34 (H1N1), A/Victoria/3/75 (H3N2) oraz A/Philippines/2/82 (H3N2), lecz nie dla wszystkich został osiągnięty satysfakcjonujący efekt inhibicji. Ten sam zamysł został zrealizowany w innych badaniach z użyciem szczepów A/PR/8/34 (H1N1), A/Udorn/307/72 (H3N2) oraz A/New Caledonia/20/99 (H1N1).⁵⁶ Efekt inhibitorowy został osiągnięty i wywołał ochronne działanie względem testowanych myszy. W kolejnej pracy, testowano ASO względem rejonów terminalnych 5' i 3' PB2 vRNA, obejmujących sygnały pakowania.⁵⁷ Efekt zahamowania namnażania wirusa został osiągnięty w warunkach komórkowych dla ośmiu szczepów H1N1. Podobną aktywność przeciwwirusową wobec kilku szczepów wirusa wykazano dla ASO nakierowanych na rejon pakowania segmentów PB1 i PA.⁵⁸ Konserwatywny rejon terminalny był także celem działania ASO o dużej aktywności w badaniach przeprowadzonych na wysoce patogennym szczepie A/Tiger/Harbin/01/2002 (H5N1).⁵⁹ Doświadczenia na myszach pozwoliły stwierdzić, że miano wirusa w płucach zostało skutecznie obniżone, a pozostałe negatywne efekty zdrowotne wywoływane przez patogen zniwelowane. W badaniach komórkowych testowano również ASO nakierowane na kodony AUG mRNA PB1, PB2, PA i NP.⁶⁰ Rezultaty potwierdziły efekt przeciwwirusowy zależny od położenia miejsca hybrydyzacji względem kodonu AUG. Maksymalna uzyskana inhibicja szczepu A/PR8/34 (H1N1) wynosiła 78%. Kontynuacją tych doświadczeń było przeprowadzenie testów na myszach, w których uzyskano zbliżone wyniki zahamowania namnażania wirusa. Odnotowano 10-krotne obniżenie miana wirusa w płucach myszy infekowanych wirusem H1N1.^{61, 62}

Ponadto, opublikowane prace prezentowały także wyniki działania modyfikowanych ASO. Oligomery nakierowane na segment PB1 oraz PA okazały się zdolne do zahamowania namnażania wirusów szczepu A/PR8/34 (H1N1) oraz A/WSN/33 (H1N1) w teście łyśinkowym.^{63, 64} Efekt inhibitorowy modyfikowanych ASO działających na miejsce wiązania białka NP z RNA uchronił zainfekowane myszy przed działaniem śmiertelnej dawki wirusa.⁶⁵ Kolejne doświadczenia polegały na celowaniu w konserwatywne rejonu genu NS1 wysoce patogennego szczepu A/Chicken/Henan/1/04 (H5N1).⁶⁶ Wyniki analiz przeprowadzonych na tkance płuc oraz zainfekowanych

zwierzętach pozwoliły stwierdzić obniżenie miana wirusa pod wpływem modyfikowanych ASO. Zaproponowano, że w przyszłości ASO mogą posłużyć jako forma profilaktyki oraz terapii zakażeń wirusem grypy u ludzi.

W opublikowanych pracach stosowano również syntetyczne analogii kwasu nukleinowego w formie koniugatów oligomerów morfolinowych i peptydów penetrujących komórki. ASO nakierowane były na miejsce startu translacji mRNA PB1 i NP, a także region 3'-terminalny vRNA NP szczepu SC35M H7N7.⁶⁷ Wykazano redukcję miana wirusa i przeżycie 30% infekowanych myszy. Ponadto, oligomery morfolinowe były stosowane przeciwko wirusowi szczepu A/Eq/Miami/1/63 (H3N8).⁶⁸ Wywołały one obniżenie replikacji wirusa o 95% u myszy. W innych badaniach testowano oligomery morfolinowe nakierowane na sekwencje konserwatywne wśród szczepów oraz uważane za funkcjonalnie istotne.⁶⁹ Dwa z nich - celujący w kodon AUG mRNA PB1 oraz 3'-terminalny rejon vRNA NP - wykazały potencjał hamujący względem szerokiego spektrum szczepów: A/WSN/33 (H1N1), A/Memphis/8/88 (H3N2), A/Eq/Miami/63 (H3N8), A/Eq/Prague/56 (H7N7) oraz A/Thailand/1(KAN-1)/04 (H5N1).

Badania nad strukturą drugorzędową segmentów wirusa z użyciem technik eksperymentalnych oraz bioinformatycznych zapoczątkowały nowe podejście do projektowania ASO.^{25-27, 37-39} Jego podstawą jest selekcja miejsc docelowego działania oligomerów bazująca na danych strukturalnych wskazujących istnienie miejsc jednoniciowych i dostępnych dla hybrydyzacji. Metodę zastosowano względem segmentów vRNA8, vRNA5 oraz (+)RNA5. W pełni 2'-O-metylowane oligomery zawierające nukleotydy typu LNA nakierowane głównie na rejony wewnętrzne segmentów wykazały inhibicję wirusa A/California/04/2009 (H1N1).^{25, 27, 38, 39} Obniżenie miana wirusa dla najlepszych testowanych ASO było kilkudziesięciokrotne w komórkach MDCK.

Badania nad ASO toczą się także w kontekście sposobów ich dostarczenia do komórek. Przykładem nowego podejścia jest zastosowanie przeciwciała jako systemu wprowadzającego.⁷⁰ ASO modyfikowane resztami tiofosforanowymi były nakierowane na konserwatywne rejony 5' i 3' UTR mRNA PA. Wykazały wysoką aktywność przeciwwirusową w doświadczeniach na linii komórkowej MDCK oraz na myszach infekowanych wirusem A/Tiger/Harbin/01/2002 (H5N1). W literaturze istnieją również doniesienia o zastosowaniu wektorów lentiwirusowych jako nośników sekwencji ASO

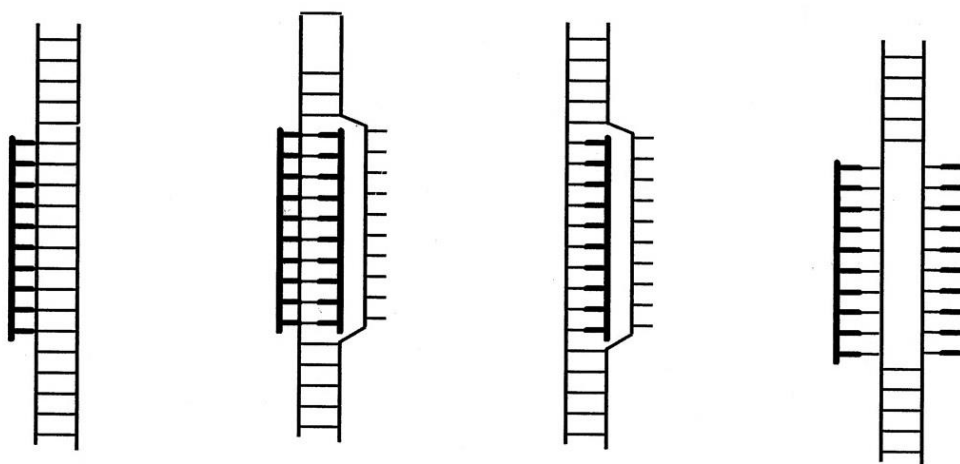
do linii komórkowych.⁷¹ Celem ich działania był rejon 5'UTR vRNA1, vRNA2 oraz vRNA3 wirusa szczepu A/PR/8/34 (H1N1). Inhibicja zapewniona przez konstytutywną ekspresję ASO w komórce była ponad 10-krotna. Rolę nośników mogą także pełnić nanocząstki. Przykładem są oligomery DNA przyłączone do dwutlenku tytanu mającego zdolności do penetracji komórki.⁷² Miejscem ich docelowego działania był konserwatywny rejon niekodujący 3' RNA segmentu 5. Doświadczenia na komórkach MDCK wykazały kilkukrotną inhibicję namnażania szczepów A/Aichi/2/68 (H3N2), A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) oraz A/Salekhard/01/2009 (H1N1).

ASO są przedmiotem licznych prowadzonych aktualnie prób klinicznych mających w perspektywie zastosowanie nowych terapii u ludzi. W 2018 roku upubliczniono wyniki pierwszej fazy badań bezpieczeństwa i właściwości farmakokinetycznych oligomeru morfolinowego, zawierającego reszty piperazyny w określonych pozycjach łańcucha.⁷³ Jest on nakierowany na inhibicję translacji M1/M2 poprzez wiązanie do konserwatywnych sekwencji mRNA. Pozytywne rezultaty prób, w których ASO podawano pacjentom wskazują, że będą prowadzone dalsze badania zmierzające do jego zarejestrowania jako leku przeciwko wirusowi grypy typu A.

3.2 PNA formujące trypleksy

Peptydowy kwas nukleinowy (PNA) jest sztucznym analogiem kwasu nukleinowego z nukleozasadami związanymi ze szkieletem neutralnego pseudopeptydu poprzez wiązanie metylenokarbonylowe.⁷⁴ Pierwsze doniesienie literaturowe dotyczące PNA pojawiło się w roku 1991. W kolejnych latach oligomery PNA znalazły szerokie zastosowanie w biologii molekularnej oraz jako potencjalne cząsteczki o działaniu terapeutycznym.⁷⁵⁻⁸² PNA są chemicznie trwałe i wykazują wyjątkową odporność na nukleazy i proteazy. Jest to cecha szczególnie korzystna w kontekście aktywności cząsteczki w warunkach *in vitro* i *in vivo*. PNA są zdolne do tworzenia dupleksów poprzez klasyczne parowanie zasad typu Watsona-Cricka, z komplementarnymi niciami w orientacji równoległej lub antyrównoległej. Ze względu na fakt, iż szkielet PNA jest pozbawiony ładunku, nie występuje zjawisko elektrostatycznego odpychania nici charakterystyczne dla fosfocukrowego szkieletu DNA oraz RNA. Powinowactwo, specyficzność i stabilność termodynamiczna wiązania oligomerów PNA są znacznie zwiększone w porównaniu do naturalnych DNA lub RNA.^{74, 76, 83-85} Wystąpienie nawet pojedynczego niesparowania w sposób znaczący obniża temperaturę topnienia i trwałość dupleksu. Niemodyfikowane PNA mogą tworzyć także oddziaływania typu Hoogsteen,

które prowadzą do powstania potrójnej helisy. Nie wykazują szczególnej selektywności wiązania względem jednoniciowych lub dwuniciowych kwasów nukleinowych. PNA może wiązać się do rejonu docelowego na różne sposoby, przyłączając się do istniejących struktur lub powodując ich naruszenie (Rycina 6). W drugim przypadku, homopirymidynowe oligomery mogą tworzyć trypleksy rozplatając dwuniciowe rejony DNA lub RNA i formować struktury PNA•DNA-PNA lub PNA•RNA-PNA. Dwie nici PNA tworzą wtedy pary Watsona-Cricka i Hoogsteena odpowiednio z nicią DNA lub RNA. Druga z nici DNA lub RNA pozostaje natomiast niesparowana i występuje w postaci tzw. pętli p (z ang. *P-loop*) (Rycina 6).^{74, 79, 86-89}

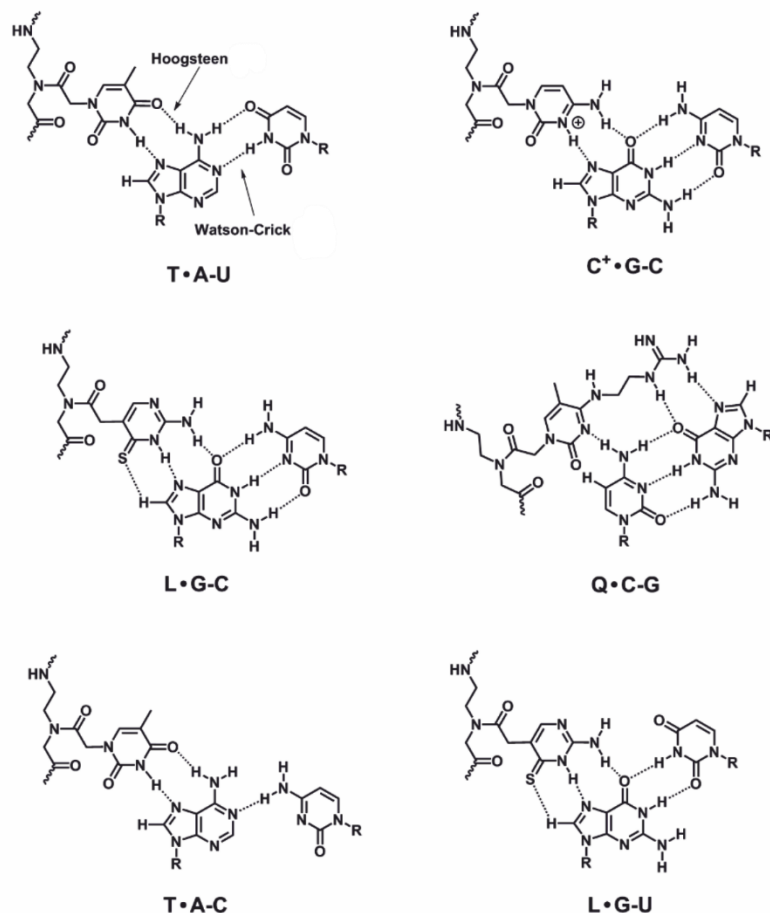


Rycina 6. Możliwe oddziaływania tworzone pomiędzy PNA a innymi kwasami nukleinowymi. PNA oznaczone są pogrubioną linią.

Pierwsze zastosowania PNA jako metody inhibicji opierały się na jego działaniu antysensowym oraz zmianie struktury kwasów nukleinowych skutkujących zahamowaniem transkrypcji i translacji w komórkach eukariotycznych.⁹⁰⁻⁹⁴ Początkowo, zasadniczym czynnikiem limitującym były ograniczone zdolności wnikania PNA do żywych komórek. Konieczność poprawienia właściwości PNA doprowadziła do zaprojektowania szeregu skutecznych strategii. Pośród nich wymienić można połączenie PNA z oligomerami DNA, ligandami receptorów, liposomami oraz peptydami penetrującymi błony komórkowe. Podejścia te zostały z powodzeniem zastosowane w kilku przeprowadzonych badaniach.^{93, 95, 96} Na szczególną uwagę zasługuje opisane w literaturze pojawienie się nowych, korzystnych cech dzięki zastosowaniu koniugatów PNA-neamina.⁹⁷ Zapewniają one zwiększoną rozpuszczalność PNA, przenikanie do komórek, stabilizację potrójnych helis oraz potencjał przecinania RNA w rejonie

docelowego wiązania. Ostatnia z wymienionych cech wynika z wykazywanej przez diaminy i poliaminy zdolności do katalizowania hydrolizy RNA. Przecięcie przez neaminę w pobliżu miejsca hybrydyzacji obserwowane było w zakresie pH 7,0- 8,0 oraz w obecności jonów dwuwartościowych o fizjologicznym stężeniu. Mechanizm tej reakcji nie został w pełni wyjaśniony. Nieznany jest także wpływ struktury drugorzędowej RNA na działanie neaminy. Strategia z zastosowaniem koniugatów została jednak wykorzystana w badaniach przeciwko wirusowi HIV i doprowadziła do zahamowania jego namnażania w komórkach.⁹⁸

Niemodyfikowany PNA zawierający zasady C i T może wiązać się z dużą bruzdą dupleksu RNA i tworzyć trypleks PNA-RNA-RNA jedynie w stosunkowo niskim pH wynoszącym 5,5. Struktura jest wtedy stabilizowana przez trójki nukleotydów C⁺•G-C i T•A-U (Rycina 7).⁸⁸ Odnotowano, że krótkie oligomery preferencyjnie wiążą się do dwuniciowych RNA, prawdopodobnie przyczyną jest niepełna kompatybilność strukturalna wiązania do większej bruzdy DNA. W celu zwiększenia powinowactwa i selektywności wiązania PNA do dwuniciowych RNA w warunkach zbliżonych do fizjologicznych opracowane zostały zmodyfikowane zasady.⁹⁹⁻¹⁰¹ Wykazano, że PNA zawierające tiopseudoizocytozynę (L) i 5-metylocytozynę zmodyfikowaną guanidyną (Q) mogą preferencyjnie wiązać dwuniciowe RNA, w stosunku do jednoniciowych RNA i dwuniciowych DNA, w sposób zależny od sekwencji (Rycina 7).^{100, 102-106} Pierwsza z modyfikowanych zasad została zaczerpnięta z badań prowadzonych nad tworzeniem trypleksów DNA₂-DNA. Przewiduje się, że na podobnych zasadach oparte jest działanie monomerów wprowadzonych do sekwencji PNA. Podobna stabilność dupleksów RNA-RNA oraz RNA-PNA jest przyczyną indukowanej przez PNA inwazji dupleksu RNA. Tiopseudoizocytozyna wykazuje steryczne odpychanie guanozyny w parze typu Watson-Crick, dlatego destabilizuje ewentualne wiązanie RNA-PNA. Natomiast, w przypadku par typu Hoogsteen wzmacnia oddziaływania van der Waalsa skutkując stabilizacją trypleksu RNA₂-PNA i minimalizacją wpływu pH oraz jonów na to wiązanie. Druga z modyfikacji, 5-metylocytozyna zmodyfikowana guanidyną, z wysoką specyficznością tworzy wiązanie Q•C-G. Jednocześnie, faworyzuje formowanie trypleksu poprzez steryczną destabilizację tworzenia ewentualnej pary typu Watson-Crick. Modyfikacja wspomaga także zdolność PNA do penetracji błony komórkowej.



Rycina 7. Struktury chemiczne trójek nukleotydowych będących podstawą trypleksów tworzonych pomiędzy PNA i RNA.

Zdolność do tworzenia trypleksów z dwuniciowymi RNA wydaje się wyjątkowo interesującą cechą oligomerów PNA. Struktury helikalne są zwykle rejonami, których dostępność dla strategii inhibicji jest bardzo ograniczona. Jednocześnie motywom, w których występuje parowanie nukleotydów, takich jak chociażby spinki do włosów, często przypisuje się istotne funkcje biologiczne. Wiele par nukleotydowych wykazuje wysoką zachowawczość, wspierając hipotezę roli w ważnych procesach wewnątrzkomórkowych. Przyłączenie PNA może prowadzić do stabilizacji dupleksów RNA, zakłócenia oddziaływań trzeciorzędowych oraz interakcji z białkami. Kierunek rozwijania tego typu podejść, nastawionych na celowanie w helikalne rejony RNA, stanowi wciąż obszar badawczo niewyeksplorowany. Istnieją duże szanse, że nowe odkrycia w tej dziedzinie przyniosą przełomowe koncepcje i pomysły, które zaowocują w zastosowaniach terapeutycznych. Pierwsze badania z zastosowaniem PNA

formujących trypleksy nakierowanych na hamowanie namnażania wirusa grypy są przedmiotem niniejszej pracy.

3.3 siRNA

Interferencja RNA (RNAi) jest to występujący wśród wielu organizmów mechanizm wewnątrzkomórkowej posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów poprzez ingerencję w mRNA. Po raz pierwszy został opisany w 1998 roku.¹⁰⁷ Podczas gdy RNAi jest naturalnym procesem regulacji genów istnieją narzędzia oligonukleotydowe wykorzystujące ten mechanizm dla celów inhibitorowych. Takim mediatorem są wprowadzane z zewnątrz do komórek małe interferujące RNA, czyli siRNA (z ang. *small interfering RNA*).¹⁰⁸ Składają się z dwóch antyrównoległych nici RNA tworzących dupleks. Obecnie projektując siRNA przeważnie umieszcza się na końcu 3' tzw. wystające końce zbudowane z dwóch niesparowanych nukleotydów tymidynowych.¹⁰⁸ Ich rolą jest zapewnienie stabilności termodynamicznej i enzymatycznej dupleksu w niesprzyjających kwasom nukleinowym warunkach wewnątrzkomórkowych. Długość łańcuchów RNA może być różna, jednak zwykle waha się w granicach 21 nukleotydów. Każda z nici pełni odrębną rolę w inicjowanych przez siRNA procesach komórkowych. Jedna z nici, zwana antysensową lub wiodącą, niesie sekwencję komplementarną do rejonu docelowego w mRNA. Druga zaś, zwana sensową lub pasażerską, odpowiada sekwencji miejsca docelowego. SiRNA wchodzi w interakcję z białkowym kompleksem RISC (z ang. *RNA-induced silencing complex*). Nić pasażerska jest usuwana z kompleksu prawdopodobnie poprzez przecięcie i dalszą degradację. Wtedy dochodzi do aktywacji RISC i nić wiodąca hybryduje do rejonu docelowego mRNA w sposób specyficzny wobec sekwencji. Następnie, dochodzi do przecięcia transkryptu przez białko efektorowe kompleksu Ago. Wykorzystując ten naturalnie zachodzący proces, odpowiednio zaprojektowane, egzogenne, syntetyczne siRNA po wprowadzeniu do komórki mogą stać się skutecznymi inhibitorami ekspresji genów.¹⁰⁸

Szereg czynników wpływa na efektywność wyciszania. Występują ograniczenia podobnie jak w przypadku innych kwasów nukleinowych o potencjale terapeutycznym. Zasadniczym problemem jest m.in. szeroko pojęta stabilność siRNA. Bazując na doświadczeniu płynącym z zastosowania ASO, zaczęto wprowadzać modyfikacje chemiczne poszczególnych części składowych siRNA.¹⁰⁹ Jednak, w przypadku siRNA podejście to okazało się mieć trudne do przewidzenia konsekwencje. Tylko niektóre modyfikacje pozwalają na zachowanie wysokiej aktywności siRNA. Efekt wydaje się być

zależny zarówno od rodzaju modyfikacji, umiejscowienia w nici, liczby wprowadzonych zmian oraz sekwencji dupleksu. Prawdopodobnie ograniczenia są narzucone przez budowę i sposób działania kompleksu białkowego RISC. Mimo licznych badań nadal brakuje elementów budujących pełen obraz zachodzących przemian i wyjaśniających obserwowane wyniki. Nie zaproponowano do tej pory reguł i schematów, które w sposób wiarygodny i jednoznaczny opisywałyby prawa rządzące korzystną dla procesu inkorporacją modyfikowanych nukleotydów do siRNA.

Możliwość sterowania procesem RNAi stała się atrakcyjną, alternatywną strategią celowania w RNA pochodzenia wirusowego¹¹⁰ Dotychczas opublikowano kilkanaście prac dotyczących zastosowania niemodyfikowanych siRNA jako inhibitorów namnażania wirusa grypy typu A. W eksperymentach stosowano szeroki zakres metod wprowadzania siRNA do komórek oraz stężeń reagentów. Różnice dotyczyły także wykorzystywanych szczepów i stężeń wirusa grypy oraz metod monitorowania miana wirusa w zakażonych komórkach. Wymienione rozbieżności niejednokrotnie utrudniają porównanie i interpretację rezultatów uzyskanych przez różne grupy badawcze. Pierwsze doniesienia o aktywności siRNA nakierowanych na mRNA segmentów wirusa pojawiły się w 2003 roku. Testowano wtedy szereg cząsteczek o różnych rejonach docelowego działania.¹¹¹ Kryterium doboru stanowiła zachowawczość sekwencji pośród szczepów i podtypów wirusa. Pominięto wysoce zmienne segmenty HA i NA. Około 40% zaprojektowanych siRNA wykazało znaczącą aktywność przeciwwirusową względem szczepów A/PR/8/34 (H1N1) i A/WSN/33 (H1N1) w komórkach MDCK. Stopień inhibicji wywołany przez poszczególne siRNA różnił się w zależności od szczepu.¹¹¹ Dupleksy o największym potencjale, celujące w mRNA podjednostek polimerazy i białka NP, zostały poddane testom na myszach.¹¹² W efekcie zaobserwowano obniżenie namnażania wirusa w płucach zwierząt. Następnie, pokazano również, że te same siRNA wykazują działanie wobec wielu szczepów wirusa: A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Hong Kong/156/97 (H5N1), A/NL/219/03 (H7N7) oraz A/Hong Kong/1073/99 (H9N2).¹¹³ Na liniach komórkowych badano również działanie siRNA nakierowanych na miejsce splicingowe oraz konserwatywne pod względem sekwencji rejonu mRNA segmentu 7.¹¹⁴ ¹¹⁵ Eksperymenty zaowocowały zahamowaniem namnażania wirusa szczepu A/WSN/33 (H1N1). Ten sam segment był miejscem docelowego działania efektywnych siRNA testowanych w warunkach komórkowych na szczepach A/New Caledonia/20/1999 (H1N1), A/Hong Kong/486/97 (H5N1), A/India/LKO2151/2012 (H1N1)

i A/India/LKO864/2011 (H3N2).^{116, 117} Kolejne doświadczenia, w których celowano w konserwatywne rejony M2 oraz NP przeprowadzone były na komórkach MDCK oraz myszach.¹¹⁸ Pod wpływem działania siRNA replikacja oraz miano wirusa zostały znacząco obniżone dla szczepów A/chicken/Hubei/327/2004 (H5N1), A/Duck/Hubei/W1/2004, (H9N2) oraz A/Hubei/2003 (H1N1). Opublikowano także wyniki badań siRNA nakierowanych na konserwatywne rejony sekwencji PB1, PA oraz NP. Najlepsze wyniki uzyskano dla ostatniego z wymienionych segmentów w eksperymentach komórkowych oraz na myszach infekowanych wirusem A/chicken/Qinghaihu/726/2005 (H5N1). Transkrypt podjednostki polimerazy PA był celem siRNA hamujących replikację wirusa A/Tiger/Harbin/01/2002 (H5N1) w warunkach *in cellulo* oraz *in vivo*.¹¹⁹ Jednak, znaczący efekt inhibicji został osiągnięty tylko przez jedną z trzech testowanych cząsteczek. Kolejne badania dotyczące szczepu A/duck/Fujian/13/2002 (H5N1) przeprowadzone zostały na komórkach MDCK.¹²⁰ Miejsca docelowe działania zaprojektowanych siRNA znajdowały się w konserwatywnych pod względem sekwencji rejonach PB1, PA, NP i NS1 dla podtypu H5N1. Wyniki pokazały, że dwie cząsteczki z pięciu zaprojektowanych wykazały znaczącą inhibicję namnażania wirusa. Również konserwatywne rejony segmentów PB1, PB2, PA, NP oraz M1/M2 były celem badań siRNA wykonanych na komórkach A549.¹²¹ Pośród nich wysoki potencjał inhibicji wykazały siRNA nakierowane na podjednostki polimerazy wirusowej, hamując transkrypcję wirusową o 70%. Kolejne badania siRNA nakierowanego na podjednostkę PB1 przeprowadzono na linii komórkowej MDCK, zarodkach kurzych i myszach.¹²² Osiągnięto ponad 50% przeżywalność zwierząt infekowanych letalną dawką A/PR/8/34 (H1N1). W warunkach komórkowych testowano także osiem siRNA nakierowanych na mRNA NP, infekując komórki MDCK pięcioma szczepami wirusa: A/turkey/Italy/2676/2000 (H7N1), A/swine/Italy/1521/1998 (H1N2), A/swine/Italy/1523/1998 (H3N2), A/swine/Italy/1513/1998 (H1N1) oraz A/swine/Italy/437/1976 (H1N1).¹²³ Rezultatem było obniżenie liczby kopii mRNA wirusowego. Stwierdzono, że wystąpienie pojedynczego niesparowania pomiędzy nicią wiodącą a rejonem docelowym powoduje zmniejszenie efektu inhibitorowego, lecz nie niweluje działania siRNA w sposób całkowity. Geny PB2 oraz NP. były celem działania skutecznych siRNA nakierowanych na szczep A/chicken/Navapur/7972/2006 (H5N1) w komórkach MDCK.¹²⁴ Na tej samej linii komórkowej testowano siRNA przeciwko segmentowi 7 i 8.¹²⁵ Maksymalne obniżenie kopii RNA wirusowego szczepu A/WS/33 (H1N1) wyniosło około 55% w przypadku siRNA nakierowanych na segment 7.

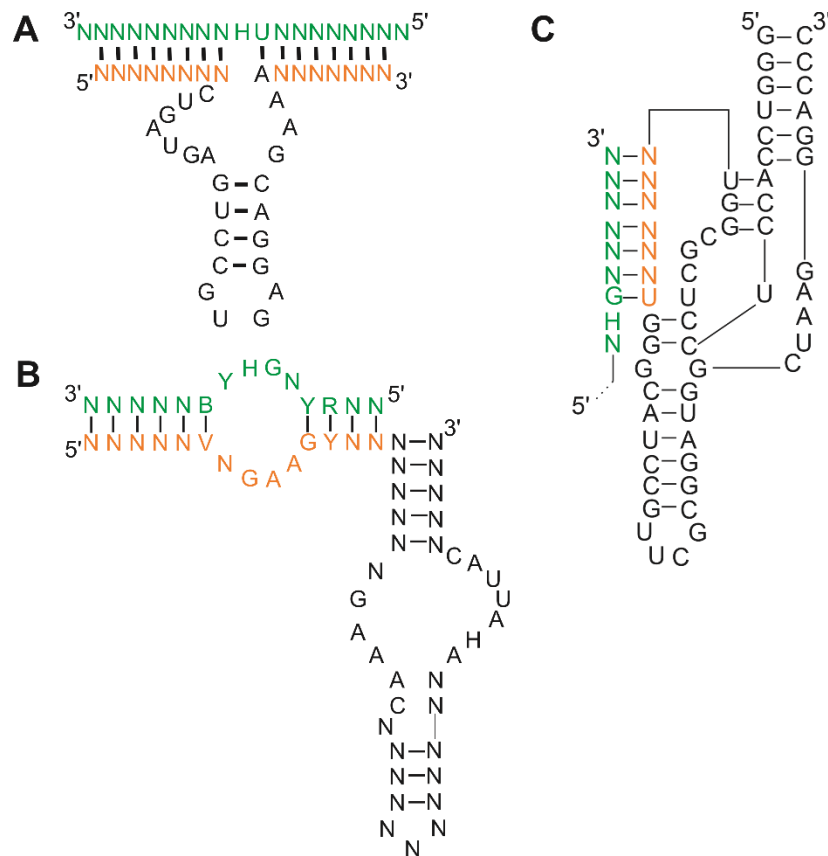
Znaczącej redukcji miana wirusa nie udało się uzyskać dla siRNA wymierzonych w segment 8. W innych badaniach, serię siRNA nakierowanych na mRNA podjednostek polimerazy testowano na myszach.¹²⁶ Dla jednego z dupleksów odnotowano 70% przeżycie myszy traktowanych śmiertelną dawką wirusa A/WSN/33 (H1N1). Wszystkie opisane prace oprócz dwóch^{116, 120} nie opierały schematu projektowania siRNA na analizach strukturalnych. Dwie wymienione prace bazowały na przewidywaniu struktury drugorzędowej *in silico*, gdyż nie dysponowały danymi eksperymentalnymi. Tak jak wspomniano powyżej pozostali autorzy celowali w konserwatywne sekwencje RNA wirusowego.

W dużej części opublikowanych prac wykorzystywano metody wprowadzania siRNA w postaci konstruktów osadzonych na plazmidowych lub lentiwirusowych wektorach ekspresyjnych. Zapewniają one stałą i długotrwałą produkcję siRNA w komórkach. Testowano także użycie nośników nanocząsteczkowych.¹²⁷ Biorąc pod uwagę tkankową lokalizację infekcji u ludzi oraz modelowych zwierząt obejmującą górne drogi oddechowe i płuca, istnieje możliwość dostarczenia siRNA drogą donosową. Jedna z grup badawczych pracujących nad aplikacją siRNA zastosowała metodę suszenia rozpyłowego siRNA w celu uzyskania proszku do podania w formie aerozolu.¹²⁸ Dodatkowo, kompleksowanie siRNA z peptydami wrażliwymi na zmiany pH pozwoliło na zwiększenie uwalniania cząsteczek z endosomów. Przeciwdziałanie uwięzieniu dostarczanych kwasów nukleinowych o potencjale terapeutycznym w endosomach zapewnia pokonanie jednej z barier limitujących ich aktywność.

3.4 Katalityczne kwasy nukleinowe

Rybozomy należą do grupy cząsteczek RNA o aktywności katalitycznej. Ich występowanie oraz funkcje biologiczne zostały zaobserwowane w przebiegu procesów biologicznych wymagających przecinania wiązań fosfodiesterowych kwasów nukleinowych.¹²⁹ Naturalne rybozomy typu *hammerhead*, *hairpin* i HDV katalizują obróbkę multimerycznych transkryptów do pojedynczych cząsteczek i występują głównie w wiroidach roślinnych i RNA satelitarnym. W przyrodzie istnieją także rybozomy należące do intronów grupy I lub II, które pełnią rolę w składaniu transkryptów np. w organellach grzybów, roślin, protistów, a także u bakterii i archeonów. Aktywność rybozymów stała się obiektem zainteresowania naukowego ze względu na opracowanie wariantów rybozymów o stosunkowo niewielkich rozmiarach w stosunku do cząsteczek występujących w naturze. Do najlepiej poznanych należy rybozym typu *hammerhead*

(Rycina 8A). Składa się on z 22-nukleotydowego konserwatywnego rdzenia katalitycznego oraz dwóch ramion o zmiennej sekwencji, które determinują hybrydyzację do rejonów docelowego działania. Ramiona pozwalają na skierowanie aktywności rybozymu na dowolną sekwencję zawierającą tryplet NUH w miejscu potencjalnego przecięcia (gdzie N to dowolny nukleotyd, a H to dowolny nukleotyd z wyłączeniem G). W obecności substratu dochodzi do utworzenia trzech helis oraz trzech jednoniciowych rejonów pomiędzy nimi. Docelowy RNA jest przecinany w miejscu występowania pojedynczego niesparowanego nukleotydu pomiędzy pierwszym a ostatnim rejonem dwuniciowym formowanego kompleksu.



Rycina 8. Schemat budowy minimalnych wariantów rybozymów typu *hammerhead* (A), *hairpin* (B) oraz HDV (C) związanych z docelowym RNA. Kolorem zielonym oznaczono rejon sekwencji docelowego RNA, a pomarańczowym hybrydujący do RNA rejon rybozymu.

Drugi z minimalnych wariantów to rybozym typu *hairpin* (Rycina 8B).¹³⁰ Składa się z czterech helis przerwanych dwoma pętlami, a w rozpoznawanie substratu zaangażowanych jest 14 nukleotydów. Działanie rybozymu jest wysoce specyficzne

względem zaprojektowanej sekwencji. Pośród znanych katalitycznych kwasów nukleinowych należy wymienić także rybozym wywodzący się z naturalnego motywu obecnego u wirusa wątroby typu D (*Hepatitis delta virus*, HDV) (Rycina 8C).¹³¹ Przyjmuje on złożoną strukturę drugorzędową, a specyficzność przecięcia substratu warunkowana jest przez siedem nukleotydów.

Odrębną grupą cząsteczek o aktywności katalitycznej są DNazymy.⁵² Są to jednoniciowe cząsteczki pochodzenia syntetycznego. Charakteryzują się centralnym motywem katalitycznym otoczonym dwoma ramionami komplementarnymi do miejsc docelowego działania. DNazymy zdolne do przecinania RNA pozyskane zostały na drodze selekcji *in vitro*, w której wyłoniono dwie grupy o nazwie „10-23” oraz „8-17”. Pierwsze dokonują cięć pomiędzy purynami a pirymidynami, drugie pomiędzy A a G, lecz dodatkowym warunkiem jest obecność pary rG-dT pomiędzy DNazymem a substratem tuż za miejscem przecięcia.

W literaturze odnotowano próby zastosowania rybozymów naczelnianych na RNA wirusa grypy przeprowadzone na liniach komórkowych. Pierwsza z prac opisywała użycie rybozymów typu *hammerhead* oraz *hairpin*.¹³² Kryterium doboru miejsca docelowego działania było wyselekcjonowanie trypletu GUC znajdującego się najbliżej zachowawczego rejonu znajdującego się na końcu 5' segmentu vRNA. Wymagania te spełnił segment 5, w którym tryplet nukleotydowy mogący być celem katalitycznego przecięcia RNA znajdował się w odległości 30 nukleotydów od końca 5'. Wstępne badania wykazały, że pierwszy z wariantów był bardziej efektywny w warunkach *in vitro*. W następnym etapie, rybozimy zostały wprowadzone do linii komórkowej COS w postaci wektorów plazmidowych. Zahamowanie namnażania rekombinowanego szczepu wirusa X-31 [powstałego z A/HK/68 (H3N2) i A/PR/8/34 (H1N1)] osiągnęło wartość 5-krotną. W kolejnych badaniach celem działania rybozymu *hammerhead* było mRNA PB1.¹³³ Sekwencje wprowadzano do komórek CV-1 przy użyciu wektora adenowirusowego. Sekwencja docelowego działania obejmowała tryplet GUC w pozycji 1568. Efekt 90% inhibicji obserwowano dla szczepów wirusa A/Singapore/1/57 (H2N2) oraz A/WSN/33 (H1N1). W kolejnych latach opublikowano pracę wykorzystującą do celów inhibicji wirusa grypy w komórkach MDCK zestaw DNazymów, rybozymów typu *hammerhead* oraz ASO.¹³⁴ Celem działania cząsteczek były konserwatywne pod względem sekwencji rejonu segmentu 7. Wykazano synergistyczny efekt działania kombinacji zaproponowanych cząsteczek rybozymów i DNazymów, które wywołały

około 50% inhibicję namnażania wirusa A/PR/8/34 (H1N1). ASO hybrydujące w okolicy miejsca przecięcia wspomagały potencjał rybozymów powodując zwiększenie efektu zahamowania. DNazymy redukujące namnażanie wirusa grypy były przedmiotem badań prowadzonych przez inne zespoły.¹³⁵⁻¹³⁷ Jedna z grup badawczych pracowała także nad zastosowaniem RNazy P wobec segmentów PB2 i NP wirusa grypy.¹³⁸ Pod wpływem niektórych wariantów zaproponowanych konstruktów namnażanie wirusa A/WSN/33 (H1N1) w komórkach zostało znacząco obniżone. W innych badaniach, stosowano ulepszoną wersję rybozimu HDV przeciwko wirusowi grypy.¹³⁹ Zawierał on specjalny adapter (SOFA) zwiększający specyficzność katalitycznego przecięcia. Jego obecność pozwala na czasowe zablokowanie aktywności katalitycznej i jej uruchomienie w obecności substratu. Rybozym został nakierowany na konserwatywne sekwencje w sześciu segmentach mRNA wirusowego (pominięto HA i NA). Niektóre warianty użyte w kombinacji zapewniły efekt ochronny u myszy infekowanych wirusem A/PR/8/34 (H1N1). Przeciwko wirusowi grypy zastosowano także nową koncepcję zakładającą wzmożony efekt inhibitorowy połączenia dwóch aktywnych cząsteczek pod postacią chimerycznego konstruktów RNA-rybozym.¹⁴⁰ Oba składniki połączone są linkerem, który ulega przecięciu w warunkach komórkowych pod wpływem obecności specyficznych nukleaz. Dochodzi do uwolnienia siRNA oraz rybozimu typu *hammerhead* oraz działania w miejscach docelowych. Strategia została nakierowana na segment 7. Wspólna aktywność komponentów zapewniła wzmożoną inhibicję wynoszącą 84%. Doświadczenia te pokazują, że zastosowanie dwóch cząsteczek o wysokim potencjale może przynieść korzystne efekty.

3.5 Aptamery

Aptamery występują zwykle pod postacią jednoniciowych oligonukleotydów DNA lub RNA o zróżnicowanej długości (zazwyczaj 20-90 nukleotydów), które przyjmują ściśle określone struktury przestrzenne.⁵² Powstają w wyniku selekcji *in vitro* i mają zdolność specyficznego wiązania różnych cząsteczek na wzór przeciwciał. W dotychczasowych badaniach, uzyskano aptamery rozpoznające antygeny wirusa grypy. Wykazano, że wiele aptamerów rozpoznających glikoproteinę powierzchniową wirusa HA jednocześnie blokuje jej aktywność i zapobiega wejściu wirusa do komórki. Przykładem takiego działania jest aptamer DNA A22, który obniżył miano wirusa w płucach myszy zakażonych szczepem A/Texas/1/77 (H3N2) o ponad 90%.¹⁴¹ Kontynuację tych badań stanowiły eksperymenty nad udoskonaleniem A22.¹⁴² Uzyskano

15-krotne zwiększenie potencjału w stosunku do pierwowzoru. W innej pracy, aptamer DNA nakierowany na NS1 hamował replikację wirusa i stymulował produkcję przeciwwirusowego interferonu w hodowli komórkowej.¹⁴³ Testowane były także aptamery wiążące podjednostki polimerazy PA, PB1 oraz PB2.¹⁴⁴ W toku doświadczeń wyłoniony został aptamer nakierowany na PA hamujący namnażanie kilku szczepów wirusa jednocześnie: A/HK/415742/09 (H1N1), A/Vietnam/1194/2004 (H5N1), A/Netherlands/219/2003 (H7N7) oraz A/Anhui/1/2013 (H7N9).

3.6 CRISPR

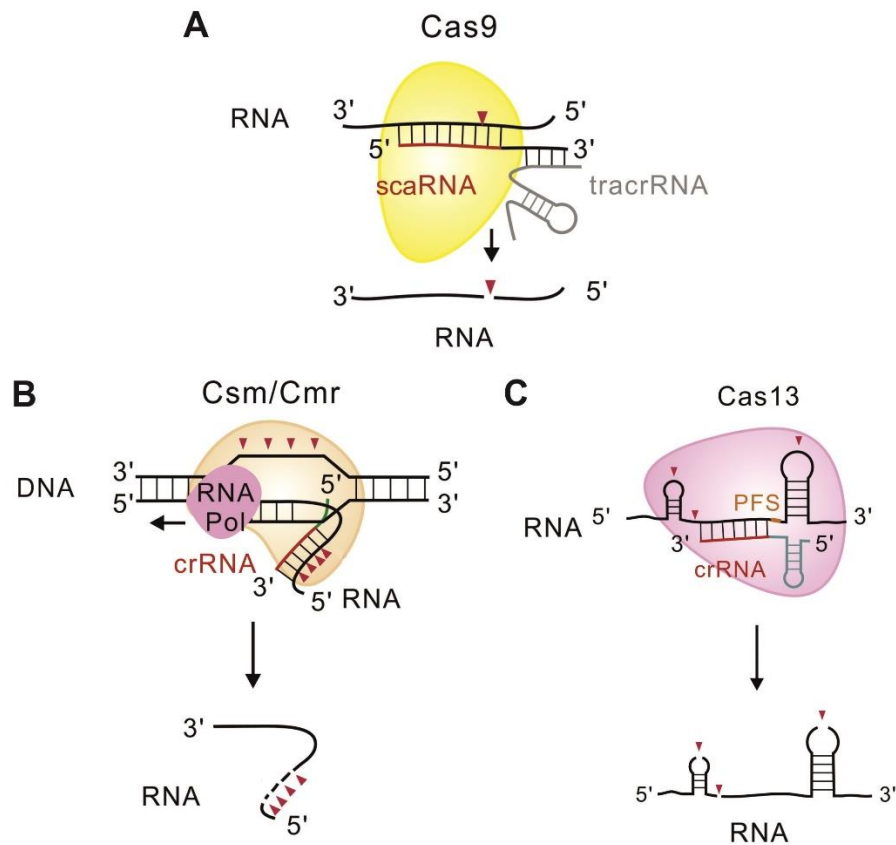
System CRISPR/Cas należy do najbardziej przełomowych odkryć ostatnich lat. Został pierwotnie wykryty u bakterii i archeonów jako mechanizm wewnętrznej odporności adaptacyjnej na wirusy i plazmidy.^{145, 146} Opiera się na działaniu małych cząsteczek RNA, które w sposób zależny od sekwencji kierują wyciszaniem obcych kwasów nukleinowych. System składa się z loci CRISPR, które zwykle występuje w postaci kilku rozproszonych powtórzeń, oddzielonych od siebie ciągami zmiennych sekwencji (z ang. *protospacer*). W jego pobliżu znajdują się także geny kodujące białka Cas, zwykle zorganizowane w formie operonów. Badania pokazały, że loci CRISPR są dynamiczne i ewoluują w odpowiedzi na kontakt z patogenami. Ciągi zmiennych sekwencji to w rzeczywistości fragmenty obcych kwasów nukleinowych wbudowane do genomu gospodarza w wyniku inwazji wirusów lub plazmidów. Kolejna styczność z patogenem wywołuje reakcję w postaci transkrypcji loci CRISPR i przetwarzania mRNA do małych RNA nakierowanych na obcy DNA. Systemy CRISPR/Cas dzielą się na klasy (1, 2) i typy (I-VI) na podstawie różnic w składowych i przebiegu procesu.¹⁴⁷ Fazy działania systemu w dużej mierze zależą od powiązanych z nimi białek. Białka Cas należą do heterogennej rodziny, w której występują domeny o funkcji nukleazy, helikazy, polimerazy oraz wiązania polinukleotydów. Pełnią one rozmaite zadania (np. pozyskiwanie nowych sekwencji do CRISPR loci), jednak pośród nich to Cas9 odpowiada za ostateczne wyciszenie sterowane przez RNA.^{145, 146}

System typu II ze względu na swoją charakterystykę i właściwości stał się obiektem największego zainteresowania badawczego.¹⁴⁷ Do jego prawidłowej aktywności wymagana jest obecność struktury dwuniciowej tworzonej pomiędzy transaktywującym CRISPR RNA (*tracrRNA*) oraz nakierującym CRISPR RNA (*crRNA*). Przecięcie determinowane jest komplementarnością zasad pomiędzy *crRNA* i sekwencją docelową oraz motywem sąsiadującym ze zmienną sekwencją (*protospacer*)

zwanym PAM (z ang. *protospacer adjacent motif*). Dokładniejsze poznanie elementów niezbędnych do przeprowadzenia procesu wyciszania pozwoliło na zastosowanie ich w tak zwanej programowanej edycji genomu.¹⁴⁸ W klasycznym podejściu stosowano nukleazę Cas9 pochodzącą z bakterii *Streptococcus pyogenes* sterowaną przez oddziaływanie tracrRNA i crRNA lub wzorowaną na nich chimerę sgRNA (z ang. *single guide RNA*). Małe RNA rozpoznają 20-nukleotydowy fragment sekwencji docelowego DNA. Wymagana jest także obecność sekwencji PAM w pobliżu końca 3' miejsca docelowego. Dalsze badania doprowadziły do pierwszych prób zahamowania namnażania wirusów o genomie DNA z użyciem systemu CRISPR/Cas.^{149, 150} Dotyczyły one takich wirusów jak HSV-1, HCMV, EBV, HBV, Vaccinia, ASF oraz PRV. Zjawisko wbudowywania sekwencji wirusa HIV-1 do genomu gospodarza pod postacią sekwencji DNA pozwoliło również na liczne próby zastosowania CRISPR/Cas.¹⁵¹ Obserwowanym efektem działania strategii była inhibicja replikacji patogenów.

Gwałtowne zainteresowanie licznych grup badawczych tematem doprowadziło do opublikowania szeregu doniesień w obszarze biologii i zastosowań CRISPR/Cas. Odkrycie zdolności bakterii *Francisella novicida* do wyciszania endogennych transkryptów za pomocą tegoż systemu zapoczątkowało doświadczenia nad kontrolowanym wyciszaniem RNA.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Bakteria posługuje się mechanizmem, aby uniknąć odpowiedzi odpornościowej zakażonego gospodarza. Zasadniczą rolę w tym procesie odgrywają trzy rodzaje małych cząsteczek RNA: tracrRNA, crRNA i scaRNA (z ang. *small CRISPR-Cas associated RNA*). Małe RNA współpracują ze sobą i nakierowują białko Cas9 na rejon docelowego działania (Rycina 9A). Warunkiem aktywności nukleazy jest obecność sekwencji NGG PAM. Na wzór poznanych interakcji zaprojektowany został uproszczony system oparty na działaniu cząsteczki rgRNA, która zastępuje i odtwarza funkcje sprawowane przez naturalnie występujące małe RNA. Metodę zastosowano w celu zahamowania namnażania wirusa HCV, osiągając efekt inhibitorowy na poziomie 70%.¹⁵⁴ Aktywność wyciszającą względem RNA wykazuje również system typu III (Rycina 9B). Rolę cząsteczki nakierowującej pełni w nich crRNA. Funkcje efektorowe sprawują kompleksy białkowe Csm/Cmr składające się z różnych podjednostek, które determinują specyficzność przecięcia RNA. Duże znaczenie dla badań dotyczących RNA miało także odkrycie systemów CRISPR/Cas typu VI opartych na działaniu białka Cas13 oraz pojedynczej cząsteczki crRNA (Rycina 9C).¹⁵⁵ Funkcje efektorowe są zależne od sekwencji i struktury rejonu docelowego.

Proces ulega regulacji przez dodatkowe białka systemu. Do tej pory system ten został użyty przeciwko wirusowi RNA roślin.^{156, 157} Przeprowadzone doświadczenia dotyczące wirusów RNA stanowią niewielki ułamek badań prowadzonych z użyciem technologii CRISPR/Cas. W literaturze przeważają raporty dotyczące systemów nakierowanych na DNA. Celowanie w RNA jest zatem obszarem o dużym potencjale, w którym rozwój wiedzy dopiero nastąpi i może przynieść nowe perspektywy badawcze.



Rycina 9. Schemat działania systemów CRISPR/Cas typu II (A), III (B) oraz VI (C) nakierowanych na RNA.¹⁴⁷

WYNIKI I DYSKUSJA

1. PNA jako inhibitory namnażania wirusa grypy

Chemicznie modyfikowane oligomery PNA zdolne do tworzenia stabilnych trypleksów z dwuniciowym RNA stają się obiecującymi nowatorskimi narzędziami posiadającymi korzystne cechy. Charakteryzują się obojętnym szkieletem podobnym do peptydów, są chemicznie stabilne i odporne na działanie nukleaz. Zapewniają także specyficzną rozpoznawania sekwencji i struktury rejonów docelowych RNA.^{82, 99, 102} Prezentowane badania stanowią pierwszą próbę zastosowania modyfikowanych PNA wiążących dwuniciowy RNA jako narzędzi hamujących namnażanie wirusa grypy. Przedstawione wyniki mają szczególne znaczenie, ponieważ nakierowane są na sekwencje i struktury RNA szczepu pandemicznego A/California/04/2009 (H1N1). Wszystkie docelowe dwuniciowe rejony RNA są wysoce konserwatywne strukturalnie i mogą być funkcjonalnie istotne dla cyklu replikacyjnego wirusa grypy.^{37, 45} W niniejszej pracy właściwości zaprojektowanych PNA analizowano za pomocą eksperymentów wiązania *in vitro*. Przeprowadzono elektroforezę w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących z użyciem krótkich modelowych cząsteczek RNA jako partnerów wiązania z PNA. W warunkach pozakomórkowych sprawdzano także potencjał PNA do wiązania z pełnej długości segmentami RNA wirusa grypy oraz DNA. Zdolność do penetracji komórek i aktywność przeciwwirusową koniugatów PNA testowano w hodowli komórkowej MDCK. Współpraca z zespołem prof. Ganga Chena (Uniwersytet Technologiczny Nanyang w Singapurze) pozwoliła na uzupełnienie uzyskanych wyników dodatkowymi danymi eksperymentalnymi potwierdzającymi specyficzną i uniwersalność PNA, jako inhibitora namnażania grypy.

1.1 Projektowanie PNA

PNA nakierowane na dwuniciowe regiony RNA wirusa grypy zostały zaprojektowane w oparciu o drugorzędowe struktury vRNA pełnej długości (vRNA8) i konserwatywnego motywu mRNA segmentu 8 (mRNA8) (Rycina 10).^{37, 45}

Struktura drugorzędowa vRNA8 szczepu A/California/04/2009 (H1N1) została wyznaczona w oparciu o wcześniej scharakteryzowaną strukturę drugorzędową vRNA8 szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), która jest konserwatywna dla typu A wirusa w 87,6%, na podstawie analizy 14135 sekwencji.³⁷ Strukturę drugorzędową vRNA8 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) zaproponowano stosując dane eksperymentalne uzyskane

w wyniku mapowań chemicznych, mikromacierzy izoenergetycznych, sekwencyjno-strukturalnych analiz bioinformatycznych oraz minimalizację energii swobodnej.³⁷ Modelowanie struktury vRNA8 A/California/04/2009 (H1N1) (Rycina 10A) przeprowadzono przy użyciu algorytmu Dynalign w programie RNAstructure 5.4, wprowadzając jako tzw. wyznaczniki (z ang. *constraints*) fałdowania struktury bazowej, vRNA8 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), konserwatywne pary zasad o zachowawczości większej lub równej 99,9%.^{27, 37} Program Dynalign wyznacza homologiczną strukturę drugorzędową dla dwóch sekwencji RNA o równocześnie minimalnej energii swobodnej.

Konserwatywny motyw mRNA8 został natomiast zaproponowany we wcześniejszych badaniach strukturalnych, dla sekwencji konsensusowej wyznaczonej na podstawie analizy 1017 unikatowych sekwencji mRNA8 pochodzących z różnych szczepów wirusa grypy typu A.⁴⁵ Motyw ten obecny jest w rejonie nukleotydów 81-148 NS1 mRNA (numeracja odnosi się do otwartej ramki odczytu), który sąsiaduje z miejscem splicingowym 5' mRNA8. Model struktury powstał w wyniku analiz mapowań chemicznych, mikromacierzowych oraz bioinformatycznych z uwzględnieniem konserwatywności par zasad dla wirusa grypy typu A i minimalizacji wartości energii swobodnej. Struktura motywu została zaprezentowana dla sekwencji mRNA8 szczepu A/California/04/2009 (H1N1) (Rycina 10B). Zmiany nukleotydowe w stosunku do sekwencji konsensusowej uniemożliwiły utworzenie par 27-42 i 29-40 przewidzianych w modelu. Co istotne, rejon docelowy PNA znajduje się w rejonie wysoce strukturalnie konserwatywnym dla typu A wirusa z prawdopodobieństwem utworzenia par zasad 97% i jednocześnie został przewidziany w strukturze o minimalnej energii swobodnej dla tej sekwencji motywu.

Jako cele potencjalnego wiązania PNA wybrano dwuniciowe rejony RNA wirusa grypy konserwatywne pod względem struktury i jednocześnie o sekwencji ułatwiającej utworzenie trypleksu. PNA mają zdolność hybrydyzowania do sekwencji komplementarnych i tworzenia trypleksów PNA•RNA-RNA. Dodatkowo, wprowadzono modyfikacje - tiopseudoizocytozynę (L) oraz 5-metylocytozynę modyfikowaną guanidyną (Q) - które zwiększają powinowactwo i specyficzność wiązania oligomerów do dwuniciowych rejonów RNA.

Zaprojektowano trzy sekwencje PNA do testów wiązania *in vitro* i eksperymentów w hodowli komórkowej (Tabela 1, Rycina 10). Każda z tych sekwencji występuje w trzech wariantach N-końca. PNA oznaczone jako IR-1a, IR-2a, IR-3a

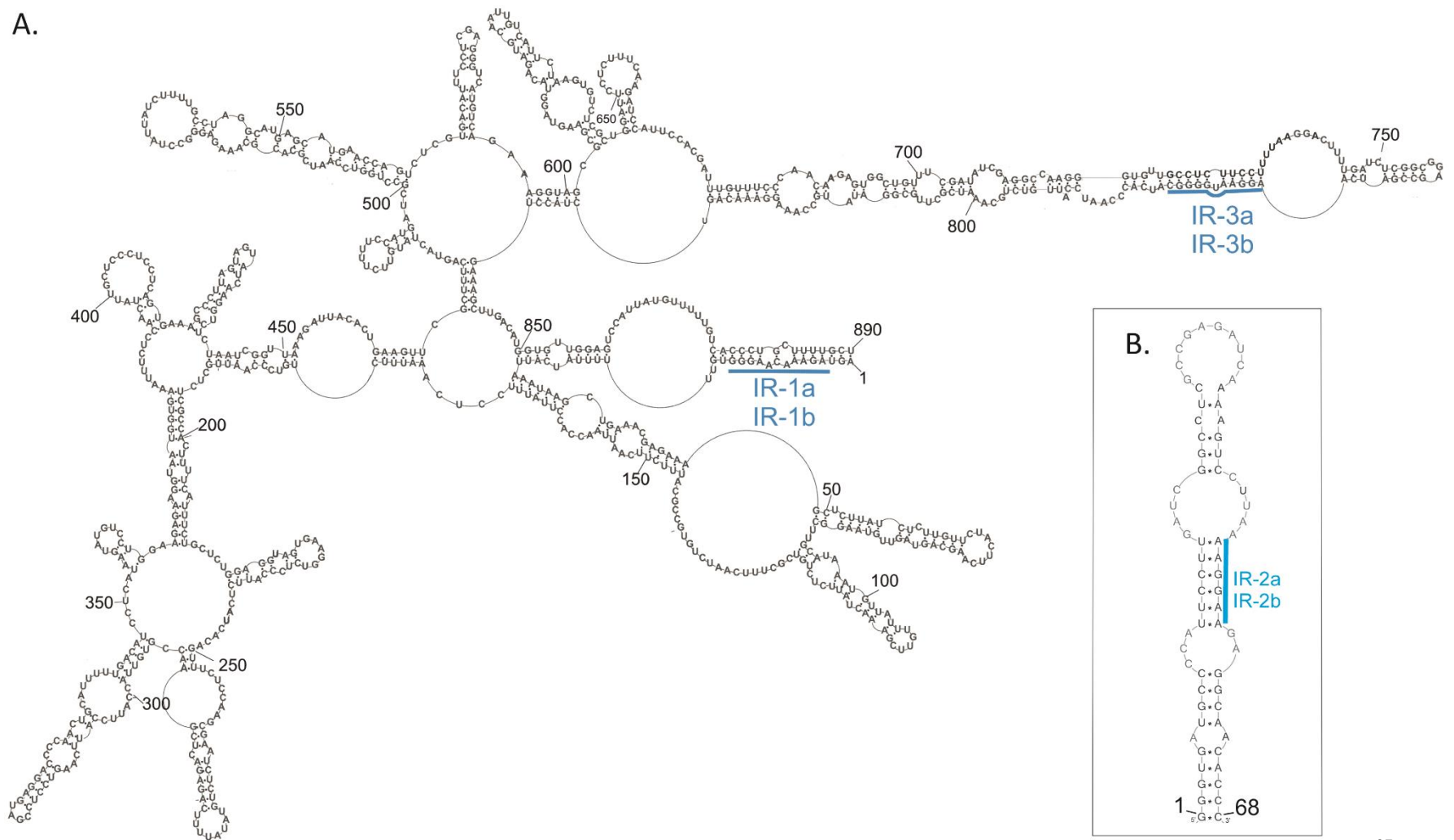
posiadają grupę 6-aminoheksylokarboksylową na N-końcu. IR-1b, IR-2b, IR-3b są koniugatami neaminy z PNA, w których neamina znajduje się na N-końcu. Koniugacja neaminy z PNA ma na celu ułatwienie jego penetracji przez błonę komórkową.^{97, 158} Dodatkowo, znakowanie koniugatu PNA-neamina za pomocą karboksyfluoresceiny (IR-1b-cf) pozwala na obrazowanie wewnątrzkomórkowej lokalizacji cząsteczek. PNA IR-1 zaprojektowano tak, aby celował wrejony dwuniciowy motyw *panhandle* (obejmującego nukleotydy 1-12), którego sekwencja i struktura jest uniwersalna dla wszystkich ośmiu genomowych segmentów vRNA wirusa grypy. PNA IR-3 nakierowany jest na dwuniciowy rejon RNA obejmujący nukleotydy 767-776 w vRNA8. Celem działania IR-2 jest dwuniciowy rejon konserwatywnego motywu mRNA8 obejmujący nukleotydy 131-136.

Na podstawie wcześniejszych badań dotyczących trypleksów^{103, 105} w miejscu występowania par G-U oraz niesparowania A•C w rejonie wiązania PNA przewidziano tworzenie trójek odpowiednio L•G-U oraz T•A•C. W motywie *panhandle* występuje jedna zasada U naprzeciw dwóch zasad A, dla których zaproponowano tworzenie tylko jednej trójki z zasadą T w PNA IR-1. Taka konstrukcja pozwala na współosiowe ułożenie trypleksu PNA•RNA•RNA oraz dodatkowej niesparowanej zasady A, która po związaniu PNA do bruzdy większej może utworzyć zewnętrzne jednonukleotydowe wybrzuszenie.

Tabela 1. Sekwencje badanych PNA.

Nazwa	Sekwencja PNA (N ^{ter} -PNA-C ^{ter})
IR-1a	NH ₂ - ahx -TLTTTQTLLL
IR-1b	NH ₂ -Lys(Neamina)-TLTTTQTLLL
IR-1b-cf	cf -Lys(Neamina)-TLTTTQTLLL
IR-2a	NH ₂ -ahx-TTLLTT
IR-2b	NH ₂ -Lys(Neamina)-TTLLTT
IR-2b-cf	cf -Lys(Neamina)-TTLLTT
IR-3a	NH ₂ - ahx -TLLTTLLLLQT
IR-3b	NH ₂ -Lys(Neamina)-TLLTTLLLLQT
IR-3b-cf	cf -Lys(Neamina)-TLLTTLLLLQT

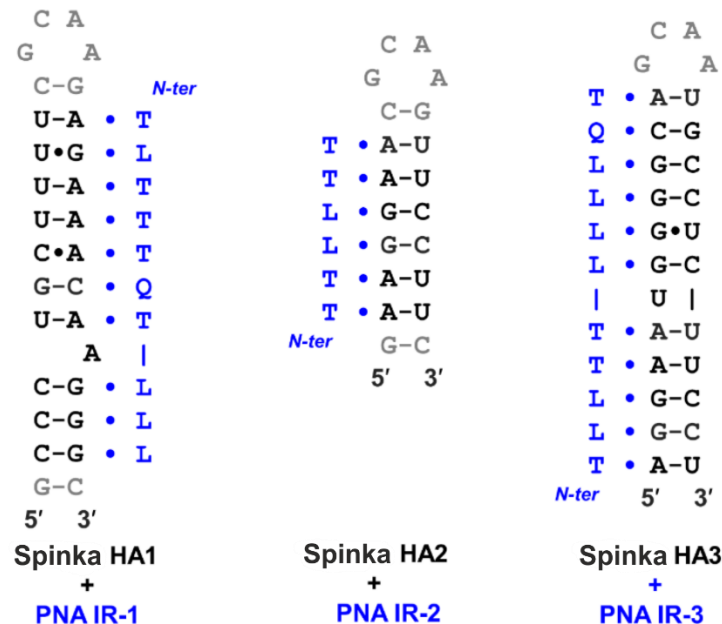
ahx oznacza grupę 6-aminoheksylokarboksylową, **cf** to 5(6)-karboksyfluoresceina, L to tiopseudoizocytozyna, Q to 5-metylocytozyna modyfikowana guanidyną



Rycina 10. Rejony docelowe wiązania PNA oznaczone na strukturze drugorzędowej vRNA8 szczepu A/California/04/2009(H1N1)³⁷ (A) oraz konserwatywnym motywie strukturalnym mRNA8 (B) (niebieskie linie), przedstawionym dla sekwencji szczepu A/California/04/2009(H1N1).⁴⁵

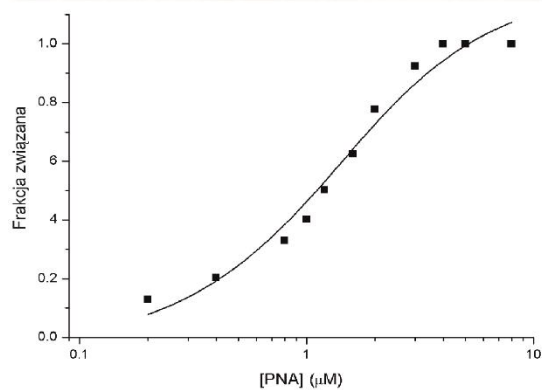
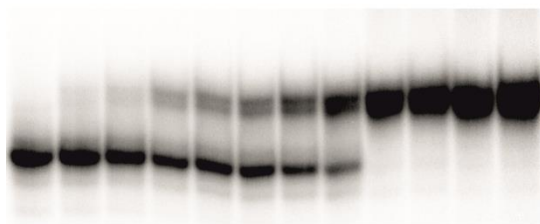
1.2 Charakterystyka tworzenia trypleksów

Formowanie trypleksów zostało scharakteryzowane w badaniach *in vitro* za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących. Określono stałą wiązania K_d PNA do krótkich modelowych cząsteczek RNA (HA1, HA2, HA3) tworzących spinki do włosów o strukturze i sekwencji odpowiadającej rejonowi docelowemu w pełnej długości RNA wirusowym (Rycina 11). IR-1a wiąże się z HA1 z wartością K_d $1,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (Rycina 12). Wiązanie IR-1b, odpowiednika cząsteczki IR-1a zawierającej neaminę, z HA1 jest silniejsze ($K_d = 0,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Przyłączenie neaminy zwiększa w sposób istotny zdolność do tworzenia trypleksu PNA•RNA-RNA. Zmiana ta może być spowodowana występowaniem oddziaływań między dodatnimi ładunkami neaminy i ujemnymi ładunkami RNA. IR-3a wiąże się z modelową cząsteczką HA3 z K_d wynoszącą $1,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$. Trypleks utworzony pomiędzy modelową spinką HA2 i IR-2a wykazuje słabe wiązanie, K_d wynosi $17,9 \pm 0,6 \mu\text{M}$ (Rycina 12). Mimo zastosowania wysokich stężeń IR-2a w eksperymencie, wiązanie z RNA nie ulega wysyceniu. Udział kompleksu względem frakcji niezwiązanej nie osiąga wartości 100%. Przyczyną obniżonego powinowactwa może być długość tworzonego trypleksu. Jest on formowany przez sześć nukleotydowych trójek, podczas gdy pozostałe trypleksy powstają na długości dziesięciu (IR-1) i jedenastu nukleotydów (IR-3).

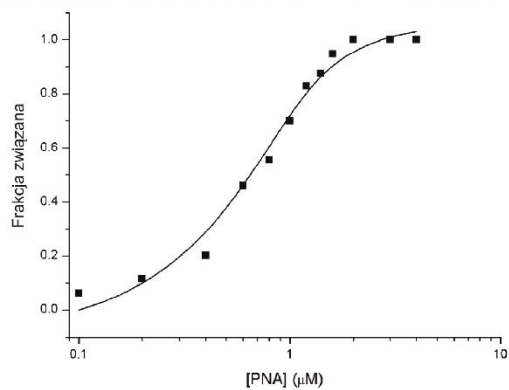
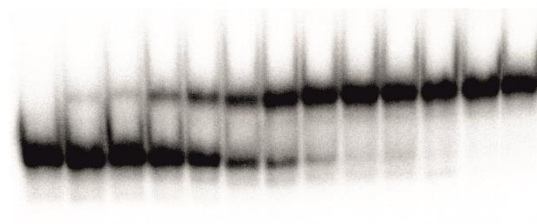


Rycina 11. Struktury trypleksów tworzonych pomiędzy PNA i krótkimi modelowymi spinkami RNA o strukturze i sekwencji docelowego rejonu dla PNA w pełnej długości RNA wirusowym.

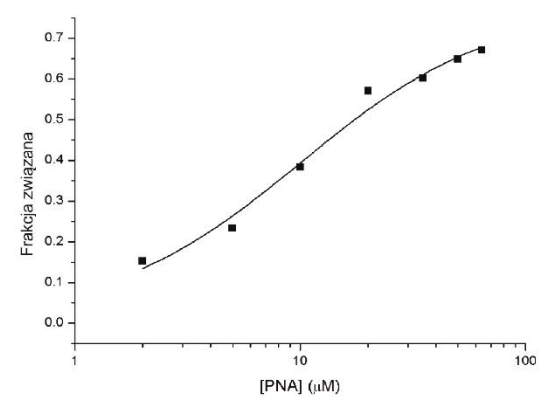
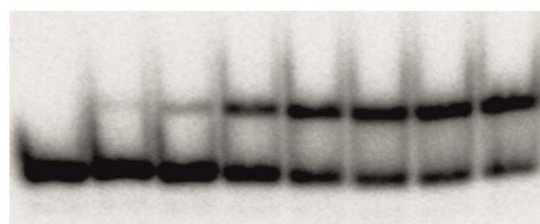
A HA1-IR-1a



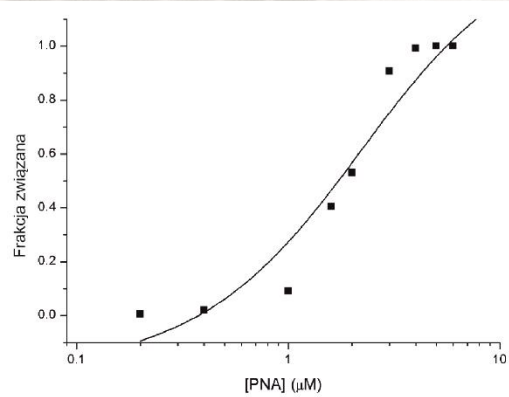
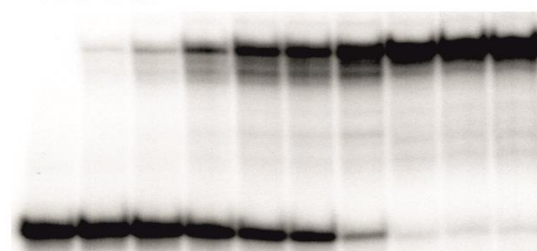
B HA1-IR-1b



C HA2-IR-2a

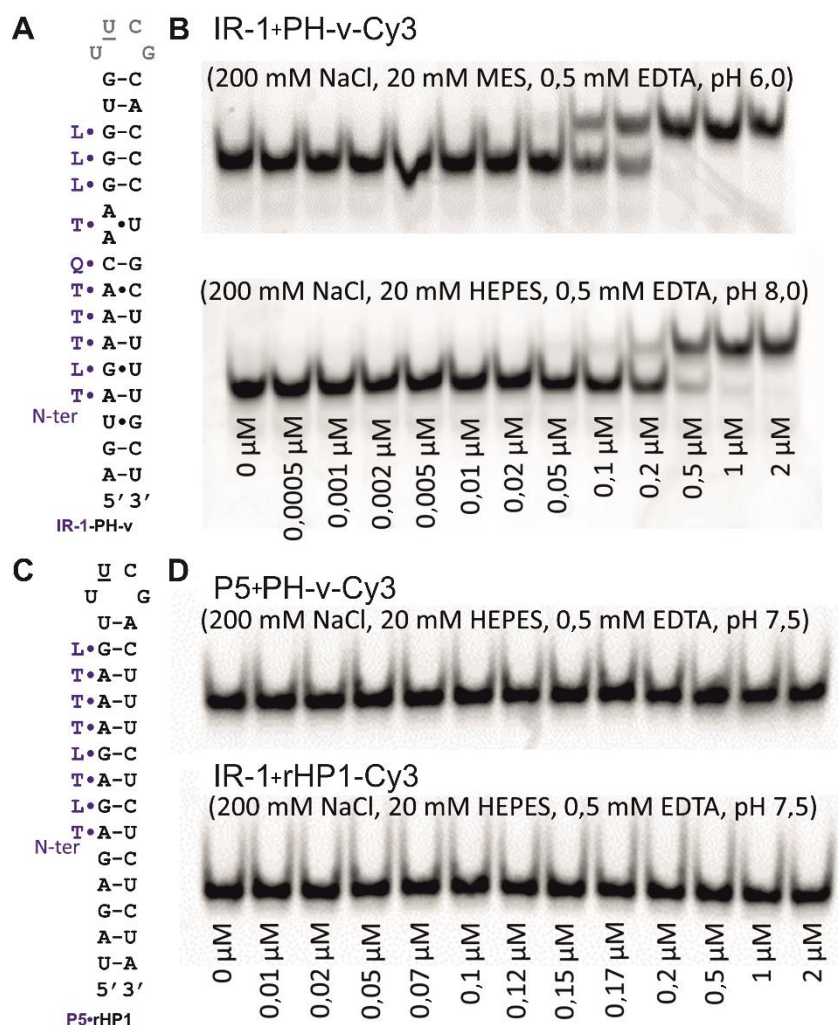


D HA3-IR-3a



Rycina 12. Charakterystyka tworzenia trypleksów przez PNA i krótkie modelowe RNA metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących. RNA są znakowane radioizotopem ^{32}P i mają stężenia: 1 μM dla HA1 i HA3 i 0,5 μM dla HA2. Stężenie PNA jest zmienne: (A) IR-1a (od lewej do prawej): 0; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 1,2; 1,6; 2; 3; 4; 5 i 8 μM ; (B) IR-1b: 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2; 1,4; 1,6; 2; 3 i 4 μM ; (C) IR-2a: 0; 2; 5; 10; 20; 35; 50 i 64 μM ; (D) IR-3a: 0; 0,2; 0,4; 1; 1,6; 2; 3; 4; 5 i 6 μM .

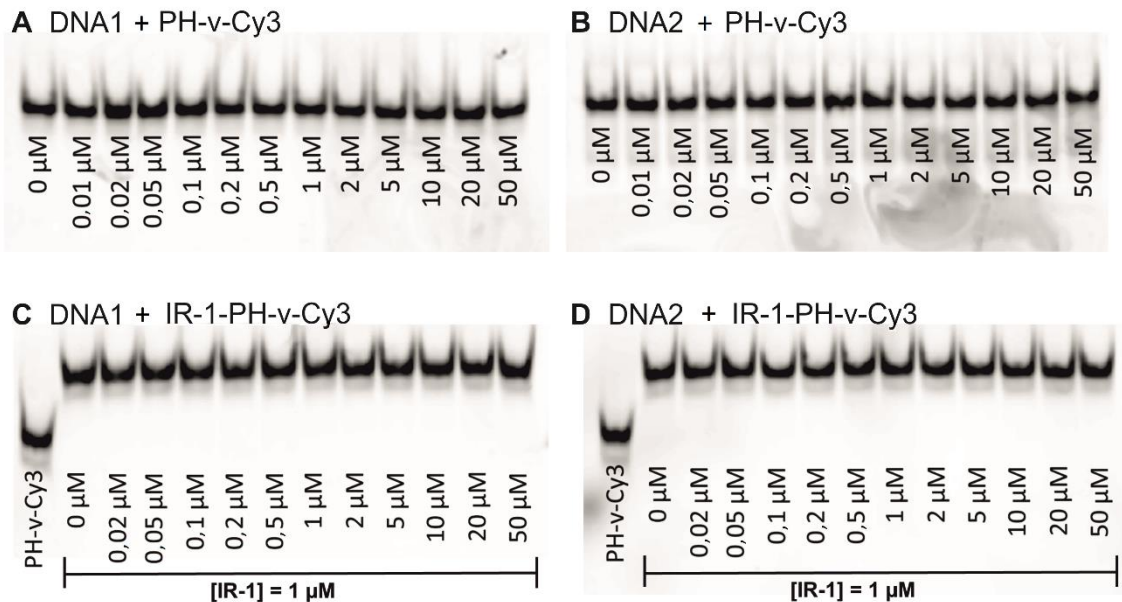
Badania przeprowadzone dzięki współpracy z grupą prof. Chena pozwoliły uzyskać uzupełniające dane dotyczące najbardziej efektywnego w tworzeniu trypleksów z testowanych PNA IR-1b.¹⁵⁹ Wykonane zostały dodatkowe rozdziały na żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących. Krótki modelowy RNA HA1 o strukturze spinki do włosów odwzorowującej motyw *panhandle* znakowany był barwnikiem fluorescencyjnym Cy3 w celu wizualizacji (PH-v-Cy3) (Rycina 13A). PNA IR-1a natomiast zamiast grupy 6-aminoheksylokarboksylowej zawierał lizynę (IR-1). Stwierdzono, że wiązanie IR-1 do modelowego RNA PH-v-Cy3 jest w sposób nieznaczny zależne od pH - K_d waha się w przedziale od $0,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ do $0,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$ w zakresie pH 6,0-8,0 (Rycina 13B). Sprawdzano również wiązanie IR-1 do kontrolnej modelowej cząsteczki RNA o strukturze spinki do włosów i sekwencji nie wykazującej komplementarności względem testowanego PNA (rHP1-Cy3) (Rycina 13C). Nie zaobserwowano wiązania pomiędzy IR-1 a kontrolą rHP1-Cy3 (Rycina 13D). Dodatkowo, przeprowadzono kontrolny eksperyment z udziałem modelowego RNA PH-v-Cy3. Inkubowano go w obecności PNA P5 o sekwencji niekomplementarnej i wykazano brak wiązania (Rycina 13D). Doświadczenia te pozwoliły stwierdzić, że wiązanie IR-1 jest specyficzne i zależne od sekwencji.



Rycina 13. Analiza wiązania PNA do modelowych cząsteczek. (A) Struktura kompleksu IR1-PH-v. (B) Wiązanie IR-1 do PH-v-Cy3 w pH 6,0 i 8,0. (C) Struktura teoretycznego kompleksu P5-rHP1. (D) Wiązanie P5 do PH-v-Cy3 oraz IR-1 do rHP1-Cy3. Modelowe cząsteczki PH-v-Cy3 oraz rHP1-Cy3 znakowane są Cy3. Pomiędzy P5 a PH-v-Cy3 oraz IR-1 a rHP1-Cy3 nie dochodzi do utworzenia kompleksu.¹⁵⁹

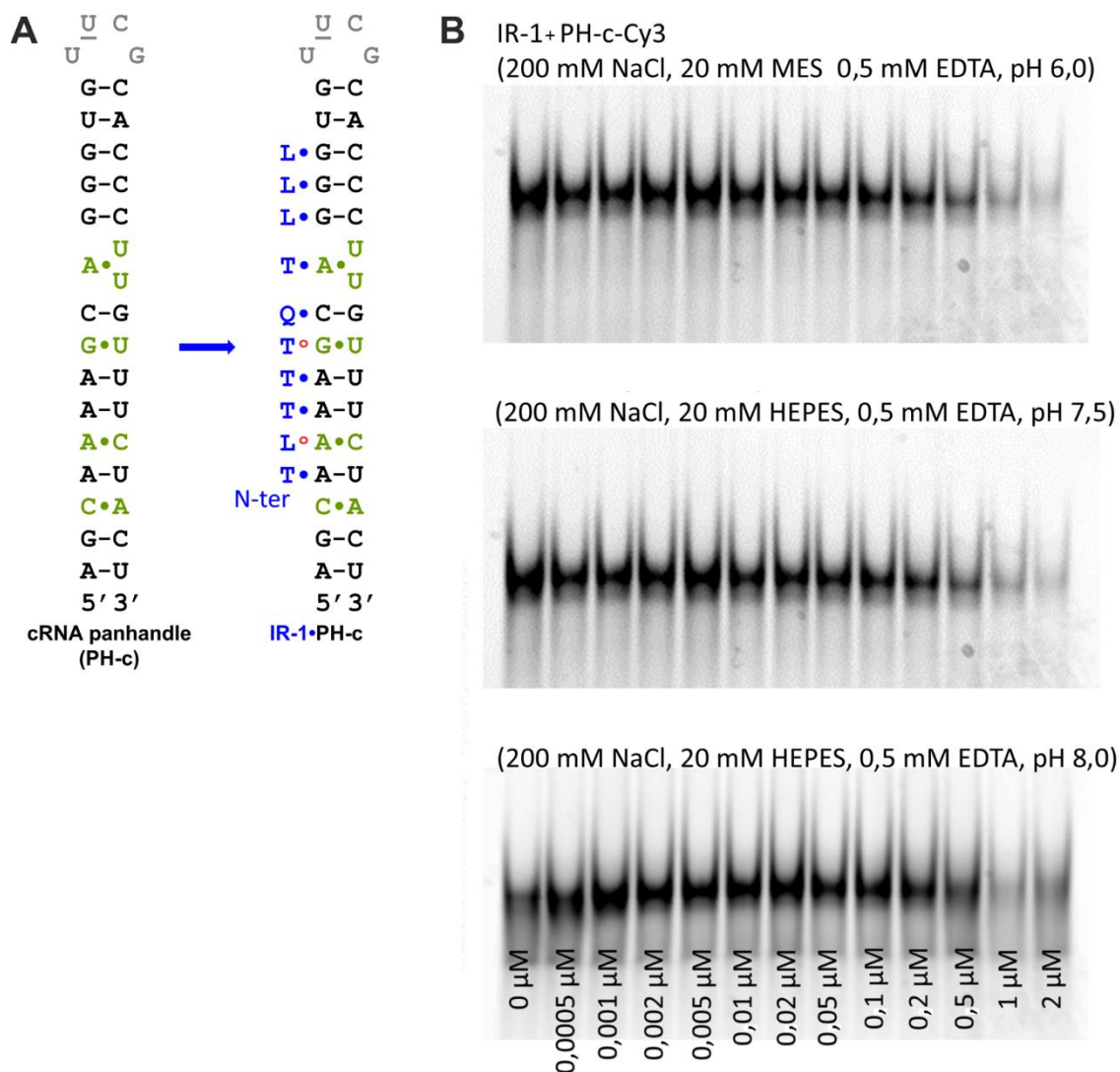
Kolejne analizy na żelach poliakrylamidowych wykazały, że antysensowe oligonukleotydy DNA (DNA1, DNA2), o sekwencji komplementarnej do miejsca wiązania IR-1 w motywie *panhandle* (odpowiednio do końca 5' i 3' *panhandle*), nie mają zdolności wiązania modelowej spinki PH-v-Cy3 (Rycina 14A i B).¹⁵⁹ Wyniki te stanowią potwierdzenie braku dostępności stabilnych struktur dwuniciowych takich jak *panhandle* dla konwencjonalnych strategii antysensowych. Wiązania DNA1 i DNA2 nie obserwowano także w przypadku inkubacji z utworzonym uprzednio kompleksem IR-1•PH-v-Cy3 (Rycina 14C i D).¹⁵⁹ Można zatem wnioskować, że wiązanie pomiędzy

PNA a modelowym RNA nie zaburza struktury spinki do włosów i nie powoduje jej rozplecenia.



Rycina 14. Analiza wiązania oligonukleotydów DNA do: (A) i (B) PH-v-Cy3, (C) i (D) kompleksu IR-1-PH-v-Cy3. Modelowa cząsteczka RNA PH-v-Cy3 znakowana jest Cy3. Oligonukleotydy DNA1 i DNA2 nie wiążą się do PH-v-Cy3 oraz do kompleksu IR-1-PH-v-Cy3.¹⁵⁹

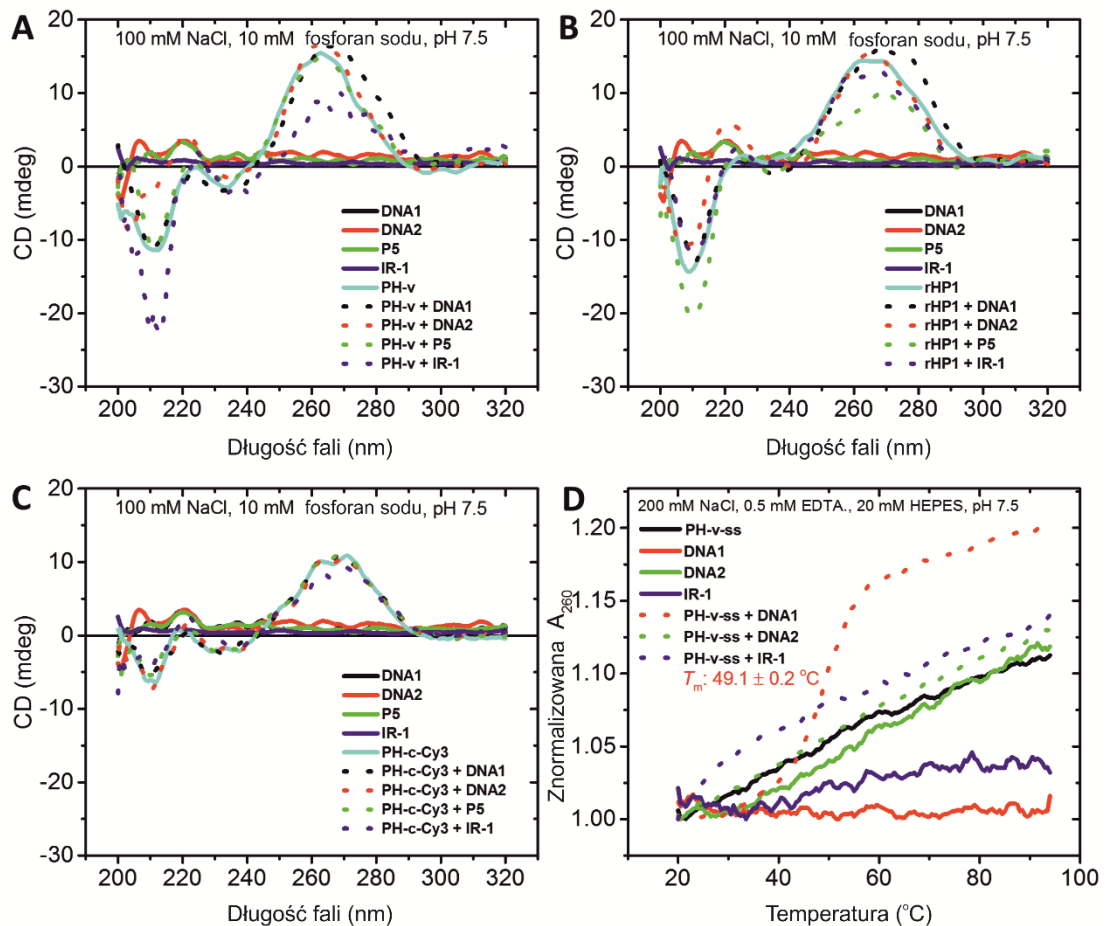
Częściowo dwuniciowa struktura parujących się końców 5' i 3' segmentu występuje także w cRNA wirusa grypy. Sekwencja tego motywu jest w dużej części komplementarna do IR-1, występują jednak dwa niesparowania skutkujące niemożnością utworzenia dwóch z dziesięciu możliwych trypletów, które są obecne podczas tworzenia trypleksu z vRNA (Rycina 15).¹⁵⁹ Doświadczenia wskazują, że IR-1 ma zdolność wiązania PH-c-Cy3, jednak słabiej niż PH-v-Cy3. Wynik ten związany jest zapewne z niepełną komplementarnością PNA oraz zmianami w strukturze motywu formowanego przez cRNA.



Rycina 15. Analiza wiązania IR-1 do PH-c: (A) struktura tworzonego trypleksu, (B) elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach niedenaturujących pH 6,0; 7,5 oraz 8,0. Modelowa cząsteczka RNA PH-c-Cy3 znakowana jest Cy3.¹⁵⁹

Przez grupę prof. Chena wykonane zostały widma CD, dzięki którym potwierdzono tworzenie trypleksu pomiędzy modelowym RNA PH-v (PH-v-Cy3 bez fluorochromu) odpowiadającym sekwencji vRNA a PNA IR-1 (Rycina 16A).¹⁵⁹ Trypleks tworzony był także pomiędzy kontrolną parą PNA P5 i modelowym rHP1 (rHP1-Cy3 bez fluorochromu) (Rycina 16B). Widmo CD nie wykazało jednak tworzenia potrójnej helisy w przypadku IR-1 i PH-c (PH-c-Cy3 bez fluorochromu), którego sekwencja odpowiadała cRNA (Rycina 16C). Prawdopodobną przyczyną braku sygnału wskazującego na tworzenie trypleksu, było jego osłabienie przez mniejszą siłę wiązania PNA z RNA oraz większą elastyczność ze względu na wspomniane wcześniej zmiany sekwencyjne i strukturalne cRNA powodujące występowanie niesparowań (Rycina 15A). Trypleks nie

powstawał także w próbkach kontrolnych, gdzie znajdowały się pary PNA P5 i PH-v (Rycina 16A) oraz IR 1 i rHP1 (Rycina 16B). Dane te zostały uzupełnione o topnienia UV, w których wykazano, że IR-1 nie wiąże się do RNA modelowego o strukturze jednoniciowej (PH-v-ss), w przeciwieństwie do DNA1 i DNA2 (Rycina 16D). Wpływ na wiązanie do rejonu jednoniciowego miał sposób w jaki zaprojektowano IR-1. IR-1 nakierowany jest na dwuniciową helisę zawierającą motyw U/AA z jedną niesparowaną adenozyną, z którym parowała się tylko jedna zasada PNA (Rycina 11). Rejon jednoniciowy o takiej samej sekwencji uniemożliwia pełną hybrydyzację IR-1. Dodatkowo, IR-1 zawiera modyfikacje L i Q, które opisane zostały jako promujące wiązanie do rejonów dwuniciowych. Oligonukleotydy DNA były natomiast w pełni komplementarne do rejonu jednoniciowego.

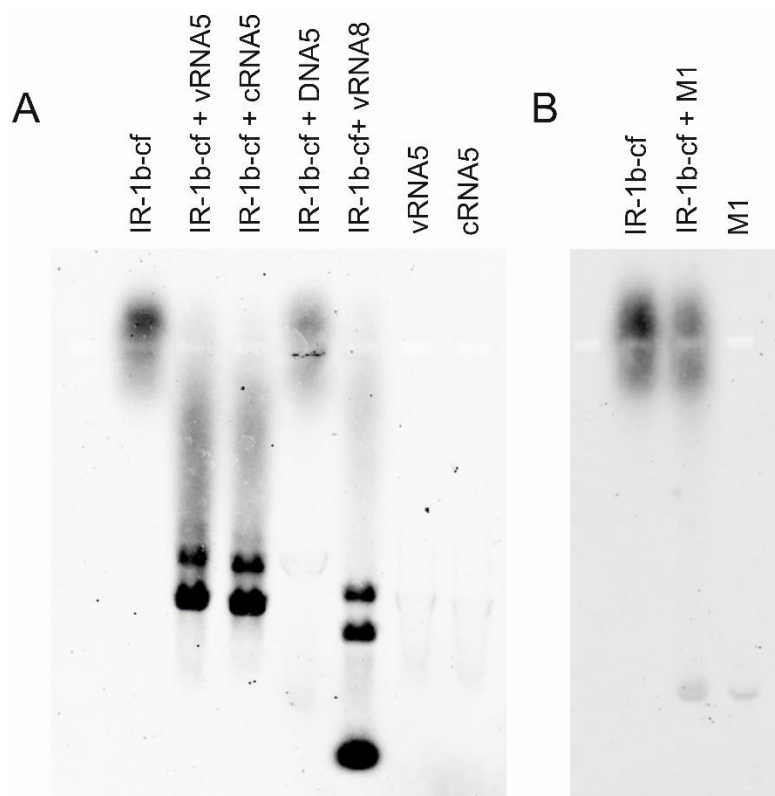


Rycina 16. Obrazy widm CD (A-C) i UV (D) przedstawiające wiązanie modelowej spinki PH-v (A), rHP1 (B), PH-c (C) oraz jednoniciowych RNA o sekwencji *panhandle* vRNA (D) do oligomerów PNA i DNA.¹⁵⁹

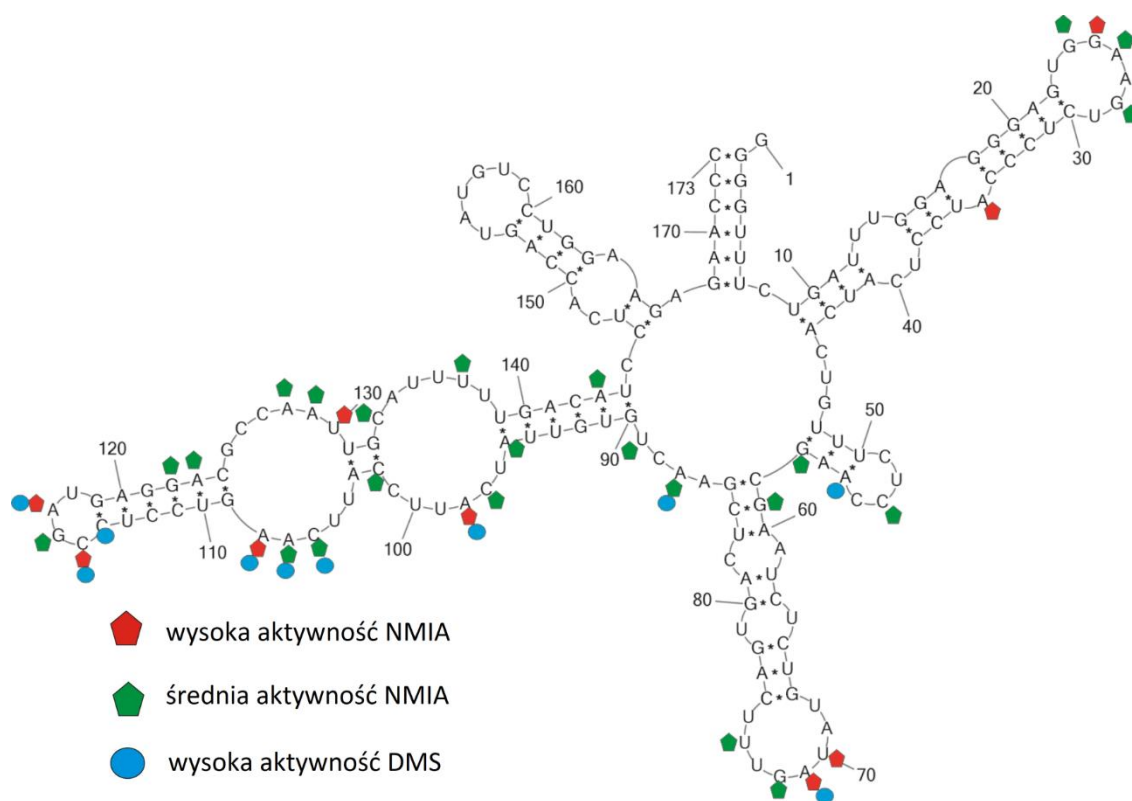
W celu wykluczenia oddziaływań niespecyficznych IR-1 został poddany testowi translacji *in vitro* z użyciem podwójnego systemu reporterowego z lucyferazą.¹⁵⁹ Test ten pozwala wykryć niespecyficzne oddziaływanie z najbardziej liczną populacją RNA komórkowego- rRNA. W podwójnym systemie reporterowym modelowa spinka rHP1 wprowadzona została pomiędzy geny dwóch lucyferaz: Renilla (RLuc) i Firefly (FLuc) (Rycina 17A). W ramce odczytu 0 tylko RLuc ulega ekspresji. Po przesunięciu ramki odczytu (-1) przez rybosom na tzw. „śliskiej” (ang. *slippery*) sekwencji (UUUUUUA) ekspresji ulegają obie lucyferazy. W konstrukcie kontrolnym poprzez mutację „śliskiej” sekwencji dochodzi do powstania RLuc i FLuc w ramce odczytu 0. Po dodaniu IR-1 w stężeniach niższych niż 10 μ M do konstruktów doświadczalnych lub kontrolnych, poziomy ekspresji zarówno RLuc, jak i FLuc nie są hamowane w sposób znaczący (Rycina 17B). Dodatkowo, po dodaniu PNA IR-1 w stężeniu do 20 μ M nie zaobserwowano istotnej zmiany w wydajności przesunięcia ramek odczytu rybosomu (-1) (Rycina 17C). W przeprowadzonym eksperymencie IR-1 nie wykazał niespecyficznej inhibicji translacji. W dotychczas opublikowanych pracach z użyciem tego samego konstruktów wykazano, że PNA P5 (w sposób specyficzny względem sekwencji rHP1) może powodować przesunięcie ramki odczytu oraz zmianę poziomu ekspresji lucyferaz.¹⁰⁴

pokazującymi, że mimo subtelnych różnic w sekwencji, vRNA i cRNA mają wspólne elementy strukturalne. W warunkach komórkowych vRNA występuje w znacznie większych ilościach niż cRNA, dlatego można się spodziewać preferencyjnego wiązania PNA do vRNA.

IR-1b-cf nie wiąże się do dwuniciowego DNA5, które swoją sekwencją odpowiada cRNA5 i vRNA5 w zależności od nici. W badaniach wykorzystano także kontrolę w postaci motywu RNA pochodzącego z vRNA8 wirusa grypy o długości 172 nukleotydów (M1). Stosując mapowania chemiczne określono strukturę drugorzędową tego modelowego RNA (Rycina 19)¹⁶⁰, potwierdzając, że zarówno sekwencja jak i struktura RNA nie powinna pozwolić na specyficzne wiązanie IR-1b. W eksperymencie rzeczywiście nie zaobserwowano tworzenia kompleksu (Rycina 18B). Brak wiązania między IR-1b-cf i DNA5, a także krótkim motywem M1 wskazuje na zdolność modyfikowanych PNA do tworzenia trypleksów ze specyficznym pod względem sekwencji i struktury motywem dwuniciowym RNA.



Rycina 18. Analiza wiązania IR-1b-cf do RNA i DNA za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym. PNA IR-1b znakowany jest 5(6)-karboksyfluoresceiną (cf), RNA i DNA nie zawierają znaczników.

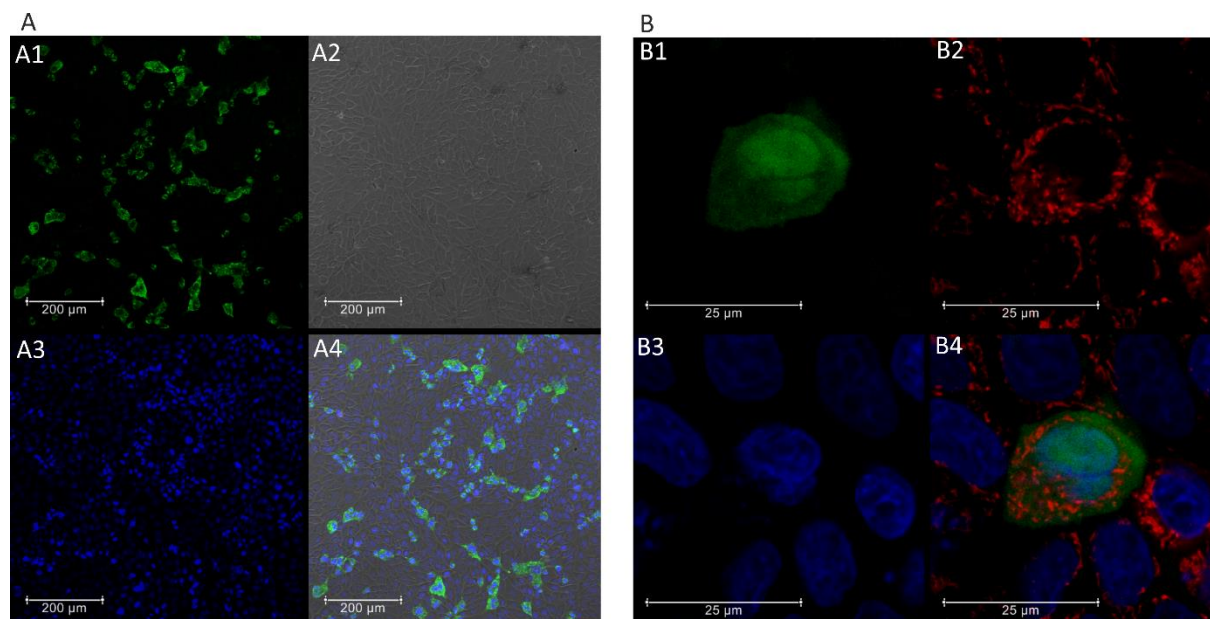


Rycina 19. Struktura motywu M1 vRNA8 [nukleotydy 204-376 w sekwencji A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)] z naniesionymi wynikami mapowania chemicznego.

1.4 Przenikanie koniugatów PNA-neamina do komórek

Niemodyfikowane oligomery PNA wykazują niską zdolność wnikania do komórek jeśli nie zostaną zastosowane czynniki transfekujące lub grupy umożliwiające penetrację błony komórkowej.^{78, 98, 102, 161-163} Badania z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego pokazują, że koniugaty PNA-neamina znakowane karboksyfluoresceiną (IR-1b-cf) przenikają przez błonę komórek MDCK bez konieczności użycia dodatkowego czynnika wspomagającego penetrację. Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi niemodyfikowanych PNA połączonych z neaminą.^{97, 158} Cząsteczki IR-1b-cf po penetracji do wnętrza komórek są równomiernie rozprowadzone w cytoplazmie, jądrze komórkowym i mitochondriach. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami neamina pozwala na uniknięcie zatrzymania PNA wewnątrz endosomu i w efekcie obniżenia jego potencjału inhibitorowego.^{97, 98, 158} Wydajność pobierania koniugatów przez poszczególne komórki jest jednak zróżnicowana (Rycina 20). Co jest ważne dla skuteczności potencjalnego inhibitora wirusa grypy, dystrybucja przenikających do wnętrza komórki koniugatów obserwowana jest w przedziałach komórkowych, w których obecny jest wirus i zachodzą poszczególne etapy jego cyklu

replikacyjnego. Możliwa jest zatem interakcja PNA z rejonem docelowego działania w RNA wirusowym.

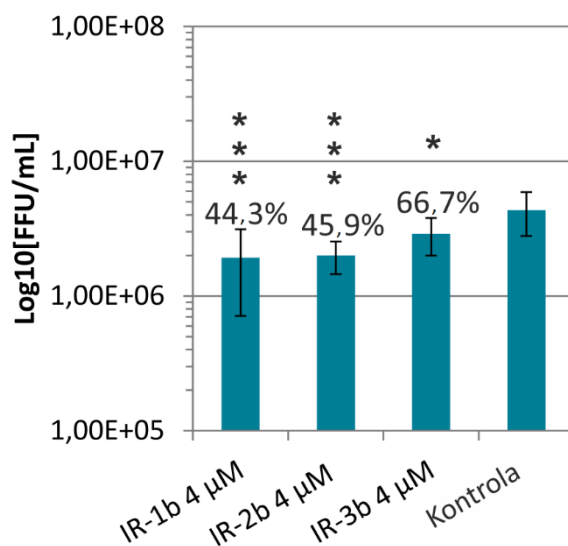


Rycina 20. Zdjęcia komórek MDCK traktowanych 4 μ M IR-1b-cf przez 12 godzin pochodzące z mikroskopu konfokalnego: (A1) fluorescencja IR-1b-cf w komórkach, (A2) komórki w świetle widzialnym, (A3) barwienie jąder komórkowych z użyciem DAPI, (A4) nałożenie obrazów A1-A3, (B1) fluorescencja IR-1b-cf, (B2) barwienie mitochondriów z zastosowaniem MitoTracker, (B3) barwienie jąder komórkowych z zastosowaniem DAPI, (B4) nałożenie obrazów B1-B3.

1.5 Inhibicja namnażania wirusa grypy przez PNA

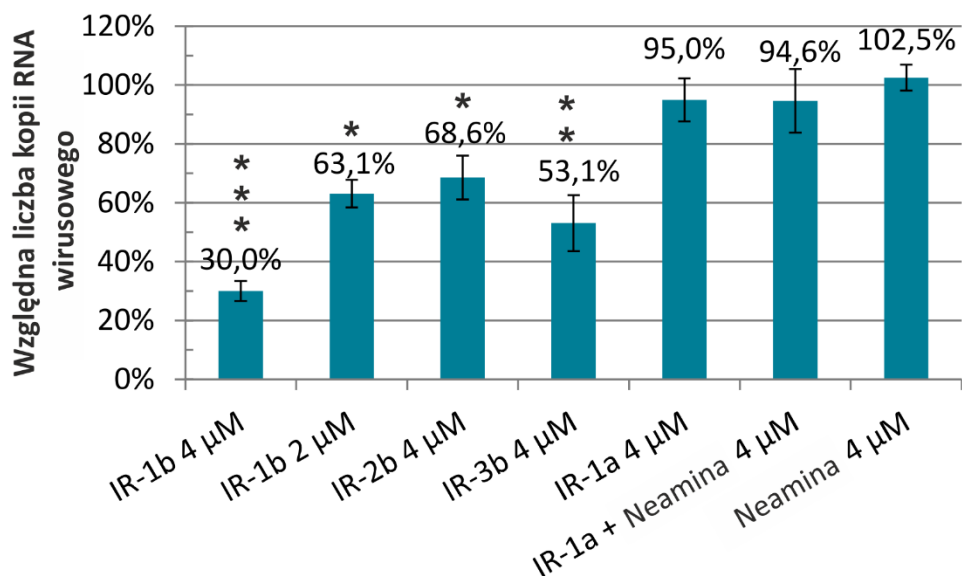
Przeprowadzono eksperymenty w hodowli komórkowej w celu określenia potencjału przeciwwirusowego PNA zdolnych do tworzenia trypleksów z drugorzędowymi strukturami RNA wirusa grypy. Linię komórkową MDCK poddano działaniu IR-1b, IR-2b, IR 3b i zakażano wirusem grypy. Poziom wirusa dla próbek traktowanych PNA oraz kontroli badano za pomocą dwóch metod: immunofluorescencji pośredniej (IFA) i PCR w czasie rzeczywistym. Supernatanty z zakażonych hodowli komórkowych pobierano i stosowano do ponownej infekcji monowarstwy komórek w celu przeprowadzenia testu IFA. Metoda ta pomaga wykluczyć nieaktywne i niezdolne do zakażenia wiriony z ilościowej analizy wirusa. Testowane PNA o stężeniu 4 μ M okazały się hamować namnażanie wirusa grypy w teście IFA (Rycina 21). PNA IR-1b ogranicza propagację wirusa o 55,7%. IR-3b wykazuje mniejszą aktywność i redukuje miano wirusa o 33,3%. IR-2b hamuje namnażanie wirusa o 54,1%, mimo że analiza tworzenia trypleksów *in vitro* pokazuje bardzo słabe wiązanie IR-2a (bez przyłączonej

neaminy) do docelowego rejonu RNA (Rycina 12). Istnieje prawdopodobieństwo, że neamina przyłączona do IR-2b i IR-3b może zwiększać wiązanie z wirusowymi RNA poprzez interakcje odpowiednio z wewnętrzną pętlą i wybrzuszeniem (Rycina 11).



Rycina 21. Wyniki IFA w komórkach MDCK zakażonych wirusem grypy i traktowanych PNA. Słupki błędów przedstawiają standardowe odchylenia niezależnych eksperymentów. Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem testu t-studenta (***) $p < 0,001$; *) $p < 0,05$).

Następnie, aktywność przeciwwirusowa PNA została określona za pomocą analizy PCR w czasie rzeczywistym. Jako materiał do badania posłużyły izolaty całkowitego RNA pochodzące z monowarstwy komórek w zainfekowanej hodowli MDCK. W reakcji określono liczbę kopii wirusowego RNA w próbkach traktowanych PNA i porównano z nietraktowanymi kontrolami (Rycina 22). Zgodnie z wynikiem testu IFA, IR-1b (4 µM) wykazał najbardziej znaczące działanie przeciwwirusowe poprzez zmniejszenie liczby kopii RNA wirusa o 70%. PNA IR-2b i IR-3b (4 µM) hamowały wirusa grypy odpowiednio o 31,4% i 46,9%. Ponadto zaobserwowano, że aktywność przeciwwirusowa IR-1b jest zależna od stężenia. IR-1b w niższym stężeniu (2 µM) powoduje 36,9% redukcję miana wirusa. Efekt ten jest znacznie niższy niż obserwowany dla IR-1b przy stężeniu 4 µM. Analiza ilościowa wirusowych RNA metodą PCR w czasie rzeczywistym jest bardziej skorelowana z badaniami tworzenia trypleksów w warunkach *in vitro*, a zatem może być uważana za dokładniejszą.



Rycina 22. Analiza PCR w czasie rzeczywistym liczby kopii RNA wirusowego w komórkach traktowanych PNA. Słupki błędów przedstawiają standardowe odchylenia niezależnych eksperymentów. Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem testu t-studenta (***) $p < 0,001$; **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$.

Zarówno test IFA, jak i PCR w czasie rzeczywistym wykazały, że IR-1b jest najbardziej aktywnym z testowanych PNA i hamuje replikację wirusa odpowiednio o 55,7% i 70%. Aktywność przeciwwirusowa poszczególnych cząsteczek PNA jest znacznym stopniu spójna z danymi powinowactwa wiązania ustalonymi dla PNA i krótkich modelowych RNA o strukturze spinki do włosów w warunkach *in vitro*. Spośród PNA niebędących koniugatami neaminy to IR-1a wykazał największe powinowactwo do cząsteczki docelowej. Powinowactwo wiązania było znacznie zwiększone w trypleksie zawierającym koniugat PNA-neamina. Wiadomo, że wolny aminoglikozyd jest w stanie stabilizować niemodyfikowane trypleksy kwasu nukleinowego przez wiązanie z większą bruzdą.^{164, 165} Obecność neaminy wpływa korzystnie na tworzenie się kompleksów, dlatego można spekulować, że pozwala ona również na zmniejszenie efektywnego stężenia PNA stosowanego w eksperymentach komórkowych w porównaniu do cząsteczek nie zawierających neaminy.

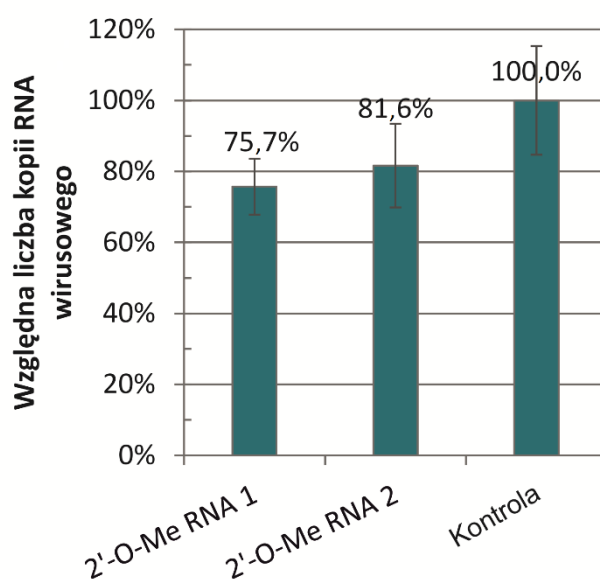
IR-2a wykazuje słabe wiązanie z HA2 w badaniach *in vitro*. Wartość K_d tego wiązania była kilkakrotnie wyższa niż uzyskana dla pozostałych kompleksów. Natomiast, w teście IFA IR-2b wykazuje podobną aktywność przeciwwirusową do IR-1b (ponad 50%). Możliwe jest, że po przyłączeniu do wirusowego RNA, neamina w IR-2b wykazuje korzystne interakcje z sąsiadującą pętlą wewnętrzną rejonu docelowego

wiązania (Rycina 11). Jednak w analizie PCR w czasie rzeczywistym potencjał IR-2b jest znacznie niższy (31,4% inhibicji). Różnice mogą wynikać z metod stosowanych do badania miana wirusa- począwszy od materiału wyjściowego służącego do oceny ilościowej a skończywszy na wybranej metodzie [detekcja białka wirusowego i ocena infekcyjności (IFA) lub detekcja RNA (PCR w czasie rzeczywistym)] i jej czułości. Niekorzystny wynik uzyskany dla IR-2a w badaniach *in vitro* oraz IR-2b w metodzie PCR w czasie rzeczywistym mogą wynikać z samej konstrukcji cząsteczki. Słabe oddziaływanie IR-2a z miejscem docelowym może być spowodowane długością rejonu, który tworzy trypleks. Cząsteczka IR-2a jest zbyt krótka, aby utworzyć wystarczająco stabilny kompleks z HA2 w warunkach ustalonych dla doświadczenia. Obniżone powinowactwo wiązania może również wystąpić w środowisku komórkowym i wpływać negatywnie na właściwości inhibitorowe cząsteczki. Choć krótkie oligomery PNA mają korzystne cechy użytkowe (większa rozpuszczalność oraz biodostępność), 6-mery mogą być niewystarczające, aby zapewnić dostateczną specyficzność i siłę wiązania z miejscem docelowym.

W hodowli komórek MDCK testowano również wpływ wolnej neaminy (4 μ M) i PNA IR-1a (4 μ M) (niezawierającego neaminy) podawanego w obecności niezwiązanej neaminy (4 μ M), na infekcję wirusem grypy. W obu przypadkach nie zaobserwowano znaczących zmian w namnażaniu wirusa w porównaniu do kontroli (Rycina 22). Wykazano, że nieskoniugowane PNA nie wywierają działania hamującego na wirusa grypy, także w obecności wolnej neaminy. Ponadto, sama niezwiązana neamina nie wpływa na replikację wirusa. Konieczna jest zatem koniugacja neaminy z PNA w celu uzyskania skutecznego ograniczenia namnażania wirusa grypy. Efekt ten opiera się prawdopodobnie na nadaniu PNA zdolności do penetracji komórki i potencjalnej dodatkowej stabilizacji tworzonych trypleksów.

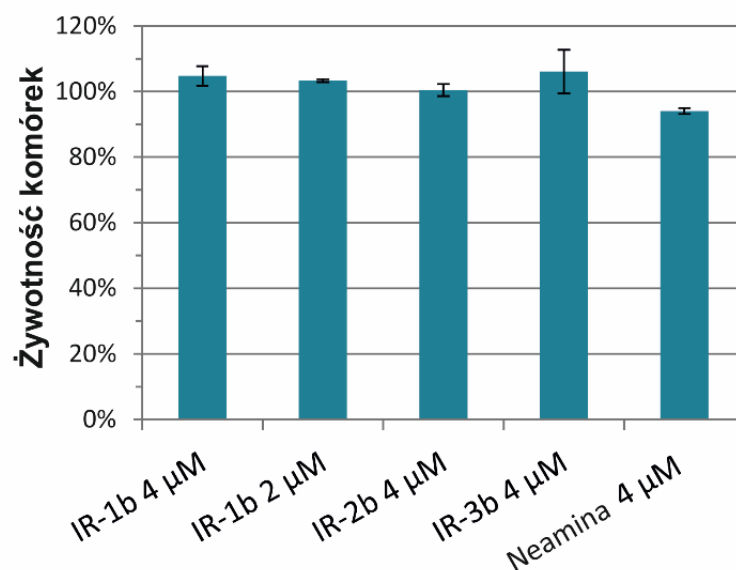
W celu porównania strategii z użyciem ASO i PNA oraz ich efektów przeciwwirusowych zaprojektowano parę oligonukleotydów antysensowych 2'-O-Me RNA1 i 2'-O-Me RNA2, komplementarnych do ramion 5' oraz 3' motywu *panhandle*. Oligonukleotydy RNA są w pełni 2'-O-metylowane, aby zapewnić odporność na działanie nukleaz oraz zwiększoną stabilność tworzonych dupleksów. Transfekcja do komórek MDCK w stężeniu 4 μ M, odpowiadającemu efektywnemu stężeniu IR-1b, odbywała się przy użyciu lipofektaminy. Analiza ilości wirusa w zakażonej hodowli przy użyciu metody PCR w czasie rzeczywistym wykazała znikomy efekt inhibicji w próbkach

traktowanych antysensowymi oligonukleotydami RNA (Rycina 23). Liczba kopii RNA wirusowego była obniżona o 24,3% oraz 18,4% odpowiednio dla 2'-O-Me RNA1 i 2'-O-Me RNA2 w stosunku do kontroli traktowanej tylko lipofektaminą. Wynik ten potwierdza, że motyw *panhandle* nie jest dostępny dla działania standardowej strategii antysensowej. Kluczowym wymogiem dla efektywności podejścia z zastosowaniem oligonukleotydów antysensowych, w przeciwieństwie do PNA formujących trypleksy, jest dostępność rejonów docelowych dla potencjalnej hybrydyzacji. Warunek ten nie został spełniony w przypadku motywu *panhandle*.



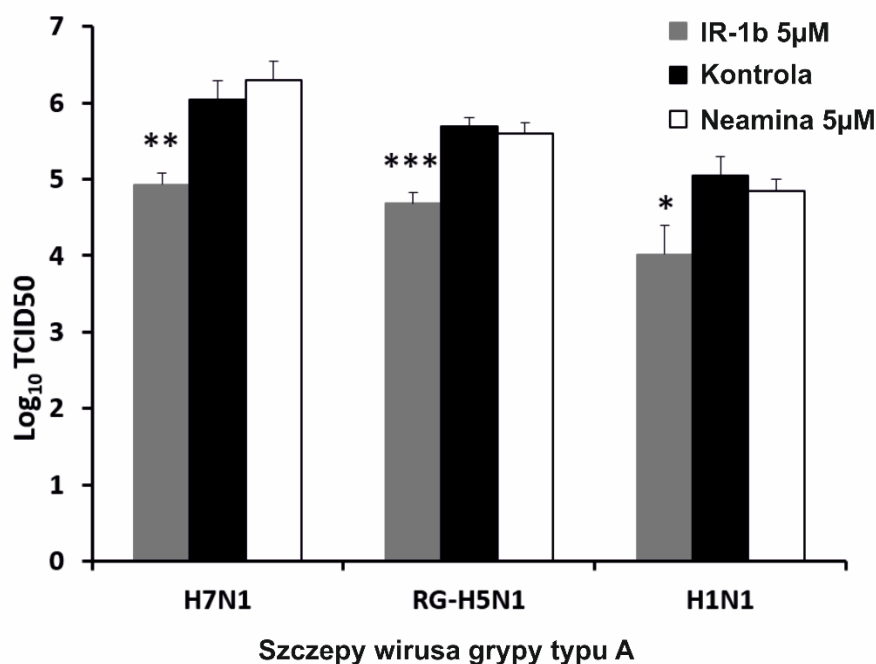
Rycina 23. Wpływ 2'-O-metylowanych oligonukleotydów RNA nakierowanych na motyw *panhandle* na namnażanie wirusa grypy. Słupki błędów przedstawiają standardowe odchylenia niezależnych eksperymentów.

Przeprowadzono również test MTT w celu oceny potencjalnego efektu cytotoksycznego badanych oligomerów PNA na komórki MDCK. Wyniki testu MTT pokazują, że komórki traktowane koniugatami PNA-neamina i wolną neaminą nie wykazują znaczących zmian w proliferacji w porównaniu z nietraktowaną kontrolą (Rycina 24). Wynik ten sugeruje, że działanie hamujące oligomerów PNA na replikację wirusa grypy zależy od specyficznej aktywności koniugatów PNA ukierunkowanej na wybrane motywy strukturalne RNA wirusowego, a nie od zmniejszenia żywotności komórek.



Rycina 24. Wyniki testu MTT przeprowadzonego na komórkach traktowanych PNA o różnym stężeniu oraz neaminą. Słupki błędów przedstawiają standardowe odchylenia niezależnych eksperymentów.

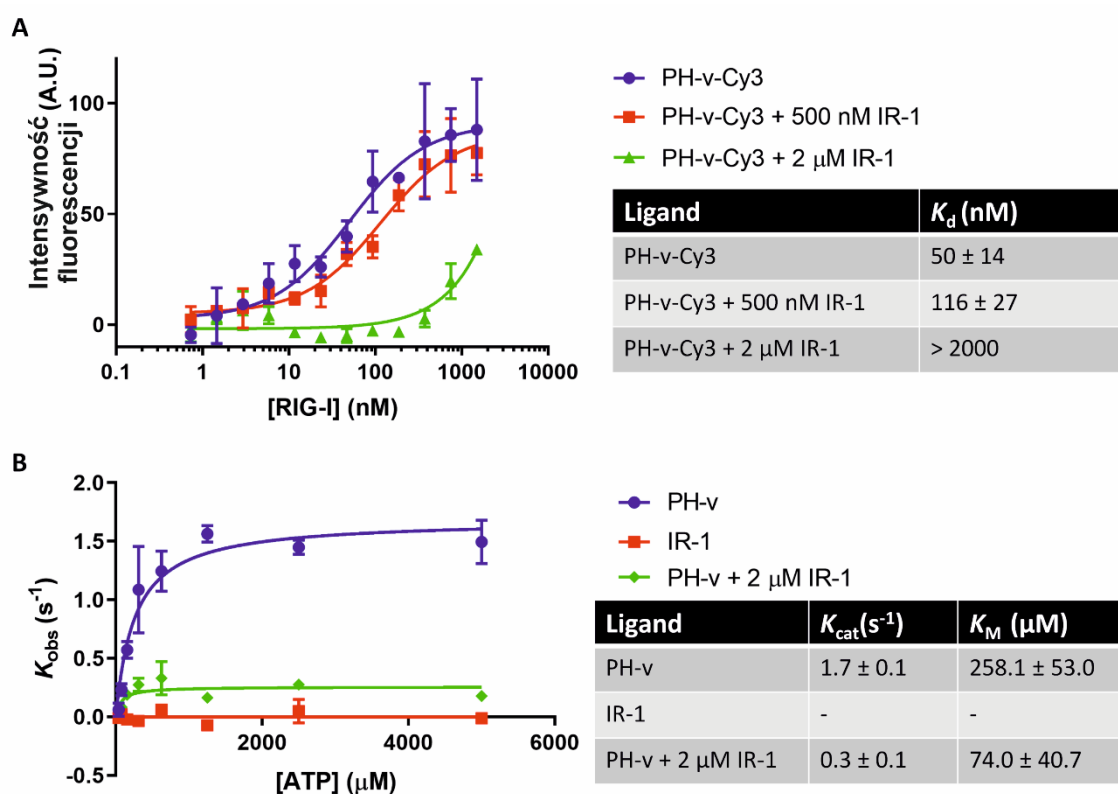
Współpraca z prof. Chenem pozwoliła także na przeprowadzenie doświadczeń, w których badano wpływ IR-1b na różne podtypy wirusa grypy: otrzymany metodą odwrotnej genetyki RG-H5N1 (HA i NA pochodzą z A/Hubei/1/2010, pozostałe segmenty z A/Puerto Rico/8/1934), pdm H1N1 (A/Singapore/TLL01/2009) oraz H7N1 (A/common iora/Indonesia/F89/11/95) (Rycina 25).¹⁵⁹ Podtypy te mają zachowaną sekwencję i strukturę w rejonie *panhandle*, odpowiednie dla działania IR-1b. IR-1b o stężeniu 5 μM w badaniach na komórkach MDCK spowodował znaczące, ponad 10-krotne obniżenie miana wirusa wszystkich podtypów w porównaniu do nietraktowanej kontroli lub próbki traktowanej 5 μM neaminą.



Rycina 25. Analiza aktywności IR-1b względem różnych szczepów wirusa grypy typu A: H7N1 (A/common iora/Indonesia/F89/11/95), RG-H5N1 (A/Hubei/1/2010) oraz pdm09 H1N1 (A/Singapore/TLL01/2009). Wynik został uzyskany poprzez zastosowanie testu IFA oraz metody określania miana wirusa TCID50. Komórki MDCK infekowano z użyciem MOI = 0,05, supernatanty do seryjnych rozcieńczeń w IFA pobierano po upływie 36 godzin. Słupki błędów przedstawiają standardowe odchylenia niezależnych eksperymentów. Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem testu t-studenta (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$).¹⁵⁹

Receptor immunologiczny RIG-I jest jednym z kluczowych sensorów RNA w komórce, którego aktywację wykazano w szeregu infekcji wirusowych.³⁶ Odgrywa on zasadniczą rolę w odpornościowej kaskadzie sygnałowej zakażonego organizmu gospodarza, indukując produkcję interferonu oraz cytokin prozapalnych. W przypadku wirusa grypy odpowiedź obronna organizmu prawie całkowicie opiera się na działaniu receptora RIG-I. Warunkiem koniecznym do aktywacji receptora jest obecność dwuniciowego RNA. Tworzenie cyrkularnych form RNA poprzez parowanie końców 5' i 3' stanowi wspólną cechę wirusów posiadających genom w postaci RNA o ujemnej polarności. Motyw *panhandle* jest zatem jedynym poznanym dotąd konserwatywnym motywem strukturalnym, który aktywuje kaskadę sygnalizacyjną receptora RIG-I.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ Dodatkowym nurtem badań prowadzonych we współpracy z prof. Chenem było badanie zahamowania aktywacji RIG-I pod wpływem wiązania PNA do rejonu *panhandle*.¹⁵⁹ Badania oparte były na wcześniej opisywanym zjawisku wzrostu intensywności fluorescencji w wyniku wiązania białek.¹⁶⁹ W eksperymentach obserwowano, że

modelowy RNA odwzorowujący strukturalnie rejon *panhandle* PH-v-Cy3 w wyniku wiązania do RIG-I wykazywał przewidywany wzrost intensywności fluorescencji (Rycina 26A). Wykazano, że obecność 2 μM IR-1 w mieszaninie powoduje odwrotny efekt w postaci spadku intensywności fluorescencji. Można zatem wnioskować, że wiązanie IR-1 do motywu *panhandle* zaburza rozpoznawanie struktury przez RIG-I. Następnie, badano również aktywność ATPazową RIG-I (Rycina 26B). Modelowy RNA PH-v odpowiadający motywowi *panhandle* stymuluje hydrolizę ATP. W obecności 2 μM IR-1 aktywność ATP-azowa RIG-I ulega osłabieniu. Powyższe obserwacje pozwalają sądzić, że IR 1 oprócz hamowania namnażania wirusa grypy może również działać jako inhibitor ostrej odpowiedzi odpornościowej zainfekowanego organizmu, która jest przyczyną uszkodzenia płuc w wyniku zakażenia.



Rycina 26. Badanie wpływu wiązania IR-1 do PH-v-Cy3 na oddziaływanie rejonu *panhandle* z receptorem białkowym RIG-I oraz jego aktywność ATPazową.¹⁵⁹

Na aktywność przeciwwirusową oligomerów PNA znaczący wpływ ma wybór miejsca docelowego działania. IR-1a i jego odpowiednik IR-1b zawierający neaminę są nakierowane na motyw *panhandle*. Ta dobrze opisana w literaturze drugorzędowa struktura jest utworzona poprzez parowanie końców 5' i 3' vRNA i jest charakterystyczna

dla wszystkich ośmiu segmentów wirusa grypy (Rycina 10).^{17, 25, 26, 37, 38, 170-172} Region *panhandle* jest wysoce konserwatywny pod względem sekwencji i struktury nie tylko wśród wszystkich genomowych segmentów wirusa, ale również wśród różnych szczepów wirusa. Przejście wirusa przez poszczególne etapy cyklu replikacyjnego wymaga dynamicznych zmian strukturalnych. *Panhandle* został zidentyfikowany jako motyw nieodzowny dla regulacji replikacji, transkrypcji i pakowania wirionów potomnych. Fundamentalne znaczenie funkcjonalne motywu *panhandle* mogło przyczynić się do zwiększenia skuteczności przeciwwirusowej IR-1b w porównaniu do IR-2b i IR-3b w eksperymentach komórkowych. Spostrzeżenie to może stanowić cenną informację w opracowywaniu leków przeciwko wirusowi grypy.

IR-2b zaprojektowano tak, aby rejonem jego oddziaływania była dwuniciowa struktura przewidziana dla mRNA8 (Rycina 10B).⁴³⁻⁴⁵ Rejon docelowy umiejscowiony jest w konserwatywnej domenie RNA znajdującej się w regionie intronowym genu NS1. Rejon oddziaływania RNA z PNA zawiera sześć par zasad (z udziałem reszt 131-136 mRNA8), które wykazują ponad 90% zachowawczość par zasad. PNA IR-3b jest nakierowany na trzon spinki do włosów obejmujący reszty 767-776 w vRNA8. Docelowy dwuniciowy RNA składa się z rdzenia 11 par zasad przerwanej przez jednonukleotydowe wybrzuszenie U, które według przewidywań jest zachowane w wielu szczepach.³⁷

Inhibicja wirusa grypy przez oligomery PNA może zachodzić na drodze kilku procesów indukowanych przez tworzenie trypleksu. Dotychczasowe doniesienia pokazały, że PNA celujące w mRNA mogą blokować translację i hamować ekspresję białka w hodowli komórkowej w sposób wysoce specyficzny dla sekwencji.⁸² Ponieważ hybrydy PNA-RNA nie są rozpoznawane jako substraty dla żadnego ze znanych enzymów, uważa się, że hamowanie opiera się na sterycznym zablokowaniu funkcji RNA. Ten sam mechanizm może być odpowiedzialny za zmniejszenie miana wirusa w hodowli komórkowej MDCK. Stabilne wiązanie PNA z podwójną helisą wirusowego RNA może zakłócać funkcje zapewniane przez strukturę i potencjalne przejścia konformacyjne RNA, które kontrolują procesy wewnątrzkomórkowe. Można zobrazować ten mechanizm na przykładzie testowanego IR-1b. Zablokowanie motywu *panhandle* poprzez stworzenie stabilnego trypleksu nie pozwala na opisane w literaturze zmiany struktury vRNA.^{17-24, 173} Są one wymagane do przeprowadzenia zmian w aktywności procesów wirusowych o tak fundamentalnych funkcjach jak replikacja czy

transkrypcja. W ten sposób cykl wirusa zostaje zatrzymany na pewnym etapie. Blokada nie pozwala na produkcję wirionów potomnych i w konsekwencji dalszą propagację wirusa. Tworzenie trypleksów może również zakłócać aktywność białek wiążących RNA. Proces ten, a w szczególności komponenty, które mogą brać w nim udział nie są dokładnie poznane. PNA gromadzące się w cytoplazmie i jądrze komórkowym, nakierowane na vRNA i mRNA, mogą zatem wpływać na cykl replikacyjny wirusa na różnych etapach, w tym na replikację, transkrypcję i pakowanie wirionów potomnych.

Celowanie w rejony dwuniciowego RNA otwiera nowe możliwości dla inhibicji propagacji wirusów i regulacji funkcji komórkowych. Standardowe strategie wymierzone w RNA wirusowy i oparte na kwasach nukleinowych były dotychczas głównie nakierowane na prawdopodobne lub zdeterminowane rejony jednociowe, takie jak wyrzuszenia i wewnętrzne pętle. Nowe podejście oparte na tworzeniu trypleksów pozwala na celowanie w RNA, który jest wyjątkowo stabilny konformacyjnie i zwykle niedostępny dla tworzących dupлексы narzędzi oligonukleotydowych. Ponadto, celowanie w regiony zachowawcze pod względem sekwencji i struktury jest bardzo specyficzne i może skutecznie prowadzić do zaburzeń podstawowych funkcji RNA niezbędnych dla przeprowadzenia cyklu replikacyjnego wirusa. Równocześnie, stosowanie stosunkowo krótkich oligomerów PNA (10-mer) pozwala rozwiązać problem zmniejszonej rozpuszczalności i biodostępności, które obserwuje się dla dłuższych PNA. Biorąc pod uwagę korzystne cechy zbadanych, zmodyfikowanych oligomerów PNA i wpływ przyłączenia do nich neaminy, podejście nakierowane na konserwatywny dwuniciowy motyw RNA za pomocą koniugatów PNA-neamina wydaje się bardzo obiecującą strategią i zasługuje na dalsze rozwijanie. Dodatkowy potencjał PNA może zostać ujawniony w dalszej optymalizacji długości, poszukiwaniu nowych motywów strukturalnych i sekwencji miejsca wiążącego, chemicznej modyfikacji czy czynników wspomagających wnikanie do komórek.

2. SiRNA jako inhibitory namnażania wirusa grypy

Cząsteczkami inicjującymi interferencję RNA mogą być egzogenne siRNA wprowadzane do komórek za pomocą znanych i powszechnie stosowanych nośników kwasów nukleinowych. SiRNA zastosowano również jako skuteczne inhibitory namnażania wirusów, w tym wirusa grypy.⁵² W tych badaniach podstawą doboru sekwencji docelowej była jej zachowawczość pośród szczepów wirusa. Jednak, nie wszystkie zaproponowane w ten sposób dupлексы wykazały znaczący potencjał

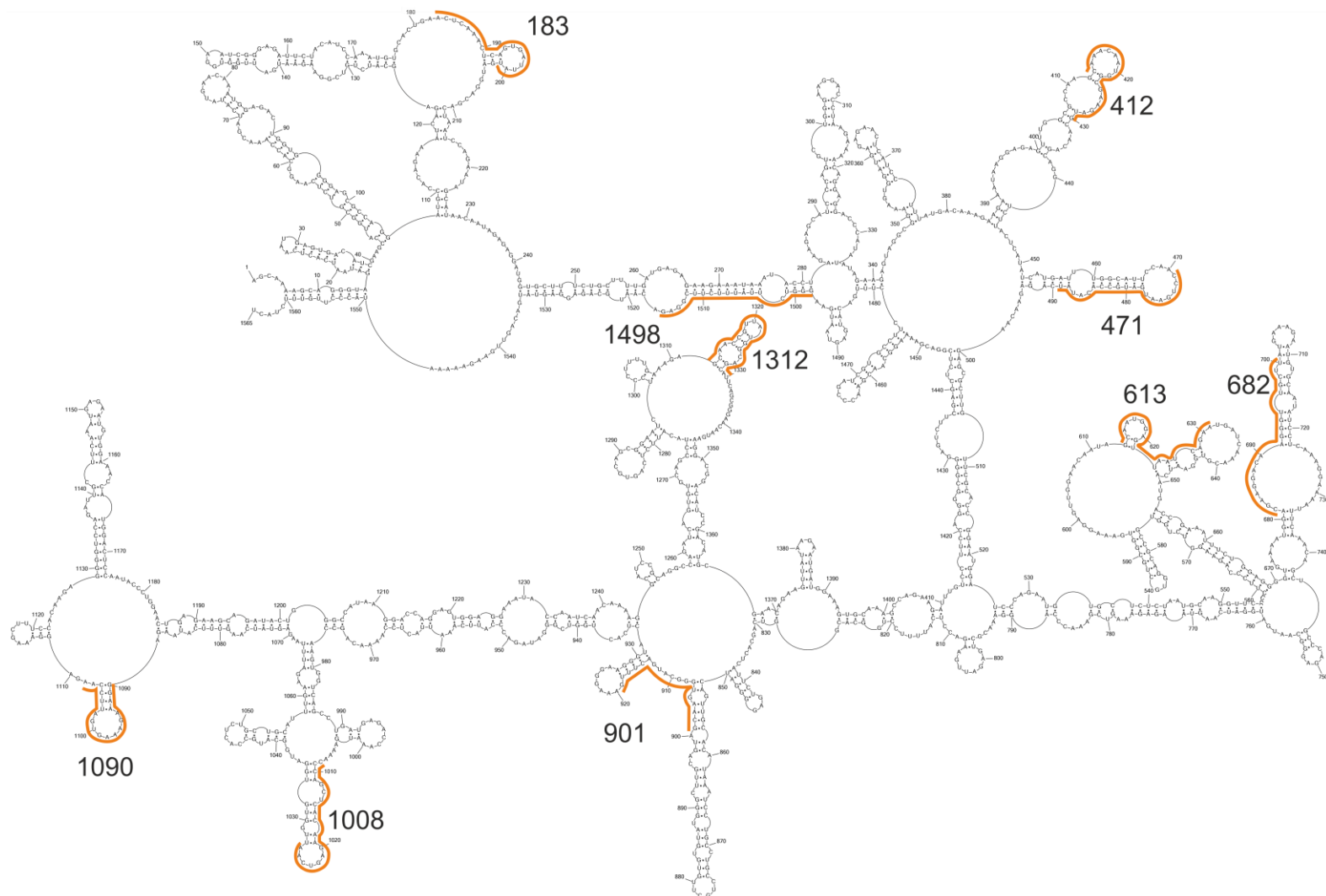
przeciwwirusowy.^{111, 117, 125, 126, 174} W niniejszej pracy analizie poddana została nie tylko sekwencja, ale także kontekst strukturalny docelowego RNA wirusowego. Szczególna uwaga została poświęcona motywom, które mogą mieć znaczenie funkcjonalne w cyklu replikacyjnym wirusa grypy. Podejście to ma na celu stworzyć podstawy dla udoskonalenia procesu projektowania siRNA w oparciu o dane strukturalne oraz zwiększyć potencjał inhibitorowy narzędzi oligonukleotydowych.

Kolejnym istotnym zagadnieniem dotyczącym siRNA są czynniki, które gwarantują ich potencjalne zastosowanie terapeutyczne. Wśród nich, poza wysoką efektywnością, wymienić należy cechy takie jak stabilność i specyficzność. W niniejszych badaniach testowane są modyfikowane chemicznie warianty siRNA, których celem jest poprawienie właściwości siRNA w tym zakresie.

2.1 Projektowanie siRNA i ASO nakierowanych na mRNA segmentu 5

Przeprowadzono staranną analizę i selekcję rejonów docelowego działania interferencji RNA w oparciu o strukturę drugorzędową (+)RNA segmentu 5 wirusa grypy typu A [(+)RNA5]. Drugorzędowa struktura (+)RNA5 A/California/04/2009 (H1N1) została określona na bazie opisaną dotychczas struktury (+)RNA5 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1).³⁸ Struktura drugorzędowa (+)RNA5 drugiego z wymienionych szczepów została dokładnie zbadana w eksperymentach mapowania chemicznego *in vitro*, z użyciem mikromacierzy izoenergetycznych oraz bioinformatycznych analiz sekwencyjno-strukturalnych. Struktura modelowa tego szczepu ma charakter zachowawczy wśród wirusów typu A. Na podstawie bioinformatycznej analizy zachowawczości struktury drugorzędowej w oparciu o 15533 sekwencji RNA szczepów wirusa grypy typu A stwierdzono, że średnia konserwatywność par zasad wynosi 85%.³⁸ Dlatego też, struktura ta stanowi wiarygodny fundament dla przewidywania struktury drugorzędowej (+)RNA5 innych szczepów typu A. Do fałdowania (+)RNA5 A/California/04/2009 (H1N1) posłużył algorytm Dynalign w oprogramowaniu RNAStructure 6.1, który przewiduje wspólną strukturę drugorzędową dla dwóch homologicznych RNA.¹⁷⁵ Dodatkowo, do sekwencji (+)RNA5 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) wprowadzono ograniczenia fałdowania pod postacią konserwatywnych par zasad o zachowawczości większej lub równej 99% (Tabela 8, DODATEK). Spośród 244 konserwatywnych par zasad kontekst strukturalny par 115-217, 133-165, 184-209 i 285-332 uniemożliwił wygenerowanie struktury drugorzędowej (+)RNA5 A/California/04/2009 (H1N1) przez program. Powodem były niekorzystne

wartości energii swobodnej spowodowane obecnością sąsiadujących niesparowanych nukleotydów zarówno od strony 5', jak i 3'. Prawdopodobnie doprowadziło to do destabilizacji motywów struktury drugorzędowej. W konsekwencji, wymienione cztery z 244 przewidywanych konserwatywnych par zasad wykluczono z ostatecznego modelowania. Uzyskana struktura drugorzędowa (Rycina 27) charakteryzuje się występowaniem analogicznych domen oraz motywów strukturalnych przewidzianych dla (+)RNA5 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1).³⁸ Niewielkie rearanżacje różniące te dwie struktury dotyczą głównie utworzenia dodatkowych par zasad lub wydłużenia rejonów jednoniciowych przez rozplecenie niektórych par zasad. Takie zmiany występują zwykle w częściach terminalnych helis i są determinowane przez sekwencję szczepu.



Rycina 27. Struktura drugorzędowa (+)RNA5 A/California/04/2009 (H1N1) z zaznaczonymi rejonami docelowymi działania zaprojektowanych siRNA.

Preferowane miejsca docelowe dla siRNA były zlokalizowane w rejonach (+)RNA5 A/California/04/2009 (H1N1) odpowiadających nukleotydom silnie zmodyfikowanym przez odczynniki mapujące w A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), konserwatywnych pod względem struktury, potencjalnie dostępnych dla interakcji z oligonukleotydami i podatnych na zakłócenia ze względu na kontekst strukturalny. Małe interferujące RNA nakierowane na mRNA5 zostały zaprojektowane przy użyciu narzędzia RNAi Designer udostępnionego na stronie internetowej firmy Thermo Fisher Scientific. Narzędzie to bierze pod uwagę ogólne zasady selekcji sekwencji docelowych mRNA i wymagania dla efektywnej interferencji dupleksów siRNA w komórkach ssaków.¹⁷⁶ Podstawowym kryterium projektowania jest dobór unikalnych sekwencji rejonu docelowego, aby zapewnić wysoką specyficzność siRNA. Dodatkowo, algorytm wykonuje analizę statystyczną sekwencji docelowej. Bierze pod uwagę czynniki takie jak skład sekwencji (np. pary GC), zawartość nukleotydów na końcach 5' i 3' oraz właściwości termodynamiczne. Uzyskane dane konfrontuje z wynikami uzyskanymi dla znanych zestawów siRNA testowanych na różnych genach docelowych. Preferowane są sekwencje docelowe rozpoczynające się od 5' AA i oddzielone 19 nukleotydami od UU. Jeśli kryterium to nie może zostać spełnione, pod uwagę brane są także sekwencje nie zawierające końca 3' UU, a także rozpoczynające się od strony 5' NA. Zawartość par GC powinna być zbliżona do 50%, jednak można ustalić szerszy przedział akceptowany przez program. Kolejnym etapem była niezależna od narzędzia projektującego analiza uwarunkowań strukturalnych proponowanych miejsc docelowych. W ostatecznej selekcji uwzględniono zarówno cechy strukturalne jak i sekwencyjne. Z puli cząsteczek zaproponowanych przez narzędzie do projektowania wybrano dziewięć siRNA pokrywających się ze wstępnie zdefiniowanymi rejonami docelowymi (sekwencje w Tabeli 2, Rycina 27). Przygotowano pozytywne i negatywne kontrole dla eksperymentu. Jako pozytywna kontrola posłużył siRNA NP-1498, którego skuteczność wyciszania została zaprezentowana we wcześniejszych testach i opublikowana.^{111, 121} Kontrola negatywna została utworzona przez losowe przetasowanie sekwencji jednego z zaprojektowanych siRNA, tak aby nie wykazywał komplementarności względem sekwencji wirusowych i komórkowych. Oligonukleotydy tworzące dupleksy siRNA miały długość 21 nukleotydów i zawierały dwunukleotydowe niesparowane końce 3'TT. Dla wybranych rejonów docelowych zaprojektowano również ASO. Były one w pełni 2'-O-metylowane i zawierały nukleotydy LNA w wybranych pozycjach poszczególnych

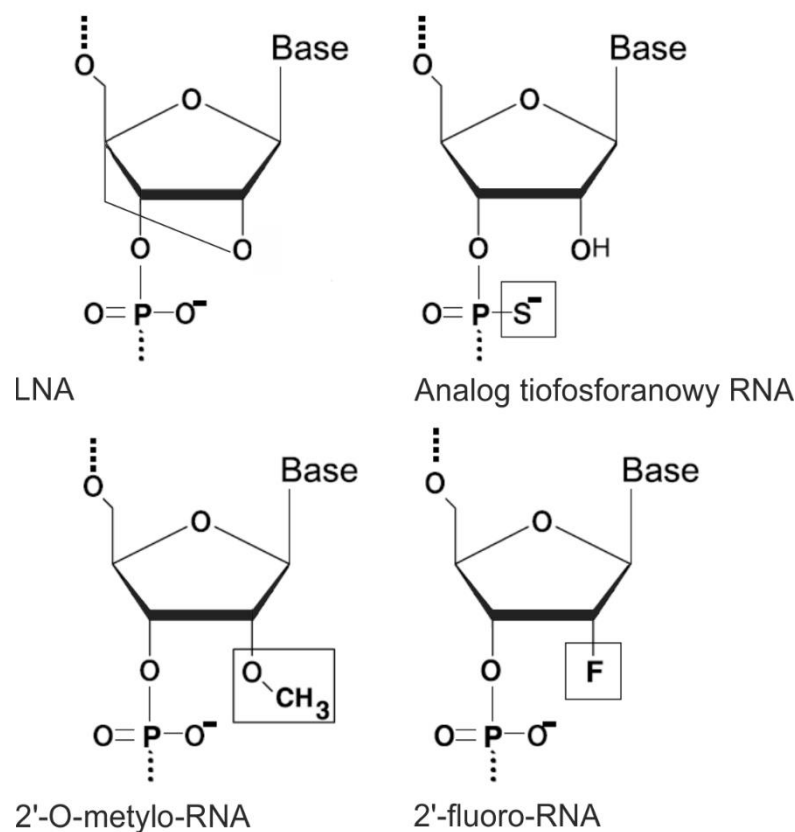
nici w celu zmniejszenia szybkości degradacji w warunkach komórkowych i zwiększenia stabilności termodynamicznej wiązania do miejsca docelowego w RNA (Rycina 28).

Tabela 2. Sekwencje testowanych siRNA i ASO.

Nazwa	Sekwencja	Rejon docelowy
siRNA		
1498	s1498	GGGUCUUAUUUCUUCGGAGTT
	a1498	CUCCGAAGAAAUAAGACCCTT
1312	s1312	GCAACCGUUAUGGCAGCAUTT
	a1312	AUGCUGCCAUAACGGUUGCTT
1090	s1090	GGAAAGAAAGUGAUUCCAATT
	a1090	UUGGAAUCACUUUCUUUCCTT
1008	s1008	CCCAGCUCACAAGAGUCAATT
	a1008	UUGACUCUUGUGAGCUGGGTT
901	s901	GCAAGUGGGCAUGACUUUGTT
	a901	CAAAGUCAUGCCCACUUGCTT
682	s682	CGAAGGACAAGGGUUGCUUTT
	a682	AAGCAACCCUUGUCCUUCGTT
613	s613	GCAAUGGAGUAAUCAGAATT
	a613	UUCUGAUUAAUCUCCAUUGCTT
613-sF1	s613-sF1	<u>GfCAAfUGGAGfUfUAAfUfCAGAATT</u>
	a613	UUCUGAUUAAUCUCCAUUGCTT
613-sF2	s613-sF2	<u>GfCAAfUGGAGfUfUAAfUfCAGAAfUfU</u>
	a613	UUCUGAUUAAUCUCCAUUGCTT
613-aF1	s613	GCAAUGGAGUAAUCAGAATT
	a613-aF1	<u>fUfUfCfUGAfUfUAAfCfUfCfCAfUfUGfCCTT</u>
613-aF2	s613	GCAAUGGAGUAAUCAGAATT
	a613-aF2	<u>fUfUfCfUGAfUfUAAfCfUfCfCAfUfUGfCfUfU</u>
613-aF3	s613	GCAAUGGAGUAAUCAGAATT
	a613-aF3	<u>fUfUfCfUGAfUfU^dA^dAfCfU^dCfCAfUfUGfCCTT</u>
613-asF1	s613-sF1	<u>GfCAAfUGGAGfUfUAAfUfCAGAATT</u>
	a613-aF1	<u>fUfUfCfUGAfUfUAAfCfUfCfCAfUfUGfCCTT</u>
613-sMe2	s613-sMe2	<u>G^MC^MA^MA^MU^MGGAGUAAUCAGAATT</u>
	a613	UUCUGAUUAAUCUCCAUUGCTT
613-sTT-PS	s613-sTT-PS	GCAAUGGAGUAAUCAGAAT ^{PS} T ^{PS}
	a613	UUCUGAUUAAUCUCCAUUGCTT
613-aTT-PS	s613	GCAAUGGAGUAAUCAGAATT
	a613-aTT-PS	UUCUGAUUAAUCUCCAUUGCT ^{PS} T ^{PS}
613-sPS	s613-sPS	<u>GC^{PS}AAUGGAGUAAUC^{PS}AGAATT</u>
	a613	UUCUGAUUAAUCUCCAUUGCTT
613-aPS	s613	GCAAUGGAGUAAUCAGAATT
	a613-aPS	<u>UUC^{PS}UGAUUAA^{PS}UC^{PS}C^{PS}AUUGC^{PS}TT</u>
613-asPS	s613-sPS	<u>GC^{PS}AAUGGAGUAAUC^{PS}AGAATT</u>
	a613-aPS	<u>UUC^{PS}UGAUUAA^{PS}UC^{PS}C^{PS}AUUGC^{PS}TT</u>
613-sDNA	s613-sDNA	<u>^dG^dC^dA^dAT^dG^dG^dA^dGTT^dA^dAT^dC^dA^dG^dA^dATT</u>
	a613	UUCUGAUUAAUCUCCAUUGCTT

613-aDNA	s613	GCAAUGGAGUAAAUCAGAATT		
	a613-aDNA	TT^dCT^dG^dATT^dA^dA^dCT^dC^dC^dATT^dG^dCTT		
613-siDNA	s613-sDNA	^dG^dC^dA^dAT^dG^dG^dA^dGTT^dA^dAT^dC^dA^dG^dA^dATT		
	a613-aDNA	TT^dCT^dG^dATT^dA^dA^dCT^dC^dC^dATT^dG^dCTT		
471	s471	CCUGAAUGAUGCCACAUAUTT	471-489	
	a471	AUAUGUGGCAUCAUUCAGGTT		
471-sF1	s471-sF1	<u>fCfCfUGAAfUGAfUGfCfCAfCAfUAfUTT</u>		
	a471	AUAUGUGGCAUCAUUCAGGTT		
471-sF2	s471-sF2	<u>CfCfUGAAfUGAfUGfCfCACAUAUTT</u>		
	a471	AUAUGUGGCAUCAUUCAGGTT		
471-sMe1	s471-sMe1	<u>C^M C^M U^M G^M A^M AUGAUGCCACAUAUTT</u>		
	a471	AUAUGUGGCAUCAUUCAGGTT		
412	s412	GCAAACAAUGGCGAAGAUGTT		412-430
	a412	CAUCUUCGCCAUUGUUUGCTT		
183	s183	ACUCAAACUCAGUGAUUAUTT	183-201	
	a183	AUAAUCACUGAGUUUGAGUTT		
183-sF1	s183-sF1	<u>AfCfUfCAAAfCfUfCAGfUGAfUfUAfUTT</u>		
	a183	AUAAUCACUGAGUUUGAGUTT		
183-sF2	s183-sF2	<u>AfCfUfCAAAfCfUfCAGfUGAUUAUTT</u>		
	a183	AUAAUCACUGAGUUUGAGUTT		
Negatywna kontrola K1	sK1	GGUUUACCGUGUUCUGUGATT	-	
	aK1	UCACAGAACACGGUAAACCTT		
Oligonukleotydy antysensowe				
682	AAG ^L AAC ^L CCU ^L GUC ^L CUU ^L CG		682-700	
613	UUC ^L UGAU ^L UAAC ^L UCC ^L AUU ^L GC		613-631	

Nazwy siRNA pochodzą od numeracji pierwszego nukleotydu od końca 5' w sekwencji docelowej (+) RNA5 (s przed nazwą siRNA oznacza nić sensową, a- nić antysensową). Modyfikacje sekwencji RNA zaznaczono pogrubionymi i podkreślonymi literami (**T**- tymidyna, **fN**- fluororybonukleotyd, **N^{PS}**- rybonukleotyd tiofosforanowy, **N^M**- 2'-O-metylowany rybonukleotyd, **^dN**- deoksyrybonukleotyd, **N^L**- nukleotyd LNA). ASO są 2'-O-metylowanymi oligonukleotydami zawierającymi LNA (**N^L**).

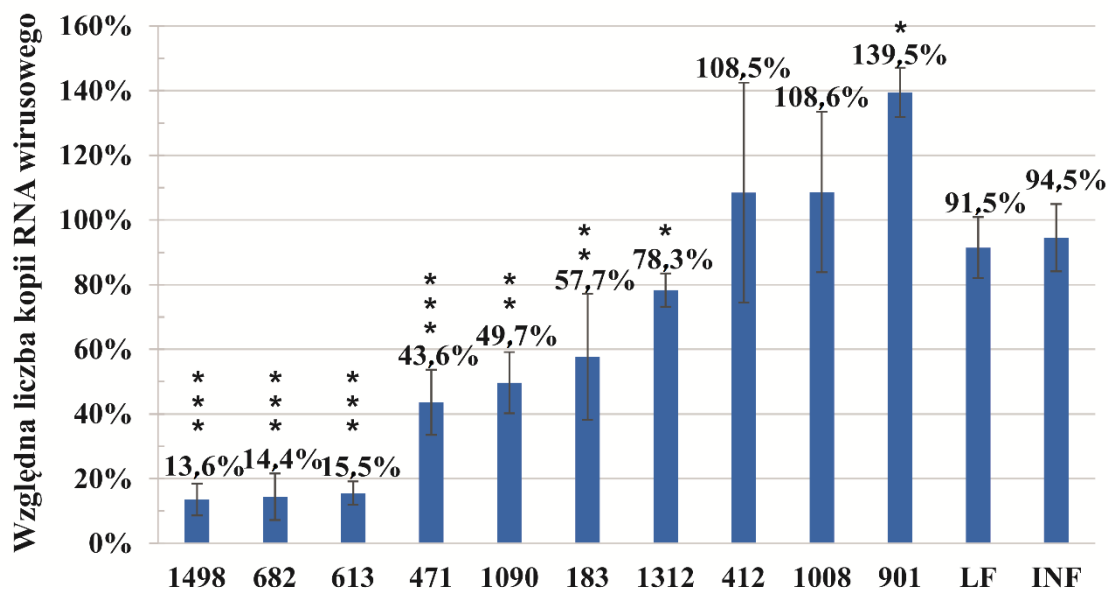


Rycina 28. Wzory strukturalne modyfikowanych reszt nukleotydów zastosowanych w pracy.

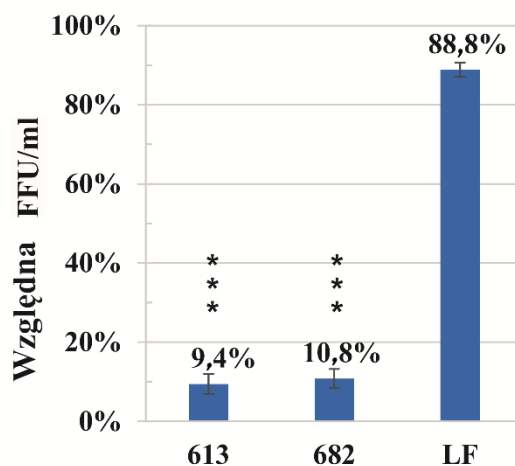
2.2 Potencjał inhibitorowy niemodyfikowanych siRNA

Wyniki uzyskane w doświadczeniach przeprowadzonych w hodowlach komórkowych wykazały, że sześć z dziewięciu zaprojektowanych siRNA hamowało replikację wirusa grypy (Rycina 29). Stężenie 8 nM było wystarczające do wywołania znacznego działania przeciwwirusowego. Najbardziej efektywne były siRNA 613 i 682, które zmniejszyły liczbę kopii wirusa odpowiednio o 84,5% i 85,6%, w porównaniu z kontrolą negatywną. Dwa inne siRNA - 1090 i 471 - wykazały średnią aktywność i zahamowały namnażanie wirusa o odpowiednio 50,3% i 56,4%. Niektóre z dupleksów w sposób umiarkowany wpłynęły na replikację wirusa grypy. Dla siRNA 183 redukcja wyniosła 42,3%, a dla 1312 jedynie 21,7%. Cząsteczki 412 i 1008 nie wykazały żadnego efektu hamującego. Co ciekawe, transfekcja siRNA 901 do komórek doprowadziła do znaczącego zwiększenia namnażania wirusa. Następnie, wyniki uzyskane dla siRNA 613 i 682 zostały potwierdzone w teście IFA (Rycina 30 i 31). W obu przypadkach miano

wirusa było zmniejszone w porównaniu z kontrolą negatywną, odpowiednio o 90,6% i 89,2%.

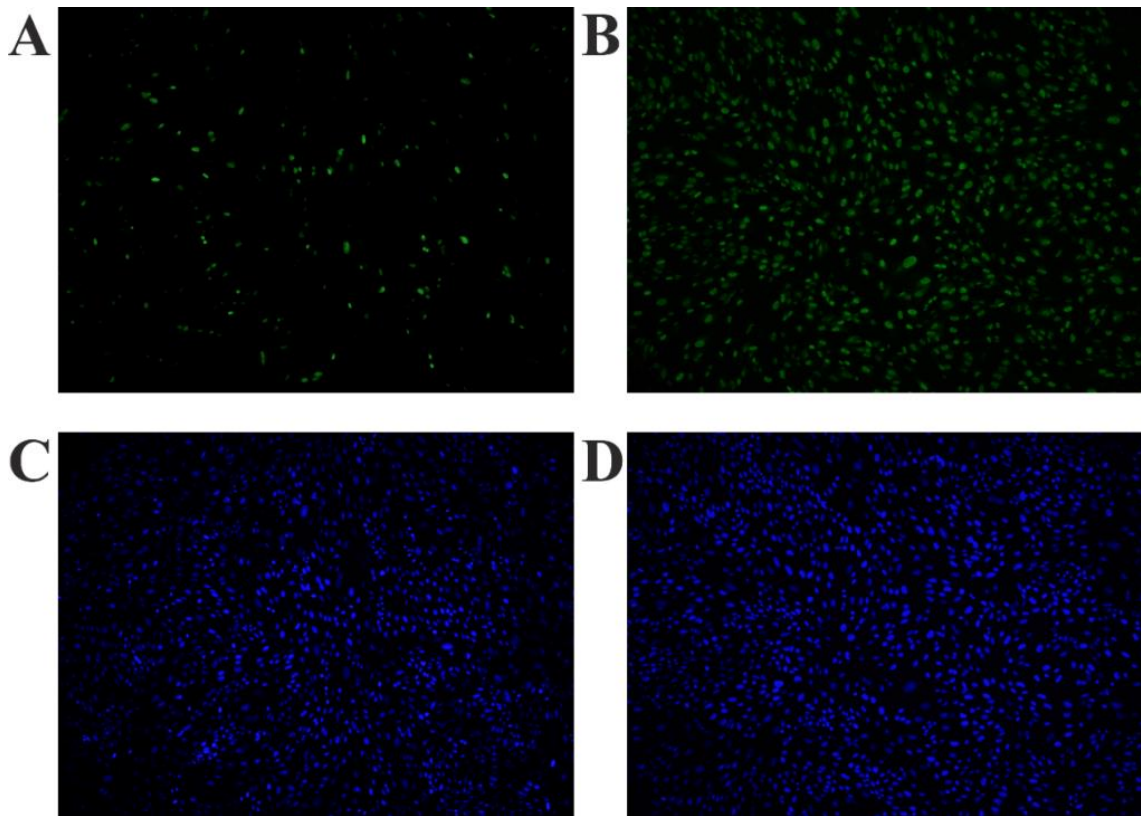


Rycina 29. Potencjał inhibitorowy siRNA wobec szczepu A/California/04/2009 (H1N1) w komórkach MDCK. Liczbę kopii RNA wirusowego określono metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wartości otrzymane dla próbek siRNA porównano z wartością uzyskaną dla kontroli negatywnej K1 (stanowiącej 100%). Komórki traktowane lipofektaminą bez użycia siRNA są oznaczone jako LF, komórki nietransfekowane i poddane infekcji to INF, 1498 to siRNA stanowiący kontrolę pozytywną (testowany wcześniej przez innych badaczy^{111, 121}), pozostałe znaczniki są nazwami siRNA. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe niezależnych eksperymentów. Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem testu t-studenta (***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05).



Rycina 30. Aktywność przeciwwirusowa dwóch najbardziej skutecznych niemodyfikowanych siRNA w teście IFA. Wyniki uzyskane dla siRNA porównano

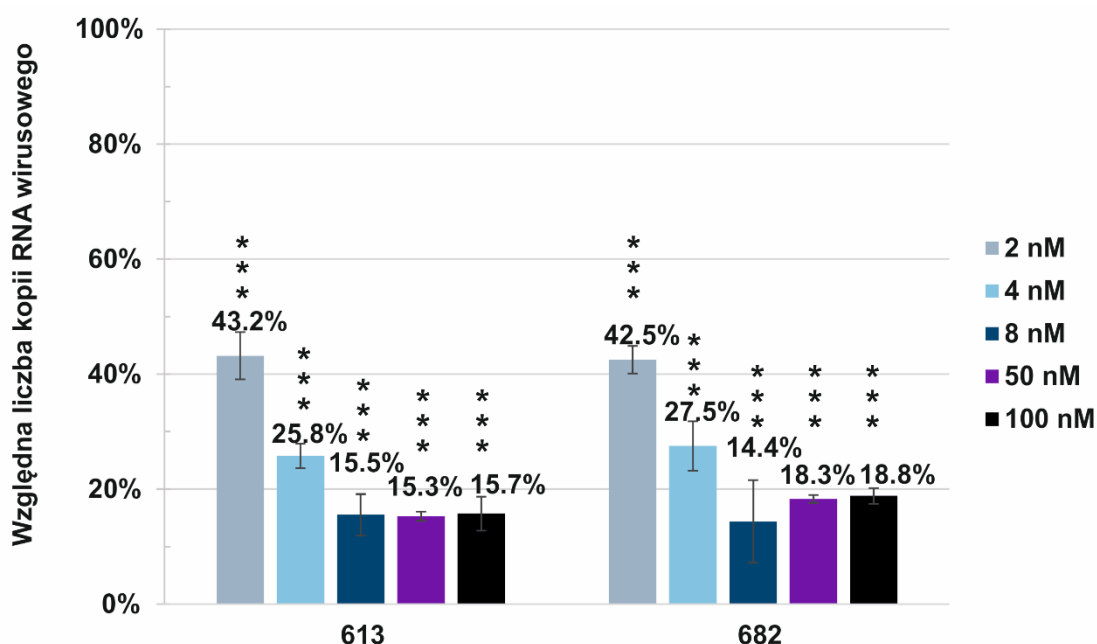
z kontrolą negatywną K1 (stanowiącą 100%). Komórki traktowane lipofektaminą bez użycia siRNA są oznaczone jako LF, pozostałe znaczniki są nazwami siRNA. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe niezależnych eksperymentów. Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem testu t-studenta (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).



Rycina 31. Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiające hodowlę komórek MDCK zakażonych wirusem grypy w teście IFA. (A) i (C) prezentują hodowlę traktowaną siRNA 613. (B) i (D) kontrolę. Zielona fluorescencja pochodzi od przeciwciał przeciw wirusowi grypy nakierowanych na białko NP, niebieska to barwienie jądra przy użyciu DAPI. Ilość sygnałów pochodzących od przeciwciał skierowanych przeciwko białku NP grypy jest zmniejszona w próbce traktowanej siRNA 613, co świadczy o inhibicji namnażania wirusa.

W toku prac badawczych testowano różne stężenia siRNA 613 i 682 w zakresie od 100 nM do 2 nM. Zaobserwowano, że podniesienie stężenia powyżej 8 nM (50 nM, 100 nM) nie skutkuje wzmocnieniem efektu hamującego namnażanie wirusa grypy, a liczba kopii RNA wirusa osiąga plateau i utrzymuje się na stałym poziomie (Rycina 32). Istnieją doniesienia, że wewnątrzkomórkowa egzozonukleaza Eri-1, która jest negatywnym regulatorem RNAi, ulega nadekspresji w odpowiedzi na wysokie dawki siRNA.¹⁷⁷ Zjawisko to może przyczyniać się do usuwania pewnej puli cząsteczek siRNA,

które wniknęły do komórki i zapobiegać zachodzeniu dalszych etapów prowadzących do wyciszenia genów. Powyższa obserwacja wskazuje, że w niektórych przypadkach zwiększanie stężenia nie przynosi pożądanych skutków biologicznych. Należy zatem zwracać uwagę, aby stosować najniższe możliwe stężenie siRNA, które wywołuje oczekiwany efekt inhibicji. Z drugiej strony, obniżenie stężenia z 8 nM do 4 nM i 2 nM powodowało proporcjonalny wzrost liczby kopii wirusowego RNA. Przeciwwirusowa aktywność siRNA w tym zakresie stężeń jest zatem zależna od dawki (Rycina 32).



Rycina 32. Najskuteczniejsze siRNA testowano w kilku stężeniach. Liczbę kopii RNA wirusowego analizowano metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wyniki uzyskane dla siRNA porównano z kontrolą negatywną. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe niezależnych eksperymentów. Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem testu t-studenta (***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05).

2.3 Analiza konserwatywnych motywów struktury drugorzędowej jako celu dla strategii RNAi

SiRNA 613 i 682 o największym potencjale przeciwwirusowym nakierowane są na konserwatywne rejony struktury drugorzędowej mRNA5 wirusa grypy- 613-631 i 682-700 (Tabela 2, Rycina 27). Rejon 613-631 obejmuje przewidywane miejsce silnego wiązania sondy w mapowaniu (+)RNA5 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) przy użyciu mikromacierzy izoenergetycznych i sąsiaduje ze stosunkowo długim elastycznym regionem 633-639.³⁸ Konserwatywność strukturalna w porównaniu z innymi obranymi

celami siRNA jest najwyższa (92%, Tabela 3), a sam motyw jest stabilny termodynamicznie. Rejon 682-700 jest natomiast częścią spinki do włosów 671-743, dobrze scharakteryzowanej w mapowaniu chemicznym (+)RNA5 szczepu H5N1, a także obejmuje elastyczny rejon 683-687. Domena odznacza się wysoką konserwatywnością (88%), jest jednak bardziej labilna strukturalnie, o czym świadczy obliczona energia swobodna, natomiast dupleks mRNA/nić antysensowa siRNA jest bardzo termodynamicznie stabilny (Tabela 3). SiRNA 613 częściowo pokrywa się z miejscami wiązania wcześniej testowanych ASO 615A i 640A, znajdującymi w pętlach spinki do włosów.³⁸ Rejony te zostały zdefiniowane jako dobre cele dla ASO o silnym działaniu hamującym namnażanie wirusa grypy (3-krotne obniżenie miana w teście IFA i odpowiednio 70% i 64% w analizie metodą PCR w czasie rzeczywistym). Uniwersalność tych sąsiadujących rejonów jako celu dla dwóch różnych strategii ukierunkowanych na RNA potwierdza pogląd, że niektóre stabilne i konserwatywne motywy mogą mieć znaczenie funkcjonalne. Nie istnieje jednak prosta zależność między obliczoną konserwatywnością strukturalną wybranego motywu, danymi termodynamicznymi i skutecznością nakierowanych na dany motyw siRNA (Tabela 3).

Tabela 3. Analiza konserwatywności strukturalnej domen docelowych oraz energii swobodnej dupleksu mRNA/nić antysensowa siRNA.

Nazwa siRNA	Domena docelowa	Średnia konserwatywność par zasad domeny docelowej dla typu A	Energia swobodna domeny ΔG^{0}_{37} (kcal/mol)	Energia swobodna dupleksu mRNA/nić antysensowa siRNA ΔG^{0}_{37} (kcal/mol)
183	107-227	83,7%	-4,4	-27,5
412	386-444	81,3%	-0,5	-31,7
471	452-493	86,9%	-8,8	-31,6
613	559-669	92,4%	-12,7	-29,2
682	671-743	88,5%	-5,2	-34,4
901	851-931	89,7%	-12,3	-34,6
1008	977-1067	81,0%	-0,2	-35,7
1090	1077-1197	86,8%	-20,5	-28,8
1312	1258-1365	78,6%	-7,8	-34,8
1498	244-341, 1533-1479	86,4%	-23,5	-32,3

Należy jednak pamiętać, że cel i samo siRNA musi spełniać wiele kryteriów aby aktywacja RNAi była skuteczna. Można jedynie zauważyć, że dla czterech z sześciu najlepszych testowanych siRNA konserwatywność par zasad jak i stabilność motywu strukturalnego była wysoka.

Rejon docelowy dla siRNA 613 również sąsiaduje z miejscami docelowymi dla trzech skutecznych siRNA opublikowanych przez inne grupy badawcze.^{120, 121} Nukleotydy 591-612 sąsiadujące z końcem 5' docelowego miejsca wiązania siRNA 613 były celem dla NP571 i NP574 testowanych na szczepie A/Beijing/01/2009 (H1N1).¹²¹ Przy stężeniu 40 nM NP571 i NP574 powodowały około 80% obniżenie mRNA NP wirusa grypy i około 70% redukcję poziomu białka NP. Nukleotydy 649-667, oddzielone od końca 3' miejsca docelowego siRNA 613 przez 17 nukleotydów, były celem dla NP604 testowanego na szczepie A/duck/Fujian/13/2002 (H5N1).¹²⁰ NP604 dostarczano do komórek pod postacią wektora plazmidowego zawierającego sekwencję shRNA. Transfekowane komórki niosące wyżej wymienione siRNA wykazały najniższe miano wirusa w teście IFA. Ze względu na różne warunki prowadzonych doświadczeń i metody analizy, bezpośrednie porównanie efektów przeciwwirusowych uzyskanych we wszystkich eksperymentach przedstawionych powyżej i w niniejszej pracy doktorskiej nie jest możliwe, pokazuje jednak konkretny trend. Pomimo, iż eksperymenty przeprowadzono na różnych szczepach, ta sama domena docelowa była podatna na działanie siRNA i hamowanie replikacji wirusa. Odkrycie to potwierdza ważną rolę wybranego motywu strukturalnego w cyklu replikacyjnym wirusa grypy.

Drugi z najbardziej efektywnych siRNA 682, był nakierowany na częściowo jednoniciowy rejon umiejscowiony po przeciwległej stronie długiej wewnętrznej pętli, będącej miejscem wiązania dla wcześniej testowanego ASO 727A.³⁸ ASO 727A wykazał najwyższy potencjał inhibitorowy względem wirusa grypy w doświadczeniach na hodowli komórkowej, zarówno w analizie IFA, jak i PCR w czasie rzeczywistym. Wynik ten wskazuje, że motyw strukturalny 671-743 może spełniać szczególnie ważną rolę w cyklu replikacyjnym wirusa, która może zostać zakłócona przez strategię ukierunkowane na RNA. Co ciekawe, siRNA 471, 1312, 183, których sekwencje docelowe pokrywały się z miejscami wiązania wcześniej testowanych ASO 470A, 1320A, 200A wykazywały aktywność w zakresie od średniej do umiarkowanej (Rycina 29), podczas gdy ich odpowiedniki ASO nie były zdolne do zahamowania namnażania wirusa.³⁸ siRNA 412 i 901, których rejony oddziaływania częściowo pokrywają się

z miejscami docelowymi ASO 415A i 920A nie wykazały właściwości przeciwwirusowych (Rycina 29), co było zgodne z wynikami uzyskanymi dla ASO.³⁸ ASO i siRNA stosowano w różnych stężeniach, odpowiednio 750 nM i 8 nM. Dodatkowo, siRNA 1090 zaprojektowany został na rejon docelowy znajdujący się w obrębie dobrze opisanego konserwatywnego motywu struktury drugorzędowej.³⁹ Jest to pętla wieloramienna zawierająca trzy motywy spinkowe. Hybrydyzacja siRNA 1090 następuje w rejonie 1090-1108 obejmującym jedną ze spinek, której pętla, a w szczególności nukleotydy 1097-1101, zostały dobrze zmapowane chemicznie i enzymatycznie w opublikowanych badaniach. Dotychczas, miejsce to było celem działania ASO 1C, jednak pomimo wysokiego, 4 μ M stężenia nie wykazał on znaczącej inhibicji namnażania wirusa.³⁹ Wspomniany ASO na końcu 5' i 3' częściowo zachodził na rejony helikalne spinki. Wnioskowano wtedy, że rejon ten może nie być w pełni dostępny. Większy potencjał inhibitorowy wykazał w tym miejscu testowany w niniejszej pracy siRNA 1090 obniżając miano wirusa o 50,3%.

Dwie przedstawione strategie, wykorzystujące siRNA i ASO, działają w oparciu o różne mechanizmy komórkowe. ASO powodują steryczną blokadę docelowego RNA, zaburzają jego interakcję z białkami oraz procesy zależne od struktury. Rejon docelowy musi być dostępny dla hybrydyzacji ASO. SiRNA natomiast są włączane do kompleksu RISC, a ostatecznym etapem jest hybrydyzacja i przecięcie docelowego RNA przez białko efektorowe kompleksu o nazwie Ago2. Rola struktury RNA w tym procesie wciąż nie jest w pełni poznana. Fakt, że te same motywy strukturalne są miejscem działania skutecznych ASO oraz siRNA o wysokiej aktywności wskazuje, że projektowanie cząsteczek w oparciu o strukturę jest obiecującym sposobem na zrewolucjonizowanie projektowania efektywnych siRNA. Proces ten wymaga jednak uwzględnienia dodatkowych strukturalnych ograniczeń poszczególnych strategii. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można wnioskować, że pewne rejony struktury są bardziej dostępne dla siRNA niż dla ASO. Wyselekcjonowane na podstawie struktury siRNA wykazały skuteczność przeciwwirusową w stosunkowo niskich stężeniach. Zaprezentowane podejście zapewnia także wgląd w biologię wirusa grypy. Niniejsze badania zidentyfikowały rejony mRNA5 dostępne dla strategii RNAi, których zakłócenie w sposób znaczący zmniejsza replikację wirusa grypy. Postuluje się, że docelowe rejony działania najlepszych siRNA są szczególnie ważne dla cyklu życiowego wirusa i mogą pełnić rolę funkcjonalną.

2.4 Projektowanie modyfikowanych siRNA

Modyfikacje chemiczne są szeroko stosowane w strategii antysensowej w celu poprawy niektórych cech narzędzi opartych na kwasach nukleinowych.⁵⁴ Podejście to może przynieść korzyści, takie jak zwiększona stabilność oligonukleotydów, oporność na działanie nukleaz, zwiększona zdolność wiązania w miejscu docelowym, zmniejszony efekt niespecyficzny i przedłużona aktywność. Wyżej wymienione czynniki byłyby również korzystne dla działania RNAi, jednak jest to proces bardziej złożony i wieloetapowy. Wymagania sekwencyjne i strukturalne siRNA nie są jeszcze w pełni poznane. Modyfikacje mogą wpływać na różne etapy działania kompleksu RISC, takie jak rozpoznawanie, ładowanie i aktywność helikazy z powodu wiązań wodorowych, efektów elektrostatycznych i sterycznych.¹⁷⁸ Głównym celem jest znalezienie modyfikacji i schematów, które zapewnią korzystne cechy, nie wpływając negatywnie na maszynię komórkową. Funkcje, takie jak skuteczna inhibicja docelowego RNA, zwiększona stabilność w osoczu i mała cytotoksyczność siRNA powinny być korzystne dla zastosowań *in vivo*.

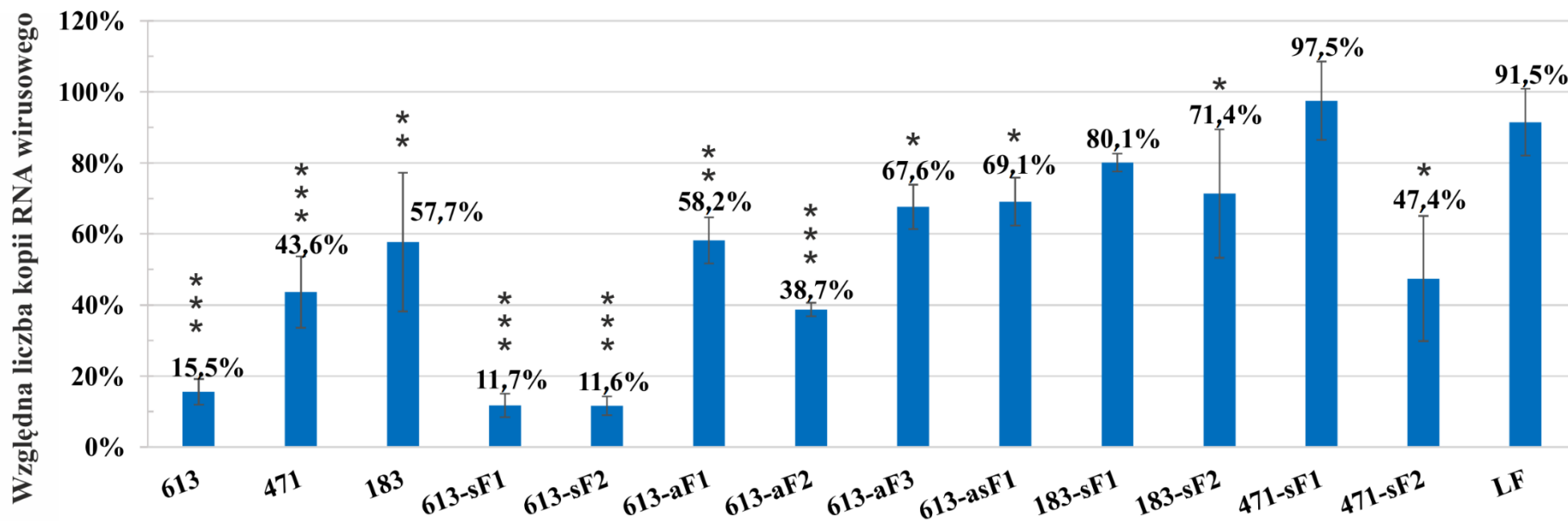
Do siRNA 613, 471 i 183 wprowadzono modyfikacje zgodnie z doniesieniami wykazującymi zwiększony potencjał dupleksów po wprowadzeniu danych substytucji.¹⁷⁷⁻¹⁸² Sekwencje wszystkich zaproponowanych cząsteczek przedstawiono w Tabeli 2. Wybrane siRNA są przedstawicielami trzech różnych kategorii aktywności przeciwwirusowej - wysokiej, średniej i umiarkowanej. Testowanie zróżnicowanej grupy siRNA pozwala na ocenę wpływu modyfikacji na duplekсы, których pierwotny potencjał inhibitorowy jest odmienny. Pełen zestaw modyfikowanych nukleotydów – 2'-fluorocytydyny i 2'-fluorourydyny - wprowadzono do nici sensowej i nici antysensowej siRNA 613 (613-asF1; Tabela 2). Proponowana modyfikacja prowadzi do zwiększenia stabilności tworzonych par zasad. Zastosowany dobór pozycji pozwolił na stabilizację każdej pary zasad w duplesie. Dodatkowo, przygotowano dwa warianty nici sensowej zawierające niesparowane tymidyny (s613-sF1) lub 2'-fluorourydyny (s613-sF2) na końcu 3' (Tabela 2). Istniały również trzy warianty nici antysensowej (a613-aF1, a613-aF2, a613-aF3; Tabela 2). Dwa z nich były analogiczne do nici sensowej (a613-aF1, a613-aF2), a trzeci zawierał deoksyrybonukleotydy w pozycjach 9, 10 i 13 (a613-aF3), które tworzą parę zasad z nukleotydami otaczającymi miejsce docelowego przecięcia w mRNA5 (zakończony niesparowanymi końcami 3'TT). siRNA 471 i 183 zawierały zmodyfikowane wszystkie cytydyny i urydyny w nici sensowej (471-sF1,

183-sF1; Tabela 2). Zaproponowano również mniej zmodyfikowany wariant nici sensowej, gdzie zmiany koncentrowały się po stronie 5' nici obu dupleksów (471-sF2, 183-sF2; Tabela 2). Jako drugi rodzaj modyfikacji zastosowano tiofosforanowe analogii nukleotydów w nici sensowej i antysensowej siRNA 613 (613-asPS, 613-aPS, 613-sPS; Tabela 2). Wprowadzono je w wiązaniu internukleotydowym po każdej cytydynie. Wzór modyfikacji był bardzo podobny do tego stosowanego w przypadku 2'-fluororybonukleotydów, jednak wiązanie internukleotydowe urydyn pozostało niezmienione. Wprowadzenie tiofosforanowych analogów nukleotydów, w przeciwieństwie do 2'-fluorybonukleotydów, powoduje destabilizację pary zasad w dupleksie.¹⁸⁰ W celu uniknięcia nadmiernej destabilizacji zredukowano liczbę zmian. Eksperymentom na hodowli komórkowej poddano także 2'-O-metylowane siRNA (613-sMe2, 471-sMe1; Tabela 2). Zmienione nici siRNA 613 i 471 zawierały pięć modyfikowanych nukleotydów na końcu 5'. Obie nici siRNA 613 również zostały zsyntetyzowane jako łańcuchy DNA (a613-aDNA, s613-sDNA; Tabela 2).

2.5 Przeciwwirusowe właściwości modyfikowanych siRNA nakierowanych na rejony 183-201, 471-489 i 613-631 mRNA5

Do siRNA wprowadzono 2'-fluororybonukleotydy lub reszty tiofosforanowe w wybrane pozycje w celu zwiększenia właściwości hamujących namnażanie wirusa grypy (Tabela 2). Eksperymenty, w których zastosowano siRNA 613 z dwiema niemi zawierającymi 2'-fluororybonukleotydy (613-asF1), wykazały, że wprowadzenie w pełni zmodyfikowanego dupleksu powoduje znaczną utratę potencjału przeciwwirusowego cząsteczki (Rycina 33). Następnie, przetestowano mieszaninę niemodyfikowanych i modyfikowanych nici. Modyfikacja nici antysensowej, gdy nić sensowa pozostała nienaruszona, spowodowała znaczny wzrost liczby kopii wirusowego RNA, o 42,7%, 23,2% i 52,1% dla każdego badanego wariantu (odpowiednio: 613-aF1, 613-aF2, 613-aF3), w porównaniu z niemodyfikowanym dupleksem (Rycina 33). Obecność 2'-fluororybonukleotydów tylko w nici sensowej pozwoliła na utrzymanie wysokiego poziomu inhibicji wirusa (88,3% i 88,4% odpowiednio dla wariantów 613-sF1 i 613-sF2). Wyniki wskazują, że substytucje na 2'-fluorourydyne i 2'-fluorocytydyne są dobrze tolerowane w nici sensowej, podczas gdy zakłócają proces efektywnej interferencji RNA, gdy są umieszczone w nici antysensowej. Sytuacja była inna w przypadku siRNA 183 i 471. W niemodyfikowanej postaci powodowały one umiarkowaną i średnią inhibicję wirusa grypy. Celem było zwiększenie ich potencjału inhibitorowego poprzez

wprowadzenie 2'-fluororybonukleotydów do nici sensowej, gdzie zmiana została wcześniej określona jako dobrze tolerowana w siRNA 613 (613-sF1). Dla siRNA 183-sF1 liczba kopii wirusowego RNA wzrosła o 22,4%, podczas gdy 471-sF1 praktycznie stracił aktywność (Rycina 33). Porównano różnice między modyfikowaną nicią sensowną 613-sF1 i powyższymi dwoma testowanymi. Zauważono, że oprócz zależnych od sekwencji różnic w rozkładzie modyfikacji istnieją również inne. Zmodyfikowanie wszystkich cytydyn i urydyn w nici sensowej oznacza sześć modyfikacji na 21 nukleotydów dla 613-sF1, podczas gdy dla 183-sF1 i 471-sF1 jest to 10 modyfikacji. Liczbę modyfikacji w nici sensowej mniej skutecznych cząsteczek zmniejszono następnie do siedmiu modyfikacji w 471-sF2 i sześciu w 183-sF2. Zmiany zostały skoncentrowane na końcu 5' nici zgodnie z zasadą, że część ta powinna być bardziej stabilna, aby pozwolić na separację nici na końcu 3' i prawidłowy wybór nici wiodącej. Modyfikacja ostatniego nukleotydu na końcu 5' również została wyeliminowana. Dupleks zawierający 471-sF2 odzyskał aktywność przeciwwirusową w zakażonej hodowli komórkowej porównywalny do niemodyfikowanego siRNA, jednak nie zaobserwowano znaczącego wzrostu potencjału hamującego namnażanie wirusa grypy (Rycina 33). W przypadku 183-sF2 aktywność przeciwwirusowa była wyższa niż 183-sF1, ale wciąż niższa niż niemodyfikowanego siRNA 183 (Rycina 33). Pewne różnice mogą wynikać z faktu, że w 183-sF2 zmodyfikowano nukleotydy 9 i 10 otaczające miejsce przecięcia RNA przez endonukleazy. W 471-sF2 modyfikowano tylko jeden z otaczających miejsce przecięcia nukleotydów.



Rycina 33. Ilościowa analiza wirusowego RNA metodą PCR w czasie rzeczywistym określająca potencjał inhibitorowy modyfikowanych siRNA, zawierających 2'-fluororybonukleotydy, względem A/California/04/2009 (H1N1) w komórkach MDCK. Stężenie siRNA wynosiło 8 nM. Słupki błędów przedstawiają standardowe odchylenia niezależnych eksperymentów. Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem testu t-studenta (*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

Wprowadzenie modyfikacji każdej pirymidyny narzuciło równomierną dystrybucję 2'-fluoro-substytucji w poszczególnych niciach siRNA, bez faworyzowania 5' lub 3' końca. Niektóre z dotychczasowych publikacji wskazywały, że 2'-fluorocytydyna i 2'-fluorourydyna są lepiej tolerowane w nici antysensowej na końcu 3', pozwalając na zachowanie wysokiej zdolności siRNA do wyciszania genów.¹⁸³ Nadmierna modyfikacja końca 5' w proponowanych w niniejszej pracy niciach antysensowych mogła przyczynić się do zmniejszenia aktywności 613-aF1, 613-aF2, 613-aF3, 613-asF1 (Rycina 33). Uwzględnienie tej przesłanki przy projektowaniu kolejnych wariantów nici antysensowych siRNA może wpłynąć na poprawę ich właściwości inhibitorowych.

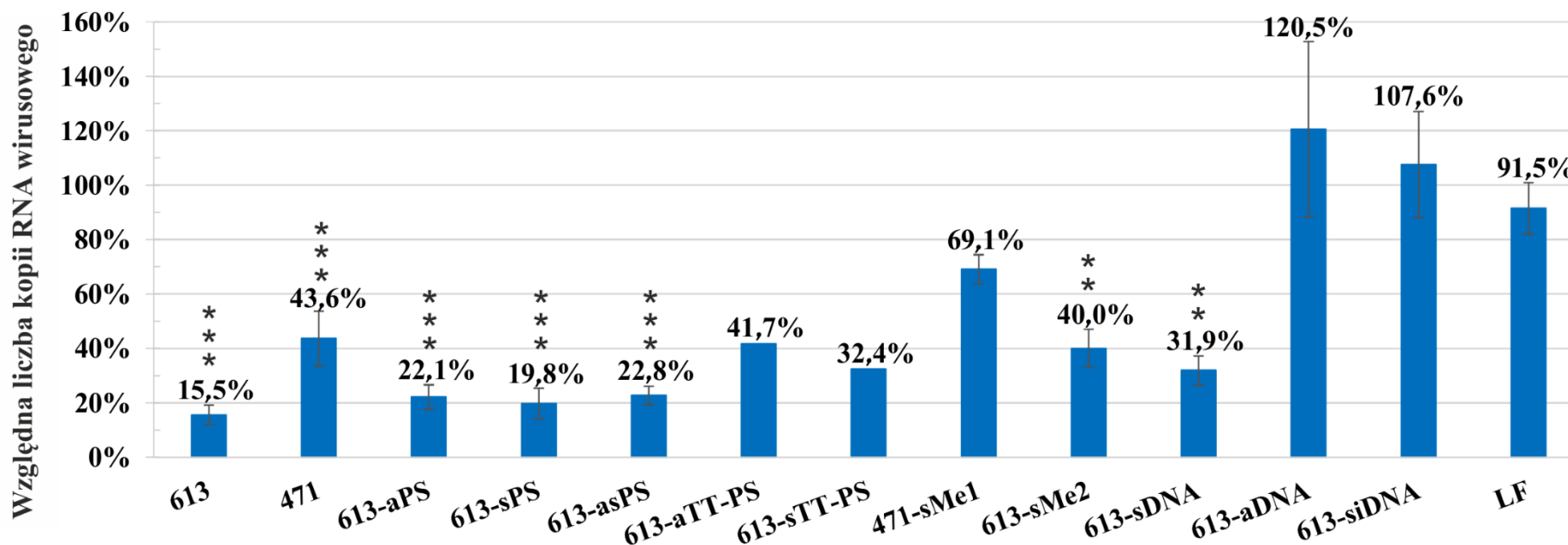
Zaobserwowano, że obecność 2'-fluorocytydyny i 2'-fluorourydyny w nici sensowej wpływa na działanie inhibitorowe siRNA w odmienny sposób, w zależności od pozycji i liczby modyfikacji. Aktywność siRNA nie ulegała zmianie gdy poziom modyfikacji w nici sensowej był umiarkowany (613-sF1, 613-sF2, Rycina 33). Efekt przeciwwirusowy wywoływany przez siRNA był obniżony, gdy nić sensowna była silnie zmodyfikowana (471-sF1, 183-sF2, Rycina 33). Ograniczenie poziomu modyfikacji w tym przypadku pozwoliło na wzmocnienie inhibicji (471-sF2, 183-sF2, Rycina 33). Czynnikiem odpowiedzialnym za ograniczony potencjał nadmiernie modyfikowanego siRNA może być zwiększona stabilność termodynamiczna. Liczba zmian i rozmieszczenie modyfikacji może spowodować inaktywację siRNA poprzez blokowanie zdolności rozplatania i funkcji RISC. Poziom stabilizacji prowadzący do utraty aktywności nie został do tej pory zdefiniowany.

Do tej pory nie udało się ustalić w jaki sposób konkretne modyfikacje wpływają na poszczególne etapy enzymatycznego przecięcia RNA, które występują podczas działania RNAi. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami obecność 2'-OH nie jest wymagana w nici antysensowej dla nukleotydów parujących się z miejscem przecięcia mRNA.¹⁸³ Mamy również ograniczoną wiedzę na temat tego, jak modyfikacje wpływają na losy nici pasażerskiej po rozdzieleniu nici siRNA. Brak przecięcia nici sensowej pomiędzy nukleotydem 9 i 10 był wcześniej odnotowany jako czynnik powodujący upośledzenie RNAi.¹⁷⁷ W niniejszej pracy, zaprojektowano siRNA, w których rozkład 2'-fluorocytydyn i 2'-fluorourydyn był równomierny, nie wyłączając miejsca przecięcia. Najbardziej skuteczne modyfikowane siRNA w niniejszych badaniach - 613-sF1,

613-sF2- zawierały jeden modyfikowany nukleotyd w miejscu przecięcia. Obserwacja ta może wskazywać, że brak 2'-OH w tej pozycji nie zakłóca aktywności siRNA.

Uprzednio wykazano, że siRNA zawierające 2'-fluorocytydynę i 2'-fluorourydynę, skutecznie wyciszają docelowe geny.¹⁸³ Obserwacje te były w dużej mierze spójne z niniejszymi wynikami. We wcześniejszych publikacjach donoszono także, iż modyfikacja nici sensowej może być korzystna dla aktywności siRNA, ponieważ chroni nić wiodącą i pozwala na zachowanie jej integralności na etapach poprzedzających aktywację RISC.¹⁷⁷ 2'-fluorocytydyna i 2'-fluorourydyna zostały opisane w literaturze jako modyfikacje chroniące siRNA przed wewnątrzkomórkowymi RNazami (zwłaszcza egzonukleazą Eri-1, która może być negatywnym regulatorem RNAi) i umożliwiające przedłużoną aktywność w komórkach.^{177, 183} Dlatego wprowadzenie 2'-fluorocytydyny i 2'-fluorourydyny do nici sensowej może być korzystne. Znalezienie odpowiedniego schematu modyfikacji siRNA nawet dla pojedynczego dupleksu może prowadzić do udoskonaleń, które będą korzystne dla przyszłych zastosowań.

Tiofosforanowe analogii nukleotydów natomiast były dobrze tolerowane w obu niciach. Wprowadzenie tej modyfikacji do jednej lub obu nici siRNA jednocześnie miało bardzo podobny efekt hamujący namnażanie wirusa (Rycina 34). Analizy wykazały około 80% redukcji liczby kopii wirusowego RNA w próbkach traktowanych siRNA, gdzie modyfikacje były równomiernie rozlokowane na całej długości obu nici (613-aPS, 613-sPS, 613-asPS). SiRNA zawierające tiofosforanowe wiązania internukleotydowe należą do najbardziej aktywnych z testowanych dupleksów. Warto jednak wspomnieć, że po wprowadzeniu modyfikacji do niesparowanych końców 3'TT aktywność przeciwwirusowa uległa zmniejszeniu. Zaobserwowano 58,3% inhibicję namnażania wirusa grypy dla siRNA zawierającego modyfikowaną nić antysensową (613-aTT-PS) oraz 67,6% gdy modyfikacja obejmowała nić sensową (613-sTT-PS). Negatywny efekt modyfikacji miał większy wymiar, gdy modyfikowana była nić wiodąca.



Rycina 34. Ilościowa analiza wirusowego RNA metodą PCR w czasie rzeczywistym określająca potencjał inhibitorowy modyfikowanych siRNA, zawierających tiofosforanowe analogi nukleotydów, grupę 2'-O-metylową oraz deoksyrybonukleotydy względem A/California/04/2009 (H1N1) w komórkach MDCK. Stężenie siRNA wynosiło 8 nM. Słupki błędów przedstawiają standardowe odchylenia niezależnych eksperymentów. Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem testu t-studenta (*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

W niniejszych badaniach tiofosforanowe analogii nukleotydów były dobrze tolerowane w nici sensowej i antysensowej siRNA 613, gdy były równomiernie rozłożone w niciach dupleksu RNA. SiRNA utrzymały wysoką aktywność przeciwwirusową pomimo różnej pozycji i liczby modyfikacji w obu niciach (613-sPS, 613-aPS, 613-asPS, Rycina 34). Modyfikacja nici antysensowej nie spowodowała spadku aktywności przeciwwirusowej, chociaż wprowadzono pięć wiązań tiofosforanowych (613-aPS, Rycina 34). Według literatury internukleotydowe wiązanie tiofosforanowe w siRNA zapewnia zwiększoną oporność na RNazy i poprawia wewnątrzkomórkową stabilność siRNA.¹⁸²⁻¹⁸⁵

Wcześniejsze doniesienia wskazywały, że wprowadzenie tej modyfikacji ma mniejszy wpływ na aktywność siRNA, gdy obejmuje tylko nić sensową.¹⁸³ Jednocześnie, dupleks zawierający w pełni modyfikowaną nić sensową był znacznie mniej skuteczny niż jego niemodyfikowany wariant. Obserwacja ta odbiega od wyników niniejszych badań. Istotny pozytywny wpływ na aktywność siRNA, mógł mieć umiarkowany poziom testowanych modyfikacji. Podejście to było również uzasadnione ze względu na cytotoksyczność ujawniająca się przy rozległej modyfikacji tiofosforanowymi analogami nukleotydów, której skutecznie uniknięto.^{186, 187} Uzyskane dane pokazują, że nie ma znaczących różnic w proliferacji komórek pomiędzy próbkami traktowanymi siRNA zawierającymi wiązania tiofosforanowe i kontrolą, szczególnie w stężeniu stosowanym w eksperymentach na hodowli komórkowej (8 nM).

Istnieją również pewne rozbieżności dotyczące wprowadzania tiofosforanowych analogów nukleotydowych na końcu 3'. We wcześniejszych badaniach wykazano, że trzy modyfikacje wprowadzone do obu nici zwiększają stabilność w surowicy bez znaczącej utraty skuteczności wyciszania.¹⁸⁵ Rezultaty przedstawione w niniejszej pracy wykazują zmniejszone działanie inhibitorowe dla podobnego schematu modyfikacji (613-aTT-PS, 613-sTT-PS).

Z perspektywy przyszłego zastosowania, wprowadzenie tiofosforanowych wiązań internukleotydowych ma pewne korzystne cechy.^{184, 188} Podobnie jak 2'-fluororybonukleotydy, tiofosforanowe analogii wydłużają okres półtrwania siRNA narażonych na działanie ekstraktów cytoplazmatycznych lub surowicy. Modyfikowane grupami tiofosforanowymi oligonukleotydy wykorzystywane *in vivo* zwiększają wiązanie z białkami surowicy, poziom usuwania z organizmu jest niższy, a biodostępność dla tkanek poprawiona.^{184, 188}

Grupy 2'-O-metylowe wprowadzono do nici sensowej siRNA 613 i siRNA 471 na 5' końcu (613-sMe2, 471-sMe1). Każda z nici sensowych zawierała pięć modyfikowanych nukleotydów. W dotychczasowych badaniach wykazano, że dupлексы zawierające 2'-O-metylowane nukleotydy wykazują zwiększoną stabilność termodynamiczną.^{178, 185, 189} Proponowana modyfikacja powinna doprowadzić do stabilizacji na 5' końcu siRNA, pozostawiając koniec 3' bardziej podatnym na rozplatanie. Ta asymetryczna architektura jest korzystna ze względu na prawidłowy wybór nici wiodącej przez kompleks RISC. W doświadczeniach na hodowli komórkowej oba modyfikowane siRNA wykazały zmniejszony potencjał hamowania namnażania wirusa w porównaniu z niezmienionymi wariantami. Zastosowanie 471-sMe1 i 613-sMe2 powodowało odpowiednio 30,9% i 60% zmniejszenie kopii wirusowego RNA (Rycina 34).

Modyfikacja 2'-O-Me-RNA zwiększa stabilność termodynamiczną dupлексу RNA, poprawia dzięki temu powinowactwo do docelowych RNA. Dodatkowo, tak modyfikowane dupлексы są stabilne chemicznie i odporne na degradację enzymatyczną.^{178, 185, 188} W dotychczasowych badaniach postulowano także, że modyfikacja nici sensowej może wyeliminować efekty niespecyficzne z powodu preferencyjnej selekcji nici antysensowej przez kompleks RISC.¹⁹⁰ Niestety, modyfikacje sekwencji siRNA za pomocą grup 2'-O-metylowych zaproponowane w niniejszych badaniach nie skutkowały wysoką aktywnością przeciwwirusową siRNA. Wprowadzenie pięciu 2'-O-metylowanych nukleotydów na końcu 5' nici sensowej prowadziło do istotnego zmniejszenia skuteczności inhibicji (471-sMe1, 613-sMe2, Rycina 34).

Wprowadzenie grupy 2'-O-metylowej do siRNA opisano wcześniej, lecz uzyskane efekty były trudne do przewidzenia i odmienne w różnych badaniach. Niektóre z wcześniej zaprojektowanych modyfikowanych siRNA wykazały zwiększoną stabilność w surowicy i zachowały skuteczność wyciszania.^{178-181, 186} Wprowadzenie nawet trzech nukleotydów zawierających grupę 2'-O-metylową obok siebie, w dowolnej pozycji nici sensowej skutkowało zachowaniem wysokiej aktywności siRNA, zbliżonej do wariantu niemodyfikowanego. W innych eksperymentach obserwowano natomiast zmniejszenie lub całkowite zniesienie efektu RNAi.^{178, 180, 181, 183, 185, 189} Modyfikacja trzech terminalnych, parujących się nukleotydów na końcu 3' obu nici skutkowałą zwiększoną stabilnością w surowicy, jednak zdolność do wyciszania genów uległa nieznacznemu obniżeniu.¹⁸⁵ Kiedy natomiast modyfikacja była rozproszona na całej długości nici

zwykle efekty były niekorzystne dla aktywności siRNA. Występowała utrata potencjału inhibitorowego siRNA pod wpływem modyfikacji grupami 2'-O-metylowymi.

W obu przypadkach autorzy badali wiele wariantów siRNA z wynikami nie wykazującymi jednoznacznego wzorca modyfikacji pozwalającego utrzymać pierwotny potencjał inhibitorowy dupleksów. Przyczyny utraty aktywności upatrywano w znaczących rozmiarach grupy metylowej.¹⁹⁰ Cecha ta może negatywnie wpływać na interakcje między siRNA, docelowymi mRNA i kompleksem RISC. Wcześniejsze badania ujawniły, że zakłócenie zjawiska wyciszania genów przez wprowadzenie modyfikacji jest proporcjonalne do rozmiaru grup modyfikujących – im większa grupa, tym silniejszy spadek aktywności.¹⁹⁰ Spośród badanych wariantów to grupa 2'-fluoro powodowała najbardziej subtelną zawadę przestrzenną, umożliwiając działanie siRNA na poziomie porównywalnym do niemodyfikowanego wariantu.

W niniejszych badaniach może istnieć kilka przyczyn zmniejszenia efektu inhibitorowego względem wirusa grypy przez modyfikowane grupą 2'-O-metylową siRNA. Po pierwsze, wielkość pięciu sąsiadujących ze sobą grup 2'-O-metylowych może zakłócać złożone działanie kompleksu RISC. Parowanie końca 5' nici sensowej z końcem 3' nici antysensowej może być wysoce stabilne w sposób niekorzystny dla funkcji siRNA. Pomimo zachowania termodynamicznej asymetrii dupleksu całkowita separacja nici siRNA może być trudna i powodować zakłócenie prawidłowego działania. Utrudnione rozplatanie siRNA zostało wcześniej opisane w literaturze, jako czynnik odpowiedzialny za obniżenie aktywności RNAi.¹⁸³ Zjawisko to występowało w przypadku nadmiernej modyfikacji grupami stabilizującymi takimi jak 2,6-diaminopuryna, 2'-fluoro, 5-bromourydyna czy 5-jodourydyna. Z drugiej jednak strony badania siRNA z użyciem metody fotoszzywania pokazują, że blokada jednego nukleotydu blisko 3' końca nici antysensowej lub 5' końca nici sensowej pozwala na częściowe rozplatanie siRNA oraz hybrydyzację do sekwencji docelowej.¹⁸³ Przytoczone badania oraz wyniki własne pokazują, że poziom stabilizacji siRNA powinien być umiarkowany, aby umożliwić wydajne rozdzielenie nici RNA.

Przedstawione dane pokazują, że nadal istnieją interakcje i mechanizmy w procesie RNAi, które nie zostały do tej pory w pełni opisane i są podatne na zaburzenia spowodowane przez modyfikacje, prowadzące do zmniejszonej aktywności zmodyfikowanego siRNA. Brak gruntownej i pełnej wiedzy o procesach

wewnątrzkomórkowych znajduje odzwierciedlenie w opublikowanych danych i niemożności dokładnego przewidzenia ostatecznego wyniku modyfikacji.

2.6 Region 613-631 jako cel dla interferencji DNA

Obie nici siRNA nakierowanego na rejon 613-631 zostały przekształcone w sekwencję DNA. Testowano dupлексы składające się z dwóch nici DNA, zwane często siDNA (613-siDNA; Tabela 2), w hodowli komórkowej i nie zaobserwowano zmniejszenia liczby kopii RNA (107,6% kopii RNA wirusowego) (Rycina 34). Wprowadzono również do hodowli komórkowej warianty, w których jedną z nici było RNA, a drugą DNA. Gdy nić sensową stanowiło RNA a antysensową DNA (613-aDNA), wyniki były bardzo podobne jak w przypadku siDNA (120,5% kopii RNA wirusowego). Gdy natomiast dupлекс składał się z nici sensowej DNA i antysensowej RNA (613-sDNA), zaobserwowano znaczne, 68,1% obniżenie miana wirusa w próbce.

W dotychczasowych doniesieniach pojawiały się informacje, że siRNA tolerują do pewnego stopnia zamianę rybonukleotydów na deoksyrybonukleotydy.¹⁸³ W niektórych badaniach hybrydy RNA-DNA były prezentowane jako niezdolne do indukowania RNAi prawdopodobnie ze względu na ich strukturę, która jest formą pośrednią między helisą A i B.¹⁹¹ Obserwacje te nie są w pełni zgodne z innymi doniesieniami wykazującymi, że zjawisko interferencji DNA może wystąpić w hodowli komórek ludzkich.¹⁹²⁻¹⁹⁴ Chociaż interferencję DNA opisano po raz pierwszy u roślin, dziś wiadomo, że siDNA są zdolne do inhibicji wirusowego RNA w hodowli komórek ssaczy.¹⁹³ Odkrycia te poparte są badaniami krystalograficznymi, w których ujawniono zdolność domen Ago PAZ do wiązania DNA.¹⁹⁵ W niniejszych badaniach siDNA nie był w stanie zahamować namnażania wirusa grypy w komórkach MDCK (613-siDNA, Rycina 34). Natomiast jedna z testowanych hybryd RNA-DNA - 613-sDNA - wykazała znaczny poziom aktywności przeciwwirusowej. Warunkiem koniecznym do uzyskania efektu inhibicji było pozostawienie niezmienionej nici antysensowej pod postacią niemodyfikowanego RNA.

Opublikowane do tej pory badania dotyczące posttranskrypcyjnego wyciszania genów indukowanego przez miRNA wskazują możliwe ścieżki tego procesu.^{183, 196, 197} Elementy maszyneryi komórkowej wykorzystywane przez to zjawisko w dużej mierze pokrywają się z RNAi indukowaną przez siRNA. W procesie sterowanym przez miRNA nie ma etapu degradacji, a tworzenie helisy A nie jest wymagane do jego

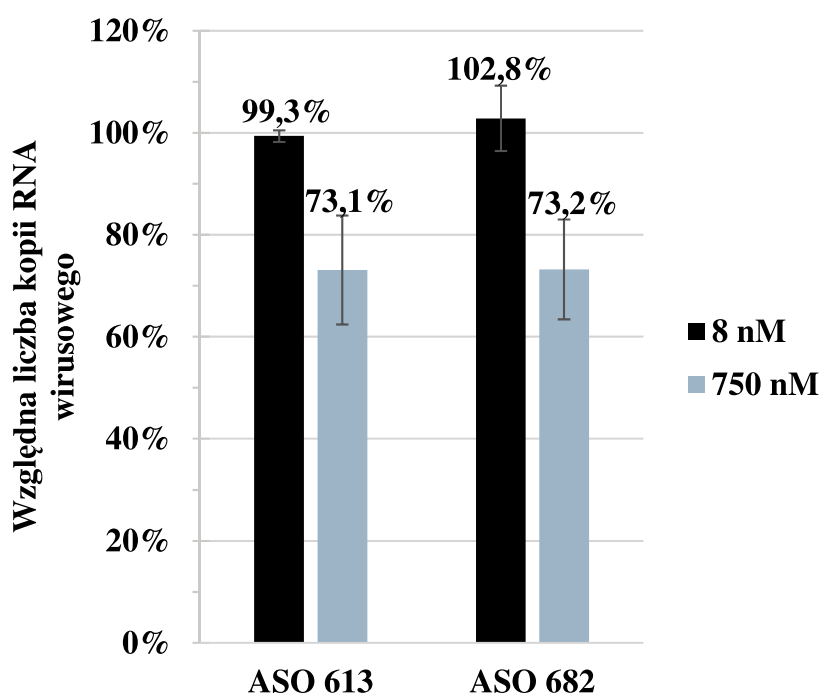
przeprowadzenia. Wydaje się, że tylko degradacja RNA jest zależna od utworzenia odpowiedniej helisy. Fakt ten należy wziąć pod uwagę podczas analizy wyników uzyskanych dla testowanych w niniejszej pracy hybryd RNA-DNA, gdzie nicią sensową jest DNA, a dupleks zachowuje w pewnym stopniu potencjał inhibitorowy. Możliwym wyjaśnieniem jest to, że hybryda została rozpoznana przez kompleks RISC, a antysensowa nić RNA mogła działać jak w konwencjonalnym siRNA. W świetle sprzecznych opublikowanych danych dokładna ścieżka przebiegających procesów z udziałem modyfikowanych DNA siRNA wciąż nie jest jasna.

2.7 Antysensowe oligonukleotydy celujące w rejon 613-631 i 682-700

Badaniom poddano także ASO 613 i 682 o długości 19 nukleotydów. Ich sekwencja była odpowiednikiem nici antysensowej siRNA 613 i 682 nie uwzględniającym niesparowanych końców 3'TT. Celem eksperymentu było zastosowanie dwóch strategii antysensowych dla tego samego rejonu docelowego w RNA. Podczas eksperymentu w hodowli komórkowej zastosowano dwa stężenia. Pierwsze wynosiło 8 nM - stosowano je rutynowo dla eksperymentów z użyciem siRNA. W tym stężeniu oba ASO nie wykazywały żadnej aktywności przeciwwirusowej. Drugie stężenie było wyższe - 750 nM - takie jak w poprzednich doświadczeniach z zastosowaniem ASO nakierowanych na segment 5 RNA(+).³⁸ Wyniki wykazały, że liczba kopii RNA wirusa została zmniejszona o 26,9% i 26,8% odpowiednio przez ASO 613 i 682 (Rycina 35).

ASO o sekwencjach będących ekwiwalentami nici wiodących najskuteczniejszych testowanych w niniejszej pracy siRNA nie wykazały znaczącego potencjału przeciwwirusowego (Rycina 35). Stężenie potrzebne do uzyskania efektu inhibitorowego było znacznie wyższe niż dla siRNA - 750 nM dla ASO 613, 682 i mniej niż 8 nM dla siRNA 613, 682 (Rycina 32). Nawet przy wysokim stężeniu zahamowanie namnażania wirusa był nieznaczne (około 27%) w porównaniu z siRNA (około 85%). Sekwencja docelowa wiązania ASO 613 częściowo pokrywa się z rejonem hybrydyzacji wcześniej testowanych ASO, wykazujących wysoki potencjał przeciwwirusowy.³⁸ Przesunięcie miejsca docelowego działania ASO powoduje znaczną utratę aktywności, co może wynikać z kontekstu strukturalnego RNA. Skuteczne ASO 615A i 640A zaprojektowano tak, aby nakierowane były na rejony jednoniciowe.³⁸ Miejsca docelowe działania ASO 613 i 682 są częściowo zaangażowane w tworzenie struktur dwuniciowych (Rycina 27). Dostępność rejonów struktury drugorzędowej może być

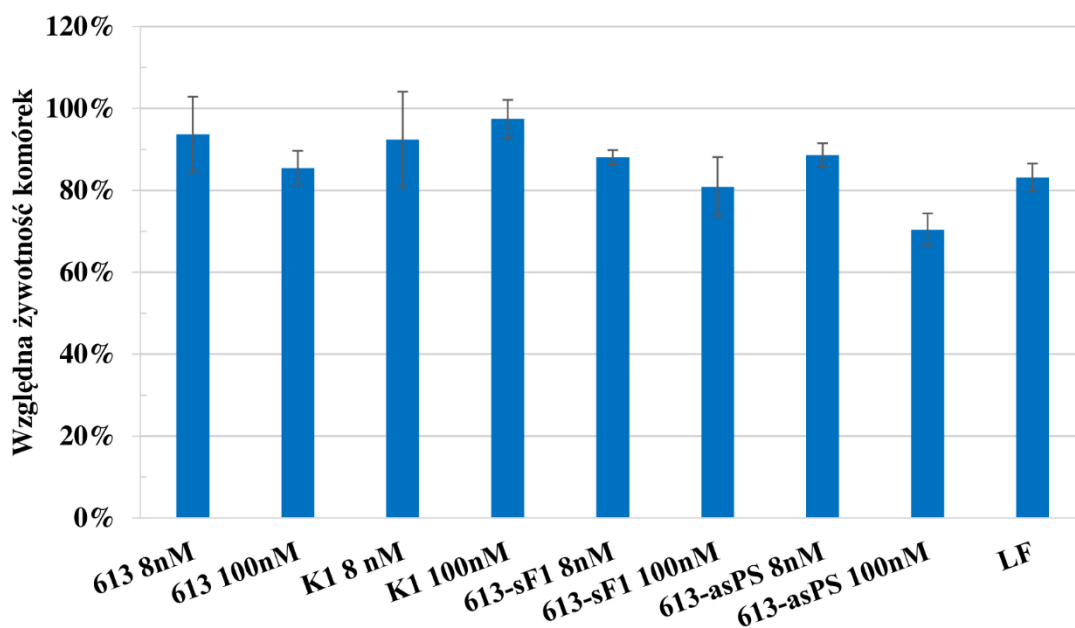
czynnikiem ograniczającym skuteczność ASO. Uzyskane dane eksperymentalne wskazują, że regiony wybrane jako dobre cele dla działania RNAi mogą nie być podatne i dostępne dla konwencjonalnej strategii antysensowej. Podstawowym czynnikiem determinującym efekt inhibitorowy mogą być wspomniane wcześniej odmienne ścieżki procesów biologicznych indukowane przez oba typy narzędzi oligonukleotydowych. Strategia RNAi wydaje się bardziej tolerancyjna i elastyczna pod względem doboru miejsca docelowego działania w konserwatywnej, funkcjonalnej strukturze RNA.



Rycina 35. Analiza ilościowa metodą PCR w czasie rzeczywistym aktywności przeciwwirusowej ASO w zainfekowanych szczepem A/California/04/2009 (H1N1) komórkach MDCK. ASO testowano w dwóch stężeniach: 8 i 750 nM. Liczbę kopii RNA wirusowego w próbkach traktowanych siRNA porównano z liczbą kopii wirusowego RNA w kontroli traktowanej lipofektaminą (uznaną za 100%). Słupki błędów przedstawiają standardowe odchylenia niezależnych eksperymentów.

2.8 Określenie cytotoksyczności wybranych siRNA o wysokim potencjale przeciwwirusowym

Test MTT wykazał, że proliferacja komórek we wszystkich testowanych próbkach nie odbiegała w sposób znaczący od próby kontrolnej, którą stanowiły niczym nietraktowane komórki MDCK. Najbardziej aktywne siRNA nie wpływają na żywotność komórek, nawet przy stężeniu wyższym niż rutynowo stosowane w opisanych eksperymentach (8 nM) (Rycina 36).



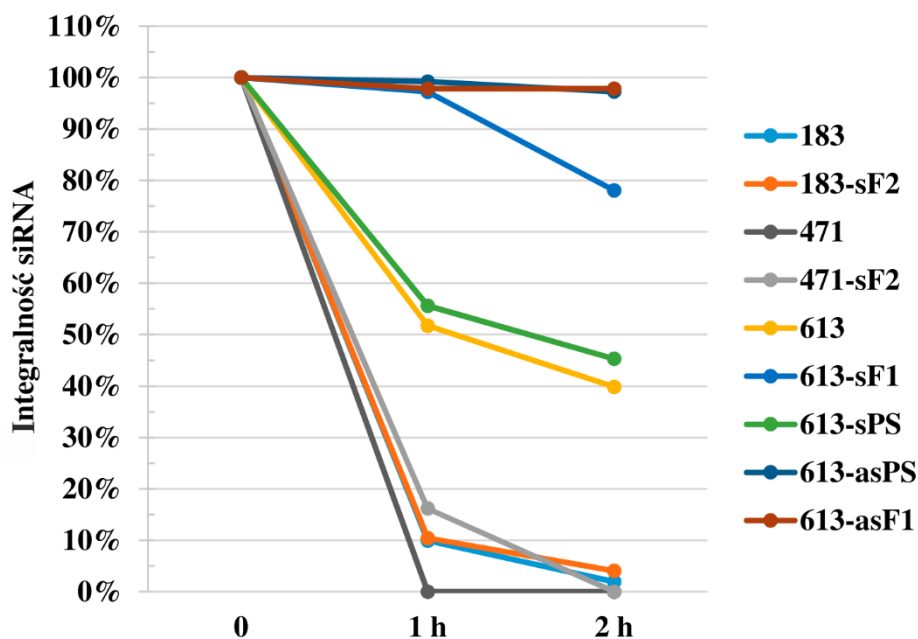
Rycina 36. Test MTT przeprowadzono dla najskuteczniejszych wariantów siRNA 613 w różnych stężeniach. Wynik dla komórek traktowanych lipofektaminą bez użycia siRNA jest oznaczony jako LF, pozostałe znaczniki osi x są nazwami siRNA. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe niezależnych eksperymentów.

2.9 Ocena stabilności wybranych siRNA w surowicy

Eksperyment pomiaru stabilności siRNA w surowicy daje relatywny obraz podatności na hydrolizę różnych RNA. Nie można go jednak bezpośrednio przekładać na stabilność siRNA podczas eksperymentu komórkowego, jednak ukazuje względny wpływ zastosowanych modyfikacji na stabilność w stosunku do niemodyfikowanych wariantów.

Analizy wykazały, że proponowane modyfikacje nici antysensowej siRNA 613 i nici sensowej 2'-fluororybonukleotydami zwiększają stabilność w surowicy (Rycina 37). Próbkę rozpuszczaną w 10% roztworze FBS, następnie inkubowaną w temperaturze 37°C i po upływie czasu inkubacji pobierane w celu analizy na żelu poliakrylamidowym. Po 2 godzinach inkubacji siRNA 613 zawierającego modyfikowaną nić antysensową (613-aF1, 613-aPS) prawie cała pula RNA pozostaje nienaruszona. W tym samym czasie degradowuje około 60% siRNA niemodyfikowanego. Kiedy modyfikowana jest nić sensowa stabilność RNA zależy od testowanego wariantu. SiRNA zawierające nić sensową modyfikowaną 2'-fluororybonukleotydami (613-sF1) po upływie 2 godzin inkubacji w surowicy wykazują około 80% integralność. Poprawy stabilności w surowicy nie odnotowano w przypadku siRNA, którego nić sensowa była

modyfikowana tiofosforanowymi analogami nukleotydów (613-sPS). Jego stabilność była porównywalna z niemodyfikowanym wariantem. W przypadku siRNA 471 i 183 zawierających 2'-fluorocytydyny i 2'-fluorourydyny w nici sensowej ich podatność na degradację nie jest zmniejszona. Porównując stabilność niemodyfikowanych siRNA można zauważyć, że siRNA 471 i 183 uległy całkowitej degradacji podczas inkubacji w surowicy w ciągu 2 godzin, podczas gdy w tym czasie 40% z siRNA 613 nadal pozostaje nienaruszone. Na degradację RNA ma zatem wpływ sekwencja.



Rycina 37. Stabilność w surowicy wybranych wariantów siRNA. Próbkę pobierane były w trzech punktach czasowych i porównywane do próbek pobranych tuż po rozpuszczeniu w 10% roztworze FBS.

2.10 Rodzaj i rozmieszczenie modyfikacji siRNA wpływają na stabilność w surowicy

Dotychczasowe doniesienia literaturowe wskazują, że większość niemodyfikowanych siRNA ulega degradacji w ciągu 20 minut w 10% surowicy, a niemal całkowita degradacja następuje po 3 godzinach.¹⁸¹ W przeprowadzonych w niniejszej pracy testach stabilności w surowicy zaobserwowano, że 2'-fluororybonukleotydy i tiofosforanowe wiązania internukleotydowe wprowadzone do nici siRNA mogą poprawić jego właściwości (613-sF1, 613-aF1, 613-sPS, 613-aPS, Rycina 37). Zwiększona stabilność w surowicy nie jest jednak cechą, która może zostać zagwarantowana przez dowolny rodzaj i schemat modyfikacji. Przede wszystkim wydaje

się, że duże znaczenie ma poziom modyfikacji i sekwencja. Modyfikacja nici sensowej w siRNA 613 (613-sF1, 613-sPS) w sposób mniej skuteczny wpływała na zwiększanie stabilności w surowicy niż modyfikacja nici antysensowej (613-aF1, 613-aPS), nie można jednak przyjąć tego za regułę. Należy podkreślić, że liczba modyfikowanych nukleotydów była różna dla każdej z nici siRNA. Pozycje modyfikacji były determinowane przez sekwencję siRNA - każda cytydyna i urydyna zamieniona została na 2'-fluororybonukleotyd, a internukleotydowe tiofosforany występowały po każdej cytydynie. W konsekwencji nic sensowa siRNA 613 zawiera sześć 2'-fluororybonukleotydów (613-sF1) lub dwa wiązania tiofosforanowe (613-sPS), podczas gdy nic antysensowa zawiera odpowiednio 13 (613-aF1) i pięć (613-aPS). Fakt ten może wyjaśniać zwiększoną stabilność w surowicy siRNA, którego nic antysensowa jest modyfikowana. Z drugiej strony, zmodyfikowana nic sensowa siRNA 471 (471-sF2) i 183 (183-sF2) zawiera odpowiednio sześć i siedem 2'-fluororybonukleotydów. Chociaż liczba modyfikacji jest zbliżona do nici sensowej siRNA 613 (613-sF1), nie wpływa ona w sposób znaczący na stabilność. Wyniki pokazują, że zarówno sekwencja siRNA, jak i pozycja konkretnej modyfikacji jest ważna dla uzyskania optymalnego wzoru modyfikacji dla zwiększonej stabilności w surowicy oraz właściwości inhibitorowych. Ponadto, stabilność niemodyfikowanych siRNA w surowicy jest również różna w zależności od sekwencji.

Interesujący wydaje się fakt, że najbardziej stabilny siRNA spośród poddanych testowi jest jednocześnie najbardziej aktywnym względem hamowania namnażania wirusa grypy (siRNA 613). Jednak wnioskowanie, że stabilność w surowicy bezpośrednio prowadzi do zwiększenia potencjału inhibitorowego siRNA w hodowli komórkowej stanowiłoby nadinterpretację. Podczas transfekcji do komórek MDCK nośnikiem siRNA jest lipofektamina, która otacza dupleksy lipidowym płaszczem. Pęcherzyki liposomów chronią ładunek w postaci siRNA przed bezpośrednią ekspozycją na serum, które jest dodawane na kolejnych etapach jako składnik medium. Ogólnie pojęta stabilność może być korzystna po penetracji błony komórkowej z powodu obecności wewnątrzkomórkowych RNaz. W poprzednich publikacjach postulowano istnienie bezpośredniego związku między czasem trwania efektu inhibitorowego a stabilnością siRNA w komórkach ludzkich.¹⁸³ Stabilność w surowicy jest również ważnym aspektem w kontekście potencjalnego przyszłego zastosowania terapeutycznego siRNA, szczególnie dożylniej drogi podania. Według danych literaturowych zastosowanie

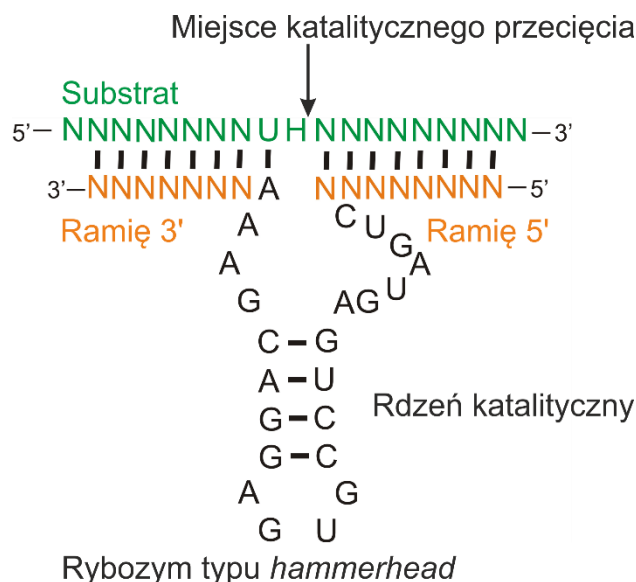
dwóch różnych rodzajów modyfikacji w jednym duplekcie może zapewnić zwiększoną stabilność w ludzkiej surowicy.^{181, 185} Przykładowo, w opublikowanej pracy największą stabilność w ciągu 24-godzinnej inkubacji w 10% ludzkiej surowicy uzyskał siRNA, którego jedna z nici była w pełni 2'-O-metylowana, druga natomiast składała się w całości z tiofosforanowych analogów nukleotydów.¹⁸⁵ Jednak, jak wynika także z przedstawionych badań, modyfikacje istotnie wpływają na włączanie siRNA w mechanizmy RNAi i pogodzenie wszystkich, czasem sprzecznych cech, mających dać końcowy korzystny efekt jest trudne. Wprowadzanie modyfikacji, które umożliwiają wydajną indukcję RNAi i przedłużoną aktywność, jest bardzo istotne z punktu widzenia zastosowania terapeutycznego.⁵⁴

3. Rybozomy jako inhibitory namnażania wirusa grypy

Ze względu na mały rozmiar i dobrze scharakteryzowane właściwości katalityczne dla celów inhibicji namnażania wirusa grypy wybrany został rybozym typu *hammerhead*. Najmniejszy jego wariant składa się z 22-nukleotydowego konserwatywnego rdzenia katalitycznego zdolnego do przecinania cząsteczek RNA i dwóch ramion o zmiennej sekwencji, komplementarnej i hybrydującej do rejonów otaczających miejsce przecięcia RNA docelowego (Rycina 38).¹⁹⁸ Warunkiem koniecznym, które spełniać musi miejsce docelowego działania rybozomu jest występowanie sekwencji NUH, gdzie N to dowolny nukleotyd, U - urydyna, H - dowolny nukleotyd prócz guanozyny. Pośród często wskazywanych zalet stosowania rybozymów jest absolutna specyficzność względem projektowanej docelowej sekwencji, a także zdolność jednej cząsteczki rybozomu do przecinania wielu cząsteczek docelowych RNA. Znane są także ograniczenia tej strategii. Do zasadniczych czynników limitujących wysoką aktywność katalityczną jest jej zależność od stężenia jonów magnezu, które w komórkach jest wielokrotnie niższe od optymalnego w warunkach *in vitro*.¹⁹⁹ Próba dostosowania rybozymów do warunków panujących w komórce zaowocowała zaproponowaniem szeregu zmian w rdzeniu katalitycznym oraz dodania elementów stabilizujących aktywną konformację kompleksu rybozym-substrat.

Dotychczasowe badania wykazały, że standardowe warianty rybozymów typu *hammerhead* mają zdolność hamowania namnażania wirusów.²⁰⁰ Rybozomy typu *hammerhead* były także przedmiotem badań klinicznych, w których wykazano, że można je skutecznie dostarczyć i zastosować jako narzędzie terapeutyczne wobec wirusa HIV.²⁰¹ Względem HIV stosowano także z sukcesem nowe warianty katalitycznych kwasów

nukleinowych.²⁰² Poprawa właściwości rybozymów oraz celowanie w konserwatywne strukturalnie rejony docelowe może przyczynić się do zwiększenia potencjału podejścia oraz stać się podstawą dla konstruowania efektywnych cząsteczek o złożonej strukturze (np. chimeryczne konstrukty shRNA-rybozym).¹⁴⁰



Rycina 38. Schemat budowy rybozimu typu *hammerhead* związanego z substratem RNA.

3.1 Projektowanie rybozymów typu *hammerhead*

W ostatnich latach w literaturze pojawiły się doniesienia o możliwości poprawy właściwości rybozimu *hammerhead*. Ma ona nastąpić poprzez odtworzenie oddziaływań trzeciorzędowych obecnych w pełnej długości naturalnym rybozymie, którego aktywność katalityczna znacznie przewyższa minimalny wariant.^{199, 203} Rolą przewidywanych interakcji ma być strukturalna stabilizacja aktywnej katalitycznie konformacji rybozimu. Cel ten można osiągnąć poprzez skrócenie ramienia 5' rybozimu i dobór odpowiedniej sekwencji docelowej, tak aby tworzyła ona dodatkową parę zasad typu trans-Hoogsteen z nukleotydem obecnym w konserwatywnym rdzeniu rybozimu.¹⁹⁹ Oddziaływanie tworzy się pomiędzy pierwszą niesparowaną zasadą U przed ramieniem 5' rybozimu a zasadą A w 4-nukleotydowej pętli rybozimu. Do zwiększenia stabilizacji może przyczynić się także wprowadzenie do struktury rybozimu dodatkowego motywu strukturalnego typu spinka.²⁰³ Motyw 19-nukleotydowej spinki, zwanej także TLR (receptor 4-nukleotydowej pętli, z ang. *terta loop receptor*), wprowadzony zostaje tuż za

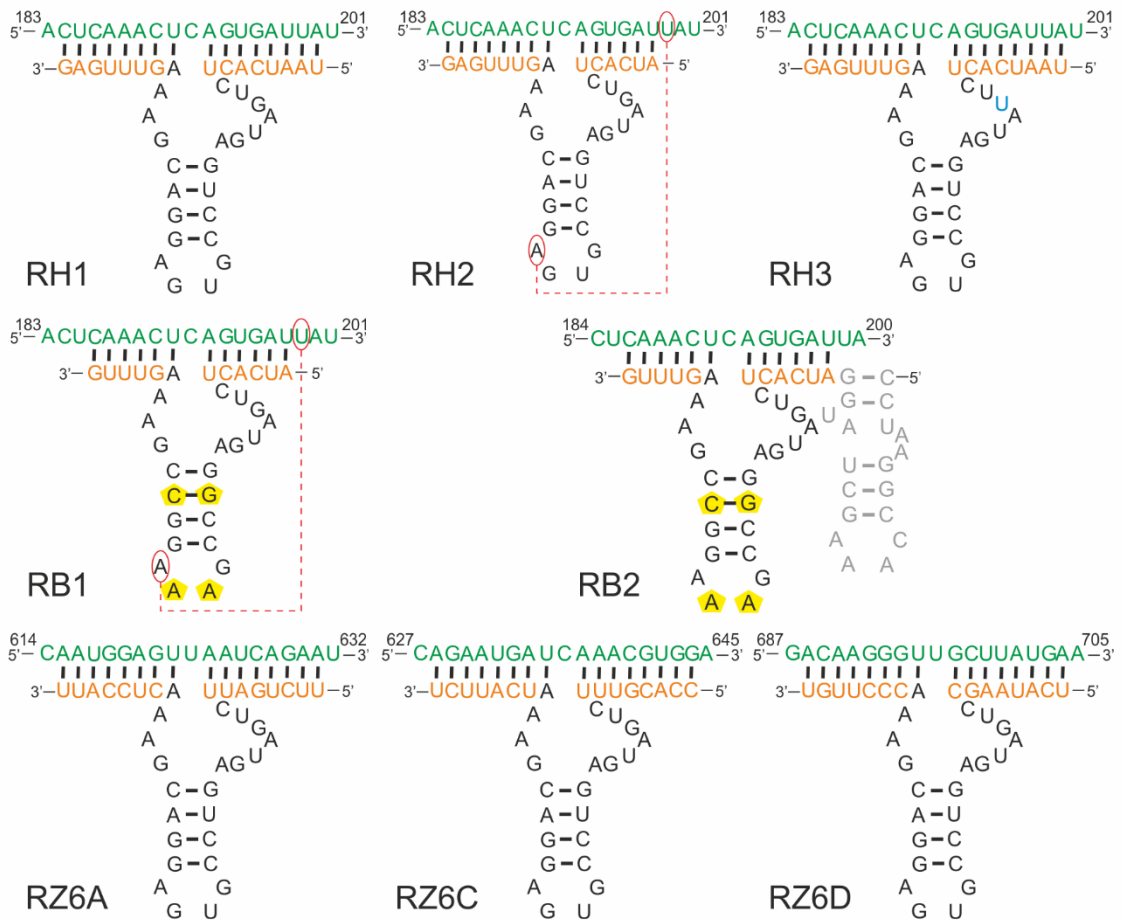
ramieniem 5' i powoduje utworzenie trzeciorzędowych oddziaływań z 4-nukleotydomową pętlą rdzenia katalitycznego rybozomu. Podejście to zostało z sukcesem zastosowane dla rybozymów nakierowanych na RNA wirusa HIV.²⁰²

W celu inhibicji namnażania wirusa grypy zostały zaprojektowane rybozomy typu *hammerhead* zgodnie z powyższymi, zrewidowanymi wytycznymi. Ich sekwencje znajdują się w Tabeli 4. Rejonem docelowym działania proponowanych wariantów rybozymów RH1 i RH2 jest fragment (+)RNA segmentu 5 rozpoczynający się od nukleotydu 184 (Rycina 39 i 40). Dla wariantów RB1 i RB2 rejon ten jest przesunięty w sekwencji (+)RNA5 o dwa nukleotydy w kierunku końca 5' (rozpoczyna się od nukleotydu 186). W obu przypadkach sekwencja docelowa została zaprojektowana tak, aby spełniać warunki tworzenia pary typu trans-Hoogsteen z rybozymem. Dodatkowo, miejsce przecięcia RNA przez rybozomu pokrywa się z rejonem docelowym dla testowanego w niniejszej pracy siRNA 183. RH1 jest standardowym rybozymem typu *hammerhead*, a RH2 to jego wariant zawierający skrócone ramię 5' w celu umożliwienia oddziaływania trzeciorzędowego (Rycina 39). RB1 to standardowy wariant rybozomu typu *hammerhead*, na którego trzonie powstał wariant RB2 zawierający motyw stabilizujący aktywną konformację rybozomu w postaci spinki TLR. Dodatkowo, zaprojektowano standardowe dwa rybozomy na bazie rdzenia RH1 w rejonie 615-644 (RZ6A, RZ6C) oraz jeden w rejonie 688-704 (RZ6D), aby ocenić zależność potencjału inhibitorowego od doboru miejsca potencjalnego działania (Rycina 40). Rejony pokrywają się lub sąsiadują z miejscem docelowego działania siRNA 613 i 682 oraz ASO 613 i 682 testowanych w niniejszej pracy. Jako dodatkowa kontrola posłużył rybozym, który zawiera 1-nukleotydomową mutację w katalitycznym rdzeniu rybozomu (RH3), mającą upośledzać jego aktywność.

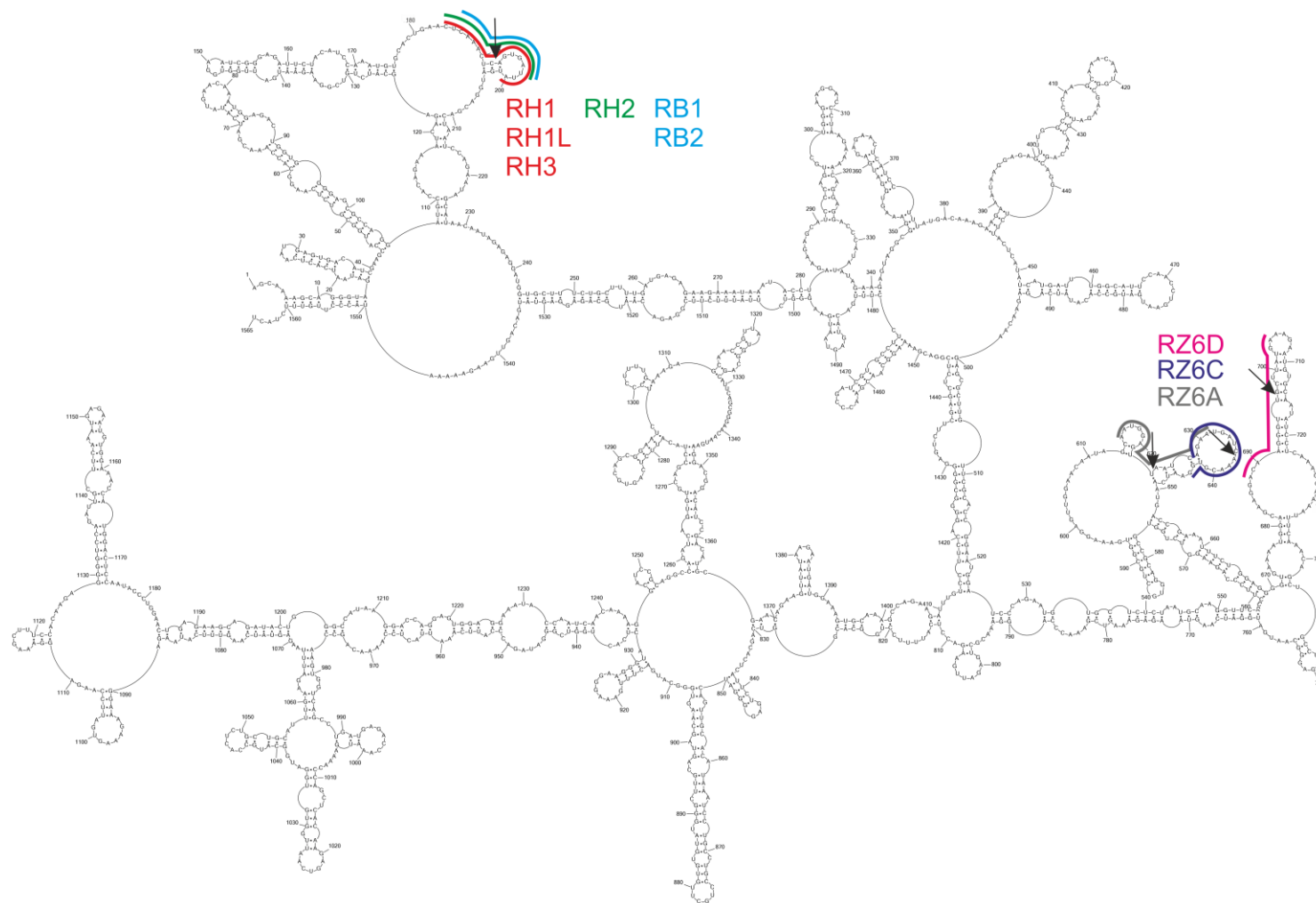
Tabela 4. Sekwencje testowanych rybozymów.

Nazwa	Sekwencja	Rejon docelowy	Tryplet nukleotydowy*
RH1	UAAUCACUCUGAUGAGUCCGUGAGGAC GAAAGUUUGAG	184-200	CUC
RH1L	UAAUCACUCUGAUGAGUCCGUGAGGAC GAAAGUUUGAG ^L		
RH2	AUCACUCUGAUGAGUCCGUGAGGACGA AAGUUUGAG	184-198	
RH3	UAAUCACUCUUAUGAGUCCGUGAGGAC GAAAGUUUGAG	184-200	
RB1	AUCACUCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGA AAGUUUG	186-198	
RB2	CCUAAGGCCAAAGCUAUGGAUCACUCAG AUGCGGCCGAAAGGCCGUAAGUUUG		
RZ6A	UUCUGAUUCUGAUGAGUCCGUGAGGAC GAAACUCCAU ^L	615-631	GUU
RZ6C	CCACGUUUCUGAUGAGUCCGUGAGGAC GAAAUCAUUC ^L	628-644	AUC
RZ6D	UCAUAAGCCUGAUGAGUCCGUGAGGAC GAAACCCUUG ^L	688-704	GUU

Pogrzbionymi literami oznaczono rdzeń katalityczny, kolorem niebieskim mutację w rdzeniu katalitycznym, podkreśleniem motyw stabilizujący rdzeń katalityczny i oddziaływania trzeciorzędowe, ^LN nukleotyd LNA, * miejsce katalitycznego przecinania RNA docelowego.



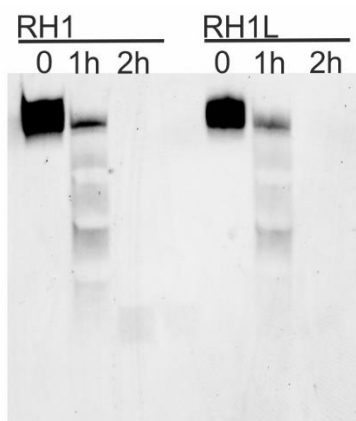
Rycina 39. Sekwencje i struktury testowanych rybozymów wraz z sekwencjami ich substratów. Kolorem zielonym oznaczono sekwencję docelowego przecięcia, pomarańczowym zmienne sekwencje ramion rybozymu, czerwonym nukleotydy mające po odpowiednim ułożeniu w przestrzeni brać udział w oddziaływaniu typu trans-Hoogsteen, żółtym różnice w alternatywnej sekwencji katalicznego rdzenia, niebieskim jego mutację.



Rycina 40. Rejony wiązania zaprojektowanych rybozymów oznaczone na strukturze drugorzędowej (+)RNA5 A/California/04/2009 (H1N1). Miejsca autokatalicznego przecinania RNA oznaczone zostały czarnymi strzałkami.

3.2 Porównanie stabilności rybozemu modyfikowanego i niemodyfikowanego w surowicy

Testowi stabilności w surowicy poddano dwa rybozemy o takiej samej sekwencji RH1 i RH1L. Rybozemy różniły się jedynym nukleotydem na końcu 3', który w RH1L został zamieniony na LNA. Rybozemy inkubowano przez 1 lub 2 godziny w 10% surowicy bydłowej. Analiza na żelu poliakrylamidowym wykazała, że nie ma znaczących różnic w stabilności obu rybozymów (Rycina 41). W obu przypadkach w ciągu 2 godzin RNA podlega całkowitej degradacji. Po upływie 1 godziny inkubacji pozostaje tylko niewielka pula nienaruszonych rybozymów pełnej długości. Brak różnic pomiędzy modyfikowanym a niemodyfikowanym rybozymem może wskazywać, że wprowadzenie jednego nukleotydu LNA na jednym z końców nie jest wystarczające, aby uzyskać zwiększoną stabilność enzymatyczną RNA. Na stabilność niemodyfikowanego rybozemu z pewnością wpływ ma jego struktura. Rejony dwuniciowe chronią przed natychmiastową degradacją zmniejszając dostępność rybozemu dla czynników powodujących rozpad. Podobnie jak w przypadku siRNA w eksperymentach komórkowych rybozemy nie są bezpośrednio ekspozowane na działanie składników surowicy. Dlatego też, utrata pełnej długości cząsteczek jest prawdopodobnie mniej gwałtowna i pozwala na zachowanie aktywności.

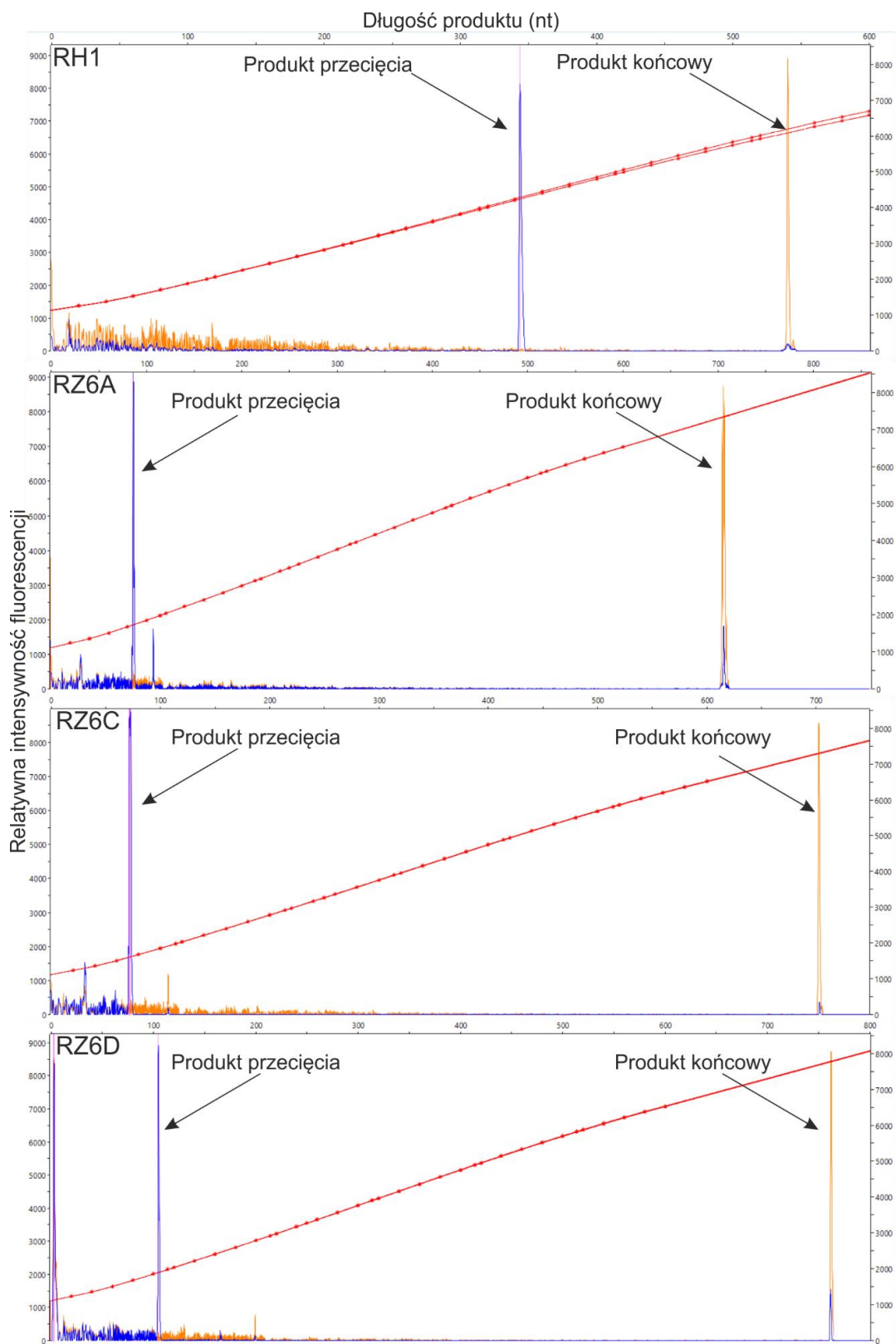


Rycina 41. Stabilność RH1 i RH1L w surowicy bydłowej.

3.3 Analiza zdolności przecięcia RNA przez rybozemy w warunkach *in vitro*

Analiza wyników inkubacji (+)RNA5 w obecności rybozymów została przeprowadzona za pośrednictwem rozdzielacza za pomocą elektroforezy kapilarnej produktów reakcji wydłużania startera nacełowanego na (+)RNA5. Wykazała ona

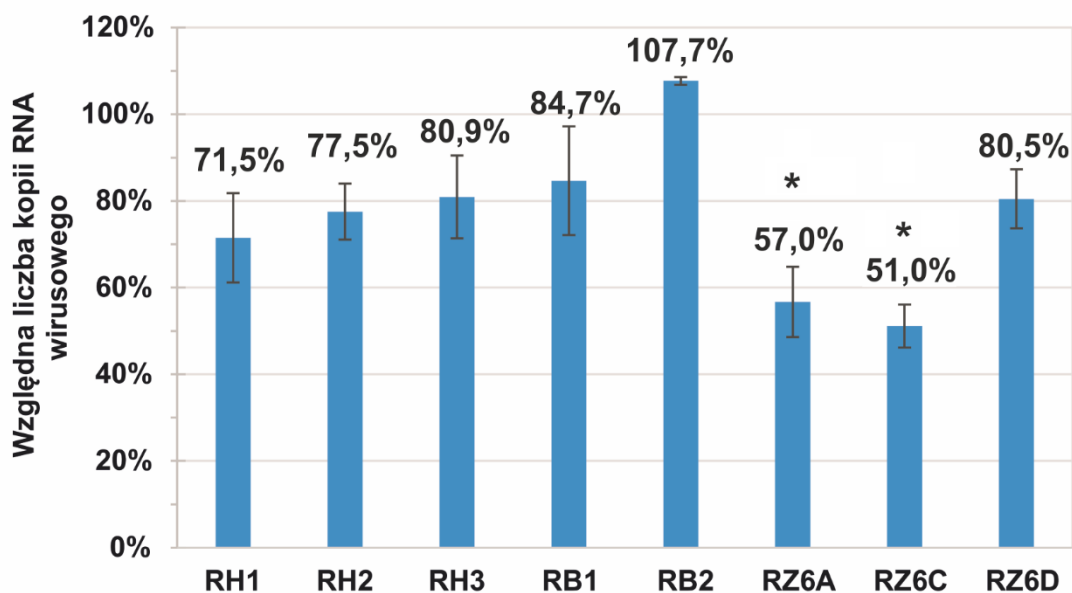
obecność charakterystycznych skróconych produktów reakcji odwrotnej transkrypcji wynikających ze specyficznej hydrolizy RNA (Rycina 42). Wszystkie poddane testowi katalityczne kwasy nukleinowe - RH1, RZ6A, RZ6C, RZ6D - są zdolne do inicjacji przecinania (+)RNA5 w miejscu projektowanej hybrydyzacji rybozemu w warunkach *in vitro*.



Rycina 42. Fragmenty elektroforegramów pokazujące krótsze produkty cDNA wynikające z hydrolizy (+)RNA5 w obecności danego rybozymu (podanego w lewym rogu). Kolorem niebieskim oznaczono elektroforegram próbki poddanej działaniu rybozymu, a pomarańczowym próbkę kontrolną. Przecięcie następuje po nukleotydzie 192 w sekwencji (+)RNA5 (numeracja od końca 5') w przypadku rybozymu RH1, 623 dla RZ6A, 636 dla RZ6C oraz 696 dla RZ6D.

3.4 Inhibicja namnażania wirusa grypy z użyciem rybozymów

Wyniki uzyskane w doświadczeniach przeprowadzonych na hodowlach komórkowych wykazały, że tylko dwa spośród zaprojektowanych rybozymów wykazały znaczącą inhibicję wirusa grypy w stężeniu 200 nM (Rycina 43). Były to standardowe rybozomy zaprojektowane tak, aby ich miejsca docelowego działania pokrywały się lub sąsiadowały z rejonami działania najskuteczniejszych siRNA: RZ6A i RZ6C. Spowodowały one zahamowanie namnażania wirusa o odpowiednio 43% i 49%. Rybozomy o takiej samej budowie i sekwencji rdzenia katalitycznego jak wyżej wymienione, ale innej sekwencji docelowej, RH1 oraz RZ6D wykazały znikomy potencjał przeciwwirusowy powodując zaledwie 28,5% i 19,5% inhibicję. Skrócenie rybozomu typu *hammerhead* do formy RH2, która ma pozwolić na odtworzenie trzeciorzędowych oddziaływań występujących w naturalnych rybozymach nie przyniosło pożądaných efektów. Inhibicja nie przekroczyła w tym przypadku 22,5%. Sekwencyjny wariant rybozomu *hammerhead* nakierowany na ten sam rejon docelowy RB1 okazał się nie wpływać w stopniu znaczącym na namnażanie wirusa grypy. Powodowane przez RB1 obniżenie liczby kopii RNA wirusowego o 15,3% to jeden z najmniej obiecujących wyników uzyskanych przez testowane rybozomy. Jeszcze mniej zadowalające rezultaty przyniosło wykorzystanie wariantu strukturalnego RB2 powstałego na trzonie RB1, zawierającego element stabilizujący typu spinki TLR. Wprowadzenie motywu stabilizującego nie spowodowało pożądanego wzrostu aktywności katalitycznej. Badania w hodowli komórek MDCK wykazały, że RB2 nie wpływa w sposób hamujący na namnażanie wirusa grypy, a ilość kopii RNA wirusowego w próbce jest zbliżona do kontroli traktowanej lipofektaminą (komórki transfekowane są lipofektaminą, bez rybozomu, a liczbę kopii RNA wirusowego przyjmuje się za 100%). Rybozym RH3, który zawiera 1-nukleotydomową potencjalnie inaktywującą mutację w rdzeniu katalitycznym spowodował obniżenie liczby kopii RNA wirusowego o 19,1%. Podobny poziom inhibicji zmutowanych rybozymów był obserwowany we wcześniejszych badaniach.²⁰²



Rycina 43. Inhibicja namnażania wirusa grypy w zakażonej hodowli komórek MDCK przy użyciu rybozymów. Liczbę kopii RNA wirusowego określono metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wartości otrzymane dla próbek traktowanych 200 nM rybozymem porównano do kontroli traktowanej lipofektaminą, która stanowiła 100%. Słupki błędów przedstawiają standardowe odchylenia niezależnych eksperymentów. Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem testu t-studenta (* $p < 0,05$).

Rezultaty działania rybozymów pokazują, że zastosowanie katalitycznych kwasów nukleinowych w układach biologicznych jest wymagającym zadaniem. Analiza zdolności przecięcia RNA indukowanego przez rybozimy w warunkach *in vitro* wykazała, że każdy ze standardowych wariantów testowanych rybozymów promuje hydrolizę (+)RNA5. Reakcja prowadzona w środowisku pozakomórkowym *in vitro* jest jednak modelem skrajnie uproszczonym. Czynnikiem wpływającym na aktywność rybozymów w komórkach jest wiele (np.: jony, pH, biomolekuły). Niebagatelne znaczenie może mieć dobór sekwencji docelowej, w tym kontekście sekwencyjnego i strukturalnego, a w szczególności w obrębie trypletu nukleotydowego będącego miejscem przecięcia RNA. Do tej pory wykazano, że dostępność rejonu docelowego jak i konkretna sekwencja trypletu NUH decydują o skuteczności rybozymu.^{200, 202, 204} Nie każda z możliwych trójek nukleotydowych zapewnia wysoki stopień przecięcia sekwencji docelowej. W opublikowanych pracach największą wydajność hydrolizy obserwowano dla trypletów GUC oraz AUC.^{202, 204} Tylko jeden z testowanych w niniejszej pracy rybozymów zaprojektowany został w obrębie występowania optymalnego trypletu nukleotydowego. Był to rybozym RZ6C, który w badaniach na linii komórkowej MDCK wykazał największy potencjał inhibicji namnażania wirusa grypy.

Warto również zwrócić uwagę, iż tryplet docelowy dla RZ6C znajdował się w rejonie pętli jednoniciowej, dostępnej dla testowanych wcześniej oligonukleotydów. Drugi z najaktywniejszych rybozymów - RZ6A - przecinał RNA po tryplecie GUU, podobnie jak rybozym RZ6D o niskiej aktywności. Wyniki te pokazują, że wydajność katalitycznego przecięcia inicjowanego przez rybozomy nie zależy wyłącznie od rodzaju trypletu docelowego. Rozpatrując natomiast kontekst strukturalny miejsca przecięcia wszystkie tryplety poza AUC (RZ6C) znajdowały się w rejonach częściowo lub całkowicie zaangażowanych w tworzenie struktur dwuniciowych. Poprzedzał je jednak ciąg nukleotydów niesparowanych, do których mogło potencjalnie hybrydyzować jedno z ramion rybozymów. Niejasne jest zatem w jaki sposób struktura rejonu docelowego wpływa na aktywność rybozimu. Warto jednak podkreślić fakt, że rejonem docelowego działania dwóch najbardziej aktywnych rybozymów - RZ6A oraz RZ6C - była domena, na którą nakierowane były efektywne ASO oraz siRNA. Drugi rejon o podobnym profilu inhibicji za pośrednictwem ASO i siRNA (682-700) okazał się nie być celem odpowiednim dla skutecznego działania rybozimu RZ6D. Wyniki te pokazują, że choć najbardziej efektywne narzędzia oligonukleotydowe działają w obrębie tych samych domen to nie każdy rejon struktury RNA wirusowego może stanowić uniwersalny cel dla różnych strategii nakierowanych na RNA. Niektóre podejścia antysensowe wymagają bezwarunkowej, pełnej dostępności rejonu docelowego RNA.

W świetle uzyskanych wyników duże wątpliwości budzi zastosowanie wariantów sekwencyjnych i strukturalnych rybozymów mających za zadanie potencjalną stabilizację konformacji korzystnej dla aktywności rybozimu.^{199, 203} W niniejszych badaniach warianty te zostały zaproponowane dla rybozimu typu *hammerhead*, którego wyjściowy potencjał inhibitorowy okazał się umiarkowany. Mimo to, żaden z wariantów nie przewyższał swoją aktywnością standardowej cząsteczki. Warunki, w których obserwuje się poprawę cech oraz wysoką aktywność minimalnych wariantów rybozymów wymagają doprecyzowania oraz bardziej szczegółowych analiz.

Skrócony wariant rybozimu stanowił koncepcję zgodną z dostępnymi danymi literaturowymi i wiedzą dotyczącą rybozymów występujących w naturze.¹⁹⁹ Odwzorowanie naturalnej aktywności oraz próba zwiększenia potencjału w przypadku RH2 okazała się jednak daremna. Wnioskować można, że poznane do tej pory zależności przewidują odstępstwa lub dodatkowe niezdefiniowane dotąd obwarowania ograniczające użyteczność wprowadzonych zmian w warunkach komórkowych. Mimo,

iż rybozym typu *hammerhead* wydaje się najlepiej opisanym i scharakteryzowanym katalitycznym kwasem nukleinowym to wiedza ta nie jest nadal kompletna.

Rybozym, na bazie którego projektowano RB2, zawierający motyw TLR stabilizujący strukturę został wcześniej z sukcesem zastosowany wobec mRNA białka gp41 wirusa HIV-1.²⁰² Osiągnął wyższą aktywność od standardowego wariantu rybozomu, a także DNAzemu nakierowanych na ten sam rejon RNA. Rybozym o stężeniu 50 nM był zdolny do 90% inhibicji ekspresji docelowego HIV-1 gp41-GFP mRNA. W niniejszych badaniach stabilizowany wariant rybozomu (RB2) nie wykazał właściwości hamujących namnażanie wirusa grypy, ani zwiększenia potencjału inhibitorowego w odniesieniu do wariantu standardowego RB1.

Można zatem spekulować, iż pomimo doboru sekwencji rejonu docelowego odpowiadającej wymogom oddziaływania typu Hoogsteen, w przypadku RB2 nie dochodzi do spodziewanej interakcji. Istnieje prawdopodobieństwo, że duża struktura trzeciorzędowa (+)RNA5, która do tej pory nie została poznana, przyjmuje taką konformację, że oddziaływanie typu Hoogsteen nie jest możliwe. W warunkach komórkowych mogą występować także inne oddziaływania RNA-RNA lub RNA-białko. Struktura przestrzenna naturalnych rybozymów, których rozmiary są znacznie większe od tych stosowanych w warunkach laboratoryjnych, jest złożona. Występuje tam skomplikowana sieć oddziaływań różnych elementów struktury. Części poznanych dotychczas interakcji przypisuje się rolę w utrzymywaniu konformacji, która zapobiega tworzeniu konkurencyjnych oddziaływań względem wiązania typu Hoogsteen.¹⁹⁸ W (+)RNA5 takie konkurencyjne oddziaływania mogą występować, ponieważ minimalny wariant rybozomu nie zapewnia ochrony przed ich utworzeniem. Próba odwzorowania trzeciorzędowych interakcji obserwowanych w pełnej długości naturalnych rybozymach jest jedynie namiastką rzeczywistych oddziaływań, które są złożone i wciąż trudne do zrozumienia.

Poszukiwanie i zastosowanie nowych wariantów rybozymów ma szczególne znaczenie w świetle faktu, iż rybozomy typu *hammerhead* były już wcześniej poddawane testom klinicznym fazy I i II.²⁰¹ Wykazały w nich efekt biologiczny jako potencjalna terapia genowa wobec wirusa HIV. W trakcie trwania badania nie zaobserwowano także wytworzenia opornych form wirusa, które to zjawisko jest słabym punktem wielu stosowanych do tej pory strategii terapeutycznych.

PODSUMOWANIE

W niniejszej pracy zaprojektowano szereg narzędzi oligonukleotydowych: PNA formujące trypleksy, siRNA, antysensowe oligonukleotydy oraz rybozomy typu *hammerhead*, których zadaniem było hamowanie namnażania wirusa grypy typu A. Podstawą projektowania strategii była dogłębna analiza danych strukturalnych dotyczących miejsc docelowego działania inhibitorów w RNA wirusowym. Strategie nakierowane zostały na wybrane konserwatywne motywy strukturalne vRNA segmentu 8 oraz (+)RNA segmentu 5 wirusa, które mogą mieć znaczenie funkcjonalne w jego cyklu replikacyjnym. Potencjał przeciwwirusowy narzędzi oligonukleotydowych sprawdzany był na linii komórkowej MDCK zakażonej wirusem grypy szczepu A/California/04/2009 (H1N1).

Wszystkie testowane w niniejszej pracy PNA formujące trypleksy wykazały aktywność przeciwwirusową. Koniugat PNA-neamina IR-1b o największym potencjale inhibitorowym, nakierowany na rejon *panhandle*, wniknął do komórek i wykazał najwyższą aktywność przeciwwirusową spośród oligomerów PNA. Hamował namnażanie wirusa grypy o 55,7% w teście IFA oraz 70% w analizie ilościowej RNA wirusowego przy użyciu metody PCR w czasie rzeczywistym, a efekt był zależny od stężenia. ASO nakierowanym na ten sam rejon nie udało się osiągnąć znaczącego efektu inhibicji. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły stwierdzić, że wiązanie pomiędzy PNA a docelowym dwuniciowym RNA nie zaburza struktury rejonu docelowego i dochodzi do utworzenia trypleksu. Wiązanie PNA do RNA jest specyficzne oraz zależne od sekwencji i struktury.

Kolejną testowaną strategią w niniejszej pracy była interferencja RNA z użyciem siRNA. Wyniki doświadczeń na komórkach wykazały, że sześć z dziewięciu zaprojektowanych niemodyfikowanych siRNA nakierowanych na mRNA5 hamowało replikację wirusa grypy. Najbardziej efektywne były siRNA 613 i 682, które zmniejszyły liczbę kopii wirusa odpowiednio o 84,5% i 85,6% w analizie przeprowadzonej metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wynik ten został potwierdzony w teście IFA - obie cząsteczki siRNA skutkowały inhibicją bliską 90%. Efekt inhibitorowy wykazywał zależność od stężenia w zakresie 2-8 nM. Zaobserwowano, że podniesienie stężenia powyżej tej wartości (50 nM, 100 nM) nie skutkuje wzmocnieniem efektu hamującego namnażanie wirusa grypy, liczba kopii RNA wirusa utrzymuje się wtedy na stałym, niskim poziomie. SiRNA 613 i 682 są nakierowane na konserwatywne rejony struktury

drugorzędowej mRNA5 wirusa grypy - 613-631 i 682-700. ASO nakierowane na te same rejony nie wykazały znaczącej aktywności przeciwwirusowej. Prawdopodobnie powodem niepowodzenia ASO była niepełna dostępność miejsca hybrydyzacji, która nie stanowiła przeszkody dla działania siRNA w kompleksie RISC. Następnie, do siRNA 613, 471 i 183 wprowadzono modyfikacje. Początkowy potencjał hamowania namnażania wirusa przez wymienione siRNA był zróżnicowany - odpowiednio wysoki, średni i umiarkowany. Modyfikacja polegała na wprowadzeniu do sekwencji nici 2'-fluororybonukleotydów, tiofosforanowych analogów nukleotydów, 2'-O-metylowanych nukleotydów oraz deoksyrybonukleotydów. Na zachowanie wysokiej aktywności siRNA 613 pozwoliła modyfikacja nici sensowej przez wprowadzenie 2'-fluororybonukleotydów. SiRNA 613-sF1, 613-sF2 uzyskały efekt odpowiednio 88,3% i 88,4% inhibicji namnażania wirusa. Dodatkowo, siRNA 613-sF1 wykazał zwiększoną stabilność w surowicy. Umiarkowana liczba modyfikacji przy użyciu tiofosforanowych analogów nukleotydów była tolerowana w obu niciach siRNA 613. Inhibicja namnażania wirusa grypy wyniosła 87,2% dla siRNA 613-asPS. Modyfikacja z użyciem tiofosforanowych analogów nukleotydów również przyczyniła się do poprawy stabilności siRNA w surowicy. Nie udało się jednak zwiększyć potencjału siRNA o niższej aktywności początkowej poprzez wprowadzenie modyfikacji. Modyfikacja siRNA z użyciem 2'-O-metylowanych nukleotydów oraz deoksyrybonukleotydów nie przyniosła korzystnych efektów. Uzyskane wyniki wskazują, że modyfikacje w sposób istotny wpływają na włączanie siRNA w mechanizmy RNAi.

Ostatnim testowanym narzędziem były rybozomy typu *hammerhead*. Zaprojektowano rybozomy o standardowej budowie oraz ich warianty strukturalno-sekwencyjne. Warianty miały zapewnić stabilizację katalitycznie aktywnej konformacji rdzenia rybozomu i w konsekwencji zwiększoną aktywność. Zdolność hamowania namnażania wirusa grypy sprawdzana była w warunkach komórkowych. Wyniki wskazały, że tylko dwa spośród zaprojektowanych rybozymów zapewniały znaczącą inhibicję wirusa grypy w stężeniu 200 nM. RZ6A i RZ6C osiągnęły efekt inhibitorowy na poziomie odpowiednio 43% i 49%. Były to standardowe rybozomy typu *hammerhead*. Zastosowanie wariantów stabilizujących nie spowodowało pożądanego wzrostu aktywności katalitycznej i żaden z nich nie osiągnął potencjału wyższego od wersji standardowej. Ustalono natomiast, że najbardziej efektywne rybozomy działają w obrębie

tych samych domen co skuteczne siRNA 613 i 682. Prawdopodobnie to właśnie dobór rejonu docelowego warunkuje aktywność przeciwwirusową rybozymów typu *hammerhead*.

Stosowane w niniejszej pracy narzędzia inhibicji wirusa grypy wiążą się do miejsca docelowego zgodnie z regułami komplementarności zasad. Właściwość ta pozwala na skierowanie ich aktywności na określone rejony sekwencji i struktury docelowe. Działają jednak za pośrednictwem różnych mechanizmów komórkowych, które wywołują efekt inhibicji. Przewiduje się, że PNA i ASO stanowią steryczną zawadę blokującą strukturę i funkcję RNA docelowego.^{82, 205} Natomiast, skuteczne zastosowanie rybozymów oraz siRNA skutkuje przecięciem RNA.^{176, 200} W pierwszym przypadku następuje autokatalityczne przecięcie RNA docelowego przez rybozym. SiRNA natomiast jest częścią dużego, wieloskładnikowego kompleksu białkowego RISC. Jego białkiem efektorowym jest endonukleaza Ago.¹⁷⁶ Procesy inicjowane przez poszczególne proponowane cząsteczki mają znaczenie dla wydajności inhibicji.

Efektywne cząsteczki inhibitorowe muszą spełniać odmienne kryteria sekwencyjne i strukturalne. ASO mogą celować w dowolną sekwencję, która jest dostępna do hybrydyzacji w rejonie jednoniciowego RNA docelowego. Natomiast, podstawowym warunkiem utworzenia trypleksu z udziałem PNA jest występowanie polipirymidynowej sekwencji w dwuniciowym rejonie docelowego RNA.⁹² Z kolei dla siRNA istnieje szereg wytycznych sekwencyjnych, które w ogólnym zarysie mają determinować asymetryczny charakter dupleksu, gdzie koniec 5' dupleksu (nici sensowej) wykazuje zwiększoną stabilność termodynamiczną.¹⁷⁶ W przypadku rybozymów aktywność zależna jest od występowania katalitycznego przecięcia w tryplecie NUH sekwencji docelowego RNA.²⁰⁰ To niewielkie ograniczenie daje możliwość celowania w szeroki zakres sekwencji RNA. Niektóre badania wykazują jednak, że określone warianty trypletów przyczyniają się do zapewnienia wyższej aktywności katalitycznej. Dokładne uwarunkowania strukturalne miejsc docelowego działania siRNA oraz rybozymów o wysokiej aktywności nie są w pełni poznane. W literaturze opisano jednak, że struktury dwuniciowe są dla tych podejść w mniejszym stopniu dostępne i hamują mechanizmy efektorowe.²⁰⁶⁻²⁰⁸ Wyniki doświadczeń przeprowadzonych w niniejszej pracy wskazują, że siRNA wykazują większą elastyczność doboru miejsca docelowego.

Różne są także rodzaje RNA wirusowego, które poddają się działaniu proponowanych strategii. PNA, ASO oraz rybozomy ze względu na mechanizm działania mogą być nakierowane (w zależności od sposobu zaprojektowania) na wszystkie rodzaje RNA wirusowego występujące w cyklu replikacyjnym patogenu – vRNA [(-)RNA], cRNA oraz mRNA [(+)RNA]. Ze względu na prawie całkowitą zgodność sekwencji mRNA z cRNA, z wyjątkiem krótszych mRNA powstających w wyniku *splicingu* segmentów 7 i 8, cząsteczka celująca w jeden z tych rodzajów RNA oddziałuje z obiema populacjami. Wyjątek stanowią rejony końca 5' i 3' cRNA, które są zredukowane w mRNA. Testowany w pracy PNA IR-1b nakierowany na rejon *panhandle* vRNA wykazał także zdolność wiązania do terminalnego rejonu cRNA, ze względu na duże podobieństwo sekwencyjno-strukturalne. Wiązanie do cRNA było jednak znacznie słabsze niż do vRNA. Bardziej restrykcyjne pod względem celowania w określony rodzaj RNA wirusowego jest RNAi. Aktualny stan wiedzy w tym zakresie wskazuje, że siRNA działają jedynie wobec mRNA. Mimo, że aktywność siRNA skierowana jest na najmniej liczną populację RNA wirusowego, w niniejszej pracy wywołały największy efekt inhibitorowy.

Ważną rolę w doborze odpowiedniej modyfikacji pełni zdolność do prognozowania jej efektów. Dlatego też doświadczenia wnoszące nowe dane na temat aktywności modyfikowanych narzędzi inhibitorowych przyczyniają się do lepszego projektowania, przewidywania i zrozumienia procesów biologicznych. Dla każdej z zastosowanych strategii obserwuje się odmienne efekty związane z wprowadzaniem modyfikacji chemicznych do sekwencji. W oligomerach PNA modyfikacje - tiopseudoizocytozyna oraz 5-metylocytozyna zmodyfikowana guanidyną - pozwoliły na zwiększenie powinowactwa względem dwuniciowych rejonów docelowych RNA, zwiększając tym samym specyficzność wiązania. Dotychczas opublikowane badania pokazują, że modyfikacja ASO również przynosi korzystne efekty. W pełni 2'-O-metylowane ASO zawierające nukleotydy typu LNA nie osiągnęły w niniejszych badaniach wysokich wartości inhibicji wirusa grypy. Biorąc jednak pod uwagę wcześniejsze doświadczenia wykonane na tym samym szczepie wirusa, można sądzić, że wynik ten był zależny od wyboru sekwencji i miejsca docelowego, nie zaś niekorzystnego wpływu stosowanych modyfikacji. Natomiast, RNAi jest bardziej wrażliwa na wprowadzanie modyfikacji chemicznych. Istnieją publikacje, które pokazują, że zastosowanie modyfikacji w sekwencji siRNA przynosi korzystne efekty.^{177, 179-182, 190}

Z drugiej strony, pojawiają się doniesienia o obniżonej aktywności modyfikowanych siRNA.^{183-185, 189, 190} Badania przeprowadzone w toku niniejszej pracy również ukazują, że rezultaty wprowadzania modyfikacji są niejednoznaczne. Istotne znaczenie mają w tym przypadku czynniki takie jak rodzaj modyfikacji, ich liczba, rozmieszczenie, a także sekwencja modyfikowanego dupleksu. Ten sam zestaw czynników może decydować o wpływie na stabilność enzymatyczną dupleksów w surowicy. W przeprowadzonych doświadczeniach zaobserwowano, że nie każdy schemat modyfikacji zapewnia zwiększenie trwałości siRNA. Przy tak dużej ilości zmiennych wpływających na efekt przewidywanie skutków wprowadzenia określonych modyfikacji stanowi dużą trudność. Odnalezienie korzystnego wariantu sekwencyjnego wymaga przeprowadzenia doświadczeń i wyłonienia go spośród proponowanej puli.

W odniesieniu do rybozymów typu *hammerhead* dane literaturowe wskazują, że wiele grup funkcyjnych występujących w naturalnym rdzeniu katalitycznym jest niezbędnych dla pełnej aktywności katalitycznej.¹⁹⁸ Dotyczy to zarówno nukleotydów znajdujących się w sąsiedztwie miejsca przecięcia, jak i bardziej od niego oddalonych. Obecność wszystkich znanych restrykcji nie może być zatem uzasadniona zaangażowaniem w formowanie miejsca aktywnego. Postuluje się występowanie interakcji wpływających na globalną strukturę rybozomu, które działają w sposób kooperatywny, a ich zaburzenie powoduje jej destabilizację. W związku z tym wprowadzanie modyfikacji do rdzenia katalitycznego zwykle w sposób negatywny wpływa na aktywność rybozomu. Ramiona rybozomu o zmiennej sekwencji, hybrydujące do miejsc docelowych, w większym stopniu tolerują wprowadzanie zmian.²⁰⁹ W niniejszej pracy nie testowano jednak złożonych schematów modyfikacji. Zastosowano jedynie modyfikację typu LNA dla ostatniego nukleotydu na 3' końcu ramienia rybozomu, której głównym zadaniem miało być zapewnienie większej stabilności enzymatycznej RNA w warunkach komórkowych. Jednak w testach stabilności w surowicy modyfikacja ta nie wpływała w sposób znaczący na zachowanie integralności rybozomu.

Zastosowanie wiedzy o strukturze drugorzędowej RNA jako dodatkowego kryterium w projektowaniu narzędzi oligonukleotydowych wydaje się skutecznym podejściem. Niniejsza praca wykazuje, że konserwatywne motywy struktury RNA wirusowego stanowią dobry cel dla strategii inhibitorowych nakierowanych na RNA. Wyniki niniejszych badań pozwoliły wskazać rejony, których zakłócenie przez

zastosowanie narzędzi oligonukleotydowych w sposób znaczący zmniejsza replikację wirusa grypy. Docelowe rejony działania najlepszych siRNA są najprawdopodobniej szczególnie ważne dla cyklu replikacyjnego wirusa. Wyjątkowo istotne w tym kontekście wydają się konserwatywne domeny 559-669 oraz 671-743 (+)RNA5 podatne na inhibicję z użyciem siRNA i rybozymów, a także ASO testowanych w innych pracach. Rezultaty doświadczeń pokazują również, że choć najbardziej efektywne narzędzia oligonukleotydowe działają w obrębie tych samych domen to nie każdy rejon struktury RNA wirusowego może stanowić uniwersalny cel dla różnych strategii nakierowanych na RNA. Niektóre podejścia antysensowe wymagają zwiększonej dostępności rejonu docelowego RNA. W związku z tym ważną rolę w projektowaniu efektywnych narzędzi opartych na kwasach nukleinowych jest selekcja sekwencji oraz kontekstu strukturalnego miejsca docelowego odpowiedniego i dopasowanego do wymagań oraz ograniczeń konkretnej strategii. Niektóre stabilne i konserwatywne motywy mogą mieć znaczenie funkcjonalne, dlatego dobór odpowiednich miejsc docelowego działania strategii inhibitorowych może mieć kluczowe znaczenie dla osiągnięcia efektu zahamowania namnażania wirusa.

MATERIAŁY I METODY

1. Materiały

1.2 Oligonukleotydy

Tabela 5. Oligonukleotydy stosowane w doświadczeniach wykonanych na potrzeby niniejszej pracy.

Nazwa	Sekwencja (5'→3')
Startery do reakcji PCR w czasie rzeczywistym	
QF	AGACCAATCTTGTCACCTCTGAC
QR	AGGGCATTGTTGGACAAAGCGTCTACG
Sonda typu TaqMan do reakcji PCR w czasie rzeczywistym	
QP	<u>FAM</u>TCACCGTGCCCAGTGAGCGAGGACTGCT<u>TAMRA</u>
Starter do odwrotnej transkrypcji (komplementarny do vRNA7)	
RT	ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG
Startery do odwrotnej transkrypcji na matrycy (+)RNA5 znakowane FAM [elektroforeza kapilarna po katalitycznym przecięciu (+)RNA5 rybozymami <i>in vitro</i>]	
M4C	<u>FAM</u>CAATCTCAGCGTTTCCTGGGT
M7C	<u>FAM</u>GCACATTCTTTCATAAGCAACCC
RT5C	<u>FAM</u>TCAACTGTCATACTCCTCTGCATT
Startery do PCR - otrzymanie matrycy do transkrypcji <i>in vitro</i> (+)RNA5	
5CFP	GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGCAAAAGCAGGGTAGATAATCA
5CRP	AGTAGAAACAAGGGTATTTTTCTTCAACTG
Startery do PCR - otrzymanie matrycy do transkrypcji <i>in vitro</i> vRNA5	
5VFP	GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGTAGAAACAAGGGTATTTTTCTTCAA
5VRP	AGCAAAAGCAGGGTAGATAATCA
Startery do PCR - otrzymanie matrycy do transkrypcji <i>in vitro</i> vRNA7	
PF	GCGTAATACGACTCACTATAGGGTACTCTAGCTCTATGTTGACAAAATGAC
PR	ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAAC
Startery do PCR - otrzymanie matrycy do transkrypcji <i>in vitro</i> vRNA8	
ELF	AAAATAATACGACTCACTATAGGGAGTAGAAACAAGGGTGTTTTTTATCATTAATAAGC

ELR	AGCAAAAGCAGGGTGACAAAAACATAATGG
Startery do PCR - otrzymanie matrycy do transkrypcji <i>in vitro</i> motywu M1	
UTF-7	GAATTCTAATACGACTCACTATAGG
M1-R2	GGTTCTCTTCCAGGAC
Startery do PCR - DNA segmentu 5	
5CFP	AGTAGAAACAAGGGTATTTTTCTTCAACTG
5VFP	AGCAAAAGCAGGGTAGATAATCA

FAM - 6-karboksyfluoresceina, **TAMRA** - 6-karboksytetrametylorodamina

1.3 Plazmidy

Plazmid pUC19 (Invitrogen) został wykorzystany jako wektor dla insertów w postaci pełnej długości segmentów (+)RNA5, vRNA5, vRNA7, vRNA8 oraz motywu M1.

1.4 Komercyjnie dostępne zestawy

- Zestaw do transkrypcji *in vitro*: AmpliScribe™ T7 - Flash™ Kit - Epicentre
- Zestaw do odwrotnej transkrypcji: Super Script® III Reverse Transcriptase - Invitrogen
- Zestaw do oczyszczania produktów PCR: PCR mini kit - Syngen
- Zestaw do oczyszczania RNA RNeasy MiniElute - Qiagen
- Zestaw do reakcji PCR w czasie rzeczywistym: 5x HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus - Solis BioDyne
- Zestaw do testu MTT CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT) - Promega

1.5 Enzymy

- Polimeraza DNA Pfu PLUS! - EURX
- Ambion™ DNaza I (wolna od RNaz) - Invitrogen
- Kinaza polinukleotydowa T4 - EURX
- Rekombinowany inhibitor RNaz rRNasin - Promega

1.6 Izotop promieniotwórczy

— [γ -³²P]ATP - Hartmann Analytics

1.7 Barwniki fluorescencyjne

— 6-TAMRA (NHS ester) - Anaspec

1.8 Wzorce wielkości

— DNA: Perfect Plus Molecular Weight Quantitative Ladder - EURX

— RNA: RiboRuler High Range RNA Ladder - Thermo Scientific

1.9 Przeciwciała

— mouse anti-influenza primary antibody targeting nucleoprotein (NP) (MAB8257 Merck)

— FITC-conjugated secondary rabbit anti-mouse IgG antibody (AP160F Merck)

1.10 Odczynniki i roztwory

— Agarozą; 40% roztwór żelu poliakrylamidowego 29:1 (w/w); Tris; EDTA; HEPES; octan sodu; mocznik; Triton X-100; PBS - Bioshop

— Simply Safe; zestaw dNTP - EURX

— N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina (TEMED); dimetylosulfotlenek (DMSO), nadsiarczan amonu (APS); MgCl₂; KCl; NaCl; glicerol; błękit bromofenolowy; tetraboran sodu; BSA; penicylina-streptomycyna; trypsyna traktowana TPCK - Sigma

— Formamid - Applied Biosystems

— Kwas borowy - Chempur

— Formaldehyd - Polyscience

— DMEM; FBS; penicylina-streptomycyna-glutamina (100X) - Gibco

— Lipofectamine 2000; Opti-MEM - Invitrogen

1.11 Bufory

Bufor 1x TBE

100 mM Tris-HCl, pH 8,3

100 mM kwas borowy

1 mM EDTA

Bufor obciążający do elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

7 M mocznik

1x TBE

0,03% błękit bromofenolowy

Bufor obciążający do elektroforezy w żelu agarozowym

40 mM Tris-HCl, pH 7,5

12,5% glicerol

0,03 % błękit bromofenolowy

Bufor do faldowania (+)RNA5

50 mM HEPES, pH 7,5

100 mM KCl

5 mM MgCl₂

Bufor do faldowania PNA z RNA

20 mM HEPES, pH 7,0

200 mM NaCl

0,5 mM EDTA

1.12 Linia komórkowa

Wszystkie testy wymagające hodowli komórek przeprowadzono na linii komórek Mandin-Darby Canine Kidney (MDCK) (Sigma-Aldrich).

1.13 Szczep wirusa grypy

Eksperymenty na hodowli komórkowej przeprowadzono z użyciem szczepu wirusa grypy A/California/04/2009 (H1N1), który otrzymano od prof. Luisa Martinez-Sobrido z Wydziału Mikrobiologii i Immunologii, Uniwersytetu w Rochester, USA.

1.14 Media

Medium hodowlane

1x Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (4,5 g/l D-glukozy, 110 mg/l pirogronianu sodu)

10% fetal bovine serum (FBS)

2 mM glutamina

100 U/ml penicylina

100 µg/ml streptomycyna

Medium infekcyjne

1x PBS

0,3% bovine serum albumine (BSA)

100 U/ml penicylina

100 µg/ml streptomycyna

Medium postinfekcyjne

1x DMEM

0,3% bovine serum albumine (BSA)

100 U/ml penicylina

100 µg/ml streptomycyna

2 mM glutamina

1 µg/ml trypsyny traktowanej TPCK

Medium do testu lysinkowego

1x DMEM

100 U/ml penicylina

100 µg/ml streptomycyna

2 mM glutamina

1 µg/ml trypsyny traktowanej TPCK

50 mM HEPES pH 7,5

2. Metody

2.1 Synteza oligonukleotydów

Syntezę wszystkich oligonukleotydów przeprowadzono metodą amidofosforynową na podłożu stałym na syntetyzerze DNA/RNA MerMade12 (BioAutomation) w Zakładzie Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych ICHB PAN. Do syntezy wykorzystano komercyjnie dostępne amidofosforyny DNA, RNA, 2'-O-Me-RNA, 2'-F-RNA, LNA (ChemGenes, GenePharma). Tiofosforanowe analogi nukleotydów uzyskano poprzez działanie roztworem *tetraethylthiuram disulfide* (TETD) na odpowiednim etapie syntezy.

2.2 Synteza PNA

PNA zostały zsyntetyzowane przez prof. Ganga Chena z Uniwersytetu Technologicznego Nanyang w Singapurze.

2.3 Odblokowanie oligonukleotydów DNA, modyfikowanych oligonukleotydów 2'OMe-RNA i 2'OMe-RNA-LNA

Do silikażelu zawierającego oligonukleotyd dodano 1,5 ml wodnego roztworu amoniaku (32%) i inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 55°C. Po upływie czasu inkubacji próbki schłodzono w temperaturze -20°C przez 20 min. Roztwór z nadłoża przeniesiono do świeżych probówek i odparowano przy użyciu obrotowej pompy próżniowej. Oligomery o długości do 16 nukleotydów oczyszczano przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej (TLC), natomiast dłuższe fragmenty z zastosowaniem metody rozdziału w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących.

2.4 Odblokowanie oligonukleotydów RNA i częściowo modyfikowanych RNA

Do silikażelu zawierającego oligonukleotyd dodano 1,5 ml 32% wodnego roztworu amoniaku i 0,5 ml 96% etanolu. Mieszaninę inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 55°C. Następnie, próbki schłodzono w temperaturze -20°C przez 20 min. Roztwór z nadłoża przesączono przez kolumny do świeżych probówek i odparowano przy użyciu obrotowej pompy próżniowej. Do osadu rozpuszczono dodano 45 µl DMF i 405 µl HF, inkubowano przez 3 godziny w 55°C. Po upływie czasu inkubacji próbki strącono w 6 ml 1-butanolu przez 1 godzinę w -20°C. W kolejnym kroku powstały osad zwirowano przy prędkości 5000 rpm przez 10 min w 4°C. Supernatant usunięto, a osad RNA suszono przez 1 godzinę przy użyciu obrotowej pompy próżniowej. Osad

rozpuszczono w 500 μ l i odsolono przy użyciu kolumn NAP-20 (GE Healthcare) zgodnie z protokołem producenta. Zebrano frakcje zawierające oligomer, połączono i odparowano, w celu zmniejszenia objętości próbki. Następnie, oczyszczono wykonując elektroforezę w żelu poliakrylamidowym (PAGE).

2.5 Znakowanie sondy typu TaqMan barwnikiem fluorescencyjnym

Sonda typu TaqMan QP (Tabela 5) przeznaczona do reakcji PCR w czasie rzeczywistym została zsyntetyzowana w postaci oligomeru zawierającego barwnik fluorescencyjny FAM na końcu 5' oraz aminolinker zabezpieczony grupą monometoksytrytylową (MMTr) na końcu 3'. Po uwolnieniu z podłoża i usunięciu blokujących grup zasadolabilnych, odblokowano grupę aminową przez inkubację w 80% kwasie octowym w temperaturze pokojowej przez 3 godziny. Następnie, kwas octowy odparowano do sucha, oligonukleotydy rozpuszczono w wodzie i dodano do 10 ml 1% nadtlenku sodu w acetonie. W kolejnym kroku oligonukleotydy strącono i przepłukano zimnym acetonem. W następnym etapie, 200 μ g oligonukleotydu inkubowano z 200 μ g barwnika 6-TAMRA (Anaspec) rozpuszczonego w 14 μ l DMSO. Reakcję prowadzono w 0,1 M tetraboranie sodu (pH 8,5) przez 6 godzin w temperaturze pokojowej. Kolejnym etapem było strącenie oligonukleotydów i ich oczyszczenie w denaturującym żelu poliakrylamidowym.

2.6 Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Oligomery o długości do 16-nt rozpuszczano w 150 μ l H₂O i oczyszczano przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na płytkach analitycznych z żelem krzemionkowym 60 F254 (grubość warstwy krzemionkowej - 0,25 mm) z zastosowaniem fazy rozwijającej 1-propanol/amoniak/woda w stosunku 55/35/10 v/v/v. Prążki odpowiadające pełnej długości oligonukleotydów izolowano z płytki, eluowano przemywając wodą i eluat odparowano do sucha. Próbkę rozpuszczano w 500 μ l wody i resztki złoży usuwano poprzez wirowanie i zebranie supernatantu z nad osadu.

2.7 Spektrometria mas

Dla zsyntetyzowanych i oczyszczonych oligomerów obliczano ich oczekiwaną masę, a następnie przeprowadzano analizę mas związków za pomocą spektrometru mas MALDI-TOF Bruker Autoflex. Masy obliczone i wyniki uzyskane z pomiaru spektrometrycznego zostały porównane w celu potwierdzenia poprawności zsyntetyzowanych oligomerów.

2.8 Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących

W zależności od długości cząsteczki wykorzystywano żele 10% lub 12% zawierające 8 M mocznik. Elektroforezę prowadzono w buforze 1x TBE, a próby przed nałożeniem do kieszonek mieszano z buforem obciążającym. Po wykonaniu preelektroforezy prowadzono rozdział, który w zależności od wielkości żelu był ograniczony mocą przepływającego prądu od 10 do 40 W. Wyniki wizualizowano za pomocą lampy UV przy długości 260 nm.

2.9 Elucja kwasów nukleinowych z żeli poliakrylamidowych

Prążki, odpowiadające cząsteczkom DNA lub RNA wycinano z żelu i przenoszono do probówek, w których rozpuszczano je w 0,3 M octanie sodu pH 5,5. Elucję prowadzono przez minimum 2 godziny w 4°C, w termobloku z wytrząsaniem. Następnie, eluat przenoszono do świeżych probówek i wykonywano strącanie w etanolu jak opisano poniżej.

2.10 Strącanie kwasów nukleinowych

Do roztworu kwasu nukleinowego dodawano octanu sodu (pH 5,5) do uzyskania końcowego stężenia 0,3 M. Następnie, całość strącano 3 objętościami 96% etanolu w temperaturze -20°C, przez co najmniej 2 godziny. Po upływie czasu inkubacji próby wirowano przez 30 min w temperaturze 4°C przy prędkości 12 000 rpm. Supernatant usunięto, osad przemyto 70% etanolem i ponownie wirowano przez 15 min w temperaturze 4°C przy prędkości 12 000 rpm. Ponownie supernatant usunięto, a osad kwasu nukleinowego suszono i rozpuszczano w wodzie.

2.11 Określenie stężenia oligonukleotydów

Stężenie oligonukleotydów określono za pomocą pomiaru absorbancji przy długości fali $\lambda = 260$ nm (spektrofotometr Nanodrop2000 Thermo).

2.12 Znakowanie końca 5' RNA radioizotopem [γ -³²P]ATP

100 pmol RNA pozbawionego grupy fosforanowej na końcu 5' inkubowano z 0,5 mCi [γ -³²P]ATP, 30 U kinazy polinukleotydowej T4 oraz buforem załączonym przez producenta enzymu w objętości 10 μ l przez 30 min w temperaturze 37°C. Krótkie cząsteczki RNA (oligonukleotydy) oczyszczano poprzez elektroforezę w 10% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących zgodnie ze standardowym

protokołem. Wizualizacja następowała poprzez autoradiografię. Prążek odpowiadający pełnej długości cząsteczce wycinano, eluowano i strącano zgodnie ze standardowym protokołem. Po rozpuszczeniu oczyszczonego RNA w wodzie dokonywano pomiaru promieniowania przy użyciu licznika scyntylicyjnego MicroBeta (PerkinElmer).

2.13 Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach agarozowych

Elektroforezę prowadzono w 1% żelu agarozowym w buforze 1x TBE zawierającym barwnik interkalujący SimplySafe (EURX). Do próbek dodawano bufor obciążający do elektroforezy w żelu agarozowym i nakładano na żel. Elektroforezę prowadzono przy mocy prądu 10 W. Wynik rozdziału obserwowano w świetle UV.

2.14 Hodowla komórek MDCK

Komórki hodowano w medium hodowlanym w atmosferze 5% CO₂ i temperaturze 37°C przy wilgotności 96%, na szalkach o średnicy 10 cm. Pasażu komórek dokonywano po osiągnięciu przez hodowlę 80-95% konfluencji. Przed rozpoczęciem procedury komórki przemywano dwukrotnie roztworem 1x PBS. Następnie, na monowarstwę komórek dodawano 1 ml roztworu trypsyny z EDTA (0,05% i 0,02%, odpowiednio) i przenoszono do 37°C na 10 min. Po upływie czasu inkubacji komórki odrywały się od powierzchni szalki. Dodawano 4 ml medium hodowlanego, rozbijano agregaty komórek i wirowano zawiesinę przez 3 min przy prędkości 1000 rpm. Supernatant usuwano, osad rozpuszczano w świeżej porcji medium hodowlanego i zawiesinę komórek o odpowiedniej gęstości wysiewano na nową szalkę.

2.15 Propagacja wirusa i przygotowanie stężonych roztworów wirusa

Hodowlę komórek MDCK na szalkach o średnicy 10 cm zakażano wirusem grypy A/California/04/2009 (H1N1) zgodnie ze standardową procedurą przy MOI = 0,01. Komórki płukano roztworem 1x PBS i inkubowano w roztworze wirusa rozcieńczonego w medium infekcyjnym przez 1 godzinę na delikatnie kołyszącej się platformie w temperaturze pokojowej. Po usunięciu supernatantu zainfekowane komórki utrzymywano w medium postinfekcyjnym przez 72 godziny w standardowych warunkach - atmosferze zawierającej 5% CO₂, temperaturze 33°C przy wilgotności 96%. Po tym czasie supernatanty z namnożonym wirusem zebrano i wirowano w celu usunięcia martwych komórek przy prędkości 1000 rpm przez 3 min. Klarowny roztwór zawierający wirusa zebrano z nad osadu i zamrożono w małych porcjach w temperaturze -80°C.

2.16 Test łyśinkowy

Miano wirusa w zebranych roztworach określano przy użyciu standardowego testu łyśinkowego. Monowarstwę komórek na płytce 6-dołkowej infekowano serią 10-krotnych rozcieńczeń stężonego roztworu wirusa w dwukrotnych powtórzeniach. Po usunięciu supernatantu medium infekcyjnego komórki pokryto 0,8% roztworem agarozy w medium do testu łyśinkowego. Zakażoną hodowlę inkubowano w standardowych warunkach - w medium postinfekcyjnym, atmosferze 5% CO₂, w temperaturze 33°C przy wilgotności 96% - przez 4 dni. Następnie, komórki barwiono 1% fioletem krystalicznym. Ostatnim etapem było zliczenie łyśinek i określenie miana wirusa zgodnie ze wzorem: [PFU/ml = liczba łyśinek x rozcieńczenie wirusa x objętość roztworu wirusa użyta do infekcji (ml)].

2.17 Transfekcja siRNA i oligonukleotydów

Transfekcję siRNA i ASO do komórek przeprowadzono przy użyciu odczynnika Lipofectamine 2000. Przygotowywano roztwór 36,5-krotnie rozcieńczonej lipofektaminy w Opti-MEM, który inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej. Następnie, siRNA, ASO lub rybozomy rozpuszczano w Opti-MEM do uzyskania odpowiedniego stężenia i 33,5 µl roztworu ostrożnie zmieszano ze 100,5 µl roztworu lipofektaminy w Opti-MEM. Mieszaninę inkubowano 30 min w temperaturze pokojowej. Tuż przed transfekcją komórki MDCK traktowano trypsyną (zgodnie z procedurą opisaną dla pasażu) i ponownie zawieszono w świeżej porcji medium hodowlanego. Następnie, przygotowany kompleks oligonukleotyd-lipofektamina dodano do zawiesiny komórek MDCK zawierającej 1,2 x 10⁵ komórek na dołek do końcowej objętości 670 µl, które wysiano na 24-dołkowej płytce. Końcowe stężenie siRNA podczas transfekcji wynosiło 8 nM. Do badań zależności od dawki testowano również stężenia 100, 50, 4 i 2 nM siRNA. ASO transfekowano przy stężeniach 8 nM, 750 nM, 4 µM. Rybozomy stosowano w stężeniu 200 nM. Po 12 godzinach inkubacji medium transfekcyjne zastąpiono standardowym medium hodowlanym.

2.18 Infekcja hodowli komórkowej wirusem grypy

Po upływie 18 godzin od transfekcji hodowlę komórkową przemyto PBS i zakażano wirusem grypy A/California/04/2009 (H1N1) przy MOI = 0,01. Komórki inkubowano w roztworze wirusa rozcieńczonego w medium infekcyjnym przez 1 godzinę na delikatnie kołyszącej się platformie w temperaturze pokojowej. Następnie, supernatant

usunięto i komórki utrzymywano w medium postinfekcyjnym przez 24 godziny w atmosferze 5% CO₂, temperaturze 33°C.

2.19 Testy PNA w hodowli komórkowej

Komórki MDCK wysiewano na płytce 96-dołkowej w ilości 2 x 10⁴ i hodowano w medium hodowlanym przez 24 godziny. Następnie, medium hodowlane zastąpiono pożywką zawierającą PNA w odpowiednim stężeniu (2 lub 4 μM) na 12 godzin. Po tym czasie usunięto roztwór z nad komórek, dwukrotnie przepłukano roztworem 1x PBS i zakażono wirusem grypy zgodnie z protokołem opisanym powyżej. Po upływie 24-godzinnego czasu infekcji supernatanty z zainfekowanej hodowli komórkowej zebrano do testu IFA oraz wyizolowano całkowity RNA z monowarstwy komórek do analizy PCR w czasie rzeczywistym.

2.20 Test immunofluorescencji pośredniej (IFA)

Supernatanty zebrane z zakażonej hodowli komórkowej wykorzystano do przygotowania 10-krotnych seryjnych rozcieńczeń wirusa w medium infekcyjnym. Monowarstwę komórek na 96-dołkowej płytce infekowano seryjnymi rozcieńczeniami wirusowych supernatantów przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej na delikatnie kołyszącej platformie. Następnie, supernatanty usunięto i komórki utrzymywano w medium postinfekcyjnym przez 10 godzin w temperaturze 33°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂. Po upływie czasu inkubacji supernatanty usunięto, a komórki utrwalono i permeabilizowano za pomocą 4% formaldehydu i 0,5% roztworu Triton X-100 w PBS przez 20 min w temperaturze pokojowej. Blokowanie przeprowadzono stosując 3% roztwór BSA w 1x PBS przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie, roztwór zastąpiono rozpuszczonym mysim pierwszorzędowym przeciwciałem przeciw grypie skierowanym na białko NP (MAB8257 Merck) w 3% roztworze BSA w 1x PBS (1 μg/ml) i inkubowano przez 1 godzinę w 37°C. Detekcję przeprowadzono przy użyciu drugorzędowego króliczego przeciwciała przeciw mysiej IgG skoniugowanego z FITC (AP160F Merck) rozcieńczonym w 3% roztworze BSA w 1x PBS (stosunek przeciwciała do 3% BSA wynosił 1/150 v/v) po 30 min inkubacji w 37°C. Analiza przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego wyników znakowania pozwoliła na obliczenie jednostek fluorescencji (FFU/ml).

2.21 Izolacja całkowitego RNA

Całkowity RNA z hodowli komórkowej MDCK izolowano metodą Chomczyńskiego-Sacchi z wykorzystaniem Trizolu. Jakość izolowanego RNA sprawdzono po wykonaniu enzymatycznej degradacji DNA poprzez rozdział w 1% żelu agarozowym.

2.22 Enzymatyczna degradacja DNA

500 ng RNA pochodzącego z izolacji odczynnikami Trizol traktowano wolną od RNaz DNazą I (Invitrogen) zgodnie z zaleceniami producenta w buforze dołączonym do enzymu, w 37°C przez 30 min. Enzym inaktywowano przez dodanie 1 µl 25 mM EDTA do końcowego stężenia 2,3 mM i ogrzewanie w 75°C przez 10 min.

2.23 Odwrotna transkrypcja

Odwrotną transkrypcję przeprowadzono za pomocą specyficznego startera i odwrotnej transkryptazy SuperScript III (Invitrogen). W tym celu, 1 µl izolatu RNA (45 ng) po traktowaniu DNazą I zmieszano z 1x First-Strand Buffer, specyficznym starterem uzyskując stężenia końcowe 0,4 µM oraz wodą do końcowej objętości 5 µl i inkubowano 3 min w 90°C, następnie 10 min w 55°C i umieszczono na lodzie. Następnie, dodano 10 mM DTT, 2,5 mM dNTP, 1x First-Strand Buffer, inhibitor RNaz 10 U rRNasin, 50 U odwrotnej transkryptazy SuperScript III oraz wody do końcowej objętości 10 µl i inkubowano przez 50 min w 55°C. Reakcję zatrzymywano przez ogrzewanie w temperaturze 70°C przez 15 min, a powstałe cDNA wykorzystano w kolejnym etapie.

2.24 PCR w czasie rzeczywistym

1 µl cDNA wykorzystano jako matrycę do reakcji PCR w czasie rzeczywistym ze specyficznymi starterami (stężenia końcowe 1 µM), sondą typu TaqMan (stężenia końcowe 1 µM) i gotową mieszaniną reakcyjną zawierającą polimerazę DNA 5x HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (Solis BioDyne) zgodnie z protokołem producenta. Całkowita objętość reakcji wynosiła 10 µl. Dla każdej badanej próbki reakcję przeprowadzono w trzech powtórzeniach w aparacie CFX96™ Real-Time System (Bio Rad) wg następującego programu: 95°C przez 15 min, 39 cykli 95°C przez 20 sek, 60°C przez 1 min. Po każdym cyklu wykonywany był odczyt fluorescencji z płytki. Analiza ilościowa bezwzględna pozwoliła na porównanie kopii wirusowego RNA w próbkach traktowanych inhibitorem i kontrolnych.

2.25 Przygotowanie standardów do analizy PCR w czasie rzeczywistym

Na matrycy vRNA7 (pochodzącej z reakcji transkrypcji *in vitro*) o znanym stężeniu wykonano odwrotną transkrypcję zgodnie ze standardowym protokołem opisanym powyżej, używając specyficznego startera RT (Tabela 5). Następnie, wykonano serię 10-krotnych rozcieńczeń stanowiących standardy cDNA, do których uzyskania użyto znanego stężeniu wyjściowego RNA. Do dalszego etapu wybrano sześć kolejno następujących po sobie rozcieńczeń. W dalszym etapie, 1 µl z każdego rozcieńczenia cDNA otrzymanego z vRNA7 amplifikowano w trzykrotnych powtórzeniach, w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Amplifikacja odbywała się równolegle do amplifikacji próbek cDNA, w których nieznanie było wyjściowe stężenie vRNA7 użyte do odwrotnej transkrypcji (uzyskane w wyniku izolacji z komórek). Seryjne rozcieńczenia cDNA uzyskanego z vRNA7 o znanym stężeniu, posłużyły do wykreślenia krzywej standardowej, dzięki której możliwe stało się określenie stężenia próbek badanych. Liczbę kopii RNA wirusowego w poszczególnych próbach liczono zgodnie ze wzorem: $[\text{stężenie RNA (g/}\mu\text{l)} / (\text{długość ampliconu} \times 340)] \times 6,022 \times 10^{23} = \text{liczba cząsteczek/}\mu\text{l}$.

2.26 Transkrypcja *in vitro*

Matrycą dla reakcji transkrypcji był liniowy DNA pochodzący z reakcji PCR, zawierający promotor dla polimerazy RNA T7. Reakcję prowadzono z użyciem zestawu Ampliscribe™ T7-Flash™ Transcription Kit (Epicentre) zgodnie z protokołem producenta, używając do pojedynczej reakcji przynajmniej 500 ng matrycy. Transkrypcję *in vitro* długich cząsteczek RNA takich jak pełnej długości segmenty vRNA8, vRNA5, cRNA5 [(+)RNA5], vRNA7 prowadzono przez 2 godziny w temperaturze 37°C. RNA o umiarkowanej długości (motyw M1) inkubowano w tej samej temperaturze do 4 godzin. Po upływie tego czasu degradowano DNA przy pomocy DNazy I dołączonej do zestawu według zaleceń producenta. Ostateczny produkt reakcji poddawano oczyszczaniu na kolumnach RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) zgodnie z protokołem producenta. Produkt RNA sprawdzano poprzez elektroforezę w żelu agarozowym zgodnie ze standardowym protokołem opisanym powyżej, stosując odpowiednie drabinki RNA, jako markery długości.

2.27 Otrzymywanie matrycy do transkrypcji *in vitro* pełnej długości segmentów (+)RNA5, vRNA5, vRNA7 i vRNA8.

DNA otrzymywano w wyniku reakcji PCR ze starterami zawierającymi promotor dla polimerazy RNA T7. Matrycę dla PCR stanowiło 25 ng plazmidu pUC19 zawierającego sekwencję vRNA lub cRNA. W reakcji stosowano 15 pmol każdego ze specyficznych starterów pozwalających na powielenie pełnej długości segmentu (Tabela 5). W mieszaninie reakcyjnej użyto także zestaw dNTP o stężeniu końcowym każdego dNTP 200 μ M, 2,5 U polimerazy Pfu Plus! (EURX), buforu dołączonego do enzymu przez producenta, które dopełniono wodą do końcowej objętości 50 μ l. Reakcję w termocyklerze C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio Rad) prowadzono według schematu innego dla poszczególnych matryc DNA, opisanego w Tabeli 6. Uzyskany produkt oczyszczono na kolumnach PCR mini kit (Syngen) zgodnie z protokołem producenta. Produkt sprawdzono poprzez elektroforezę w żelu agarozowym zgodnie ze standardowym protokołem opisanym powyżej.

Tabela 6. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR.

Etap	cRNA5/(+)RNA5	vRNA5	vRNA7	vRNA8
Denaturacja wstępna	95°C/3 min	95°C/3 min	95°C/3 min	95°C/3 min
Denaturacja	95°C/30 sek	95°C/30	95°C/20	95°C/30
Przyłączanie starterów	60°C/30 sek	50°C/30	52°C/20	55°C/30
Wydłużanie starterów	72°C/60 sek	72°C/60	72°C/60	72°C/60
Wydłużanie końcowe	72°C/5 min	72°C/5 min	72°C/7 min	72°C/5 min
Liczba cykli (etap 2-4)	30	30	34	30

2.28 Otrzymywanie DNA segmentu 5

Reakcję przeprowadzano zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 2.27, do której wprowadzono zmiany. Do powielenia sekwencji DNA segmentu 5 stosowano specyficzne startery 5CFP i 5VFP (Tabela 5) pozbawione sekwencji promotora dla polimerazy RNA T7. Reakcję w termocyklerze C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio Rad) prowadzono według schematu opisanego w tabeli powyżej dla cRNA5/(+)RNA5.

2.29 Otrzymywanie matrycy do transkrypcji *in vitro* motywu M1

Reakcję przeprowadzano zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 2.27, do której wprowadzono zmiany. Matrycę dla reakcji PCR stanowił plazmid pUC19 zawierający sekwencję motywu M1, którą powielano przy użyciu specyficznych starterów UTF-7 i M1-R3 zawierających sekwencję promotora dla polimerazy RNA T7 (Tabela 5). Zmianie uległ również profil temperaturowo-czasowy reakcji prowadzonej w termocyklerze C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio Rad), opisany w Tabeli 7.

Tabela 7. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR.

Etap	M1
Denaturacja wstępna	95°C/5 min
Denaturacja	95°C/30 sek
Przyłączanie starterów	51°C/30 sek
Wydłużanie starterów	72°C/30 sek
Wydłużanie końcowe	72°C/5 min
Liczba cykli (etap 2-4)	34

2.30 Test cytotoksyczności

Komórki MDCK wysiano, hodowano i traktowano PNA lub siRNA postępując według protokołu analogicznego do eksperymentów inhibicji opisanych powyżej. Po 12-godzinnej inkubacji w obecności PNA lub siRNA oraz kontroli bez dodatku testowanej molekuly, hodowlę komórkową poddawano testowi CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT) (Promega) zgodnie z protokołem producenta na aparacie xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio Rad). Wyniki uzyskano poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 570 nm. Wartości absorbancji zostały znormalizowane przez odjęcie wartości zarejestrowanej dla pomiaru tła przy referencyjnej długości fali 650 nm. Porównano znormalizowane wartości absorbancji próbek traktowanych i kontrolnych.

2.31 Test stabilności w surowicy

Testowi stabilności w surowicy zostały poddane zmodyfikowane i niezmodyfikowane siRNA oraz rybozomy. Wszystkie analizowane cząsteczki (po 500 ng każdej z nici dupleksu) rozpuszczono w 10 µl 10% roztworu FBS. Próbkę

inkubowano do 2 godzin w 37°C, w odpowiednich odstępach czasowych pobierano próbki mieszaniny reakcyjnej i strącano. Następnie, próbki rozpuszczono w 10 µl wody, dodano taką samą objętość 2x stężonego buforu obciążającego do żelu poliakrylamidowego i naniesiono na 20% denaturujący żel poliakrylamidowy. Obrazy żelu otrzymano za pomocą skanowania (FUJI FLA-5100) ekranu odwzorującego lub żelu wybarwionego SYBR Gold. Prążki odpowiadające siRNA lub rybozymom pełnej długości zostały poddane analizie ilościowej i porównane z próbką pobraną zaraz po rozpuszczeniu w roztworze FBS.

2.32 Analiza kinetyczna trypleksów PNA z zastosowaniem rozdziału w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących

Krótki oligonukleotyd RNA (Rycina 11) znakowany [γ -³²P]ATP i PNA (Tabela 1) zmieszano i fałdowano przez powolne chłodzenie od 80°C do 4°C (2°C/min), a następnie inkubowano w temperaturze 4°C przez noc. Stężenie RNA było stałe (1 µM dla HA1 i HA3 oraz 0,5 µM dla HA2), podczas gdy stężenia PNA były zróżnicowane. Do 10 µl próbki przed nałożeniem do dołków dodano 10 µl 25% glicerolu w 80 mM Tris-HCl o pH 7,5. Elektroforezę w 12% niedenaturującym żelu poliakrylamidowym (30 cm x 20 cm) prowadzono w temperaturze 4°C (bezpośrednio chłodzone szyby) przy mocy 20 W przez 3 godziny w buforze 1x TBE. Obrazy żelu uzyskano za pomocą skanowania (FUJI FLA-5100) ekranu odwzorującego. Ścieżki odpowiadające związanym z PNA i niezwiązanym formom RNA zostały poddane analizie ilościowej. Analizę danych przeprowadzono jak opisano poprzednio, a wartości K_d dla odpowiednich trypleksów uzyskano przez dopasowanie do równania^{102, 103, 105}:

$$Y = Y_0 + \left(\frac{B}{2R_0}\right)(R_0 + X + K_d - ((R_0 + X + K_d)^2 - 4R_0X)^{\frac{1}{2}}),$$

gdzie: R_0 oznacza stężenie spinki RNA (1 lub 0,5 µM), X oznacza całkowite stężenie PNA, Y jest frakcją trypleksu przy różnych stężeniach PNA, Y_0 i B są początkową i maksymalną zmianą frakcji trypleksu, natomiast K_d jest stałą dysocjacji.

2.33 Analiza oddziaływań PNA znakowanego karboksyfluoresceiną z długimi cząsteczkami RNA i DNA z zastosowaniem elektroforezy w żelu agarozowym

Koniugat PNA-neamina znakowany karboksyfluoresceiną IR-1b-cf był fałdowany z wirusowymi RNA (cRNA5, vRNA5, vRNA8 lub motywem M1, uzyskanymi w reakcji transkrypcji *in vitro*) lub DNA5 zgodnie z protokołem ustalonym

dla analizy kinetycznej trypleksów PNA na etapie poprzedzającym elektroforezę w żelu poliakrylamidowym. Stężenie IR-1b-cf wynosiło 1 μM , a poszczególnych RNA oraz DNA 0,5 μM . Do 10 μl próbki dodano 2 μl 10% glicerolu w 10 mM Tris-HCl pH 7,5 tuż przed nałożeniem do dołków. Elektroforezę w 0,7% żelu agarozowym prowadzono w temperaturze 4°C przy 5 W przez 2 godziny w buforze 1x TBE. Obrazy żelu uzyskano za pomocą fluorescencyjnego analizatora obrazu FUJI FLA-5100.

2.34 Mikroskopia konfokalna

Komórki MDCK wysiewano w ilości $1,2 \times 10^5$ komórek na dołek w naczyniach do hodowli komórek CELLview (Greiner Bio One) ze szklanym dnem i hodowano w medium hodowlanym w temperaturze 37°C, w atmosferze z 5% CO₂, przy wilgotności 96% przez 24 godziny. Następnie, medium hodowlane zastąpiono medium hodowlanym z dodatkiem 4 μM koniugatów PNA-neamina znakowanych fluorescencyjnie na 12 godzin. Po inkubacji komórki płukano kilkakrotnie roztworem 1x PBS i obserwowano pod mikroskopem konfokalnym.

2.35 Inkubacja (+)RNA5 w obecności rybozymów w warunkach *in vitro*

Pełnej długości segment (+)RNA5 wirusa grypy otrzymany w wyniku transkrypcji *in vitro* poddano fałdowaniu. Inkubowano RNA w buforze do fałdowania (+)RNA5 przez 5 min w 65°C, a następnie poddano powolnemu chłodzeniu. W kolejnym kroku do porcji roztworu o objętości 9 μl zawierającej 2 pmole (+)RNA5 dodano 1 μl roztworu zawierającego 50-krotny nadmiar testowanego rybozymu (100 pmol) rozpuszczonego w buforze do fałdowania (+)RNA5. Po 6 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C próbki o objętości 10 μl strącono w etanolu. Następnie, RNA poddano odwrotnej transkrypcji ze starterami M4C, M7C, RT5C, specyficznymi dla (+)RNA5 znakowanymi barwnikiem fluorescencyjnym FAM (Tabela 5) zgodnie z protokołem odwrotnej transkrypcji opisanym powyżej i strącono w etanolu. Produkt rozpuszczony w 6 μl wody przygotowano do elektroforezy kapilarnej.

2.36 Drabinki dideoksynukleotydowe do elektroforezy kapilarnej

W celu określenia miejsc degradacji RNA w sekwencji (+)RNA5 sporządzono drabinki z użyciem 5'-O-trójfosforanów dideoksynukleozydów. Początkowo, poddano hybrydyzacji starter do RNA zgodnie z procedurą pierwszego etapu odwrotnej transkrypcji opisaną powyżej. Następnie przygotowano mieszaninę reakcyjną do drugiego etapu, w której roztwór dNTP zastąpiono zestawem trzech dNTP o stężeniu

końcowym 0,5 mM każdy oraz parą tych samych dNTP i ddNTP o stężeniu końcowym odpowiednio 0,75 mM i 5 mM. Dalsze postępowanie było takie samo jak opisane wyżej dla procedury odwrotnej transkrypcji.

2.37 Przygotowanie próbek do elektroforezy kapilarnej

Próbki po reakcji odwrotnej transkrypcji poddano hydrolizie w celu usunięcia RNA poprzez dodanie 5 μ l 1 M NaOH i inkubację w temperaturze 95°C przez 5 min. Następnie, mieszaninę przeniesiono na lód i zobojętniono przez dodanie 5 μ l 1 M HCl. Całość strącono zgodnie ze standardową procedurą opisaną powyżej. Osad zawierający cDNA wysuszono i rozpuszczono w 10 μ l wody.

2.38 Elektroforeza kapilarna

Oczyszczony cDNA był poddawany kapilarnemu rozdzielaniu elektroforetycznemu w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

DODATEK

1. Konserwatywne pary zasad (+)RNA 5 wśród szczepów wirusa grypy typu A.

Tabela 8. Konserwatywne pary zasad³⁸ użyte jako ograniczenia fałdowania (+)RNA5 A/California/04/2009 (H1N1) przez algorytm Dynalign programu RNAstructure 6.1, które wprowadzono w celu ukierunkowania fałdowania (+)RNA5 szczepu A/Vietnam/1203/2004 (H5N1).

Nukleotydy tworzące pary zasad (numeracja od końca 5')		Konserwatywność pary zasad dla wirusów grypy typu A
6	1560	99,9
7	1559	99,8
9	1557	99,6
10	1556	99,4
17	38	99,8
21	35	99,8
22	34	99,9
23	33	99,9
24	32	99,9
25	31	100,0
26	30	100,0
47	104	99,8
48	103	100,0
49	102	100,0
50	101	99,9
51	100	99,7
53	97	99,9
55	95	99,9
60	94	100,0
69	83	100,0
70	82	99,7
107	227	99,9
109	225	99,5
110	224	100,0
115	217	100,0
118	215	100,0
119	214	99,9
121	212	99,7
122	211	99,8
125	174	100,0
126	173	99,4
127	172	99,9
130	169	99,9
133	165	100,0
136	163	99,7
138	161	99,9
139	160	100,0
140	159	99,9
184	209	99,9
191	203	100,0
244	1533	99,8
248	1529	100,0
249	1528	99,1
250	1526	100,0
251	1525	99,8
253	1523	99,9
254	1522	99,9
256	1520	100,0
257	1519	99,9
259	1518	100,0
266	1512	100,0
267	1511	100,0
268	1510	99,6
269	1509	100,0
270	1508	100,0
271	1507	100,0
272	1506	99,8
274	1503	99,8
276	1501	100,0
279	1499	100,0
280	1498	99,9
281	1497	99,8
283	334	100,0
285	332	100,0
291	326	100,0
292	325	100,0
293	323	100,0
296	320	99,2
301	310	99,9
302	309	100,0

338	1482	99,8
339	1481	100,0
340	1480	99,3
347	376	99,0
349	374	100,0
350	373	100,0
357	368	100,0
359	366	99,7
389	443	100,0
392	440	100,0
398	434	99,4
405	431	100,0
406	430	99,4
407	429	99,7
409	427	99,8
452	491	100,0
455	488	100,0
456	487	100,0
460	484	100,0
462	482	100,0
466	478	100,0
499	1444	99,8
501	1442	100,0
502	1441	99,8
503	1440	100,0
505	1438	100,0
506	1430	100,0
509	1427	100,0
517	1420	99,9
518	1419	100,0
520	1417	99,7
522	1415	100,0
523	1414	100,0
526	791	100,0
527	790	100,0
530	788	99,9
533	785	99,9
536	780	100,0
537	779	100,0
538	778	100,0
541	775	100,0
542	774	99,8
545	773	100,0
548	770	99,9
551	766	100,0

553	764	100,0
554	763	100,0
557	670	100,0
559	668	100,0
560	667	100,0
561	666	99,2
562	665	100,0
566	663	100,0
567	662	100,0
568	661	99,9
569	660	100,0
571	658	99,8
575	654	100,0
577	593	100,0
580	590	100,0
581	589	99,9
613	622	99,7
623	649	100,0
625	647	99,9
626	646	99,9
671	743	100,0
679	736	100,0
680	735	100,0
691	722	99,9
692	721	99,8
694	719	100,0
697	714	100,0
698	713	100,0
700	711	99,9
701	710	99,9
745	755	99,7
746	754	99,9
797	808	100,0
811	1408	99,9
812	1407	99,4
823	1397	99,7
824	1396	99,4
829	1369	100,0
839	849	99,4
841	847	100,0
842	846	100,0
851	907	100,0
854	904	100,0
856	902	100,0
861	895	99,9

866	890	100,0
868	887	99,9
869	886	100,0
873	882	99,2
874	881	100,0
914	931	99,8
916	929	100,0
917	928	100,0
934	1243	99,7
938	1238	100,0
940	1236	99,9
941	1235	99,9
944	1232	99,8
952	1226	100,0
953	1225	100,0
956	1224	99,2
957	1223	99,8
961	1217	99,6
962	1216	99,8
965	1213	100,0
967	1211	99,4
974	1205	99,8
975	1204	100,0
976	1203	100,0
977	1067	100,0
979	1065	99,2
980	1064	100,0
984	1060	99,8
989	1004	100,0
992	1001	99,9
1007	1037	100,0
1009	1035	100,0
1010	1034	100,0
1039	1055	99,9
1040	1054	100,0
1043	1052	100,0
1044	1051	99,9
1073	1197	100,0
1075	1195	99,8
1080	1193	100,0
1081	1192	99,9
1082	1191	100,0

1085	1189	99,9
1087	1187	99,7
1088	1186	99,8
1090	1106	100,0
1091	1105	100,0
1112	1121	100,0
1130	1172	100,0
1136	1166	100,0
1139	1165	99,9
1144	1160	100,0
1145	1159	100,0
1148	1157	99,1
1150	1155	100,0
1246	1253	99,5
1247	1252	99,7
1258	1365	100,0
1259	1364	100,0
1265	1358	100,0
1270	1352	100,0
1273	1349	100,0
1274	1348	100,0
1279	1294	100,0
1280	1293	100,0
1281	1292	100,0
1300	1306	100,0
1313	1327	99,7
1316	1324	100,0
1317	1323	99,3
1375	1388	100,0
1376	1387	100,0
1377	1386	99,3
1378	1385	99,8
1379	1384	99,8
1453	1477	100,0
1455	1475	99,7
1456	1474	100,0
1457	1473	99,9
1459	1472	100,0
1460	1471	100,0
1461	1470	99,9
1462	1469	100,0
1487	1493	99,8

BIBLIOGRAFIA

1. Public health round-up. *Bull World Health Organ* **2019**, 97 (4), 248-249.
2. Shin, W. J.; Seong, B. L., Novel antiviral drug discovery strategies to tackle drug-resistant mutants of influenza virus strains. *Expert Opin Drug Discov* **2019**, 14 (2), 153-168.
3. Samji, T., Influenza A: understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med* **2009**, 82 (4), 153-9.
4. Bouvier, N. M.; Palese, P., The biology of influenza viruses. *Vaccine* **2008**, 26 Suppl 4, D49-53.
5. Te Velthuis, A. J.; Fodor, E., Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nat Rev Microbiol* **2016**, 14 (8), 479-93.
6. Lee, N.; Le Sage, V.; Nanni, A. V.; Snyder, D. J.; Cooper, V. S.; Lakdawala, S. S., Genome-wide analysis of influenza viral RNA and nucleoprotein association. *Nucleic Acids Res* **2017**, 45 (15), 8968-8977.
7. Brown, E. G., Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother* **2000**, 54 (4), 196-209.
8. Nelson, M. I.; Holmes, E. C., The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet* **2007**, 8 (3), 196-205.
9. Zheng, W.; Tao, Y. J., Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. *FEBS Lett* **2013**, 587 (8), 1206-14.
10. Zhang, H.; Hale, B. G.; Xu, K.; Sun, B., Viral and host factors required for avian H5N1 influenza A virus replication in mammalian cells. *Viruses* **2013**, 5 (6), 1431-46.
11. Bolte, H.; Rosu, M. E.; Hagelauer, E.; Garcia-Sastre, A.; Schwemmle, M., Packaging of the Influenza Virus Genome Is Governed by a Plastic Network of RNA- and Nucleoprotein-Mediated Interactions. *J Virol* **2019**, 93 (4), e01861-18.
12. Fournier, E.; Moules, V.; Essere, B.; Paillart, J. C.; Sirbat, J. D.; Isel, C.; Cavalier, A.; Rolland, J. P.; Thomas, D.; Lina, B.; Marquet, R., A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments. *Nucleic Acids Res* **2012**, 40 (5), 2197-209.
13. Fournier, E.; Moules, V.; Essere, B.; Paillart, J. C.; Sirbat, J. D.; Cavalier, A.; Rolland, J. P.; Thomas, D.; Lina, B.; Isel, C.; Marquet, R., Interaction network linking the human H3N2 influenza A virus genomic RNA segments. *Vaccine* **2012**, 30 (51), 7359-67.
14. Gavazzi, C.; Isel, C.; Fournier, E.; Moules, V.; Cavalier, A.; Thomas, D.; Lina, B.; Marquet, R., An in vitro network of intermolecular interactions between viral RNA segments of an avian H5N2 influenza A virus: comparison with a human H3N2 virus. *Nucleic Acids Res* **2013**, 41 (2), 1241-54.
15. Gerber, M.; Isel, C.; Moules, V.; Marquet, R., Selective packaging of the influenza A genome and consequences for genetic reassortment. *Trends Microbiol* **2014**, 22 (8), 446-55.
16. Ferhadian, D.; Contrant, M.; Printz-Schweigert, A.; Smyth, R. P.; Paillart, J. C.; Marquet, R., Structural and Functional Motifs in Influenza Virus RNAs. *Front Microbiol* **2018**, 9, 559.
17. Hsu, M. T.; Parvin, J. D.; Gupta, S.; Krystal, M.; Palese, P., Genomic RNAs of Influenza-Viruses Are Held in a Circular Conformation in Virions and in Infected-Cells by a Terminal Panhandle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, 84 (22), 8140-8144.
18. Honda, A.; Ueda, K.; Nagata, K.; Ishihama, A., Identification of the RNA polymerase-binding site on genome RNA of influenza virus. *J Biochem* **1987**, 102 (5), 1241-9.

19. Baudin, F.; Bach, C.; Cusack, S.; Ruigrok, R. W., Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO J* **1994**, *13* (13), 3158-65.
20. Fodor, E.; Pritlove, D. C.; Brownlee, G. G., The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J Virol* **1994**, *68* (6), 4092-6.
21. Fodor, E.; Pritlove, D. C.; Brownlee, G. G., Characterization of the RNA-fork model of virion RNA in the initiation of transcription in influenza A virus. *J Virol* **1995**, *69* (7), 4012-9.
22. Flick, R.; Neumann, G.; Hoffmann, E.; Neumeier, E.; Hobom, G., Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure. *RNA* **1996**, *2* (10), 1046-57.
23. Desselberger, U.; Racaniello, V. R.; Zazra, J. J.; Palese, P., 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* **1980**, *8* (3), 315-328.
24. Pflug, A.; Guilligay, D.; Reich, S.; Cusack, S., Structure of influenza A polymerase bound to the viral RNA promoter. *Nature* **2014**, *516* (7531), 355-60.
25. Michalak, P.; Soszynska-Jozwiak, M.; Biala, E.; Moss, W. N.; Keszy, J.; Szutkowska, B.; Lenartowicz, E.; Kierzek, R.; Kierzek, E., Secondary structure of the segment 5 genomic RNA of influenza A virus and its application for designing antisense oligonucleotides. *Sci Rep* **2019**, *9* (1), 3801.
26. Ruszkowska, A.; Lenartowicz, E.; Moss, W. N.; Kierzek, R.; Kierzek, E., Secondary structure model of the naked segment 7 influenza A virus genomic RNA. *Biochem J* **2016**, *473*, 4327-4348.
27. Lenartowicz, E.; Nogales, A.; Kierzek, E.; Kierzek, R.; Martinez-Sobrido, L.; Turner, D. H., Antisense Oligonucleotides Targeting Influenza A Segment 8 Genomic RNA Inhibit Viral Replication. *Nucleic Acid Ther* **2016**, *26* (5), 277-285.
28. Leahy, M. B.; Pritlove, D. C.; Poon, L. L.; Brownlee, G. G., Mutagenic analysis of the 5' arm of the influenza A virus virion RNA promoter defines the sequence requirements for endonuclease activity. *J Virol* **2001**, *75* (1), 134-42.
29. Leahy, M. B.; Dobbyn, H. C.; Brownlee, G. G., Hairpin loop structure in the 3' arm of the influenza A virus virion RNA promoter is required for endonuclease activity. *J Virol* **2001**, *75* (15), 7042-9.
30. Luo, G. X.; Luytjes, W.; Enami, M.; Palese, P., The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol* **1991**, *65* (6), 2861-7.
31. Pflug, A.; Lukarska, M.; Resa-Infante, P.; Reich, S.; Cusack, S., Structural insights into RNA synthesis by the influenza virus transcription-replication machine. *Virus Res* **2017**, *234*, 103-117.
32. Wang, J.; Li, J.; Zhao, L.; Cao, M.; Deng, T., Dual Roles of the Hemagglutinin Segment-Specific Noncoding Nucleotides in the Extended Duplex Region of the Influenza A Virus RNA Promoter. *J Virol* **2017**, *91* (1), e01931-16.
33. Park, C. J.; Bae, S. H.; Lee, M. K.; Varani, G.; Choi, B. S., Solution structure of the influenza A virus cRNA promoter: implications for differential recognition of viral promoter structures by RNA-dependent RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **2003**, *31* (11), 2824-32.
34. Tchatalbachev, S.; Flick, R.; Hobom, G., The packaging signal of influenza viral RNA molecules. *RNA* **2001**, *7* (7), 979-89.
35. Crow, M.; Deng, T.; Addley, M.; Brownlee, G. G., Mutational analysis of the influenza virus cRNA promoter and identification of nucleotides critical for replication. *J Virol* **2004**, *78* (12), 6263-70.

36. Liu, G.; Zhou, Y., Cytoplasm and Beyond: Dynamic Innate Immune Sensing of Influenza A Virus by RIG-I. *J Virol* **2019**, *93* (8), e02299-18.
37. Lenartowicz, E.; Kesy, J.; Ruzzkowska, A.; Soszynska-Jozwiak, M.; Michalak, P.; Moss, W.; Turner, D.; Kierzek, R.; Kierzek, E., Self-Folding of Naked Segment 8 Genomic RNA of Influenza A Virus. *PLoS One* **2016**, *11* (2), e0148281.
38. Soszynska-Jozwiak, M.; Michalak, P.; Moss, W. N.; Kierzek, R.; Kesy, J.; Kierzek, E., Influenza virus segment 5 (+) RNA - secondary structure and new targets for antiviral strategies. *Sci Rep* **2017**, *7*, 15041.
39. Soszynska-Jozwiak, M.; Michalak, P.; Moss, W.; Kierzek, R.; Kierzek, E., 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* **2015**, *10* (10), e0141132.
40. Essere, B.; Yver, M.; Gavazzi, C.; Terrier, O.; Isel, C.; Fournier, E.; Giroux, F.; Textoris, J.; Julien, T.; Socratous, C.; Rosa-Calatrava, M.; Lina, B.; Marquet, R.; Moules, V., Critical role of segment-specific packaging signals in genetic reassortment of influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110* (40), E3840-8.
41. Kobayashi, Y.; Dadonaite, B.; van Doremalen, N.; Suzuki, Y.; Barclay, W. S.; Pybus, O. G., Computational and molecular analysis of conserved influenza A virus RNA secondary structures involved in infectious virion production. *RNA Biol* **2016**, *13* (9), 883-94.
42. Gulyaev, A. P.; Heus, H. A.; Olsthoorn, R. C., An RNA conformational shift in recent H5N1 influenza A viruses. *Bioinformatics* **2007**, *23* (3), 272-6.
43. Ilyinskii, P. O.; Schmidt, T.; Lukashev, D.; Meriin, A. B.; Thoidis, G.; Frishman, D.; Shneider, A. M., Importance of mRNA Secondary Structural Elements for the Expression of Influenza Virus Genes. *Omic* **2009**, *13* (5), 421-430.
44. Moss, W. N.; Priore, S. F.; Turner, D. H., Identification of potential conserved RNA secondary structure throughout influenza A coding regions. *RNA* **2011**, *17* (6), 991-1011.
45. Priore, S. F.; Kierzek, E.; Kierzek, R.; Baman, J. R.; Moss, W. N.; Dela-Moss, L. I.; Turner, D. H., Secondary Structure of a Conserved Domain in the Intron of Influenza A NS1 mRNA. *PLoS One* **2013**, *8* (9), e70615.
46. Jiang, T.; Kennedy, S. D.; Moss, W. N.; Kierzek, E.; Turner, D. H., Secondary structure of a conserved domain in an intron of influenza A M1 mRNA. *Biochemistry* **2014**, *53* (32), 5236-48.
47. Jiang, T.; Nogales, A.; Baker, S. F.; Martinez-Sobrido, L.; Turner, D. H., Mutations Designed by Ensemble Defect to Misfold Conserved RNA Structures of Influenza A Segments 7 and 8 Affect Splicing and Attenuate Viral Replication in Cell Culture. *PLoS One* **2016**, *11* (6), e0156906.
48. Priore, S. F.; Kauffmann, A. D.; Baman, J. R.; Turner, D. H., The Influenza A PB1-F2 and N40 Start Codons Are Contained within an RNA Pseudoknot. *Biochemistry* **2015**, *54* (22), 3413-5.
49. Gallagher, J. R.; Torian, U.; McCraw, D. M.; Harris, A. K., Structural studies of influenza virus RNPs by electron microscopy indicate molecular contortions within NP supra-structures. *J Struct Biol* **2017**, *197* (3), 294-307.
50. Williams, G. D.; Townsend, D.; Wylie, K. M.; Kim, P. J.; Amarasinghe, G. K.; Kutluay, S. B.; Boon, A. C. M., Nucleotide resolution mapping of influenza A virus nucleoprotein-RNA interactions reveals RNA features required for replication. *Nat Commun* **2018**, *9* (1), 465.

51. Simon, L. M.; Morandi, E.; Luganini, A.; Gribaudo, G.; Martinez-Sobrido, L.; Turner, D. H.; Oliviero, S.; Incarnato, D., In vivo analysis of influenza A mRNA secondary structures identifies critical regulatory motifs. *Nucleic Acids Res* **2019**, gkz318.
52. Asha, K.; Kumar, P.; Sanicas, M.; Meseko, C. A.; Khanna, M.; Kumar, B., Advancements in Nucleic Acid Based Therapeutics against Respiratory Viral Infections. *J Clin Med* **2018**, *8* (1), E6.
53. Zamecnik, P. C.; Stephenson, M. L., Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1978**, *75* (1), 280-4.
54. Smith, C. I. E.; Zain, R., Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2019**, *59*, 605-630.
55. Zerial, A.; Thuong, N. T.; Helene, C., Selective inhibition of the cytopathic effect of type A influenza viruses by oligodeoxynucleotides covalently linked to an intercalating agent. *Nucleic Acids Res* **1987**, *15* (23), 9909-19.
56. Kumar, P.; Kumar, B.; Rajput, R.; Saxena, L.; Banerjea, A. C.; Khanna, M., Cross-protective effect of antisense oligonucleotide developed against the common 3' NCR of influenza A virus genome. *Mol Biotechnol* **2013**, *55* (3), 203-11.
57. Giannecchini, S.; Clausi, V.; Nosi, D.; Azzi, A., Oligonucleotides derived from the packaging signal at the 5' end of the viral PB2 segment specifically inhibit influenza virus in vitro. *Arch Virol* **2009**, *154* (5), 821-32.
58. Giannecchini, S.; Wise, H. M.; Digard, P.; Clausi, V.; Del Poggetto, E.; Vesco, L.; Puzelli, S.; Donatelli, I.; Azzi, A., Packaging signals in the 5'-ends of influenza virus PA, PB1, and PB2 genes as potential targets to develop nucleic-acid based antiviral molecules. *Antiviral Res* **2011**, *92* (1), 64-72.
59. Duan, M.; Zhou, Z.; Lin, R. X.; Yang, J.; Xia, X. Z.; Wang, S. Q., In vitro and in vivo protection against the highly pathogenic H5N1 influenza virus by an antisense phosphorothioate oligonucleotide. *Antivir Ther* **2008**, *13* (1), 109-14.
60. Hatta, T.; Takai, K.; Nakada, S.; Yokota, T.; Takaku, H., Specific inhibition of influenza virus RNA polymerase and nucleoprotein genes expression by liposomally endocapsulated antisense phosphorothioate oligonucleotides: penetration and localization of oligonucleotides in clone 76 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **1997**, *232* (2), 545-9.
61. Abe, T.; Mizuta, T.; Hatta, T.; Miyano-Kurosaki, N.; Fujiwara, M.; Takai, K.; Shigeta, S.; Yokota, T.; Takaku, H., Antisense therapy of influenza. *Eur J Pharm Sci* **2001**, *13* (1), 61-9.
62. Mizuta, T.; Fujiwara, M.; Abe, T.; Miyano-Kurosaki, N.; Yokota, T.; Shigeta, S.; Takaku, H., Inhibitory effects of an antisense oligonucleotide in an experimentally infected mouse model of influenza A virus. *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, *279* (1), 158-61.
63. Kabanov, A. V.; Vinogradov, S. V.; Ovcharenko, A. V.; Krivonos, A. V.; Melik-Nubarov, N. S.; Kiselev, V. I.; Severin, E. S., 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* **1990**, *259* (2), 327-30.
64. Leiter, J. M.; Agrawal, S.; Palese, P.; Zamecnik, P. C., Inhibition of influenza virus replication by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, *87* (9), 3430-4.
65. Zhang, T.; Wang, T. C.; Zhao, P. S.; Liang, M.; Gao, Y. W.; Yang, S. T.; Qin, C.; Wang, C. Y.; Xia, X. Z., Antisense oligonucleotides targeting the RNA binding

- region of the NP gene inhibit replication of highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *Int Immunopharmacol* **2011**, *11* (12), 2057-61.
66. Wu, Y.; Zhang, G.; Li, Y.; Jin, Y.; Dale, R.; Sun, L. Q.; Wang, M., Inhibition of highly pathogenic avian H5N1 influenza virus replication by RNA oligonucleotides targeting NS1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, *365* (2), 369-74.
 67. Gabriel, G.; Nordmann, A.; Stein, D. A.; Iversen, P. L.; Klenk, H. D., Morpholino oligomers targeting the PB1 and NP genes enhance the survival of mice infected with highly pathogenic influenza A H7N7 virus. *J Gen Virol* **2008**, *89* (Pt 4), 939-48.
 68. Lupfer, C.; Stein, D. A.; Mourich, D. V.; Tepper, S. E.; Iversen, P. L.; Pastey, M., Inhibition of influenza A H3N8 virus infections in mice by morpholino oligomers. *Arch Virol* **2008**, *153* (5), 929-37.
 69. Ge, Q.; Pastey, M.; Kobasa, D.; Puthavathana, P.; Lupfer, C.; Bestwick, R. K.; Iversen, P. L.; Chen, J.; Stein, D. A., Inhibition of multiple subtypes of influenza A virus in cell cultures with morpholino oligomers. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**, *50* (11), 3724-33.
 70. Zhang, T.; Zhao, P. S.; Zhang, W.; Liang, M.; Gao, Y. W.; Yang, S. T.; Wang, T. C.; Qin, C.; Wang, C. Y.; Xia, X. Z., Antisense oligonucleotide inhibits avian influenza virus H5N1 replication by single chain antibody delivery system. *Vaccine* **2011**, *29* (8), 1558-64.
 71. Martelli, F.; Salata, C.; Calistri, A.; Parolin, C.; Azzi, A.; Palu, G.; Gianecchini, S., Small RNAs targeting the 5' end of the viral polymerase gene segments specifically interfere with influenza type A virus replication. *J Biotechnol* **2015**, *210*, 85-90.
 72. Levina, A. S.; Repkova, M. N.; Mazurkova, N. A.; Makarevich, E. V.; Ismagilov, Z. R.; Zarytova, V. F., Knockdown of different influenza A virus subtypes in cell culture by a single antisense oligodeoxyribonucleotide. *Int J Antimicrob Agents* **2015**, *46* (1), 125-8.
 73. Beigel, J. H.; Voell, J.; Munoz, P.; Kumar, P.; Brooks, K. M.; Zhang, J.; Iversen, P.; Heald, A.; Wong, M.; Davey, R. T., Safety, tolerability, and pharmacokinetics of radavirsen (AVI-7100), an antisense oligonucleotide targeting influenza A M1/M2 translation. *Brit J Clin Pharmacol* **2018**, *84* (1), 25-34.
 74. Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L.; Behrens, C.; Freier, S. M.; Driver, D. A.; Berg, R. H.; Kim, S. K.; Norden, B.; Nielsen, P. E., PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* **1993**, *365* (6446), 566-8.
 75. Adams, B. D.; Parsons, C.; Walker, L.; Zhang, W. C.; Slack, F. J., Targeting noncoding RNAs in disease. *J Clin Invest* **2017**, *127* (3), 761-771.
 76. Hyrup, B.; Nielsen, P. E., Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications. *Bioorg Med Chem* **1996**, *4* (1), 5-23.
 77. Lonkar, P.; Kim, K. H.; Kuan, J. Y.; Chin, J. Y.; Rogers, F. A.; Knauert, M. P.; Kole, R.; Nielsen, P. E.; Glazer, P. M., Targeted correction of a thalassemia-associated beta-globin mutation induced by pseudo-complementary peptide nucleic acids. *Nucleic Acids Res* **2009**, *37* (11), 3635-44.
 78. Shiraishi, T.; Nielsen, P. E., Improved cellular uptake of antisense peptide nucleic acids by conjugation to a cell-penetrating peptide and a lipid domain. *Methods Mol Biol* **2011**, *751*, 209-21.
 79. Pellestor, F.; Paulasova, P., The peptide nucleic acids (PNAs), powerful tools for molecular genetics and cytogenetics. *Eur J Hum Genet* **2004**, *12* (9), 694-700.
 80. Wang, G.; Xu, X. S., Peptide nucleic acid (PNA) binding-mediated gene regulation. *Cell Res* **2004**, *14* (2), 111-6.

81. Corradini, R.; Sforza, S.; Tedeschi, T.; Totsingan, F.; Manicardi, A.; Marchelli, R., Peptide nucleic acids with a structurally biased backbone. Updated review and emerging challenges. *Curr Top Med Chem* **2011**, *11* (12), 1535-54.
82. Endoh, T.; Hnedzko, D.; Rozners, E.; Sugimoto, N., Nucleobase-Modified PNA Suppresses Translation by Forming a Triple Helix with a Hairpin Structure in mRNA InVitro and in Cells. *Angew Chem-Int Edit* **2016**, *55* (3), 899-903.
83. Demidov, V.; Frank-Kamenetskii, M. D.; Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E., Sequence selective double strand DNA cleavage by peptide nucleic acid (PNA) targeting using nuclease S1. *Nucleic Acids Res* **1993**, *21* (9), 2103-7.
84. Winssinger, N.; Damoiseaux, R.; Tully, D. C.; Geierstanger, B. H.; Burdick, K.; Harris, J. L., PNA-encoded protease substrate microarrays. *Chem Biol* **2004**, *11* (10), 1351-60.
85. Komiyama, M.; Ye, S.; Liang, X.; Yamamoto, Y.; Tomita, T.; Zhou, J. M.; Aburatani, H., PNA for one-base differentiating protection of DNA from nuclease and its use for SNPs detection. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (13), 3758-62.
86. Olsen, A. G.; Dahl, O.; Nielsen, P. E., A novel PNA-monomer for recognition of thymine in triple-helix structures. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, *22* (5-8), 1331-3.
87. Bentin, T.; Hansen, G. I.; Nielsen, P. E., Structural diversity of target-specific homopyrimidine peptide nucleic acid-dsDNA complexes. *Nucleic Acids Res* **2006**, *34* (20), 5790-9.
88. Li, M.; Zengya, T.; Rozners, E., Short peptide nucleic acids bind strongly to homopurine tract of double helical RNA at pH 5.5. *J Am Chem Soc* **2010**, *132* (25), 8676-81.
89. Szabat, M.; Kierzek, E.; Kierzek, R., Modified RNA triplexes: Thermodynamics, structure and biological potential. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 13023.
90. Boffa, L. C.; Morris, P. L.; Carpaneto, E. M.; Louissaint, M.; Allfrey, V. G., Invasion of the CAG triplet repeats by a complementary peptide nucleic acid inhibits transcription of the androgen receptor and TATA-binding protein genes and correlates with refolding of an active nucleosome containing a unique AR gene sequence. *J Biol Chem* **1996**, *271* (22), 13228-33.
91. Hanvey, J. C.; Peffer, N. J.; Bisi, J. E.; Thomson, S. A.; Cadilla, R.; Josey, J. A.; Ricca, D. J.; Hassman, C. F.; Bonham, M. A.; Au, K. G.; et al., Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids. *Science* **1992**, *258* (5087), 1481-5.
92. Knudsen, H.; Nielsen, P. E., Antisense properties of duplex- and triplex-forming PNAs. *Nucleic Acids Res* **1996**, *24* (3), 494-500.
93. Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Buchardt, O., Sequence-specific transcription arrest by peptide nucleic acid bound to the DNA template strand. *Gene* **1994**, *149* (1), 139-45.
94. Vickers, T. A.; Griffith, M. C.; Ramasamy, K.; Risen, L. M.; Freier, S. M., Inhibition of NF-kappa B specific transcriptional activation by PNA strand invasion. *Nucleic Acids Res* **1995**, *23* (15), 3003-8.
95. Basu, S.; Wickstrom, E., Synthesis and characterization of a peptide nucleic acid conjugated to a D-peptide analog of insulin-like growth factor 1 for increased cellular uptake. *Bioconjug Chem* **1997**, *8* (4), 481-8.
96. Nastruzzi, C.; Cortesi, R.; Esposito, E.; Gambari, R.; Borgatti, M.; Bianchi, N.; Feriotta, G.; Mischiati, C., Liposomes as carriers for DNA-PNA hybrids. *J Control Release* **2000**, *68* (2), 237-49.
97. Riguet, E.; Tripathi, S.; Chaubey, B.; Desire, J.; Pandey, V. N.; Decout, J. L., A peptide nucleic acid-neamine conjugate that targets and cleaves HIV-1 TAR RNA inhibits viral replication. *J Med Chem* **2004**, *47* (20), 4806-4809.

98. Das, I.; Desire, J.; Manvar, D.; Baussanne, I.; Pandey, V. N.; Decout, J. L., A Peptide Nucleic Acid-Aminosugar Conjugate Targeting Transactivation Response Element of HIV-1 RNA Genome Shows a High Bioavailability in Human Cells and Strongly Inhibits Tat-Mediated Transactivation of HIV-1 Transcription. *J Med Chem* **2012**, *55* (13), 6021-6032.
99. Rozners, E., Recent advances in chemical modification of Peptide nucleic acids. *J Nucleic Acids* **2012**, *2012*, 518162.
100. Devi, G.; Zhou, Y.; Zhong, Z.; Toh, D. F.; Chen, G., RNA triplexes: from structural principles to biological and biotech applications. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2015**, *6* (1), 111-28.
101. Zengya, T.; Gupta, P.; Rozners, E., Sequence selective recognition of double-stranded RNA using triple helix-forming peptide nucleic acids. *Methods Mol Biol* **2014**, *1050*, 83-94.
102. Toh, D. K.; Devi, G.; Patil, K. M.; Qu, Q.; Maraswami, M.; Xiao, Y.; Loh, T. P.; Zhao, Y.; Chen, G., Incorporating a guanidine-modified cytosine base into triplex-forming PNAs for the recognition of a C-G pyrimidine-purine inversion site of an RNA duplex. *Nucleic Acids Res* **2016**, *44* (19), 9071-9082.
103. Toh, D. K.; Patil, K. M.; Chen, G., Sequence-specific and Selective Recognition of Double-stranded RNAs over Single-stranded RNAs by Chemically Modified Peptide Nucleic Acids. *J Vis Exp* **2017**, (127), 56221.
104. Puah, R. Y.; Jia, H.; Maraswami, M.; Toh, D. K.; Ero, R.; Yang, L.; Patil, K. M.; Ong, A. A. L.; Krishna, M. S.; Sun, R.; Tong, C.; Huang, M.; Chen, X.; Loh, T. P.; Gao, Y. G.; Liu, D. X.; Chen, G., Selective Binding to mRNA Duplex Regions by Chemically Modified Peptide Nucleic Acids Stimulates Ribosomal Frameshifting. *Biochemistry* **2018**, *57* (1), 149-159.
105. Devi, G.; Yuan, Z.; Lu, Y.; Zhao, Y.; Chen, G., Incorporation of thio-pseudoisocytosine into triplex-forming peptide nucleic acids for enhanced recognition of RNA duplexes. *Nucleic Acids Res* **2014**, *42* (6), 4008-18.
106. Patil, K. M.; Toh, D. K.; Yuan, Z.; Meng, Z.; Shu, Z.; Zhang, H.; Ong, A. A. L.; Krishna, M. S.; Lu, L.; Lu, Y.; Chen, G., Incorporating uracil and 5-halouracils into short peptide nucleic acids for enhanced recognition of A-U pairs in dsRNAs. *Nucleic Acids Res* **2018**, *46* (15), 7506-7521.
107. Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1998**, *391* (6669), 806-11.
108. Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **2001**, *411* (6836), 494-8.
109. Nawrot, B.; Sipa, K., Chemical and structural diversity of siRNA molecules. *Curr Top Med Chem* **2006**, *6* (9), 913-925.
110. Lopez-Fraga, M.; Wright, N.; Jimenez, A., RNA interference-based therapeutics: new strategies to fight infectious disease. *Infect Disord Drug Targets* **2008**, *8* (4), 262-73.
111. Ge, Q.; McManus, M. T.; Nguyen, T.; Shen, C. H.; Sharp, P. A.; Eisen, H. N.; Chen, J. Z., RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100* (5), 2718-2723.
112. Ge, Q.; Filip, L.; Bai, A.; Nguyen, T.; Eisen, H. N.; Chen, J., Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101* (23), 8676-81.

113. Tompkins, S. M.; Lo, C. Y.; Tumpey, T. M.; Epstein, S. L., Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101* (23), 8682-6.
114. McCown, M.; Diamond, M. S.; Pekosz, A., The utility of siRNA transcripts produced by RNA polymerase I in down regulating viral gene expression and replication of negative- and positive-strand RNA viruses. *Virology* **2003**, *313* (2), 514-24.
115. Hui, E. K.; Yap, E. M.; An, D. S.; Chen, I. S.; Nayak, D. P., Inhibition of influenza virus matrix (M1) protein expression and virus replication by U6 promoter-driven and lentivirus-mediated delivery of siRNA. *J Gen Virol* **2004**, *85* (Pt 7), 1877-84.
116. Jain, B.; Jain, A.; Prakash, O.; Singh, A. K.; Dangi, T.; Singh, M.; Singh, K. P., In vitro validation of self designed "universal human Influenza A siRNA". *Indian J Exp Biol* **2015**, *53* (8), 514-21.
117. Sui, H. Y.; Zhao, G. Y.; Huang, J. D.; Jin, D. Y.; Yuen, K. Y.; Zheng, B. J., Small interfering RNA targeting m2 gene induces effective and long term inhibition of influenza A virus replication. *PLoS One* **2009**, *4* (5), e5671.
118. Zhou, H.; Jin, M.; Yu, Z.; Xu, X.; Peng, Y.; Wu, H.; Liu, J.; Liu, H.; Cao, S.; Chen, H., Effective small interfering RNAs targeting matrix and nucleocapsid protein gene inhibit influenza A virus replication in cells and mice. *Antiviral Res* **2007**, *76* (2), 186-93.
119. Zhang, W.; Wang, C. Y.; Yang, S. T.; Qin, C.; Hu, J. L.; Xia, X. Z., Inhibition of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 replication by the small interfering RNA targeting polymerase A gene. *Biochem Biophys Res Commun* **2009**, *390* (3), 421-6.
120. Zhang, P.; Wang, J. G.; Wan, J. G.; Liu, W. Q., Screening efficient siRNAs in vitro as the candidate genes for chicken anti-avian influenza virus H5N1 breeding. *Mol Biol (Mosk)* **2010**, *44* (1), 42-50.
121. Zhiqiang, W.; Yaowu, Y.; Fan, Y.; Jian, Y.; Yongfeng, H.; Lina, Z.; Jianwei, W.; Qi, J., Effective siRNAs inhibit the replication of novel influenza A (H1N1) virus. *Antiviral Research* **2010**, *85* (3), 559-561.
122. Li, W. Y.; Yang, X. F.; Jiang, Y.; Wang, B. N.; Yang, Y.; Jiang, Z. H.; Li, M. Y., Inhibition of influenza A virus replication by RNA interference targeted against the PB1 subunit of the RNA polymerase gene. *Arch Virol* **2011**, *156* (11), 1979-1987.
123. Stoppani, E.; Bassi, I.; Dotti, S.; Lizier, M.; Ferrari, M.; Lucchini, F., Expression of a single siRNA against a conserved region of NP gene strongly inhibits in vitro replication of different Influenza A virus strains of avian and swine origin. *Antiviral Res* **2015**, *120*, 16-22.
124. Behera, P.; Nagarajan, S.; Murugkar, H. V.; Kalaiyarasu, S.; Prakash, A.; Gothwal, R.; Dubey, S. C.; Kulkarni, D. D.; Tosh, C., siRNAs targeting PB2 and NP genes potentially inhibit replication of Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Virus. *J Biosci* **2015**, *40* (2), 233-40.
125. McMillen, C. M.; Beezhold, D. H.; Blachere, F. M.; Othumpangat, S.; Kashon, M. L.; Noti, J. D., Inhibition of influenza A virus matrix and nonstructural gene expression using RNA interference. *Virology* **2016**, *497*, 171-184.
126. Huang, D. T.; Lu, C. Y.; Shao, P. L.; Chang, L. Y.; Wang, J. Y.; Chang, Y. H.; Lai, M. J.; Chi, Y. H.; Huang, L. M., In vivo inhibition of influenza A virus replication by RNA interference targeting the PB2 subunit via intratracheal delivery. *PLoS One* **2017**, *12* (4), e0174523.
127. Brodskaja, A. V.; Timin, A. S.; Gorshkov, A. N.; Muslimov, A. R.; Bondarenko, A. B.; Tarakanchikova, Y. V.; Zbrodskaya, Y. A.; Baranovskaya, I. L.; Il'inskaja,

- E. V.; Sakhenberg, E. I.; Sukhorukov, G. B.; Vasin, A. V., Inhibition of influenza A virus by mixed siRNAs, targeting the PA, NP, and NS genes, delivered by hybrid microcarriers. *Antiviral Res* **2018**, *158*, 147-160.
128. Liang, W.; Chow, M. Y.; Lau, P. N.; Zhou, Q. T.; Kwok, P. C.; Leung, G. P.; Mason, A. J.; Chan, H. K.; Poon, L. L.; Lam, J. K., Inhalable dry powder formulations of siRNA and pH-responsive peptides with antiviral activity against H1N1 influenza virus. *Mol Pharm* **2015**, *12* (3), 910-21.
129. Talini, G.; Gallori, E.; Maurel, M. C., Natural and unnatural ribozymes: back to the primordial RNA world. *Res Microbiol* **2009**, *160* (7), 457-65.
130. Berzal-Herranz, A.; Joseph, S.; Chowrira, B. M.; Butcher, S. E.; Burke, J. M., Essential nucleotide sequences and secondary structure elements of the hairpin ribozyme. *EMBO J* **1993**, *12* (6), 2567-73.
131. Bergeron, L. J.; Reymond, C.; Perreault, J. P., Functional characterization of the SOFA delta ribozyme. *RNA* **2005**, *11* (12), 1858-68.
132. Tang, X. B.; Hobom, G.; Luo, D., Ribozyme Mediated Destruction of Influenza-a Virus in-Vitro and in-Vivo. *J Med Virol* **1994**, *42* (4), 385-395.
133. Lazarev, V. N.; Shmarov, M. M.; Zakhartchouk, A. N.; Yurov, G. K.; Misurina, O. U.; Akopian, T. A.; Grinenko, N. F.; Grodnitskaya, N. G.; Kaverin, N. V.; Naroditsky, B. S., Inhibition of influenza A virus reproduction by a ribozyme targeted against PB1 mRNA. *Antiviral Res* **1999**, *42* (1), 47-57.
134. Kumar, B.; Khanna, M.; Kumar, P.; Sood, V.; Vyas, R.; Banerjea, A. C., Nucleic acid-mediated cleavage of M1 gene of influenza A virus is significantly augmented by antisense molecules targeted to hybridize close to the cleavage site. *Mol Biotechnol* **2012**, *51* (1), 27-36.
135. Kumar, B.; Rajput, R.; Pati, D. R.; Khanna, M., Potent Intracellular Knock-Down of Influenza A Virus M2 Gene Transcript by DNAzymes Considerably Reduces Viral Replication in Host Cells. *Mol Biotechnol* **2015**, *57* (9), 836-45.
136. Toyoda, T.; Imamura, Y.; Takaku, H.; Kashiwagi, T.; Hara, K.; Iwahashi, J.; Ohtsu, Y.; Tsumura, N.; Kato, H.; Hamada, N., Inhibition of influenza virus replication in cultured cells by RNA-cleaving DNA enzyme. *FEBS Lett* **2000**, *481* (2), 113-6.
137. Takahashi, H.; Hamazaki, H.; Habu, Y.; Hayashi, M.; Abe, T.; Miyano-Kurosaki, N.; Takaku, H., A new modified DNA enzyme that targets influenza virus A mRNA inhibits viral infection in cultured cells. *FEBS Lett* **2004**, *560* (1-3), 69-74.
138. Plehn-Dujowich, D.; Altman, S., Effective inhibition of influenza virus production in cultured cells by external guide sequences and ribonuclease P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95* (13), 7327-32.
139. Motard, J.; Rouxel, R.; Paun, A.; von Messling, V.; Bisailon, M.; Perreault, J. P., A novel ribozyme-based prophylaxis inhibits influenza A virus replication and protects from severe disease. *PLoS One* **2011**, *6* (11), e27327.
140. Kumar, P.; Sood, V.; Vyas, R.; Gupta, N.; Banerjea, A. C.; Khanna, M., Potent inhibition of influenza virus replication with novel siRNA-chimeric-ribozyme constructs. *Antiviral Res* **2010**, *87* (2), 204-212.
141. Jeon, S. H.; Kayhan, B.; Ben-Yedidia, T.; Arnon, R., A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin. *J Biol Chem* **2004**, *279* (46), 48410-9.
142. Musafia, B.; Oren-Banaroya, R.; Noiman, S., Designing anti-influenza aptamers: novel quantitative structure activity relationship approach gives insights into aptamer-virus interaction. *PLoS One* **2014**, *9* (5), e97696.

143. Woo, H. M.; Kim, K. S.; Lee, J. M.; Shim, H. S.; Cho, S. J.; Lee, W. K.; Ko, H. W.; Keum, Y. S.; Kim, S. Y.; Pathinayake, P.; Kim, C. J.; Jeong, Y. J., Single-stranded DNA aptamer that specifically binds to the influenza virus NS1 protein suppresses interferon antagonism. *Antiviral Res* **2013**, *100* (2), 337-45.
144. Yuan, S.; Zhang, N.; Singh, K.; Shuai, H.; Chu, H.; Zhou, J.; Chow, B. K.; Zheng, B. J., Cross-protection of influenza A virus infection by a DNA aptamer targeting the PA endonuclease domain. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**, *59* (7), 4082-93.
145. Horvath, P.; Barrangou, R., CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science* **2010**, *327* (5962), 167-170.
146. Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J. A.; Charpentier, E., A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **2012**, *337* (6096), 816-821.
147. Wang, F.; Wang, L.; Zou, X.; Duan, S.; Li, Z.; Deng, Z.; Luo, J.; Lee, S. Y.; Chen, S., Advances in CRISPR-Cas systems for RNA targeting, tracking and editing. *Biotechnol Adv* **2019**, *37* (5), 708-729.
148. Hsu, P. D.; Lander, E. S.; Zhang, F., Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* **2014**, *157* (6), 1262-1278.
149. Koujah, L.; Shukla, D.; Naqvi, A. R., CRISPR-Cas based targeting of host and viral genes as an antiviral strategy. *Semin Cell Dev Biol* **2019**.
150. Lee, C., CRISPR/Cas9-Based Antiviral Strategy: Current Status and the Potential Challenge. *Molecules* **2019**, *24* (7), E1349.
151. Xiao, Q.; Guo, D.; Chen, S., Application of CRISPR/Cas9-Based Gene Editing in HIV-1/AIDS Therapy. *Front Cell Infect Microbiol* **2019**, *9*, 69.
152. Hale, C. R.; Zhao, P.; Olson, S.; Duff, M. O.; Graveley, B. R.; Wells, L.; Terns, R. M.; Terns, M. P., RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex. *Cell* **2009**, *139* (5), 945-956.
153. Sampson, T. R.; Saroj, S. D.; Llewellyn, A. C.; Tzeng, Y. L.; Weiss, D. S., A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature* **2013**, *497* (7448), 254-7.
154. Price, A. A.; Sampson, T. R.; Ratner, H. K.; Grakoui, A.; Weiss, D. S., Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, *112* (19), 6164-6169.
155. Abudayyeh, O. O.; Gootenberg, J. S.; Konermann, S.; Joung, J.; Slaymaker, I. M.; Cox, D. B.; Shmakov, S.; Makarova, K. S.; Semenova, E.; Minakhin, L.; Severinov, K.; Regev, A.; Lander, E. S.; Koonin, E. V.; Zhang, F., C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science* **2016**, *353* (6299), aaf5573.
156. Aman, R.; Ali, Z.; Butt, H.; Mahas, A.; Aljedaani, F.; Khan, M. Z.; Ding, S.; Mahfouz, M., RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. *Genome Biol* **2018**, *19* (1), 1.
157. Aman, R.; Mahas, A.; Butt, H.; Aljedaani, F.; Mahfouz, M., Engineering RNA Virus Interference via the CRISPR/Cas13 Machinery in Arabidopsis. *Viruses* **2018**, *10* (12), E732.
158. Upadhyay, A.; Dixit, U.; Manvar, D.; Chaturvedi, N.; Pandey, V. N., Affinity capture and identification of host cell factors associated with hepatitis C virus (+) strand subgenomic RNA. *Mol Cell Proteomics* **2013**, *12* (6), 1539-52.
159. Kesy, J.; Patil, K. M.; Kumar, S. R.; Shu, Z.; Yong, H. Y.; Zimmermann, L.; Ong, A. A. L.; Toh, D. K.; Krishna, M. S.; Yang, L.; Decout, J. L.; Luo, D.; Prabakaran, M.; Chen, G.; Kierzek, E., A Short Chemically Modified dsRNA-Binding PNA

- (dbPNA) Inhibits Influenza Viral Replication by Targeting Viral RNA Panhandle Structure. *Bioconjug Chem* **2019**, *30* (3), 931-943.
160. Keşy, J., Badania struktury zmutowanej formy vRNA segmentu 8 wirusa grypy typu A. *Praca Magisterska* **2014**.
161. Torres, A. G.; Fabani, M. M.; Vigorito, E.; Williams, D.; Al-Obaidi, N.; Wojciechowski, F.; Hudson, R. H.; Seitz, O.; Gait, M. J., Chemical structure requirements and cellular targeting of microRNA-122 by peptide nucleic acids anti-miRs. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40* (5), 2152-67.
162. Gupta, A.; Bahal, R.; Gupta, M.; Glazer, P. M.; Saltzman, W. M., Nanotechnology for delivery of peptide nucleic acids (PNAs). *J Control Release* **2016**, *240*, 302-311.
163. Ma, X.; Devi, G.; Qu, Q.; Toh, D. F.; Chen, G.; Zhao, Y., Intracellular delivery of antisense peptide nucleic acid by fluorescent mesoporous silica nanoparticles. *Bioconjug Chem* **2014**, *25* (8), 1412-20.
164. Arya, D. P.; Coffee, R. L.; Charles, I., Neomycin-induced hybrid triplex formation. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123* (44), 11093-11094.
165. Arya, D. P.; Coffee, R. L., Jr.; Willis, B.; Abramovitch, A. I., Aminoglycoside-nucleic acid interactions: remarkable stabilization of DNA and RNA triple helices by neomycin. *J Am Chem Soc* **2001**, *123* (23), 5385-95.
166. Hwang, S. Y.; Sun, H. Y.; Lee, K. H.; Oh, B. H.; Cha, Y. J.; Kim, B. H.; Yoo, J. Y., 5'-Triphosphate-RNA-independent activation of RIG-I via RNA aptamer with enhanced antiviral activity. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40* (6), 2724-33.
167. Yong, H. Y.; Luo, D., RIG-I-Like Receptors as Novel Targets for Pan-Antivirals and Vaccine Adjuvants Against Emerging and Re-Emerging Viral Infections. *Front Immunol* **2018**, *9*, 1379.
168. Rehwinkel, J.; Reis e Sousa, C., RIGorous detection: exposing virus through RNA sensing. *Science* **2010**, *327* (5963), 284-6.
169. Hwang, H.; Kim, H.; Myong, S., Protein induced fluorescence enhancement as a single molecule assay with short distance sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108* (18), 7414-8.
170. Suzuki, Y.; Kobayashi, Y., Evolution of complementary nucleotides in 5' and 3' untranslated regions of influenza A virus genomic segments. *Infect Genet Evol* **2013**, *13*, 175-179.
171. Bae, S. H.; Cheong, H. K.; Lee, J. H.; Cheong, C.; Kainosho, M.; Choi, B. S., Structural features of an influenza virus promoter and their implications for viral RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98* (19), 10602-10607.
172. Gultyaev, A. P.; Fouchier, R. A. M.; Olsthoorn, R. C. L., Influenza Virus RNA Structure: Unique and Common Features. *Int Rev Immunol* **2010**, *29* (6), 533-556.
173. Noble, E.; Mathews, D. H.; Chen, J. L.; Turner, D. H.; Takimoto, T.; Kim, B., Biophysical analysis of influenza A virus RNA promoter at physiological temperatures. *J Biol Chem* **2011**, *286* (26), 22965-70.
174. Zhou, K.; He, H.; Wu, Y.; Duan, M., RNA interference of avian influenza virus H5N1 by inhibiting viral mRNA with siRNA expression plasmids. *J Biotechnol* **2008**, *135* (2), 140-4.
175. Mathews, D. H.; Turner, D. H., Dynalign: an algorithm for finding the secondary structure common to two RNA sequences. *J Mol Biol* **2002**, *317* (2), 191-203.
176. Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Weber, K.; Tuschl, T., Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* **2002**, *26* (2), 199-213.
177. Muhonen, P.; Tennila, T.; Azhayeva, E.; Parthasarathy, R. N.; Janckila, A. J.; Vaananen, H. K.; Azhayev, A.; Laitala-Leinonen, T., RNA interference tolerates

- 2'-fluoro modifications at the Argonaute2 cleavage site. *Chemistry & Biodiversity* **2007**, *4* (5), 858-873.
178. Prakash, T. P.; Allerson, C. R.; Dande, P.; Vickers, T. A.; Sioufi, N.; Jarres, R.; Baker, B. F.; Swayze, E. E.; Griffey, R. H.; Bhat, B., Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells. *J Med Chem* **2005**, *48* (13), 4247-4253.
179. Takahashi, M.; Nagai, C.; Hatakeyama, H.; Minakawa, N.; Harashima, H.; Matsuda, A., Intracellular stability of 2'-OMe-4'-thioribonucleoside modified siRNA leads to long-term RNAi effect. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40* (12), 5787-93.
180. Kraynack, B. A.; Baker, B. F., Small interfering RNAs containing full 2'-O-methylribonucleotide-modified sense strands display Argonaute2/eIF2C2-dependent activity. *RNA* **2006**, *12* (1), 163-76.
181. Wu, S. Y.; Yang, X. B.; Gharpure, K. M.; Hatakeyama, H.; Egli, M.; McGuire, M. H.; Nagaraja, A. S.; Miyake, T. M.; Rupaimoole, R.; Pecot, C. V.; Taylor, M.; Pradeep, S.; Sierant, M.; Rodriguez-Aguayo, C.; Choi, H. J.; Previs, R. A.; Armaiz-Pena, G. N.; Huang, L.; Martinez, C.; Hassell, T.; Ivan, C.; Sehgal, V.; Singhanian, R.; Han, H. D.; Su, C.; Kim, J. H.; Dalton, H. J.; Kovvali, C.; Keyomarsi, K.; McMillan, N. A. J.; Overwijk, W. W.; Liu, J. S.; Lee, J. S.; Baggerly, K. A.; Lopez-Berestein, G.; Ram, P. T.; Nawrot, B.; Sood, A. K., 2'-OMe-phosphorodithioate-modified siRNAs show increased loading into the RISC complex and enhanced anti-tumour activity. *Nature Comm* **2014**, *5*, 3459.
182. Li, Z. Y.; Mao, H. B.; Kallick, D. A.; Gorenstein, D. G., The effects of thiophosphate substitutions on native siRNA gene silencing. *Biochem Biophys Res Comm* **2005**, *329* (3), 1026-1030.
183. Chiu, Y. L.; Rana, T. M., siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *RNA* **2003**, *9* (9), 1034-1048.
184. Braasch, D. A.; Jensen, S.; Liu, Y. H.; Kaur, K.; Arar, K.; White, M. A.; Corey, D. R., RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry* **2003**, *42* (26), 7967-7975.
185. Choung, S.; Kim, Y. J.; Kim, S.; Park, H. O.; Choi, Y. C., Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. *Biochem Biophys Res Comm* **2006**, *342* (3), 919-927.
186. Amarzguioui, M.; Holen, T.; Babaie, E.; Prydz, H., Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res* **2003**, *31* (2), 589-595.
187. Harborth, J.; Elbashir, S. M.; Vandenburgh, K.; Manninga, H.; Scaringe, S. A.; Weber, K.; Tuschl, T., Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **2003**, *13* (2), 83-105.
188. Geary, R. S.; Norris, D.; Yu, R.; Bennett, C. F., Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev* **2015**, *87*, 46-51.
189. Czauderna, F.; Fechtner, M.; Dames, S.; Aygun, H.; Klippel, A.; Pronk, G. J.; Giese, K.; Kaufmann, J., Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **2003**, *31* (11), 2705-16.
190. Zheng, J.; Zhang, L.; Zhang, J.; Wang, X.; Ye, K.; Xi, Z.; Du, Q.; Liang, Z., Single modification at position 14 of siRNA strand abolishes its gene-silencing activity by decreasing both RISC loading and target degradation. *FASEB J* **2013**, *27* (10), 4017-26.
191. Parrish, S.; Fleenor, J.; Xu, S.; Mello, C.; Fire, A., Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell* **2000**, *6* (5), 1077-87.

192. Nowak, M.; Wyszko, E.; Fedoruk-Wyszomirska, A.; Pospieszny, H.; Barciszewska, M. Z.; Barciszewski, J., A new and efficient method for inhibition of RNA viruses by DNA interference. *FEBS J* **2009**, *276* (16), 4372-80.
193. Lamberton, J. S.; Christian, A. T., Varying the nucleic acid composition of siRNA molecules dramatically varies the duration and degree of gene silencing. *Mol Biotechnol* **2003**, *24* (2), 111-20.
194. Hohjoh, H., RNA interference (RNA(i)) induction with various types of synthetic oligonucleotide duplexes in cultured human cells. *FEBS Lett* **2002**, *521* (1-3), 195-9.
195. Smalheiser, N. R.; Gomes, O. L., Mammalian Argonaute-DNA binding? *Biol Direct* **2014**, *10*, 27.
196. Palauqui, J. C.; Balzergue, S., Activation of systemic acquired silencing by localised introduction of DNA. *Curr Biol* **1999**, *9* (2), 59-66.
197. Voinnet, O.; Vain, P.; Angell, S.; Baulcombe, D. C., Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **1998**, *95* (2), 177-87.
198. Blount, K. F.; Uhlenbeck, O. C., The structure-function dilemma of the hammerhead ribozyme. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2005**, *34*, 415-40.
199. O'Rourke, S. M.; Estell, W.; Scott, W. G., Minimal Hammerhead Ribozymes with Uncompromised Catalytic Activity. *J Mol Biol* **2015**, *427* (14), 2340-2347.
200. Citti, L.; Rainaldi, G., Synthetic hammerhead ribozymes as therapeutic tools to control disease genes. *Curr Gene Ther* **2005**, *5* (1), 11-24.
201. Mitsuyasu, R. T.; Zack, J. A.; Macpherson, J. L.; Symonds, G. P., Phase I/II Clinical Trials Using Gene-Modified Adult Hematopoietic Stem Cells for HIV: Lessons Learnt. *Stem Cells Int* **2011**, *2011*, 393698.
202. Fedoruk-Wyszomirska, A.; Szymanski, M.; Glodowicz, P.; Gabryelska, M.; Wyszko, E.; Estrin, W. J.; Barciszewski, J., Inhibition of HIV-1 gp41 expression with hammerhead ribozymes. *Biochem J* **2015**, *471*, 53-66.
203. Fedoruk-Wyszomirska, A.; Szymanski, M.; Wyszko, E.; Barciszewska, M. Z.; Barciszewski, J., Highly Active Low Magnesium Hammerhead Ribozyme. *J Biochem* **2009**, *145* (4), 451-459.
204. Belter, A.; Rolle, K.; Piwecka, M.; Fedoruk-Wyszomirska, A.; Naskret-Barciszewska, M. Z.; Barciszewski, J., Inhibition of miR-21 in glioma cells using catalytic nucleic acids. *Sci Rep* **2016**, *6*, 24516.
205. Bennett, C. F.; Swayze, E. E., RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2010**, *50*, 259-93.
206. Westerhout, E. M.; Berkhout, B., A systematic analysis of the effect of target RNA structure on RNA interference. *Nucleic Acids Res* **2007**, *35* (13), 4322-30.
207. Tafer, H.; Ameres, S. L.; Obernosterer, G.; Gebeshuber, C. A.; Schroeder, R.; Martinez, J.; Hofacker, I. L., The impact of target site accessibility on the design of effective siRNAs. *Nat Biotechnol* **2008**, *26* (5), 578-83.
208. Xing, Z.; Whitton, J. L., Ribozymes which cleave arenavirus RNAs: identification of susceptible target sites and inhibition by target site secondary structure. *J Virol* **1992**, *66* (3), 1361-9.
209. Hendry, P.; McCall, M. J.; Stewart, T. S.; Lockett, T. J., Redesigned and chemically-modified hammerhead ribozymes with improved activity and serum stability. *BMC Chem Biol* **2004**, *4* (1), 1.