



Oligonukleotydy jako potencjalne czynniki terapeutyczne skierowane przeciw wirusowi zapalenia wątroby typu C

Agata Świątkowska, Jerzy Ciesiołka

Pracownia Biochemii RNA, Instytut Chemii Bioorganicznej,
Polska Akademia Nauk, Poznań

Oligonucleotides as potential therapeutic tools against hepatitis C virus

Summary

Hepatitis C virus belongs to the group of particularly dangerous and most extensively studied RNA viruses. Since no vaccine for HCV is known and post-exposure treatment of infected patients has not been yet optimal, novel therapeutic strategies are being developed very intensively. Oligonucleotide-based molecular tools such as antisense oligonucleotides, ribozymes, DNAzymes, aptamers and interfering RNAs are proving as effective modulators of gene expression and potential therapeutics. Several examples of oligonucleotide-based molecular tools directed towards HCV viral RNA are discussed in this review.

Key words:

Hepatitis C virus, oligonucleotide-based therapy, antisense oligonucleotide, ribozyme, aptamer, DNAzyme, RNAi.

Adres do korespondencji

Jerzy Ciesiołka,
Pracownia Biochemii RNA,
Instytut Chemii
Bioorganicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Noskowskiego 12/14,
61-704 Poznań.

biotechnologia

1 (88) 13–33 2010

1. Wprowadzenie

Ogólnoswiatowe zagrożenie jakie niesie za sobą coraz większe rozprzestrzenianie się wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) jest bodźcem do coraz bardziej intensywnych poszukiwań nowych terapeutyków, szczególnie w obliczu braku szczepionki, która chroniłaby przed zakażeniem. Obecnie stosowane formy leczenia oparte na interferonie i rybawirynie przynoszą zadowalające rezultaty jedynie w 40-60% przypadków infekcji wirusowej.

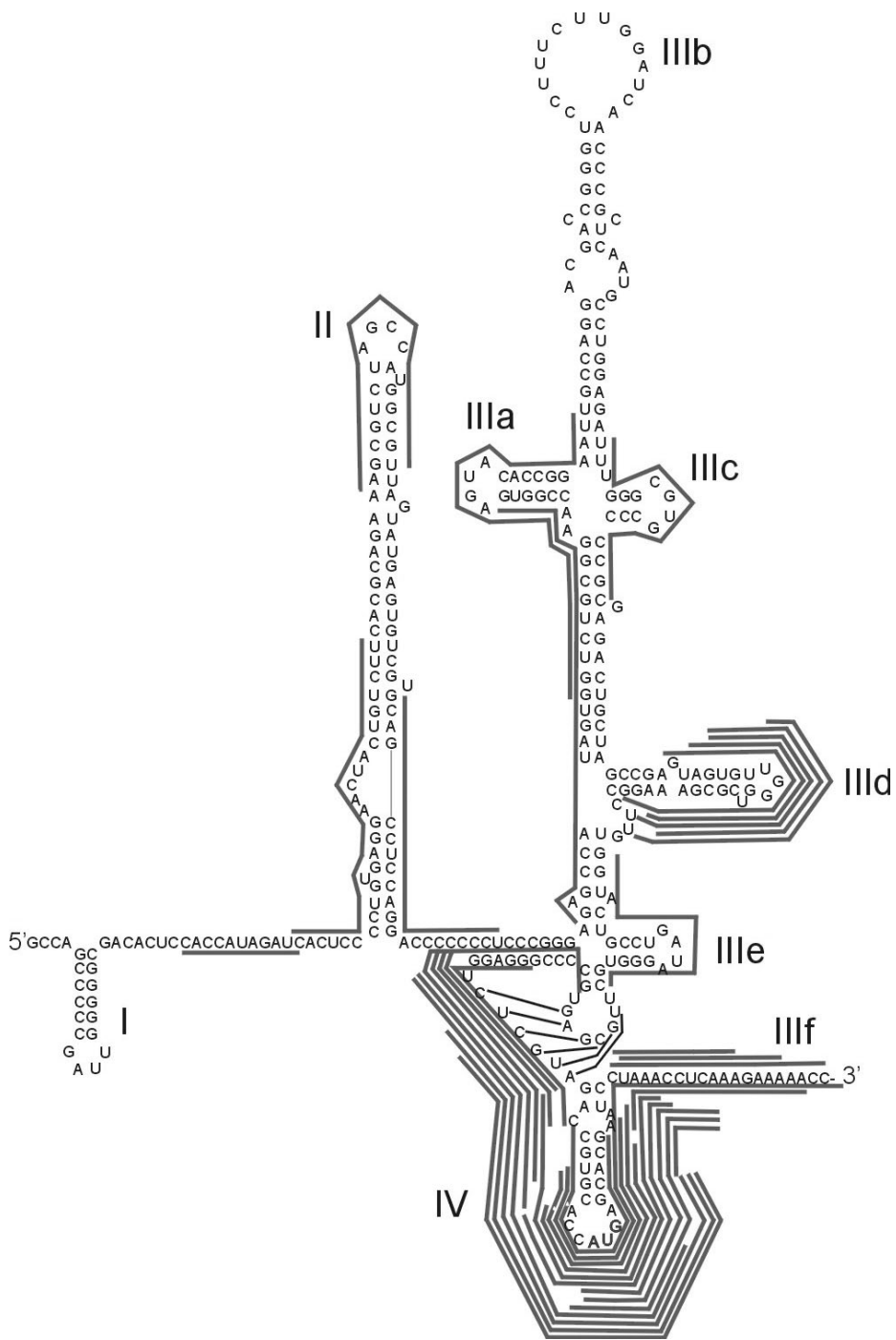
Znalezienie uniwersalnego leku utrudnia duża zmienność genetyczna wirusa HCV i jego możliwości adaptacyjne.

W poszukiwaniu terapeutyków nowej generacji skierowanych przeciw wirusowi HCV w ostatnich latach uwagę zwrócono na narzędzia molekularne oparte na kwasach nukleinowych, takie jak: oligomery typu antysens, rybozymy i DNAzymy, a także interferencyjne RNA. Atakują one wirusowy genom RNA wiążąc się do niego bezpośrednio w miejscu przewidzianym regułami parowania zasad Watsona-Cricka. Strategie antywirusowe tego typu charakteryzuje wiele zalet. Po pierwsze, konstruowanie potencjalnych terapeutyków o wysokiej specyficzności oparte jest na znajomości sekwencji nukleotydowej danego wirusa i nie wymaga wcześniejszego poznania funkcji atakowanych genów. Po drugie, inhibicja syntezy nawet jednego ważnego białka wirusowego może zaburzać cykl życiowy wirusa. Ponadto, narzędzia molekularne można zaplanować tak, aby atakując geny wirusowe nie zaburzały genów komórki gospodarza, minimalizując bądź eliminując w ten sposób efekty uboczne terapii.

2. Oligonukleotydy typu antysens

Antysensowe oligonukleotydy DNA po raz pierwszy zostały zastosowane w systemie komórkowym w 1978 r. przez Zamecnika i Stephensona (1). Przyłączają się one do docelowej cząsteczki RNA na zasadzie parowania zasad wg modelu Watsona-Cricka, działając na dwóch zasadniczych drogach. Po pierwsze, powstały heterodupleks DNA-RNA rozpoznawany jest przez RNazę H, która hydrolizuje cząsteczkę RNA w obrębie heterodupleksu. Po drugie, zakłada się, że przyłączony oligonukleotyd stanowi zawadę steryczną dla rybosomu, utrudniając jego przyłączenie lub przesuwanie się wzdłuż mRNA, co w konsekwencji obniża wydajność translacji (2,3). Efektywność działania oligonukleotydów antysensowych zależy od wielu czynników, przy czym jednym z najistotniejszych jest ich stabilność *in vivo*. Oligonukleotydy są nietrwałe w warunkach komórkowych ze względu na podatność do hydrolizy pod wpływem nukleaz. Zwiększenie trwałości oligonukleotydów *in vivo*, uzyskane poprzez zastosowanie niehydrolizowalnych analogów nukleotydowych, znacznie przyspieszyło prace nad wykorzystaniem oligonukleotydów jako potencjalnych terapeutyków (4).

Oligonukleotydy antysensowe stały się szansą na opracowanie nowej formy terapii w leczeniu zakażenia wirusem HCV. Co roku ukazuje się kilkadziesiąt publikacji opisujących różne podejścia eksperymentalne wykorzystania tej strategii w walce z wirusem. Najczęściej „atakowanymi” fragmentami genomu wirusa HCV są jego regiony niekodujące, dotyczy to zarówno nici o polarność dodatniej, jak i nici replikacyjnej (5-10). Szczególnie atrakcyjnym miejscem ataku jest region zlokalizowany na końcu 5’ nici genomowej, w obrębie którego znajduje się element IRES odpowiedzialny za inicjację translacji wirusowej poliproteiny w procesie niezależnym od 5’-terminalnej struktury „kapu” (rys. 1). Również w części kodującej genomu wirusa



Rys. 1. Struktura drugorzędowa 5'UTR wirusa HCV z zaznaczonymi wybranymi oligomerami typu anti-sens, które powodowały inhibicję translacji zależnej od elementu IRES. Opracowano na podstawie (90).

HCV próbuje się znaleźć miejsca zdolne do wiązania oligomerów antysensowych np. w obrębie regionu kodującego zachowawcze białko nukleokapsydu lub proteazę NS3 (4,11-13). Efektywność działania oligonukleotydów antysensowych skierowanych przeciwko wirusowi HCV jest różna i mieści się w przedziale od 30 do ponad 90%. Sądzi się, że tak szeroki zakres efektywności użytych oligonukleotydów wynika przede wszystkim ze zróżnicowania dostępności do hybrydyzacji atakowanych regionów RNA. Większość projektowanych oligonukleotydów skierowanych jest przeciwko regionom niekodującym, ponieważ pełnią one podstawową rolę w cyklu życiowym wirusa oraz cechują się wysoką zachowawczością. Regiony te charakteryzują się jednak silnie uporządkowaną strukturą, co stanowi duże utrudnienie w znalezieniu miejsc umożliwiających związanie oligomeru. Często rozbieżne wyniki badań dotyczących zastosowania oligonukleotydów antysensowych wynikają także z użycia różnych modeli, w jakich przeprowadzane są testy. Wiele wcześniejszych prac prowadzonych było w warunkach *in vitro* (14,15). Wraz z pojawieniem się replikonów i linii komórkowych, które umożliwiają namnażanie się wirusa HCV, pojawia się coraz więcej doniesień o badaniach w kulturach komórkowych i na modelach zwierzęcych (6,9).

Przykładem oligonukleotydu antysensowego skierowanego przeciwko wirusowi HCV jest oligomer ISIS14803, zaproponowany przez firmę ISIS Pharmaceuticals (Carlsbad, USA), który zawiera atomy siarki w miejscu niewiążących atomów tlenu wiązań internukleotydowych (16,17). Jest on komplementarny do fragmentu domeny IV (nt 345-365) elementu IRES wirusa HCV (rys. 1). W badaniach przedklinicznych w układach komórkowych oraz na modelu mysim wykazano, że oligonukleotyd ten bardzo efektywnie blokuje translację i replikację wirusa. W I fazie prób klinicznych zaobserwowano, że po czterech tygodniach od podania oligomeru ISIS14803, u trzech z dwudziestu ośmiu pacjentów z chroniczną infekcją wirusem HCV nastąpiło 10-krotne obniżenie poziomu wirusowego RNA we krwi (17). Obecność oligomeru była dobrze tolerowana przez organizmy pacjentów, aczkolwiek zaobserwowano 10-krotny wzrost poziomu aminotransferazy alaniny (ALT), który po kilku tygodniach wrócił do normy. Większość pacjentów zainfekowana była wirusem o genotypie 1, najbardziej opornym na leczenie interferonem. Jednakże dalsze badania nad oligomerem ISIS14803 wstrzymano z uwagi na małą skuteczność terapii i obawy związane z możliwymi efektami ubocznymi (18). Inny oligonukleotyd antysensowy skierowany przeciwko wirusowi HCV to AVI-4065 (19). Zawierał on ugrupowania fosforoamido-morfolinowe (PMO, ang. *Phosphoramidate-Morpholino*), a testowany był przez firmę AVI BioPharma (Portland, USA). W badaniach przeprowadzonych *in vitro* oraz na modelach zwierzęcych sugerowano, że AVI-4065 posiada zdolność hamowania ekspresji wszystkich 5 genotypów wirusa HCV. Oligonukleotyd zakwalifikowany został do etapu II fazy badań klinicznych, które zakończone zostały w 2008 r., lecz jak dotąd ich wyniki nie zostały upublicznione (www.clinicaltrials.gov).

3. Rybozomy i DNazymy

Dla celów terapii przeciwwirusowej największe znaczenie mają warianty rybozymów występujących w naturze, które poprzez ukierunkowane przecięcie docelowej cząsteczki RNA obniżają ekspresję genów wirusowych białek lub hamują replikację wirusa. Efektywność działania rybozymów zależy od wielu czynników. Przy ich planowaniu przede wszystkim brana jest pod uwagę dostępność cząsteczki atakowanej do hybrydyzacji komplementarnych sekwencji oligonukleotydowych. Ważne jest także, aby region rozpoznawany przez rybozym cechował się dużą zachowawczością sekwencji (20-22). Kolejny ważny czynnik to sposób dostarczenia rybozymu do komórki oraz jego kolokalizacja z docelową cząsteczką RNA. Rybozym może być dostarczony w formie odpowiednio zaprojektowanego wektora ekspresyjnego, który wewnątrzkomórkowo ulega transkrypcji lub może być wprowadzony bezpośrednio do komórki w postaci RNA. Bezpośrednie wprowadzenie rybozymu do komórki wymaga pokonania bariery, jaką stanowią błony biologiczne. Najczęściej jako nośniki (ang. *delivery vehicle*) wykorzystywane są kationowe lipidy i liposomy, które z kwasami nukleinowymi tworzą kompleksy i dzięki nim na drodze endocytozy dochodzi do wprowadzenia rybozymu do komórki. Aby ułatwić uwolnienie rybozymu z endosomu, do nośnika dołączane są związki promujące zmiany w błonie pęcherzyka endosomalnego np. cholesterol (23). Rybozomy chronione są przed działaniem egzo- i endorybonukleaz komórkowych poprzez wprowadzenie do RNA różnego typu modyfikacji chemicznych, podobnie jak w przypadku oligomerów antysensowych, np. podstawienie atomu siarki w miejsce atomu tlenu w wiązaniu fosfodiesterowym, obecność grupy 2'-fluoro, 2'-amino, 2'-O-metylo w reszcie rybozy, wprowadzenie tymidyny tworzącej wiązanie 3'-3' na końcu 3' cząsteczki rybozymu (20,22). Zwiększenie stabilności rybozymu w obecności nukleaz umożliwia wydłużenie czasu jego działania i w konsekwencji pozwala na zmniejszenie jego ilości wprowadzanej do komórki. Ważne, aby przy projektowaniu rybozymu była zachowana sekwencja występująca preferencyjnie w obrębie miejsca cięcia np. dla rybozymu typu *hammerhead* to 5'-NUH-3' gdzie H oznacza każdy nukleotyd z wyjątkiem G, natomiast dla rybozymu typu *hairpin* optymalna sekwencja to 5'-GUC-3'.

Większość rybozymów skierowanych przeciwko wirusowi HCV planowanych jest na „atakowanie” jego regionów niekodujących (tab. 1). Najczęściej wykorzystywane są do tego celu rybozomy typu *hammerhead*. Pomimo ich dużej efektywności w testach prowadzonych w warunkach *in vivo*, żaden z nich nie został wykorzystany jako lek w terapii przeciwko wirusowi HCV. Na etapie II fazy badań klinicznych pozostał heptazym, rybozym typu *hammerhead*, zaproponowany przez firmę Ribozyme Pharmaceuticals. Wykorzystanie heptazymu jako monoterapii spowodowało znaczące obniżenie ilości RNA wirusa HCV we krwi u 10% pacjentów, jednakże z powodu braku danych dotyczących toksyczności rybozymu (12-miesięczna seria eksperymentów na jednym modelu zwierzęcym) nie został on zakwalifikowany do kolejnej fazy badań klinicznych (<http://www.sirna.com>). W badaniach przeprowadzonych na

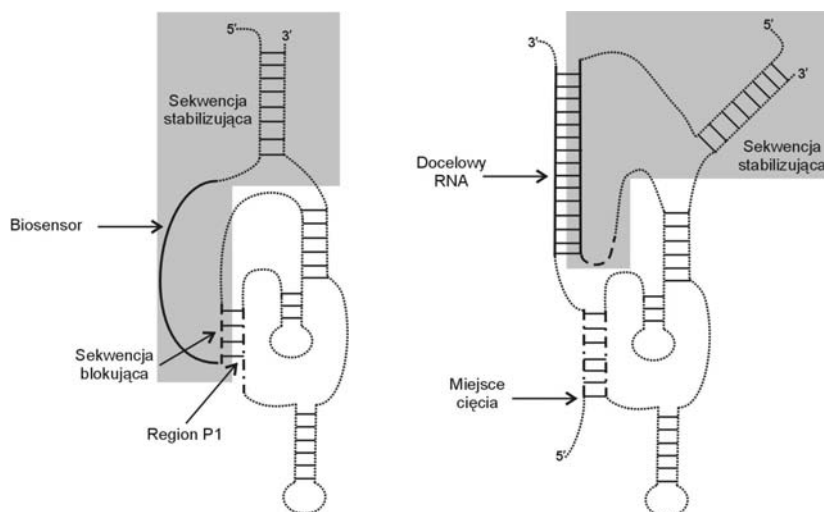
modelu mysim wykazano natomiast, że aby osiągnąć terapeutyczne stężenie rybozymu, wymagane do efektywnej inhibicji translacji zależnej od elementu IRES wirusa HCV w układzie komórkowym, trzeba było wprowadzić do wątroby jego wielokrotny nadmiar (24). Wysokie stężenie rybozymu zwiększa prawdopodobieństwo, że będzie on niespecyficznie oddziaływał z białkami i innymi elementami komórkowymi, powodując zaburzenia w jej prawidłowym funkcjonowaniu.

Tabela 1

Wybrane przykłady atakowania wirusa HCV za pomocą rybozymów

Rybozym	Atakowany fragment genomu wirusa HCV	Środowisko reakcji	Efektywność	Literatura
<i>hammerhead</i>	5'UTR	komórki Huh7	50-70% inhibicja translacji 5'UTR/LUC	(74)
<i>hammerhead</i>	5'UTR IRES minus	komórki CHO, hepatocyty	znacząca eliminacja wirusa w zainfekowanych komórkach	(75)
<i>hammerhead</i>	5'UTR	komórki HeLa i Hep3B	40-80% inhibicja translacji 5'UTR/LUC >90% inhibicja replikacji HCV-poliowirus PV chimery	(76)
<i>hammerhead</i>	5'UTR	<i>in vitro</i>	90% inhibicja translacji 5'UTR/LUC	(77)
<i>hammerhead</i>	5'UTR	komórki HeLa	>98% inhibicja replikacji HCV-poliowirus PV chimery w obecności IFN- α 2a, IFN- α 2b i IFN konsensus	(78)
<i>hammerhead</i>	5'UTR	komórki HepG2 i CCL13	>70% inhibicja translacji 5'UTR/RLuc	(79)
<i>bairpin</i>	5'UTR białko płaszczka	komórki HepG2	>70% inhibicja translacji >90% inhibicja translacji zastosowanie wektora retrowirusowego	(80)
<i>bairpin</i>	5'UTR 3'UTR (region X) 3'UTR nici replikacyjnej (region X(-))	komórki Huh-7	20-50% inhibicja translacji w układzie bicistronowym pRL-5'UTR-FL-3'UTR (brak znaczącego efektu dla rybozymu anty-5'UTR) >35% inhibicja replikacji 25-50% obniżenie ekspresji NS5B	(81)
<i>delta</i>	5'UTR	<i>in vitro</i>	21-28% przecięcia RNA IRES w obecności formamidu	(82)
<i>delta</i>	5'UTR	<i>in vitro</i>	efektywne cięcie RNA IRES	(27)
<i>trans-splicing</i>	5'UTR	komórki Huh-7	>70% redukcja ilości komórek spowodowana wystąpieniem efektu cytotoksycznego	(29)

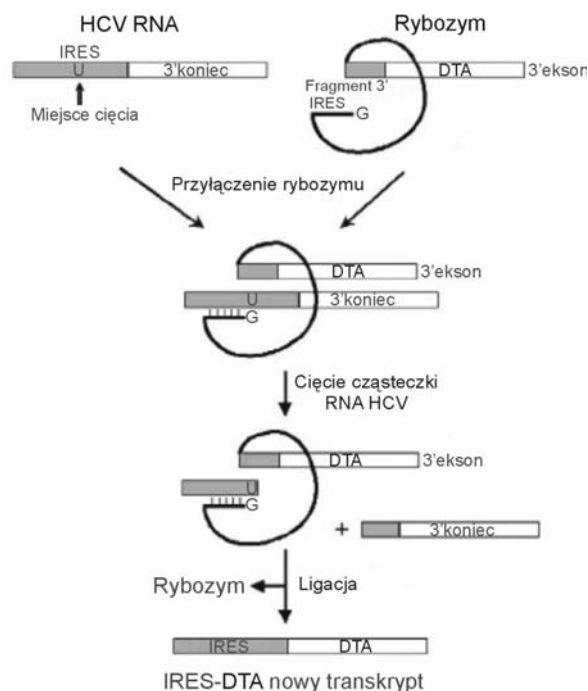
Podczas projektowania rybozymów wprowadzane są również zmiany w globalnej architekturze ich cząsteczek. Technika selekcji *in vitro* pozwala na otrzymanie tzw. rybozymów allosterycznych. Posiadają one dodatkowe domeny strukturalne, które, oddziałując z odpowiednim efektem np. niskocząsteczkowym związkami



Rys. 2. Schematyczne przedstawienie rybozomu SOFA (27) w formie nieaktywnej oraz w formie katalitycznie aktywnej.

chemicznym lub białkiem, umożliwiając w sposób kontrolowany przełączanie rybozomu z formy nieaktywnej w aktywną (25,26). Ciekawym przykładem takiej regulacji jest rybozom HDV typu SOFA (ang. *Specific On/Off Adaptor*), posiadający dodatkowe elementy: sekwencję blokującą oraz biosensor, dzięki którym rybozom jest aktywny jedynie w obecności efektoru, którym jest docelowa cząsteczka RNA (rys. 2) (27,28). Przy braku efektoru, sekwencja blokująca oddziałuje z regionem rozpoznawania substratu tworząc odcinek dwuniciowy, co powoduje, że rybozom przyjmuje formę nieaktywną. Biosensorem jest 15-nukleotydowy fragment sekwencji rybozomu komplementarny do sekwencji cząsteczki docelowej. Obecność docelowego RNA powoduje rearanżację struktury rybozomu, który przechodzi w formę aktywną, zdolną do przecięcia cząsteczki docelowej (rys. 2). Rybozom-SOFA wykazuje większą efektywność w porównaniu z niezmodyfikowaną wersją rybozomu HDV. Element IRES wirusa HCV przecinany był w warunkach *in vitro* przez rybozom typu dzikiego z bardzo małą wydajnością, natomiast intensywność cięcia wzrosła wielokrotnie przy zastosowaniu rybozomu-SOFA (27,28).

Odmienne rozwiązania w terapii przeciwwirusowej oferują rybozomy zdolne do katalizowania reakcji splicingu *in trans* (ang. *trans-splicing ribozymes*). Są one wykorzystywane w warunkach *in vivo* do naprawiania zmutowanych nukleotydów w cząsteczkach mRNA. W badaniach skierowanych przeciwko wirusowi HCV zaproponowano tego typu rybozom, który przyłączał fragment RNA kodujący białko DTA (ang. *Diphtheria Toxin A*), wykazujące aktywność cytotoksyczną (29). Fragment ten znajdował się pod kontrolą elementu IRES wirusa HCV, co umożliwiało translację białka DTA (rys. 3). Wprowadzenie rybozomu do komórek, które transfekowane były



Rys. 3. Schemat przedstawiający powstanie nowego transkryptu IRES-DTA za pomocą rybozomu zdolnego do katalizowania reakcji splicingu *in trans* (29). DTA – toksyczne białko (ang. *Diphtheria Toxin A*).

równocześnie konstrukt zawierającym element IRES, powodowało aktywację szlaku programowanej śmierci komórki. Rybozom cechował się przy tym dużą specyficznością, a obecność toksycznego białka powodowała ponad 70% redukcję ilości żywych komórek, co świadczyło o jego bardzo dużej efektywności (29). Wprowadzenie toksycznego białka do komórek wątroby pacjenta nie wydaje się jednak dobrym rozwiązaniem, ponieważ niesie za sobą niebezpieczeństwo uszkodzenia organu. Natomiast ciekawa jest idea wprowadzania za pomocą rybozymów działających w ten sposób innych białek np. zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną.

Technologia oparta na wykorzystaniu rybozimu RNazy P z przyłączoną sekwencją EGS (ang. *External Guide Sequence*), komplementarną do cząsteczki docelowej, była z powodzeniem wykorzystana w badaniach nad inhibicją wirusa cytomegalii (HCMV) (30), wirusa zespołu nabytego braku odporności (HIV) (31), czy też wirusa herpes simplex (HSV) (30). Natomiast w przypadku wirusa HCV zaobserwowano, że w warunkach *in vitro* ludzka RNaza P w sposób specyficzny rozpoznaje i przecina genom wirusa w obrębie elementu IRES, w pobliżu kodonu AUG (32). Również RNaza P z cyjanobakterii *Synechocystis* hydrolizuje IRES w zbliżonym regionie (33). Co ciekawe, rozpoznanie to nie wymaga sekwencji EGS, co świadczy o obecności w obrębie elementu IRES struktury podobnej do tRNA (ang. *tRNA-like*). Ponadto, w przypadku

bakteryjnej RNazy P, aktywność katalityczną wykazuje komponent RNA bez udziału części białkowej enzymu. Ta obserwacja może stać się podstawą do zaprojektowania rybozymu, który mógłby inaktywować wirusa HCV w komórkach. Dodatkowo zaobserwowano, że pojedyncze mutacje, które pojawiają się w regionie rozpoznawanym przez bakteryjną RNazę P, nie wpływają na efektywność cięcia, co oznacza, że zaprojektowany na jej podstawie rybozym stanowił uniwersalne narzędzie w inaktywacji wirusa HCV (33).

Przykładem katalitycznych kwasów nukleinowych są także deoksyrybozymy (DNAzy) otrzymane drogą selekcji *in vitro* (22,34). Ich zwiększona stabilność w środowisku komórkowym w porównaniu do rybozymów, wysoka efektywność oraz szybka i tania synteza sprawiły, że DNAzy budzą duże zainteresowanie badaczy. Do tej pory ukazało się tylko kilka publikacji przedstawiających próbę wykorzystania DNAzymów w ukierunkowanej hydrolizie RNA wirusa HCV (35-37). DNAzym Dz858-4-OMe, zawierający dodatkowo grupy 2'-O-metylo w obrębie ramion wiążących substrat, powodował w komórkach wątrobowych 63% redukcję ilości RNA wirusa HCV i obniżenie poziomu białka płaszczka o 87% (36). Udało się otrzymać DNAzy, które efektywnie blokowały translację zależną od elementu IRES HCV w układzie *in vitro*, jak również w systemie komórkowym (37). Podjęto także próby zaprojektowania DNAzymów przeciwko 3'-terminalnemu regionowi X. Jednakże, spośród siedmiu zbadanych tylko jeden wykazywał aktywność katalityczną prowadząc do obniżenia o około 20% poziomu RNA w warunkach *in vitro*. Zwiększanie ilości DNAzymu nawet do 2000-krotnego nadmiaru nie wpłynęło na efektywność cięcia cząsteczki docelowej (35).

4. Aptamery oraz inne niskocząsteczkowe RNA

Aptamery są to cząsteczki RNA uzyskane na drodze selekcji *in vitro* (metoda SELEX, ang. *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) o ściśle określonych, pożądanых właściwościach np. wysokim powinowactwie do związków niskocząsteczkowych lub białek (38). Metodę tę zastosowano także do poszukiwania aptamerów, które byłyby zdolne asocjować do białek lub fragmentów genomu wirusa HCV i w ten sposób zaburzać ich funkcje biologiczne. Dotychczas udało się otrzymać aptamery, które efektywnie blokują aktywność polimerazy i proteazy wirusa.

Z puli cząsteczek RNA, które zawierały 35-nukleotydową sekwencję typu *random* wyselekcjonowano aptamer wykazujący duże powinowactwo ($K_d = 1,5$ nM) do białka NS5B wirusa HCV w warunkach *in vitro* (39). Otrzymany 45-nukleotydowy aptamer był bardzo selektywny, ponieważ nie oddziaływał z polimerazą RNA wirusa polio ani z białkiem NS5B wirusa GBV-B, bardzo blisko spokrewnionego z wirusem HCV. Wykazano, że aptamer uniemożliwiał tworzenie się kompleksu białka NS5B z matrycą/starterem poli(rA)/oligo(rU), a duży nadmiar matrycy/startera nie interferował w oddziaływanie aptameru z białkiem. Oznacza to, że aptamer działał na zasadzie inhibicji niekompetycyjnej, przyłączając się w miejscu odległym od miejsca przyłączania

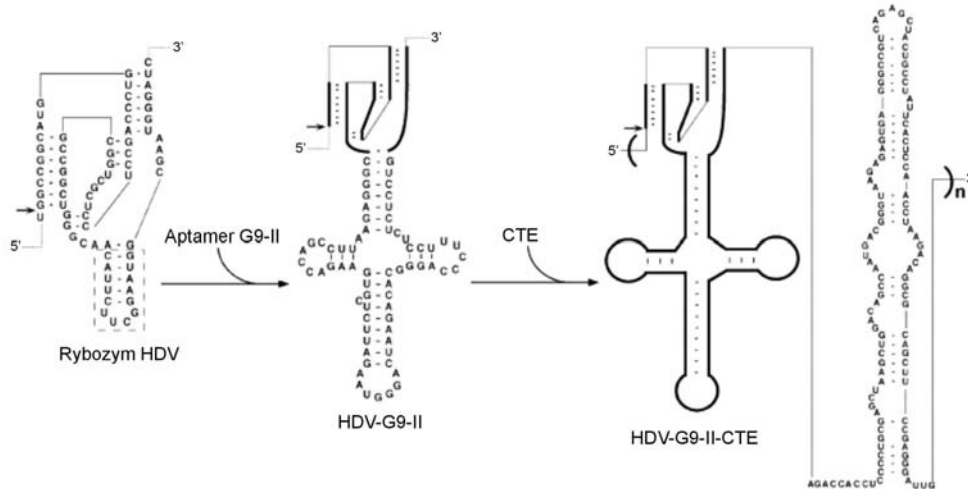
matrycy. W badaniach tych pokazano, że aptamer, oddziałując z białkiem, może powodować „zamrożenie” struktury białka w konformacji zamkniętej, co uniemożliwia odpowiednie umiejscowienie matrycy w miejscu aktywnym (39).

Przykładem innego aptameru specyficznego oddziałującego z polimerazą wirusa HCV jest aptamer RNA, który został wyselekcjonowany z biblioteki kombinatorycznej zawierającej 40-nukleotyduowy region *random* (40). Aptamer ten był zdolny, przy sześciokrotnym nadmiarze, wyprzeć z kompleksu z polimerazą wirusa HCV fragment RNA odpowiadający regionowi 3'UTR lub regionowi X. Oznacza to, że wykazuje on większe powinowactwo do białka NS5B niż fragmenty RNA odpowiadające matrycy oraz, że przyłącza się prawdopodobnie w tym samym miejscu. Sugerowano, że wysoka efektywność aptameru może wynikać z jego strukturalnego podobieństwa do regionu X wirusa HCV. Na podstawie mapowania kompleksu aptameru z polimerazą za pomocą trawienia RNazami wykazano jednak, że miejsca przyłączenia polimerazy w obrębie aptameru są inne niż w regionie X (40).

Na drodze selekcji *in vitro* udało się także otrzymać, z biblioteki kombinatorycznej cząsteczek RNA o 30-nukleotyduowym regionie *random*, trzy aptamery, które przy pięciokrotnym nadmiarze molowym obniżały o 90% aktywność proteazy NS3 wirusa HCV (41). W obecności kofaktora proteazy – białka NS4A, jej aktywność była zredukowana do 30%. W badaniach mechanizmu inhibicji wykazano, że aptamery przyłączały się do proteazy w miejscu odległym od jej miejsca aktywnego. W celu sprawdzenia aktywności w układzie komórkowym jednego z wyselekcjonowanych aptamerów, aptameru G9-II, zaprojektowano specjalny wektor, w którym przyłączono go do rybozomu HDV (rys. 4) (42). Dodatkowo, wprowadzono sekwencję CTE (ang. *Constitutive Transport Element*) ułatwiającą transport RNA z jądra do cytoplazmy. Taki układ w wektorze ekspresyjnym występował w kilku kopiach, w celu zwiększenia ilości aptameru w komórce, natomiast obecność rybozomu gwarantowała jego precyzyjne wycięcie z długiego transkryptu. Konstrukcja HDV-G9-II wykazywała większą efektywność (50% obniżenie aktywności proteazy) niż aptamer G9-II, który był wprowadzany do komórek HeLa w pojedynczej kopii (42).

Otrzymano również aptamer RNA oddziałujący specyficznie z domeną o aktywności helikazy białka NS3 wirusa HCV (43). Wykazywał on podobieństwo strukturalne do regionu zmiennego w obrębie 3'UTR, który może pełnić funkcję regulatora aktywności helikazy. Uzyskanie aptamerów specyficznie oddziałujących z domeną o aktywności proteazy oraz helikazy umożliwiło zaprojektowanie cząsteczek RNA zdolnych do blokowania jednocześnie obydwu funkcji białka NS3 w warunkach *in vitro*, oraz w warunkach komórkowych (44-46).

Metodę selekcji *in vitro* wykorzystano także do znalezienia aptamerów oddziałujących z regionem niekodującym 5' genomu wirusa HCV (47-49). Otrzymano dwa aptamery, które silnie wiązały się do pętli apikalnej domeny II elementu IRES ($K_d = 11$ nM) oraz aptamer oddziałujący z pętlą apikalną domeny III d (47,50). W warunkach *in vitro* dwa pierwsze aptamery powodowały inhibicję translacji zależnej od elementu IRES wirusa HCV o około 30%, natomiast aptamer trzeci aż o 90%. W tym



Rys. 4. Schemat otrzymania konstruktu rybozym HDV-aptamer G9-II przez Nishikawę i wsp. (42). Strzałką zaznaczone miejsce autokatalicznego przecinania się rybozemu HDV.

przypadku jego przyłączenie do domeny III_d zaburzyło prawdopodobnie oddziaływanie z podjednostką 40S rybosomu.

Przykładem innych, efektywnie działających aptamerów, są chimeryczne cząsteczki RNA, otrzymane w dwuetapowym procesie selekcji *in vitro*, zawierające domenę katalityczną (rybozym typu *hammerhead*) oraz domenę specyficznie oddziałującą z określonym regionem IRES (domena IV) wirusa HCV (51,52). Otrzymane cząsteczki RNA obniżały translację zależną od elementu IRES nawet o 95%. Dodatkowo, w komórkach Huh-7, niosących replikon wirusa HCV typu 1b, zaobserwowano obniżenie poziomu wirusowego RNA o 50%, 24 godziny po transfekcji (52). Na podstawie porównania aktywności chimerycznych cząsteczek RNA z aktywnością odpowiedniego aptameru bez domeny katalitycznej wykazano jednak, że efekt inhibicji w dużej mierze jest wynikiem specyficznego oddziaływania aptameru z elementem IRES wirusa HCV (51).

Przykładem strategii antywirusowej opartej na wykorzystaniu oligonukleotydów jest również zastosowanie cząsteczek RNA, które przyjmują strukturę podobną do naturalnie występujących w obrębie genomu wirusa elementów strukturalnych – ang. *decoy strategy*. Takie cząsteczki RNA oddziałując z białkami, które są istotne dla replikacji lub translacji wirusa działają na zasadzie inhibitorów kompetycyjnych i powodują obniżenie efektywności tych procesów. Wykazano w układzie komórkowym, że cząsteczka RNA odpowiadająca domenie III elementu IRES wirusa HCV (rys. 1) powodowała 80% inhibicję translacji zależnej od IRES, natomiast nie wywierała negatywnego wpływu na proces translacji mRNA zależny od kapu (53). W dalszych badaniach wykazano, że cząsteczki RNA odpowiadające subdomenom III_e i III_f

są odpowiedzialne za obniżenie poziomu translacji zależnej od IRES. Inhibicja translacji jest wynikiem ich oddziaływania z białkiem rybosomalnym S5 będącym komponentem podjednostki 40S. To oddziaływanie prawdopodobnie uniemożliwia przyłączenie podjednostki 40S do elementu IRES wirusa HCV i tym samym uformowanie funkcjonalnego kompleksu inicjującego translację (53).

W obrębie regionu kodującego białko NS5B genomowy RNA wirusa HCV przyjmuje strukturę drugorzędową z trzema motywami typu spinki: 5BSL3.1, 5BSL3.2, 5BSL3.3, które są niezbędne dla prawidłowego przebiegu procesu replikacji wirusa (CRE, ang. *Cis-Acting Replication Element*). Zaobserwowano, że cząsteczki RNA typu *decoy* odpowiadające spince 5BSL3.1 i 5BSL3.2 efektywnie blokowały replikację wirusa, powodując ponad 35-krotne obniżenie poziomu RNA w komórce (54). Co ciekawe, cząsteczki RNA będące analogami spinek, które pochodziły z wirusa o genotypie 2a efektywnie hamowały replikację wirusa o ewolucyjnie odległym genotypie 1b. Jest to obserwacja bardzo istotna, gdyż zastosowanie tego typu podejścia nie byłoby ograniczone do jednego genotypu wirusa. W przypadku innych narzędzi oligonukleotydowych, brak pożądanej uniwersalności ich działania stanowi często znaczny problem w ich wykorzystaniu. Zastosowanie strategii *decoy* wiąże się z poznaniem dokładnego mechanizmu działania stosowanych cząsteczek RNA. W przypadku analogów spinek 5BSL3.1 i 5BSL3.2, jak się wydaje, mogą one oddziaływać z białkami komórkowymi zaangażowanymi w tworzenie kompleksu replikacyjnego i przez to zmniejszać szansę przyłączenia się do niego nici RNA wirusa. Rodzi się pytanie czy wprowadzenie cząsteczek RNA, które wykazują powinowactwo do białek komórkowych nie zaburzy prawidłowego funkcjonowania komórki. Obecność RNA 5BSL3.1 i 5BSL3.2 w komórkach Huh nie spowodowała widocznych efektów ubocznych; konieczne są jednak dalsze szczegółowe badania w celu pełnego zrozumienia funkcjonowania zastosowanych inhibitorów RNA.

Poszukiwano także naturalnie występujących RNA, które byłyby zdolne do zaburzania prawidłowego funkcjonowania wirusa HCV. Przykładem takiej cząsteczki jest IRNA, RNA o długości 60 nukleotydów, która występuje u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Wcześniej zaobserwowano, że IRNA blokuje IRES-zależną translację wirusa polio, natomiast nie wykazuje negatywnego wpływu na przebieg translacji zależnej od kapu. Inhibicja jest prawdopodobnie wynikiem oddziaływania IRNA z białkami komórkowymi np. białkiem La (55). Wykazano, że zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* IRNA hamuje także IRES-zależną translację wirusa HCV (55,56). Inhibicja translacji w komórkach wynosiła od 50 do 90%. Na podstawie badań strukturalnych IRNA wykazano, że cząsteczka ta przyjmuje strukturę typu spinki do włosów, a jej podobieństwo do niektórych elementów strukturalnych IRES wirusa HCV może mieć istotne znaczenie w mechanizmie jej działania.

5. Interferencyjne RNA: siRNA oraz shRNA

Wirus HCV należy do grupy najbardziej intensywnie badanych patogenów pod kątem możliwości wykorzystania technologii interferencji RNA do hamowania ekspresji jego genów (57). W obrębie genomu wirusa poszukuje się miejsc podatnych na działanie interferencyjnych RNA (siRNA i shRNA), przy czym region niekodujący 5', ze względu na wysoką zachowawczość, jak się wydaje, jest szczególnie atrakcyjnym „celem ataku” (tab. 2). Wykazano, że siRNA komplementarne do domeny IV,

Tabela 2

Zestawienie przykładów atakowania wirusa HCV za pomocą siRNA/shRNA

Atakowany fragment genomu wirusa HCV	Sposób wprowadzenia siRNA/shRNA	Środowisko reakcji/ Rodzaj replikonu wirusowego	Efektywność działania	Literatura
1	2	3	4	5
5'UTR	siRNA	komórki Huh 7 replikon subgenomowy Rep-Feo (1b)	77-94% inhibicja ekspresji replikonu (genu Fluc)	(48)
	wektor siRNA wektor shRNA		znaczna inhibicja ekspresji replikonu (genu Fluc)	
	siRNA	komórki Huh 7 replikon subgenomowy	80-90% obniżenie aktywności genu FLuc	(83)
	wektor shRNA	komórki Huh 7 I ₃₈₉ /NS3-3'/LucUbiNeo-Et (1a/1b)	znaczna inhibicja ekspresji replikonu (genu Fluc)	(58)
	wektor siRNA	komórki Huh 7 replikon monocistronowy I ₃₈₉ /hyg-ubi/ NS3-3'/5.1	60% redukcja poziomu RNA wirusa (Northern blot) 60-70% redukcja poziomu białka NS5b (Western blot)	(61)
	wektor shRNA	komórki 293FT model myszy	obniżenie poziomu genu FLuc duża efektywność	(60)
	wektor shRNA	komórki Huh 7 replikon monocistronowy I ₃₈₉ /hyg-ubi/ NS3-3'/5.1 (1b)	>80% inhibicja replikacji	(70)
	wektor shRNA shRNA	komórki Huh 7 replikon subgenomowy	inhibicja replikacji wirusa (RT-PCR)	(67)
	wektor siRNA	komórki Huh 7 I ₃₈₉ /hyg-ubi/ NS3-3'/5.1	75% redukcja RNA wirusa (Northern blot)	(59)
siRNA	komórki En5-3, 2-3c replikon subgenomowy Ntat2Aneo (1a) NNoe (1b)	redukcja RNA wirusa (RT-PCR)	(84)	

1	2	3	4	5
białko C	siRNA	komórki Huh 7.5 replikon HCV-Con1 (1b)	> 80-krotne obniżenie poziomu RNA wirusa (RT-PCR)	(63)
	siRNA	komórki HEK 293T E2 (na bazie pGEM-HCJ4) (1b)	15-krotne obniżenie poziomu RNA C (RT-PCR)	(85)
glikoproteina E2	wektor shRNA	replikon (1a)	inhibicja białek wirusa (Western blot)	(86)
	siRNA	komórki HEK 293T plazmid pEGFP-E2 (na bazie pGEM-HCJ4) (1b)	12-krotne obniżenie poziomu RNA E2 (RT-PCR)	(85)
	tsiRNA (tandem siRNA)	komórki Huh 7 HCV replikon FK-R2AN	inhibicja replikacji, ok. 50% inhibicja białek wirusa (Western blot)	(87)
proteaza NS3	siRNA	komórki Huh 7 replikon subgenomowy S11791 (1b)	5,7-krotne obniżenie poziomu RNA wirusa (Northern blot)	(66)
	tsiRNA (tandem siRNA)	komórki Huh 7 HCV replikon FK-R2AN	inhibicja replikacji, ok. 50% inhibicja białek wirusa (Western blot)	(87)
	siRNA	komórki Huh 7 replikon subgenomowy HCVrepAB12neo (1b)	~ 50% obniżenie poziomu RNA wirusa (Northern blot)	(88)
	wektor shRNA	komórki Huh 7 replikon pFK2884Gly (1b)	inhibicja replikacji (RT-PCR)	(89)
	wektor shRNA	replikon (1a)	inhibicja białek wirusa (Western blot)	(86)
	wektor siRNA	komórki Huh 7 I ₃₈₉ /hyg-ubi/ NS3-3'/5.1	75% redukcja RNA wirusa (Northern blot)	(59)
NS4B	siRNA	komórki Huh 7.5 replikon HCV-Con1 (1b)	> 80-krotne obniżenie poziomu RNA wirusa (RT-PCR)	(63)
	siRNA	komórki Huh 7 I ₃₈₉ /NS3-3'/LucUbiNeo-Et (1a/1b)	90-99% inhibicja ekspresji replikonu (genu Fluc)	(58)
NS5A	siRNA	komórki HepGA p90/HCV-FL (tylko NS5a) (1a) replikon HCV-Con1 (1b)	~ 70% obniżona ekspresja białka NS5a obniżona ekspresja białek wirusa (Western blot)	(64)
	siRNA	komórki Huh 7 I ₃₈₉ /NS3-3'/LucUbiNeo-Et (1a/1b)	90-99% inhibicja ekspresji replikonu (genu Fluc)	(58)
polimeraza RNA NS5B	siRNA	komórki Huh 7 subgenomowy replikon S11791 (1b)	8,3 - krotne obniżenie poziomu wirusa RNA (Northern blot)	(66)

1	2	3	4	5
	siRNA wektor shRNA	komórki Huh 7 replikon subgenomowy HCVrepAB12neo (1b)	> 90% obniżenie poziomu RNA wirusa (RT-PCR)	(88)
	siRNA	komórki Huh 7 I ₃₈₉ /NS3-3'/LucUbiNeo-Et (1a/1b)	90-99% inhibicja ekspresji replikonu (genu Fluc)	(58)
	wektor shRNA	komórki Huh 7 replikon pFK2884Gly (1b)	inhibicja replikacji (RT-PCR)	(89)
	wektor shRNA	replikon (1a)	inhibicja białek wirusa (Western blot)	(86)
	wektor shRNA	komórki Huh 7 replikon monocistronowy I ₃₈₉ ,hyg-ubi/ NS3-3'/5.1 (1b)	98% inhibicja replikacji	(70)
3'UTR- region X	wektor siRNA	komórki Huh 7 replikon monocistronowy I ₃₈₉ ,hyg-ubi/ NS3-3'/5.1	50% redukcja poziomu RNA wirusa (Northern blot) 60% redukcja poziomu białka NS5b (Western blot)	(61)
	wektor siRNA	komórki Huh 7 I ₃₈₉ ,hyg-ubi/ NS3-3'/5.1	75% redukcja RNA wirusa (Northern blot)	(59)

regionu pseudowęzła oraz sekwencji w pobliżu kodonu START bardzo efektywnie inhibowały translację zależną od elementu IRES (58). Wyniki uzyskane dla domeny II i III są rozbieżne. Jedni autorzy sugerują, że te fragmenty IRES nie są odpowiednim celem dla siRNA, inna grupa badawcza przedstawia rezultaty świadczące o dużej podatności zarówno domeny II, jak i domeny III na działanie krótkich interferencyjnych RNA (58,59). Rozbieżności te mogą wynikać z zastosowania siRNA komplementarnych do różnych sekwencji w obrębie domeny II i III. Wykazano także, że siRNA z ponad 90% efektywnością obniża aktywność translacyjną sekwencji IRES w komórkach ludzkich transfekowanych plazmidem z genem reporterowym lucyferazy, którego ekspresja zależna była od elementu IRES (60). Region X, stanowiący fragment niekodującego regionu 3' wirusa HCV, jest także potencjalnie atrakcyjnym celem dla siRNA. Otrzymano siRNA komplementarne do tego regionu, które powodowały około 50% obniżenie poziomu wirusowego RNA w komórce (59,61). Wydaje się jednak, że region X nie jest zbyt dostępny dla siRNA, o czym świadczą wyniki prezentowane przez Smitha i wsp. (62), gdyż żaden z 13. zastosowanych siRNA nie powodował znaczącej redukcji poziomu replikacji wirusa HCV. SiRNA komplementarne do spinki SL1 regionu X nici replikacyjnej obniżało poziom wirusowego RNA jedynie o 25%, przy czym nie ulegał zmianie poziom ekspresji wirusowego białka NS5B. Prawdopodobnie, ukierunkowanie siRNA na nić replikacyjną powoduje, że efekt wyciszenia może być obserwowany na poziomie białka dopiero po dłuższym czasie (60,61).

Atakując regiony niekodujące 5' i 3' wirusa HCV zaobserwowano, że obydwie nici siRNA mogą aktywnie uczestniczyć w procesie wyciszenia, działając zarówno na

genomowy RNA, jak i RNA o polarności ujemnej (59,62). SiRNA zaprojektowane na domenę SL1 i SL2 regionu X powodowały obniżenie o około 30-60% ekspresji genu lucyferazy przyłączonego do fragmentu genomu wirusa znajdującego się w orientacji sens jak i antysens, co wskazywało, że obydwie nici dupletu siRNA brały aktywny udział w procesie wyciszenia (59). Nie wszystkie siRNA działają jednak z tą samą efektywnością na obydwie nici wirusowego RNA. Wykazano, że siRNA zaprojektowane na fragment RNA pomiędzy domeną IIIId a IIIe regionu niekodującego 5' nie powodował widocznego efektu wyciszenia nici genomowej jednak efektywnie działał na nią o polarności ujemnej. Podobne obserwacje raportowano dla regionu X (59,62). Preferencje wykorzystania danej nici siRNA, z jednej strony uwarunkowane są parametrami termodynamicznymi tworzonego dupletu, z drugiej dostępnością docelowej cząsteczki RNA do hybrydyzacji. Dotychczas uzyskane wyniki świadczą o większej podatności na działanie siRNA nici genomowej wirusa HCV, zarówno w regionie niekodującym, jak i w jej części kodującej (59,62). Dodatkowo zaobserwowano, że zastosowanie jednocześnie kilku siRNA atakujących różne regiony genomu przynosi lepszy efekt, który jest obserwowany dla obydwu nici wirusowego RNA (59).

Planowanie siRNA obejmuje wybór sekwencji docelowej oraz sposób wprowadzenia siRNA do komórki. Dostępność sekwencji docelowej do hybrydyzacji oraz jej zachowawczość to podstawowe kryteria, które muszą być spełnione przy projektowaniu siRNA. Pełna komplementarność sekwencji jest niezbędna do efektywnego wyciszenia genu. Obecność dwóch, trzech niesparowań pomiędzy siRNA a cząsteczką docelową bardzo obniża efekt interferencji (63,64). Wprowadzenie do komórek zawierających replikon genotypu 1b wirusa HCV kilku siRNA komplementarnych do tej samej sekwencji, ale pochodzącej z trzech różnych genotypów: 1a, 1b oraz 2a wykazało, że tylko siRNA zaprojektowane na bazie genotypu 1b powodowało efektywne obniżenie poziomu ekspresji genu reporterowego (58). Ponieważ różnice w sekwencji pomiędzy genotypami wirusa HCV mogą przekraczać 30% bardzo istotne jest, aby sekwencja docelowa była jak najbardziej konserwatywna. Dodatkowo, stosowanie kilku siRNA jednocześnie zwiększa szansę uzyskania wysokiego efektu wyciszenia. Zaobserwowano również pojawianie się mutacji przystosowawczych, które obniżały efektywność działania siRNA. Po jednorazowym zastosowaniu siRNA komplementarnego do regionu kodującego białko NS5B w wirusowym RNA pojawiły się pojedyncze mutacje. Są one jednak nieuniknione, ponieważ polimeraza wirusa nie posiada funkcji naprawczej. Co ciekawe, po pięciu kolejnych aplikacjach siRNA do komórek, mutacje w regionie atakowanym zaczęły się kumulować. Świadczy to, że pojedyncza mutacja nie jest w stanie całkowicie zablokować efektu RNAi, natomiast pojawienie się dodatkowych zmian w sekwencji regionu atakowanego przyczynia się do znacznego obniżenia efektywności zastosowanych siRNA (65).

Wprowadzenie do komórki interferencyjnych RNA (siRNA lub shRNA) wiąże się z możliwością aktywacji odpowiedzi interferonowej, co jest efektem niepożądanym. Dla porównania, w komórkach traktowanych interferonem α po dwóch dniach zaobserwowano ponad 300-krotny wzrost poziomu białka MxA oraz kilkukrotny

wzrost poziomu białka PKR. Natomiast po wprowadzeniu siRNA komplementarnych do regionu kodującego NS3 i NS5B wirusa HCV nie zaobserwowano zmiany ekspresji białek MxA i PKR w porównaniu z próbą kontrolną (66). Wprowadzenie do komórki shRNA, uzyskanego w warunkach *in vitro* w systemie polimerazy RNA T7, również nie aktywowało genów szlaku interferonowego w komórkach Huh 7 zawierających replikon HCV (67). Nie zaobserwowano wzrostu poziomu ekspresji białka IRF-3, wzmożonej aktywności białka PKR czy RNazy L. Brak odpowiedzi interferonowej może być jednak spowodowany mniejszą wrażliwością komórek Huh 7 na obecność dsRNA w porównaniu do komórek HEK 239 czy HeLa. W komórkach tych siRNA, otrzymane w warunkach *in vitro* w systemie polimerazy T7, indukowały odpowiedź immunologiczną (68). Generowanie w komórce shRNA z wektora ekspresyjnego budzi jeszcze większe kontrowersje. Na podstawie analizy mikromacierzowej wykazano, że obecność shRNA transkrybowanego przy udziale polimerazy III z wektora opartego na lentiwirusie aktywowała szereg genów odpowiedzi interferonowej (69). Zaobserwowano ponad 50-krotny wzrost ekspresji 2',5'-syntetazy oligoadenylowej. Co ciekawe, wprowadzenie siRNA za pomocą tego samego rodzaju wektora nie indukowało zmiany poziomu ekspresji tego białka (69). W literaturze przedstawione są także wyniki świadczące o braku indukcji odpowiedzi interferonowej w obecności shRNA wprowadzanego do komórki poprzez wektor ekspresyjny (70).

Obok prac prowadzonych w układach komórkowych pojawiają się także doniesienia o zastosowaniu technologii RNAi na modelach zwierzęcych. Duży problem przy tego rodzaju badaniach stanowi sposób wprowadzenia obcego DNA/RNA do organizmu zwierzęcia. Obecnie jedną ze stosowanych metod jest wstrzyknięcie dużej objętości roztworu DNA/RNA do żyły ogonowej myszy (ang. *Hydrodynamic Transfection Method*) (71). Stosując tę metodę udało się obniżyć o ponad 80% ekspresję białka lucyferazy w wątrobie podając siRNA dorosłym osobnikom myszy (72). Myszy nie są naturalnie infekowane przez wirusa HCV; istnieje jednak możliwość wprowadzenia plazmidu zawierającego elementy genomu wirusa i w ten sposób badania efektywności zastosowania siRNA. Zaprojektowano shRNA, które powodowało ponad 90% redukcję translacji białka lucyferazy, zależnej od elementu IRES HCV w wątrobie myszy (60). Dodatkowo zauważono, że wprowadzenie siRNA za pomocą plazmidu powodowało inhibicję ekspresji białka już w ciągu 6 godzin od iniekcji, ale po krótkim czasie efekt zanikał. Natomiast w przypadku shRNA wyciszenie genu było obserwowane dopiero po 24 godzinach i utrzymywało się przez następną dobę (60).

Odrębną strategią walki z wirusem HCV opartą na technologii RNAi jest obniżanie poziomu ekspresji białek komórkowych zaangażowanych w cykl życiowy wirusa. Wyciszenie genów takich białek jak: PTB, La, hVAP oraz HuR prowadziło do obniżenia poziomu replikacji wirusa (61,73). Białka La, PTB oraz HuR oddziałują z regionami niekodującymi wirusowego RNA, co jak się wydaje, ma znaczenie dla syntezy nici potomnej. Natomiast białko hVAP służy jako receptor błonowy dla kompleksu replikacyjnego. Obniżenie ekspresji tych białek, poprzez zastosowanie siRNA, przyczyniło się prawdopodobnie do upośledzenia procesu replikacji wirusa. Nasuwa się

jednak pytanie: czy wyciszając endogenne geny nie dojdzie do zaburzeń w prawidłowym funkcjonowaniu komórki gospodarza? Chociaż atakowanie wirusa HCV poprzez obniżenie poziomu ekspresji białek gospodarza istotnych dla jego procesów życiowych, jak się wydaje, jest ciekawym pomysłem, to każdorazowo należy sprawdzić jak redukcja poziomu określonego białka wpływa na prawidłowe funkcjonowanie komórki.

6. Podsumowanie

W ostatnich kilkunastu latach dokonano znacznego postępu prac w kierunku zwiększenia trwałości potencjalnych terapeutyków oligonukleotydowych *in vivo*, podjęto szereg prób ulepszenia naturalnie występujących rybozymów oraz poszukiwania nowych cząsteczek zarówno RNA jak i DNA o pożądanym właściwościach, a także opracowano nowe systemy ułatwiające wprowadzanie oligonukleotydów do komórki. To także czas ogromnego rozwoju w biologii molekularnej, który przejawia się, w przypadku badań nad wirusem HCV, opracowaniem replikonów zawierających cały genom wirusa oraz coraz częstszymi próbami prowadzenia badań na modelu zwierzęcym. Wykorzystanie technologii opartych na kwasach nukleinowych, w poszukiwaniu skutecznej terapii przeciwko wirusowi HCV, budzi szczególnie duże zainteresowanie badaczy oraz firm farmaceutycznych i można oczekiwać, że w najbliższych latach prace te zakończą się sukcesem.

Opracowanie powstało w ramach realizacji projektów badawczych finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego: nr 2 P04A 051 28 oraz nr N N302 385537.

Literatura

1. Zamecnik C., Stephenson M. L., (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 75, 280-284.
2. Kurreck J., (2003), Eur. J. Biochem., 270, 1628-1644.
3. Vidal L., Blagden S., Attard G., de Bono J., (2005), Eur. J. Cancer., 41, 2812-2818.
4. Romero-Lopez C., Sanchez-Luque F. J., Berzal-Herranz A., (2006), Infect. Disord. Drug Targets., 6, 121-145.
5. Alt M., Renz R., Hofschneider P. H., Caselmann W. H., (1997), Arch. Virol., 142, 589-599.
6. Alt M., Eisenhardt S., Serwe M., Renz R., Engels J. W., Caselmann W. H., (1999), Eur. J. Clin. Invest., 29, 868-876.
7. Smith R. M., Walton C. M., Wu C. H., Wu G. Y., (2002), J. Virol., 76, 9563-9574.
8. Reigadas S., Ventura M., Andreola M. L., Michel J., Gryaznov S., Tarrago-Litvak L., Litvak S., Astier-Gin T., (2003), Virology, 314, 206-220.
9. Nulf C. J., Corey D., (2004), Nucleic Acids Res., 32, 3792-3798.
10. Alotte C., Martin A., Caldarelli S. A., di Giorgio A., Condom R., Zoulin F., Durantel D., Hantz O., (2008), Antiviral Res., 80, 280-370.
11. Brown-Driver V., Eto T., Lesnik E., Anderson K. P., Hanecak R. C., (1999), Nucleic Acid Drug Dev., 9, 145-154.
12. Wakita T., Moradpour D., Tokushige K., Wands J. R., (1999), J. Med. Virol., 57, 217-222.

13. Heintges T., Encke J., Wands J. R., (2001), *J. Med. Virol.*, 65, 671-680.
14. Wakita T., Wands J. R., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 14205-14210.
15. Vidalin O., Major M. E., Rayner B., Imbach J. L., Trepo C., Inchauspe G., (1996), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40, 2337-2344.
16. Soler M., McHutchison J. G., Kwoh T. J., Dorr F. A., Pawlowsky J. M., (2004), *Antivir. Ther.*, 9, 953-968.
17. McHutchison J. G., Patel K., Pockros P., Nyberg L., Pianko S., Yu R. Z., Dorr F. A., Kwoh T. J., (2006), *J. Hepatol.*, 44, 88-96.
18. Takkenberg B., de Bruijne J., Weegink C., Jansen P., Reesink H., (2008), *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 10, 81-90.
19. Rayburn E. R., Zhang R., (2008), *Drug Discov. Today*, 13, 513-521.
20. Bartolome J., Castillo I., Carreno V., (2004), *Minerva Med.*, 95, 11-24.
21. Gomez J., Nadal A., Sabariegos R., Beguiristain N., Martell M., Piron M., (2004), *Curr. Pharm. Des.*, 10, 3741-3756.
22. Peracchi A., (2004), *Rev. Med. Virol.*, 14, 47-64.
23. Hafez I. M., Maurer N., Cullis P. R., (2001), *Gene Ther.*, 8, 1188-1196.
24. Lee P. A., Blatt L. M., Blanchard K. S., Bouhana K. S., Pavco P. A., Bellon L., Sandberg J. A., (2000), *Hepatology*, 32, 640-646.
25. Soukup G. A., Breaker R. R., (2000), *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10, 318-325.
26. Breaker R. R., (2002), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 31-39.
27. Bergeron L. J., Perreault J. P., (2005), *Nucleic Acids Res.*, 33, 1240-1248.
28. Bergeron L. J., Reymond C., Perreault J. P., (2005), *RNA*, 11, 1858-1868.
29. Ryu K. J., Kim J. H., Lee S. W., (2003), *Mol. Ther.*, 7, 386-395.
30. Yang Y. H., Li H., Zhou T., Kim K., Liu F., (2006), *Nucleic Acids Res.*, 34, 575-583.
31. Ikeda M., Habu Y., Miyano-Kurosaki N., Takaku H., (2006), *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.*, 25, 427-437.
32. Nadal A., Martell M., Lytle J. R., Lyons A. J., Robertson H. D., Cabot B., Esteban J. I., Esteban R., Guardia J., Gomez J., (2002), *J. Biol. Chem.*, 277, 30606-30613.
33. Sabariegos R., Nadal A., Beguiristain N., Piron M., Gomez J., (2004), *FEBS Lett.*, 577, 517-522.
34. Silverman S. K., (2005), *Nucleic Acids Res.*, 33, 6151-6163.
35. Smith R. M., Walton C. M., Wu H., Wu G. Y., (2002), *J. Virol.*, 76, 9563-9574.
36. Trepanier J. B., Tanner J. E., Alfieri C., (2008), *Virology*, 377, 399-444.
37. Roy S., Gupta N., Subramanian N., Mondal T., Banerjee A. C., Das S., (2008), *J. Gen. Virol.*, 89, 1579-1586.
38. Famulok M., Mayer G., Blind M., (2000), *Acc. Chem. Res.*, 33, 591-599.
39. Biroccio A., Hamm J., Incitti I., de Francesco R., Tomei L., (2002), *J. Virol.*, 76, 3688-3696.
40. Vo N. V., Oh J. W., Lai M. M., (2003), *Virology*, 307, 301-316.
41. Fukuda K., Vishnuvardhan D., Sekiya S., Hwang J., Kakiuchi N., Taira K., Shimotohno K., Kumar P. K., Nishikawa S., (2000), *Eur. J. Biochem.*, 267, 3685-3694.
42. Nishikawa F., Kakiuchi N., Funaji K., Fukuda K., Sekiya S., Nishikawa S., (2003), *Nucleic Acids Res.*, 31, 1935-1943.
43. Nishikawa S., Nishikawa F., Fukuda K., (2003), *Nucleic Acids Res.*, Suppl 241-242.
44. Fukuda K., Umehara T., Sekiya S., Kunio K., Hasegawa T., Nishikawa S., (2004), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325, 670-675.
45. Umehara T., Fukuda K., Nishikawa F., Sekiya S., Kohara M., Hasegawa T., Nishikawa S., (2004), *Nucleic Acids Symp.*, Ser. (Oxf) 195-196.
46. Umehara T., Fukuda K., Nishikawa F., Kohara M., Hasegawa T., Nishikawa S., (2005), *J. Biochem.*, (Tokyo) 137, 339-347.
47. Kikuchi K., Umehara T., Fukuda K., Hwang J., Kuno A., Hasegawa T., Nishikawa S., (2003), *Nucleic Acids Res.*, Suppl 291-292.
48. Yokota T., Sakamoto N., Enomoto N., Tanabe Y., Miyagishi M., Maekawa S., Yi L., Kurosaki M., Taira K., Watanabe M., Mizusawa H., (2003), *EMBO Rep.*, 4, 602-608.

49. Kikuchi K., Umehara T., Fukuda K., Kuno A., Hasegawa T., Nishikawa S., (2005), *Nucleic Acids Res.*, 33, 683-692.
50. Kikuchi K., Fukuda K., Umehara T., Hwang J., Kuno A., Hasegawa T., Nishikawa S., (2002), *Nucleic Acids Res., Suppl* 267-268.
51. Romero-Lopez C., Barroso-delJesus A., Puerta-Fernandez E., Berzal-Herranz A., (2005), *Biol. Chem.*, 386, 183-190.
52. Romero-Lopez C., Diaz-Gonzalez R., Barroso-delJesus A., Berzal-Herranz A., (2009), *J. Gen. Virol.*, 90, 1659-1669.
53. Ray P. S., Das S., (2004), *Nucleic Acids Res.*, 32, 1678-1687.
54. Zhang J., Yamada O., Sakamoto T., Yoshida H., Araki H., Murata T., Shimotohno K., (2005), *Virology*, 342, 276-285.
55. Das S., Ott M., Yamane A., Tsai W., Gromeier M., Lahser F., Gupta S., Dasgupta A., (1998), *J. Virol.*, 72, 5638-5647.
56. Liang X. S., Lian J. Q., Zhou Y. X., Wan M. B., (2004), *World J. Gastroenterol.*, 10, 664-667.
57. Volarevic M., Smolic R., Wu C. H., Wu G. Y., (2007), *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 5, 823-831.
58. Kronke J., Kittler R., Buchholz F., Windisch M. P., Pietschmann T., Bartenschlager R., Frese M., (2004), *J. Virol.*, 78, 3436-3446.
59. Korf M., Meyer A., Jarczak D., Beger C., Manns M. P., Kruger M., (2007), *J. Viral Hepat.*, 14, 122-132.
60. Wang Q., Contag C. H., Ilves H., Johnston B. H., Kaspar R. L., (2005), *Mol. Ther.*, 12, 562-568.
61. Korf M., Jarczak D., Beger C., Manns M. P., Kruger M., (2005), *J. Hepatol.*, 43, 225-234.
62. Smith R. M., Smolic R., Volarevic M., Wu G. Y., (2007), *J. Viral Hepat.*, 14, 194-212.
63. Randall G., Grakoui A., Rice C. M., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 235-240.
64. Sen A., Steele R., Ghosh A. K., Basu A., Ray R., Ray R. B., (2003), *Virus Res.*, 96, 27-35.
65. Wilson J. A., Richardson C. D., (2005), *J. Virol.*, 79, 7050-7058.
66. Kapadia S. B., Brideau-Andersen A., Chisari F. V., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 2014-2018.
67. Hamazaki H., Ujino S., Miyano-Kurosaki N., Shimotohno K., Takaku H., (2006), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 343, 988-994.
68. Kim D. H., Longo M., Han Y., Lundberg P., Cantin E., Rossi J. J., (2004), *Nat. Biotechnol.*, 22, 321-325.
69. Bridge A. J., Pebernard S., Ducraux A., Nicoulaz A. L., Iggo R., (2003), *Nat. Genet.*, 34, 263-264.
70. Henry S. D., Metselaar H. J., Tilanus H. W., Scholte B. J., van der Laan L. J., (2006), *Mol. Ther.*, 14, 485-493.
71. Liu F., Song Y., Liu D., (1999), *Gene Ther.*, 6, 1258-1266.
72. McCaffrey A. P., Ohashi K., Meuse L., Shen S., Lancaster A. M., Lukavsky P. J., Sarnow P., Kay M. A., (2002), *Mol. Ther.*, 5, 676-684.
73. Zhang J., Yamada O., Sakamoto T., Yoshida H., Iwai T., Matsushita Y., Shimamura H., Araki H., Shimotohno K., (2004), *Virology*, 320, 135-143.
74. Sakamoto N., Wu C. H., Wu G. Y., (1996), *J. Clin. Invest.*, 98, 2720-2728.
75. Lieber A., He C. Y., Polyak S. J., Gretch D. R., Barr D., (1996), *J. Virol.*, 70, 8782-8791.
76. Macejak D. G., Jensen K. L., Jamison S. F., Domenico K., Roberts E. C., Chaudhary N., Bellon L., Tong M. J., Conrad A., Pavco P. A., Blatt L. M., (2000), *Hepatology*, 31, 769-776.
77. Caselmann W. H., Serwe M., Lehmann T., Ludwig J., Sproat B. S., Engels J. W., (2000), *World J. Gastroenterol.*, 6, 626-629.
78. Macejak D. G., Jensen K. L., Pavco P. A., Phipps K. M., Heinz B. A., Colacino J. M., Blatt L. M., (2001), *J. Viral Hepat.*, 8, 400-405.
79. Gonzalez-Carmona M. A., Schussler S., Serwe M., Alt M., Ludwig J., Sproat B. S., Steigerwald R., Hoffmann P., Quasdorff M., Schildgen O., Caselmann W. H., (2006), *J. Hepatol.*, 44, 1017-1025.
80. Welch P. J., Tritz R., Ye S., Leavitt M., Yu M., Barber J., (1996), *Gene Ther.*, 3, 994-1001.
81. Jarczak D., Korf M., Beger C., Manns M. P., Kruger M., (2005), *FEBS J.*, 272, 5910-5922.
82. Yu Y. C., Mao Q., Gu C. H., Li Q. F., Wang Y. M., (2002), *World J. Gastroenterol.*, 8, 694-698.
83. Seo M. Y., Abrignani S., Houghton M., Han J. H., (2003), *J. Virol.*, 77, 810-812.
84. Chevalier C., Saulnier A., Benureau Y., Flechet D., Delgrange D., Colbere-Garapin F., Wychowski C., Martin A., (2007), *Mol. Ther.*, 15, 1452-1462.

85. Liu M., Ding H., Zhao P., Qin Z. L., Gao J., Cao M. M., Luan J., Wu W. B., Qi Z. T., (2006), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2049-2055.
86. Prabhu R., Vittal P., Yin Q., Flemington E., Garry R., Robichaux W. H., Dash S., (2005), *J. Med. Virol.*, 76, 511-519.
87. Duckhyang S., Hyeon L., Soo I. K., (2009), *RNA*, 15, 898-910.
88. Wilson J. A., Jayasena S., Khvorova A., Sabatino S., Rodrigue-Gervais I. G., Arya S., Sarangi F., Harris-Brandts M., Beaulieu S., Richardson C. D., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 2783-2788.
89. Takigawa Y., Nagano-Fujii M., Deng L., Hidajat R., Tanaka M., Mizuta H., Hotta H., (2004), *Microbiol. Immunol.*, 48, 591-598.
90. Dutkiewicz M., (2005), *Badanie struktury fragmentów niekodujących RNA wirusa zapalenia wątroby typu C*, praca doktorska, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań.