

AUTOREFERAT**1. Dane osobowe****1.1. Imię i nazwisko**

MARIOLA DUTKIEWICZ (nazwisko rodowe: Tądrowska)

1.2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- Stopień doktora nauk chemicznych w zakresie biochemii
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań, 2005
Tytuł rozprawy doktorskiej: „Badanie struktury fragmentów niekodujących RNA wirusa zapalenia wątroby typu C”
- Tytuł magistra biologii, specjalność biologia molekularna
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, 1999

2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

styczeń 2008 – obecnie	adiunkt/starszy specjalista biolog (od czerwca 2015) Zakład Biochemii RNA kierownik: Prof. Jerzy Ciesiołka, Instytut Chemii Bioorganicznej, Polskiej Akademii Nauk;
styczeń – grudzień 2007	staż podoktorski Zespół Medycyny Molekularnej, kierownik - Prof. Jens Kurreck Instytut Chemii I Biochemii, Wolnego Uniwersytetu Berlińskiego
kwiecień 2005 – styczeń 2007	starszy asystent Pracownia Chemii i Biochemii RNA; kierownik: Prof. Jerzy Ciesiołka, Instytut Chemii Bioorganicznej, Polskiej Akademii Nauk;

3. Podsumowanie dorobku naukowego:

Liczba wszystkich publikacji: **18** (bez artykułów konferencyjnych), w tym **11** oryginalnych prac twórczych (wszystkie z listy JCR) oraz **7** prac przeglądowych (w tym 2 z listy JCR).

Sumaryczny IF publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania (JCR): **42.735**

Łączna punktacja MNiSW: **401**

Liczba publikacji wchodzących w skład habilitacji: **6**

Udział w projektach badawczych: **7**

- a) Kierownik projektów: **2** (“własny” KBN i POMOST_Powroty FNP)
- b) Wykonawca grantu promotorskiego KBN: **1**
- c) Wykonawca grantu “własnego”/OPUS: **4**

Udział w konferencjach krajowych i międzynarodowych: **15**

Opublikowane artykuły konferencyjne: **8**

Liczba cytowań wg bazy Web of Science Core Collection: **184**

Indeks Hirscha wg bazy Web of Science: **6**

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

BADANIE STRUKTURY ORAZ ATAKOWANIE WIRUSOWEGO RNA ZA POMOCĄ NARZĘDZI OLIGONUKLEOTYDOWYCH

b) Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

Wymienione poniżej prace są podstawą wniosku habilitacyjnego i stanowią zamknięty, monotematyczny cykl. W skład osiągnięcia naukowego wchodzi **4** prace oryginalne, opublikowane na liście JCR oraz **2** prace przeglądowe: jedna z listy JCR, druga z bazy BIOSIS.

- H-I. Świątkowska A., **Dutkiewicz M.**, Ciesiołka J.* (2007) Structural features of target RNA molecules greatly modulate the cleavage efficiency of trans-acting delta ribozymes. *Biochemistry* 46, 5523-5533. **IF₂₀₀₇=3.368**, **IF_{5year}=2.828**, liczba cytowań: **6**, punktacja **MNiSW = 25**
- H-II. **Dutkiewicz M.**, Grunert H.-P., Zeichhardt H., Lena S.W., Wengel J., Kurreck J.* (2008) Design of LNA-modified siRNAs against the highly structured 5'UTR of coxsackievirus B3. *FEBS Letters* 582, 3061–3066. **IF₂₀₀₈=3.264**, **IF_{5year}=3.478**, liczba cytowań: **19**, punktacja **MNiSW = 30**
- H-III. **Dutkiewicz M.***, Swiatkowska A., Ojdowska A., Smólska B., Dymarek-Babś T., Jasińska A., Ciesiołka J. (2012) Molecular mechanisms of genome expression of coxsackievirus B3 that belongs to enteroviruses. *BioTechnologia* 93(4), 414-423 – praca przeglądowa, liczba cytowań: **2**, punktacja **MNiSW = 13**
- H-IV. **Dutkiewicz M.***, Ojdowska A., Gorska A., Swiatkowska A. and Ciesiołka J. (2014) The structural and phylogenetic profile of the 3' terminus of coxsackievirus B3 negative strand. *Virus Research* 188: 81–89. **IF₂₀₁₄=2.324**, **IF_{5year}=2.611**, liczba cytowań: **3**, punktacja **MNiSW = 25**
- H-V. **Dutkiewicz M.***, Ojdowska A., Kuczyński J., Lindig V., Zeichhardt H., Kurreck J. and Ciesiołka J. (2015) Targeting Highly Structured RNA by Cooperative Action of siRNAs and Helper Antisense Oligomers in Living Cells. *PLoS ONE* 10: e0136395. **IF₂₀₁₅=3.057**, **IF_{5year}=3.535**, liczba cytowań: **1**, punktacja **MNiSW = 40**

H-VI. **Dutkiewicz M.***, Stachowiak A., Swiatkowska A., Ciesiołka J. (2016) Structure and function of RNA elements present in enteroviral genomes. *Acta Biochimica Polonica* 63(4), 623-630 – praca przeglądowa, **IF₂₀₁₅=1.187**, **IF_{5year}=1.534** punktacja **MNiSW = 15**

* - autor korespondencyjny

Łączny **5-letni IF**, przedstawionego powyżej jednotematycznego cyklu publikacji wynosi=**13.986**

Łączna liczba cytowań= **29** wg Web of Science Core Collection

Łączna punktacja **MNiSW** przedstawionego powyżej jednotematycznego cyklu publikacji wynosi = **148**

Opis własnego udziału w powstaniu wymienionych publikacji znajduje się w załączniku nr 3 do wniosku habilitacyjnego.

Oświadczenia współautorów dotyczące ich wkładu w powstanie poszczególnych publikacji oraz kopie powyższych publikacji umieszczono w załączniku nr 4 do wniosku habilitacyjnego.

- c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

WPROWADZENIE

Biologia była moją ulubioną dziedziną nauki od najwcześniejszych lat. W szkole podstawowej i liceum brałam udział w olimpiadach biologicznych, dochodząc do etapu finałowego Ogólnopolskiej Olimpiady Biologicznej w Warszawie, jako uczennica trzeciej klasy liceum. Poznając tajniki biologii, genetyki i biochemii, na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza zdecydowałam się specjalizować w niezwykle pociągającej dziedzinie – biologii molekularnej. Już na trzecim roku studiów zgłosiłam się na wolontariat do ówczesnego Zakładu Genetyki Człowieka PAN, gdzie dołączyłam do Zespołu Mutagenезy prof. Krzysztofa Szyftera. Tematem pracy magisterskiej był „Genotoksyczny wpływ dymu tytoniowego na limfocyty osobników dorosłych i płodów szczurów”. Metoda badawcza wykorzystywała test „kometkowy”, ukazujący fragmentację DNA szczurzych limfocytów, które były ekspozowane na dym tytoniowy. Oprócz prac związanych z tematem pracy magisterskiej brałam udział w badaniach nad genotoksycznością środków używanych podczas znieczuleń w szpitalach - anestetyków takich jak halotan,

isofluran i sevofluran. Tutaj również zastosowaliśmy test „kometkowy” jako metodą badawczą do określenia stopnia zdegradowania DNA limfocytów ekspozowanych na anestetyki. Komunikat konferencyjny opisujący wyniki uzyskane *in vitro*, zaprezentowany ustnie i opublikowany w formie abstraktu zyskał cztery cytowania zanim ukazała się pełna publikacja.

Studia doktoranckie rozpoczęłam w roku 1999 w Laboratorium Chemii i Biochemii RNA, Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, pod kierunkiem prof. Jerzego Ciesiołki, który jest znanym specjalistą zajmującym się między innymi rybozymami *delta* wiroidu HDV (*hepatitis delta virus/viroid*). Byłam pierwszą osobą w zakładzie, która rozpoczęła badania nad nowym obiektem, jakim był wirus zapalenia wątroby typu C (HCV). Badania, które zostały opisane w mojej dysertacji skupiały się przede wszystkim na analizie struktury drugorzędowej RNA regionów niekodujących wirusa HCV, tzw. UTRs (untranslated regions). Przedmiotem badań były uzyskane na drodze biochemicznej (PCR, transkrypcja *in vitro*) fragmenty wirusowego RNA oraz ich izolowane motywy i domeny strukturalne. Regiony 5'UTR, 3'UTR oraz fragmenty RNA o komplementarnej do nich sekwencji zostały również scharakteryzowane przeze mnie pod kątem dostępności do hybrydyzacji oligonukleotydów. Badania strukturalne prowadzono za pomocą modyfikacji chemicznej z zastosowaniem DMS, DEPC i w obecności dwuwartościowych jonów ołowiu. Analiza komputerowa oraz porównanie wyników uzyskanych dla izolowanych motywów i cząsteczek pełnej długości pozwalały również na ustalenie autonomiczności poszczególnych elementów struktury. Po obronie pracy doktorskiej, która została przyjęta z wyróżnieniem, zgłosiłam wniosek o przyznanie stypendium naukowego fundacji DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst/Niemiecka Centrala Wymiany Akademickiej) w ramach programu „Nowoczesne zastosowania biotechnologii” na wyjazd na staż podoktorski na Wolny Uniwersytet Berliński. Mój projekt zakładał skuteczne zaatakowanie wirusa CVB3 przy pomocy samodzielnie zaprojektowanych siRNA, wymierzonych w wysoce zachowawczy region 5'UTR jego genomu RNA.

Tymczasem, wzięłam udział w projekcie skupionym wokół innych narzędzi oligonukleotydowych, wykorzystywanych do degradacji RNA - rybozymów *delta*. Projekt ten dotyczył zależności efektywności działania rybozymu *delta* typu antygenomowego od kontekstu strukturalnego rozpoznawanej sekwencji. Zaproponowałam, aby jednym z atakowanych przez rybozym obiektów RNA był izolowany region X z regionu niekodującego 3' genomu wirusa HCV, wcześniej scharakteryzowany przeze mnie w pracy doktorskiej. Dawało mi to możliwość wejścia w tematykę wykorzystania narzędzi oligonukleotydowych do degradacji RNA. Okazało się, że zarówno struktura atakowanej sekwencji jak i kontekst strukturalny, otoczenie w jakim się znajduje mają znaczący wpływ na efektywność działania rybozymu *delta* (H-I).

Otrzymawszy pozytywną decyzję w sprawie stypendium DAAD, wyjechałam na roczny staż podoktorski do Berlina. W grupie prof. Volkera Erdmanna, jako członek zespołu Medycyny Molekularnej, realizowałam swój plan badawczy pod kierunkiem prof. Jensa Kurreck'a. Zespół ten wybrałam na miejsce mojego stażu podoktorskiego ze względu na podobną tematykę (wirusy RNA, narzędzia oligonukleotydowe), a jednocześnie szerszy wachlarz technik (kultury komórkowe, testy wirusowe, wykorzystanie siRNA). Zamierzałam nauczyć się zarówno wykorzystywania zjawiska RNAi do degradacji wirusowego RNA, jak również prowadzić hodowle komórkowe i wirusowe oraz monitorować rozprzestrzenianie się wirusów w komórkach ludzkich. Podjęliśmy próbę zaatakowania narzędziami typu siRNA niemal niedostępnego regionu niekodującego 5' wirusa Cocksackie B3 (CVB3). Kilkuetapowa procedura optymalizacji projektowania siRNA i ich modyfikowanych wariantów - siRNA przeciwko temu celowi zakończyła się powodzeniem, czyli wskazaniem jednego narzędzia siRNA efektywnie wyciszającego replikację wirusa w komórkach ludzkich zakażonych wirusem (H-II). Pozostał jednakże niedosyt z powodu uzyskania tylko jednego, choć świetnie działającego, narzędzia. Podczas stażu podoktorskiego brałam również udział w innych projektach, z których jeden zakończył się ważnym odkryciem, że struktura typu G-kwadrupleks obecna w regionie 5'UTR transkryptu ludzkiego białka zic-1 może powodować inhibicję jego translacji.

Po powrocie do Polski postanowiłam kontynuować prace nad wirusem CVB3, wprowadzając go jako nowy obiekt badań do Zakładu Biochemii RNA, IChB PAN. Ponownie, ale tym razem z jeszcze lepszym rezultatem postanowiłam pokonać niedostępność regionu 5'UTR wirusa CVB3 wobec narzędzi typu siRNA. Napisałam projekt grantu, który otrzymał bardzo dobre recenzje i uzyskał finansowanie KBN. Owocem pracy nad tym projektem były dwie prace doświadczalne (H-IV; H-V) i dwie prace przeglądowe (w tym H-III) oraz praca magisterska (1).

Udało się opracować strategię atakowania konserwatywnych, lecz wysoko uporządkowanych regionów RNA i przez to słabo dostępnych do hybrydyzacji. Strategia ta zakładała między innymi: szczegółowe scharakteryzowanie regionu pod kątem struktury drugorzędowej, dostępności do hybrydyzacji jak i występowania odpowiednich sekwencji docelowych dla podejścia siRNA. Poprzez szereg testów wypracowaliśmy sposób indukowania dostępności dla siRNA w częściowo dwuniciowych motywach strukturalnych, za pomocą pomocniczych oligomerów modyfikowanych chemicznie (H-V). W tym samym czasie brałam również udział w innych badaniach prowadzonych w naszym zakładzie, nad realizacją projektów o tematyce związanej z izoformami białka p53, a dokładniej wokół struktury drugorzędowej wariantów sekwencyjnych regionu 5'UTR mRNA p53 i jej wpływu na inicjację translacji.

Ostatni projekt, którego finansowanie pozyskałam z Fundacji na rzecz Nauki Polskiej dotyczył badania struktury całego genomu CVB3 i identyfikowania nowych elementów strukturalnych RNA, zwłaszcza w części kodującej. W ramach projektu powstały między innymi prace przeglądowe charakteryzująca dotąd poznane elementy RNA w genomach enterowirusów i pełnione przez nich funkcje (H-VI) i dwie prace magisterskie (2, 3). Do tej pory zidentyfikowaliśmy kilkanaście konserwatywnych, pod względem zachowania struktury, elementów drugorzędowych RNA w obrębie dwudziestu różnych izolatów wirusa CVB3. Kilka spośród nich ma szansę występować także u innych enterowirusów. Trwają prace badawcze, które uzupełnią zawartość przygotowywanej publikacji oraz trzeciej pracy magisterskiej. Mam nadzieję, że wkrótce ruszą prace także nad przypisaniem funkcji do zaproponowanych elementów strukturalnych RNA. W tym celu przygotowuję właśnie kolejny wniosek grantowy aby kontynuować pracę nad tym obiecującym zagadnieniem.

CELE I OBIEKTY BADAŃ

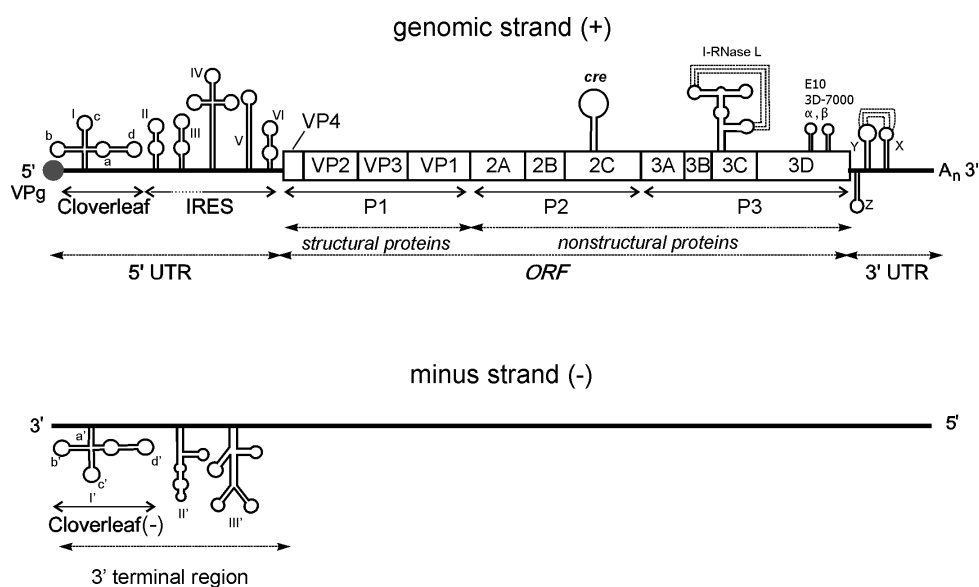
Przedmiotem niniejszej rozprawy habilitacyjnej jest badanie struktury drugorzędowej fragmentów RNA wirusa CVB3 oraz atakowanie wirusowego RNA za pomocą narzędzi oligonukleotydowych. Obiektami tych badań są fragmenty RNA wirusów, których genom stanowi pojedyncza cząsteczka RNA, o dodatniej polarności, takich jak HCV oraz CVB3.

W następującym rozdziale streszczone zostaną wchodzące w skład osiągnięcia naukowego dwie prace przeglądowe. Jedna z nich opisuje organizację genomu, mechanizmy ekspresji i cykl życiowy wirusa CVB3, porównując go do innych enterowirusów (H-III). Druga praca dotyczy struktury i funkcji licznych elementów strukturalnych RNA obecnych w genomach enterowirusów (H-VI). Następnie, omówione zostaną oryginalne prace badawcze wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, dotyczące zarówno związku pomiędzy strukturą RNA a podatnością na działanie narzędzi oligonukleotydowych (H-I), jak również badania struktury drugorzędowej wirusowych fragmentów RNA (H-IV i częściowo H-V). Badania te miały na celu jak najlepsze scharakteryzowanie właściwości strukturalnych fragmentów RNA, mogących mieć wpływ na efektywność działania narzędzi oligonukleotydowych, takich jak rybozymy, oligomery typu antysens, czy siRNA. Kolejny rozdział przedstawia wykorzystanie zdobytej wiedzy i doświadczenia do zaatakowania mocno ustrukturyzowanego regionu 5'UTR wirusa CVB3 narzędziami typu siRNA oraz oligomerami typu antysens (H-II oraz H-V). Najefektywniejsze z tych narzędzi stanowią mogą proto-terapeutyki przeciwko wirusowi CVB3, a opracowana strategia ukierunkowanej degradacji wysoko uporządkowanych regionów RNA może być przydatna zarówno w genomice funkcjonalnej jak i w przypadku atakowania innych wirusów RNA.

W omawianych artykułach cytowane jest obszernie piśmiennictwo źródłowe, wobec czego poniżej przytaczam jedynie niektóre pozycje literaturowe. Podobnie, zrezygnowano z szerokiego cytowania prac innych autorów mających związek z prowadzonymi badaniami, gdyż są one cytowane w artykułach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

CHARAKTERYSTYKA STRUKTURY RNA ORAZ WYBRANYCH MECHANIZMÓW EKSPRESJI WIRUSA COXSACKIE B3 JAKO PRZEDSTAWICIELA ENTEROVIRUSÓW (H-III oraz H-VI).

Wirus Coxsackie B3 (CVB3) jest jednym z głównych patogenów serca (4). Należy do obszernej rodziny *Picornaviridae*, rodzaju *enterovirus*, razem z wirusem polio, rinowirusami i innymi wirusami Coxsackie. Wirusy te charakteryzują się małym, nieopłaszczonym kapsydem o kształcie ikozaedralnym. W ich wnętrzu znajduje się pojedyncza cząsteczka RNA, o polarności dodatniej, w przypadku CVB3 o długości około 7400 nt (5). Genom koduje pojedynczą ramkę odczytu dla wirusowej poliproteiny. Jest ona oflankowana z obu stron przez regiony niekodujące – UTRs (untranslated regions) (Rycina 1).



Rycina 1. Schemat genomu enterowirusów ze wskazaniem elementów strukturalnych RNA oraz regionów kodujących białka. Schemat zawiera struktury RNA wspólne zarówno dla wszystkich enterowirusów, jak i te charakterystyczne dla poszczególnych przedstawicieli.

5'UTR jest bardzo długi, stanowi ponad 10% długości całego genomu i zawiera wysoko uporządkowane struktury RNA sterujące translacją i replikacją: element IRES oraz motyw liścia koniczyny. Dzięki obecności elementu IRES translacja zachodzi niezależnie od kapu i wirus może wyłączyć komórkową translację kap-zależną bez szkody dla własnego metabolizmu. Strukturę IRES stanowi kilka domen typu ramię-pętla, z licznymi pętlami wewnętrznymi (domena II, IV, V i VI) oraz rozgałęzieniami (domena IV) (6). Dzięki swej strukturze przestrzennej IRES rekrutuje niektóre czynniki translacyjne i małą

podjednostkę rybosomalną. Natomiast motyw liścia koniczyny (domena I) jest niezbędny niemal na każdym etapie replikacji, począwszy od przełączenia translacji na replikację, urydylylacji startera replikacyjnego, poprzez inicjację syntezy nici minus, a potem wsparcie inicjacji syntezy potomnych nici plus (7). Swą funkcję zawdzięcza oddziaływaniom z dwoma białkami: PBCP (*poly(C)-binding protein*) oraz z prekursorem polimerazy wirusowej - 3CD. Drugi z regionów niekodujących, 3'UTR zawiera strukturę pseudowęzła, biorącego również udział w regulacji replikacji.

Podobnie do procesu translacji, proces replikacji zachodzi w cytoplazmie, ale wewnątrz struktur błoniastych zwanych tratwami lipidowymi lub pęcherzykami replikacyjnymi. Region kodujący poliproteinę podzielony jest umownie na trzy części: P1, P2 i P3. Region P1 koduje cztery różne białka płaszcza, z kolei regiony P2 i P3 kodują białka niestrukturalne, jak proteazy 2C i 3C, polimerazę 3D, peptyd VPg i inne. Poliproteina przechodzi serię autokatalitycznych trawień doprowadzając do uwolnienia poszczególnych białek i ich prekursorów, np. 2BC, 3AB lub 3CD, które często także posiadają odrębne funkcje w cyklu życiowym wirusa. Nagromadzenie białek niestrukturalnych, doprowadza do zakończenia procesu translacji i uruchomienia na tej samej cząsteczce RNA procesu replikacji.

Wspomniany wcześniej etap urydylylacji startera replikacyjnego zachodzi na matrycy ogona poly(A), terminującego genom na końcu 3' oraz na matrycy elementu strukturalnego *cre*. Został on zidentyfikowany wewnątrz sekwencji kodującej proteazę 2C i scharakteryzowany strukturalnie jako długa spinka z kilkunastonukleotydową pętlą apikalną, bogatą w reszty A (8). Przez długi czas, element *cre* był jedyną strukturą RNA znaną wewnątrz części kodującej genomu. Pozostała część ramki odczytu uznawana była za pozbawioną stabilnych struktur drugorzędowych RNA. Tymczasem niedawno zidentyfikowano kolejne elementy strukturalne RNA o określonej funkcji, w genomach enterowirusów. Jedym z nich jest element iRNaseL, znaleziony wewnątrz sekwencji kodującej proteazę 3C w grupie enterowirusów C, do których należy wirus polio i niektóre wirusy Cocksackie A. Jest to rozgałęziona struktura z oddziaływaniami trzeciorzędowymi, która wiążąc się do monomeru RNazy L skutecznie inhibuje jej dimeryzację i co za tym idzie aktywność rybonukleazową (9). Wirus Cocksackie B3, jako przedstawiciel enterowirusów grupy B nie posiada tego elementu strukturalnego, nie wykazuje również odporności na rybonukleazę L.

Parę lat temu, w sekwencji kodującej polimerazę 3D wirusa polio, zaproponowano kolejne dwa elementy strukturalne, ważne dla wydajnej replikacji (10, 11). Analiza porównawcza sekwencji oraz przewidywanie komputerowe wskazują na potencjalną obecność przynajmniej jednego z motywów, spinki E10 u wszystkich enterowirusów, w tym u wirusa CVB3. Jak dotąd, nie zostało to potwierdzone eksperymentalnie. Jest całkiem prawdopodobne, że istnieje więcej zakodowanych struktur RNA

wewnątrz otwartej ramki odczytu, które mogą mieć istotne znaczenie dla cyklu życiowego wirusa CVB3 i innych enterowirusów. Zidentyfikowanie ich pogłębiłoby wiedzę na temat mechanizmów ekspresji tych wirusów, co z kolei może poprawić możliwości ich kontrolowania w komórce, na przykład poprzez zaburzenie struktury (misfolding) określonych elementów RNA, lub odwrotnie, przez ich naśladowanie.

Lepsze poznanie wirusa CVB3 ma znaczenie również z perspektywy terapii genowej, gdyż jako patogen serca, wirus CVB3 stał się ostatnio ważnym kandydatem jako przenośnik genów i szczepionek do mięśnia sercowego (12, 13). Będzie to wymagało jeszcze wielu badań ukierunkowanych na inhibicję jego patogenności bez utraty właściwości wektorowych. Do tego celu niezbędna będzie jak najlepsza znajomość struktur i mechanizmów cyklu życiowego wirusa CVB3, a także wiedza dotycząca interakcji pomiędzy elementami wirusowymi i komórkowymi.

Patogenność wirusa CVB3 nie ogranicza się tylko do chorób serca, choć jest on jedną z głównych przyczyn transplantacji serca w grupie młodych dorosłych. Powoduje on również choroby trzustki i innych narządów, a także zakażenia ogólnoustrojowe, szczególnie wśród najmłodszych dzieci w krajach Trzeciego Świata. Leczenie polega na kuracji interferonem, nie istnieje bowiem żaden specyficzny lek zatwierdzony do zwalczania wirusa CVB3. Trwają prace nad opracowaniem małowcząsteczkowych inhibitorów wirusowych proteaz, bądź polimerazy, a także nad zastosowaniem pozabłonowej, rozpuszczalnej formy receptora komórkowego CAR, który jest rozpoznawany przez wirus i mógłby go wychwytywać. Wiele nadziei wiązano również z zastosowaniem narzędzi oligonukleotydowych, takich jak: narzędzia typu siRNA, oligomery typu antysens, rybozymy i inne, o podobnym sposobie działania, czyli takie, które specyficznie rozpoznając sekwencje genomu wirusa doprowadzałyby do jego selektywnej dysfunkcji lub degradacji.

WPŁYW STRUKTURY RNA NA DOSTĘPNOŚĆ SEKWENCJI DOCELOWEJ I EFEKTYWNOŚĆ NARZĘDZI OLIGONUKLEOTYDOWYCH (H-I)

Już od kilku dziesięcioleci trwają prace nad wykorzystaniem narzędzi oligonukleotydowych do degradacji RNA. Okazało się, że obok wielu innych czynników, warunkiem ich efektywnego działania jest dostępność namierzonej sekwencji do hybrydyzacji komplementarnych oligonukleotydów. Dostępność, z kolei, wiąże się ściśle ze strukturą RNA i choć nie jest jedynym, to okazuje się niezwykle ważnym czynnikiem wpływającym na efektywność narzędzi oligonukleotydowych.

Celem pracy eksperymentalnej, cytowanej jako H-I osiągnięcia naukowego, było ustalenie, czy struktura sekwencji docelowej dla rybozimu *delta* działającego *in-trans* wpływa na efektywność degradacji RNA i w jakim stopniu. W tym celu skonstruowano szereg cząsteczek modelowych RNA. Sekwencja rozpoznawana i cięta przez rybozym występowała w zróżnicowanym kontekście strukturalnym w każdej z modelowych cząsteczek, a więc: w pętli struktury typu ramię-pętla, w

przyległym do regionu sparowanego regionie jednoniciowym po stronie 3', lub 5', itp. Przeprowadzono szereg reakcji cięcia rybozymem *delta*, obliczając parametry kinetyczne tych reakcji, takie jak szybkość, stała K_M , efektywność końcowa mierzona ilością przeciętego substratu w całym czasie reakcji itp. Uzyskano wyniki, które wskazywały na niezwykle znaczący wpływ struktury RNA na efektywność cięcia rybozymem *delta*. Przede wszystkim dostępność do hybrydyzacji rybozemu w miejscu rozpoznania sekwencji docelowej miała znaczenie, ale również jego giętkość ograniczana np. przez bliskość regionu dwuniciowego lub przez umiejscowienie sekwencji w pętli. Wynikało to z faktu, że po przyłączeniu substratu, rybozym przechodzi zmiany konformacyjne, które wymagają przestrzennej elastyczności substratu RNA. Efekt ten wcześniej niedoceniany, nie był uwzględniany przez innych badaczy.

Do podobnych wniosków doprowadziły doświadczenia wykorzystujące warianty rybozemu *delta*, zaprojektowane tak, aby były zdolne do rozpoznania innej niż natywna, określonej sekwencji docelowej. Zastosowano je do degradacji naturalnie występujących cząsteczek RNA o znanej strukturze drugorzędowej. Jednym z nich był tRNA^{Phe}, a drugim region X wirusa zapalenia wątroby typu C – RNA X(+). Obydwa substraty RNA zostały przez nas uprzednio scharakteryzowane pod kątem dostępności do hybrydyzacji wykorzystując semi-ramdomiczne biblioteki 6-merów DNA i aktywność RNazy H. W pierwszym etapie zastosowano bibliotekę kombinatoryczną rybozemu *delta* do mapowania podatności na cięcie cząsteczki RNA X(+). Na podstawie uzyskanych wyników zaprojektowano specyficznie działające rybozemy: R35 i R46. Przecinały one docelową cząsteczkę RNA w oczekiwanych miejscach, jednak stopień końcowego przereagowania wynosił zaledwie 1%. Cząsteczka RNA X(+) występuje w postaci czterech motywów typu spinka do włosów (14). Cięcia generowane przez rybozemy R35 i R46 pojawiają się w obrębie spinki *SL2a* i *SL2b*, które mogą oddziaływać ze sobą tworząc strukturę pseudowęzła (14). Zgodnie z przewidywaniem, w cząsteczkach RNA odpowiadających izolowanemu motywom strukturalnym regionu X(+) zaobserwowano zwiększenie efektywności generowanych cięć, odpowiednio do około 8-12%. W przypadku cząsteczki *SL1/SL2a*, rybozym R46 przyłączał się do regionu, który tworzy strukturę typu spinka do włosów, ale o niewielkiej trwałości termodynamicznej, dlatego można było oczekiwać większej efektywności jego działania (12%). Wydaje się, że bezpośrednia obecność regionu dwuniciowego przylegającego do miejsca związania rybozemu wpływa na efektywność cięcia. Pomimo, że fragmenty RNA odpowiadające izolowanemu motywom regionu X(+) przecinane były tylko w kilkunastu procentach, to w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla cząsteczki X(+) o pełnej długości, otrzymujemy istotny wzrost efektywności działania rybozymów.

W cząsteczce drożdżowego tRNA^{Phe} zaobserwowaliśmy trzy cięcia generowane za pomocą biblioteki rybozemu *delta*. Dwa cięcia pojawiły się w pętli D i jedno w pętli antykodonu. Dostępność pętli

D do hybrydyzacji potwierdzają wyniki Mir i Southern'a (15) uzyskane przy zastosowaniu mikromacierzy 6- i 12-merów DNA. Ponadto, dostępne okazały się również: ramię akceptorowe, pętla dodatkowa oraz pętla TΨC. Porównanie rozkładu miejsc dostępnych do hybrydyzacji krótkich oligonukleotydów z rozkładem cięć generowanych za pomocą biblioteki rybozemu *delta*, pokazuje wyraźnie, że dostępność do hybrydyzacji nie jest jedyną konieczną cechą, jaką musi wykazywać substrat RNA, aby uzyskać jego efektywną degradację za pomocą rybozemu.

Wniosek z badań nad rybozemu *delta*, że zarówno struktura rozpoznawanej sekwencji jak i kontekst strukturalny, otoczenie w jakim się znajduje mają znaczący wpływ na efektywność jego działania, może dotyczyć także innych rybozymów, jak np. hammerhead, a także innych narzędzi oligonukleotydowych.

BADANIA STRUKTURY DRUGORZĘDOWEJ RNA WIRUSA CVB3 (H-IV oraz H-V)

Istotnym obszarem moich badań opisanych w pozycjach H-IV. i H-V. osiągnięcia naukowego była charakterystyka struktury drugorzędowej RNA fragmentów genomu wirusa CVB3, jak również komplementarnej do niego nici minus, powstającej w procesie replikacji. Idea badań strukturalnych wypływa z udowodnionej już niejednokrotnie roli struktury RNA nie tylko dla pełnionej funkcji, ale również dla podatności na działanie narzędzi typu oligonukleotydowego, jak: rybozemy, oligomery typu antisense, siRNA.

Jednym z pierwszych obiektów moich zainteresowań był region niekodujący 5'UTR, który zawiera ważne dla cyklu życiowego elementy strukturalne sterujące translacją oraz replikacją. W opublikowanym w literaturze modelu strukturalnym tego regionu zaproponowano oddziaływania dalekiego zasięgu pomiędzy oddalonymi od siebie domenami I i V (6). Ponieważ planowaliśmy wykorzystanie regionu 5'UTR CVB3 jako modelowego przykładu ciasno upakowanej cząsteczki RNA, postanowiliśmy jako pierwsi przeprowadzić badanie jego struktury *in vivo* oraz dla porównania również *in vitro*. Zaproponowałam zastosowanie do tego celu odczynnika chemicznego DMS (siarczan dimetylu), który posiada zdolność przenikania przez błony komórkowe i modyfikuje pozycje A, C, oraz G w miejscach jednonuciowych. Badanie *in vivo* polegało na zawieszeniu żywych, zakażonych wirusem CVB3 komórek HeLa WIS w roztworze DMS przez określony czas i zatrzymaniu reakcji. Następnie izolowano totalny RNA i przeprowadzano odwrotną transkrypcję. Zastosowanie starterów specyficznych dla wirusa oraz porównanie powstających produktów z liniami sekwencjonowania pozwoliło to na identyfikację miejsc metylacji A i C w badanym regionie. Równolegle przeprowadziliśmy badania *in vitro* fragmentu 5'UTR otrzymanego na drodze syntezy biochemicznej (transkrypcja *in vitro*). Otrzymane wyniki, zarówno z mapowania *in vitro* jak i *in vivo* były z sobą zgodne oraz w większości potwierdziły zaproponowany model

struktury regionu 5'UTR. Ponieważ uzyskaliśmy sygnały metylacji w regionie proponowanych oddziaływań dalekiego zasięgu, sugerujemy że jeżeli one w ogóle zachodzą, to są słabe lub wymagają współdziału nieznanymi czynnikami. Zgodnie z oczekiwaniem, w miejscach poznanych oddziaływań z białkami, np. z PCBP (*poly(C)binding protein*) w obrębie domeny I, nie obserwowaliśmy modyfikacji chemicznej w warunkach *in vivo*, w przeciwieństwie do warunków *in vitro*.

Innym obiektem naszych badań strukturalnych był region terminalny 3' nici minus wirusa CVB3, którego struktura nie była jak dotąd badana eksperymentalnie. Nici minus powstaje w pierwszym etapie replikacji na matrycy nici genomowej – plus. Przypuszcza się, że pozostaje w formie dwuniciowego heterodupleksu z nicią plus do momentu rozpoczęcia kolejnego etapu replikacji – syntezy genomów potomnych. Wówczas konieczne jest rozplecenie terminalnego odcinka heterodupleksu w celu związania kompleksu replikacyjnego, a dokładniej mówiąc aż do sześciu kolejnych kompleksów inicjujących replikację (7). Powstające na uwolnionej nici minus struktury drugo- i trzecio-rzędowe RNA mogą ułatwiać oddziaływanie z niektórymi białkowymi komponentami kompleksów oraz zapobiegać powtórnej re-hybrydyzacji komplementarnych nici, przynajmniej w odcinku terminalnym 3'.

Zatem, zaproponowaliśmy model strukturalny terminalnego odcinka 3' nici minus CVB3, o długości około 750-nukleotydów. W tym celu zaprojektowaliśmy trzy cząsteczki RNA różnej długości: 750, 1250, 1750 nt, reprezentujące terminalną sekwencję 3' wirusowej nici minus. W ten sposób region, który zamierzaliśmy zbadać znajdował się w trzech różnych kontekstach strukturalnych. Mapowanie struktury przeprowadziliśmy metodą modyfikacji chemicznej odczynnikami DMS oraz metodą cięcia RNA indukowanych w obecności jonów ołowiu. Charakterystyka tak długiego regionu wymagała zastosowania kilku specyficznych starterów w reakcjach odwrotnej transkrypcji. Poprzez porównanie wyników uzyskanych niezależnie dla każdej z cząsteczek: 750, 1250 i 1750 nt, ustaliliśmy że region terminalny o długości 750 nt zwija się w sposób autonomiczny i najprawdopodobniej nie oddziałuje z regionami bardziej oddalonymi w kierunku 5' nici minus. Uzyskane dane eksperymentalne posłużyły za więzy strukturalne w programie przewidującym strukturę RNA. Analizowaliśmy wszystkie możliwe konformacje w obrębie 10% najniższej energii swobodnej, za pomocą programu *RNAstructure*. W ten sposób zaproponowaliśmy pierwszy model strukturalny dla terminalnych 750 nt nici minus, z wyróżnieniem najbardziej zdeterminowanych w jego obrębie domen strukturalnych: Domeny I', II' i III', obejmujących razem pierwsze 443 nt z końca 3'. Część tych wyników zostało opisanych w pracy magisterskiej (1).

Dodatkowo, poszczególne domeny I'-III' zostały przeanalizowane w kontekście filogenetycznym. W tym celu sprawdziliśmy, czy pomimo pewnej zmienności sekwencyjnej w obrębie 20 różnych izolatów wirusa CVB3 jest możliwe zawiązanie przez każdy z nich struktur podobnych do domen I'-III'. Okazało się,

że w przypadku najbardziej krańcowej 88-nt domeny I', każda z przeanalizowanych sekwencji umożliwia uformowanie się takiej samej bądź bardzo podobnej struktury typu liść koniczyny. Dla tej domeny I' przeprowadzono również modelowanie struktury trzeciorzędowej z wykorzystaniem programu *RNA Composer* i zaproponowano miejsca oddziaływania z dwoma białkami, przez analogię do wirusa polio. Poznanie struktury tego regionu nici minus, która ma prawdopodobnie istotne znaczenie dla efektywności inicjacji syntezy genomów potomnych ułatwi szczegółowe badanie tego procesu w kontekście oddziaływań ze składnikami kompleksu replikacyjnego oraz potencjalnych inhibitorów tego etapu replikacji.

ATAKOWANIE WIRUSA CVB3 ZA POMOCĄ NARZĘDZI OLIGONUKLEOTYDOWYCH (H- II oraz H- V)

Jednym ze sposobów na specyficzne zwalczanie wirusów w zakażonym organizmie jest wykorzystanie narzędzi oligonukleotydowych do indukowania degradacji wirusowego RNA. Ich ogromną zaletą jest możliwość precyzyjnego wyboru miejsca ataku, jakim jest kilkunastonukleotydowa sekwencja docelowa, która jednakże musi spełnić szereg warunków, aby umożliwić efektywną degradację lub inhibicję wirusa. W przypadku podejścia wykorzystującego mechanizmy interferencji RNA, takie jak mikro RNA (miRNA) lub krótkie interferujące RNA (siRNA) przeprowadzono wiele badań mających na celu rozpoznanie cech, jakie powinny wykazywać efektywnie działające narzędzia oligonukleotydowe i rozpoznawana przez nie sekwencja RNA (16-18). Ustalono szereg zasad dotyczących projektowania efektywnych narzędzi typu siRNA wskazując ograniczenia dowolności składu nukleotydowego wybranych pozycji sekwencji docelowej, a także na wpływ ich struktury warunkującej dostępność do hybrydyzacji komplementarnych oligonukleotydów. Do innych czynników należy również brak stabilnej struktury drugorzędowej, w obrębie nici wiodącej siRNA.

W przypadku atakowania dynamicznie zmieniających się wirusów RNA narzędziami oligonukleotydowymi, kluczowym warunkiem okazała się również zachowawczość atakowanego regionu. Wybór wysoce zachowawczej sekwencji zapobiega bowiem szybkiej ucieczce wirusa w mutacje punktowe i zniesienie inhibitorowego efektu zastosowanego narzędzia. W przypadku siRNA może wystarczyć pojedyncza mutacja punktowa, aby znacznie obniżyć lub wyłączyć aktywność takiego narzędzia. Można uniknąć ucieczki wirusa atakując najbardziej konserwatywne regiony jego RNA oraz stosując kilka narzędzi oligonukleotydowych jednocześnie. Niestety, zwykle okazuje się, że najbardziej konserwatywne regiony wykazują wysoki stopień uporządkowania strukturalnego, często ze względu na pełnione funkcje, które zależą od określonej struktury RNA. Fakt ten nie sprzyja dostępności docelowego regionu do hybrydyzacji komplementarnych oligonukleotydowych. Przykładem są prace gdzie atakowano różne regiony wirusa CVB3, uzyskując dobre wyniki w kodujących partiach genomu, natomiast ponosząc

kompletną porażkę w przypadku najbardziej konserwatywnego w genomie wirusa regionu 5'UTR (20, 21). Autorzy zaprojektowali kilka narzędzi siRNA w tym regionie kierując się tylko i wyłącznie cechami sekwencji pierwszorzędowej, bez uwzględnienia właściwości strukturalnych regionu 5'UTR, które w tamtym czasie nie były jeszcze w pełni poznane.

Postanowiłam wówczas przeprowadzić szczegółową charakterystykę tego regionu i spróbować zaprojektować działające siRNA skierowane w miejsca dostępne do hybrydyzacji wewnątrz 5'UTR wirusa CVB3. Proponowana strategia zakładała kilkuetapowy proces projektowania i optymalizacji najlepiej działających narzędzi. W pierwszym kroku wybrano 22 sekwencje docelowe kierując się wówczas niedawno opublikowanym modelem struktury drugorzędowej 5'UTR (6) oraz znanymi wymaganiami sekwencyjnymi dla siRNA (16, 17). Ponieważ długość sekwencji rozpoznawanej przez kompleks RISC wynosi 19 nt, trudno było wskazać tak długie odcinki leżące w regionach jednoniciowych i trzeba było zaryzykować wybór odcinków częściowo sparowanych. Drugim krokiem było przetestowanie wybranych miejsc 5'UTR na dostępność do hybrydyzacji komplementarnych oligonukleotydów, wykorzystując 19-mery DNA i aktywność RNazy H, enzymu który trawi heterodupleksy RNA-DNA. Z dwudziestu dwóch testowanych miejsc tylko pięć indukowało degradację RNA z zadowalającą efektywnością, 70-100%, wskazując na ich dobrą dostępność do hybrydyzacji.

Na podstawie tych wyników zaprojektowano dupleksy siRNA nakierowane na 5 wyselekcjonowanych miejsc i przetestowano je w układzie reporterowym. Przygotowany konstrukt DNA ulegał ekspresji w komórkach HeLa w postaci hybrydowego RNA, będącego połączeniem sekwencji 5'UTR wirusa CVB3 oraz transkryptu genu zielonej fluorescencji GFP. Stopień ekspresji monitorowano za pomocą mikroskopu obserwując fluorescencję białka GFP oraz za pomocą techniki Western blot. Przeprowadzono szereg testów z zastosowaniem różnych stężeń dupleksów siRNA, ale dopiero przy stężeniu 100 nM efektywność narzędzi przekraczała 70%. Postanowiliśmy poprawić efektywność siRNA wprowadzając modyfikacje LNA do dwóch dupleksów. Jednocześnie przetestowaliśmy trzy antysensowne 16-mery, gapmery LNA skierowane w te same miejsca na cząsteczce docelowej, uzyskując zadowalające wyniki dla jednego z nich (LNA_4-4).

Kolejnym etapem projektowania najbardziej efektywnych narzędzi oligonukleotydowych był test w komórkach zakażonych wirusem CVB3. Przed zakażeniem komórki HeLa-WIS transfekowano wybranymi siRNA i siLNA o stężeniach 20 i 100nM, oraz gapmerami LNA o stężeniach 1-500 nM. Następnie przeprowadzano dwa niezależne testy: Pierwszy – XTT assay, polegał na kolorymetrycznym pomiarze reakcji oddającej stopień przeżycia komórek po transfekcji naszymi narzędziami i zakażeniu wirusem, a drugi „test tynkowy” pokazywał zdolność do replikacji wirusa w uprzednio transfekowanych

komórkach. Okazało się, że gapmer LNA przy stężeniu 50 nM był w stanie zachować do około 50% zakażonych komórek przy życiu, a po zwiększeniu jego stężenia wykazywał efekty toksyczne. Szczęśliwie okazało się, że jeden z przetestowanych siRNA wykazywał antywirusową aktywność w zakażonych komórkach chroniąc je przed skutkami infekcji z 92% efektywnością – liczoną testem XTT i niemal 70% efektywnością wykazaną testem „łysinkowym”. W ten sposób zaprojektowane i przetestowane siRNA, hybrydujące częściowo do jednoniciowego łącznika między domenami V/VI, a częściowo do dwuniciowego ramienia domeny VI regionu 5'UTR wirusa CVB3 stało się obiecującym prototypem leku przeciwko temu wirusowi. Wyszliśmy od 22 potencjalnie odpowiednich miejsc ataku, z których tylko jedno okazało się słabym punktem wirusa. Niestety, jedno takie miejsce mogłoby zostać zmutowane przez wirusa po krótkim czasie presji selekcyjnej i uciec spod inhibującego działania naszego narzędzia typu siRNA.

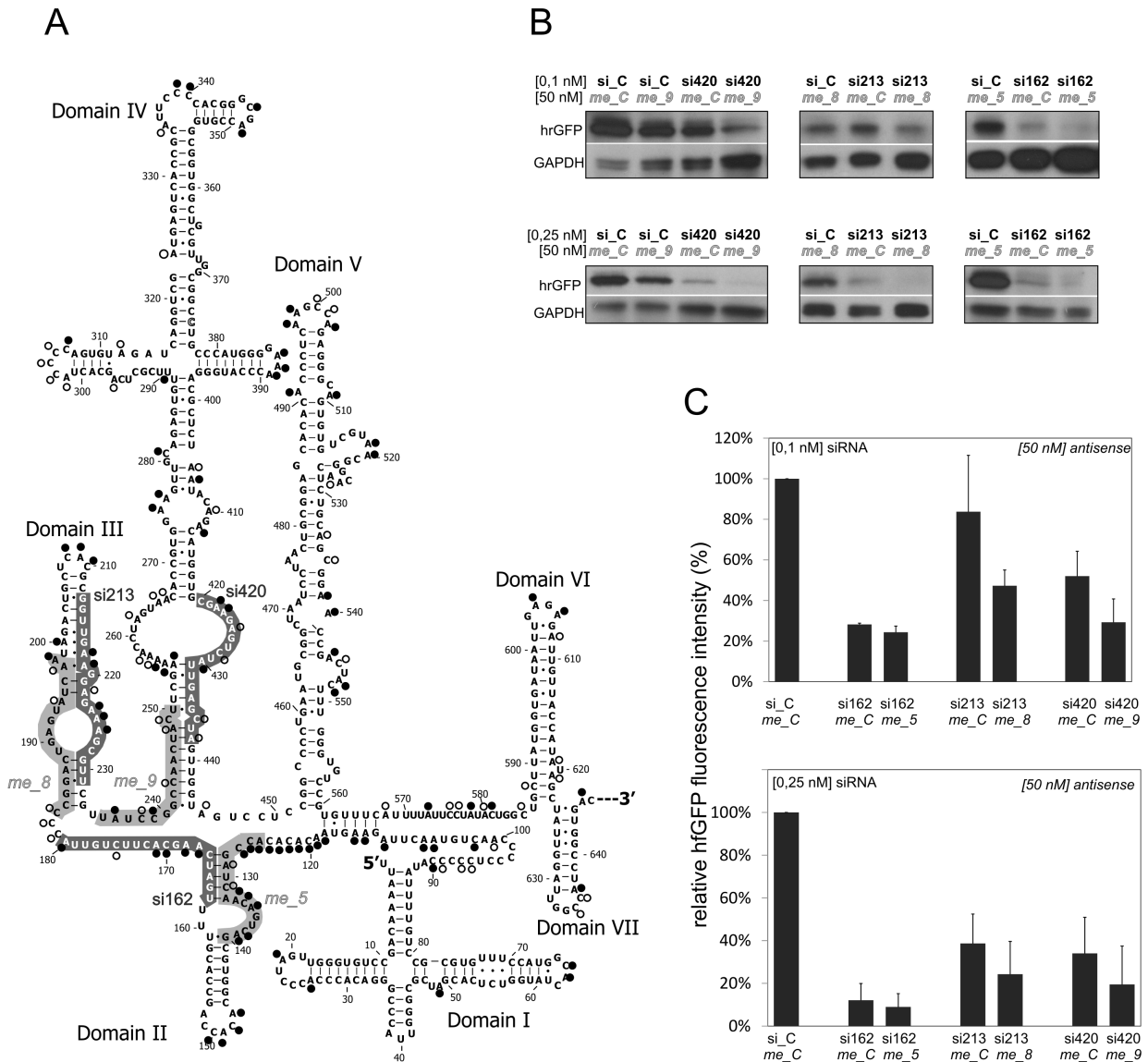
Dlatego postanowiłam zrewolucjonizować strategię atakowania wysoko uporządkowanych regionów RNA, które wymykają się narzędziom oligonukleotydowym ze względu na swą niedostępność do hybrydyzacji, stosując oligomery pomocnicze. Wybór 2'-O-metylowanych 16-merów zasugerowany był ich wzmocnioną stabilnością w komórce, zwiększonym powinowactwem do RNA, a dzięki temu także potencjalną zdolnością tolerowania pojedynczych niesparowań powstałych w wyniku ewentualnych mutacji wirusa. Z drugiej strony planowaliśmy poprawić sposób poszukiwania odpowiednich miejsc podatnych na atak siRNA, aby mając ich więcej do wyboru, móc zastosować przeciwko wirusowi swoisty koktajl, który zapobiegałby ucieczce wirusa za pomocą jednej lub dwóch mutacji punktowych.

Analizę dostępności do hybrydyzacji komplementarnych oligonukleotydów przeprowadzono dwiema metodami. Pierwsza z nich wykorzystywała biblioteki kombinatoryczne 6-merów DNA oraz aktywność RNazy H. Druga metoda polegała na wykorzystaniu oligomerów DNA zawierających 8 i 12 randomicznych pozycji nukleotydowych w połączeniu z odwrotną transkrypcją i łańcuchową reakcją polimerazy (RT-ROL) (22). Dzięki tym podejściom zidentyfikowano szereg miejsc dostępnych do hybrydyzacji oligonukleotydów w badanym RNA, odpowiadającym regionowi 5'UTR wirusa CVB3. Korzystając z otrzymanej mapy dostępności do hybrydyzacji badanych regionów wirusowego RNA zaprojektowano zestaw 16-merów DNA komplementarnych do miejsc dostępnych. Przeprowadzono testy na wiązanie 16-merów DNA do docelowych sekwencji RNA, wykorzystując aktywność RNazy H. W taki sposób zidentyfikowaliśmy miejsca najbardziej dostępne do hybrydyzacji komplementarnych oligonukleotydów 16-merowych.

Jednocześnie przeanalizowano region 5'UTR CVB3 pod względem obecności charakterystycznych sekwencji odpowiednich do związania najbardziej efektywnych narzędzi typu siRNA, biorąc pod uwagę

reguły projektowania efektywnych siRNA (16, 17) Jak się spodziewaliśmy, większość z nich umiejscowiona była w regionach zmapowanych przez nas jako częściowo lub zupełnie niedostępnych. Zauważyliśmy, co ciekawe, że kilka z wyselekcjonowanych miejsc dla siRNA było usytuowanych wewnątrz częściowo dwuniciowych odcinków domen, naprzeciwko miejsc zmapowanych jako dostępne do hybrydyzacji. Postanowiliśmy zatem wykorzystać ten fakt i zastosować podejście ukierunkowanego zmieniania lokalnej struktury RNA poprzez hybrydyzację pomocniczych oligonukleotydów. Aby sprawdzić, czy wiązanie oligonukleotydów pomocniczych spowodowało udostępnienie wybranych sekwencji dla siRNA po drugiej stronie dwuniciowego elementu atakowanej domeny, przeprowadziliśmy test z wykorzystaniem RNazy H oraz kilku par oligonukleotydów. Każda para zawierała 19-mer DNA o zdefiniowanej sekwencji, odzwierciedlającej planowane siRNA oraz modyfikowany 16-mer DNA (2'-O-metylo-), taki który w dupleksie z RNA nie jest rozpoznawany przez RNazę H. W reakcjach kontrolnych stosowano jeden z oligomerów, jak również pary specyficznych 19-merów z kontrolnymi, niespecyficznymi 2'-O-metylo-16-merami. Zaobserwowano produkty przecięcia docelowego RNA przez RNazę H, tylko w tych przypadkach, gdzie zaszło wiązanie 19-meru DNA do nowo udostępnionego miejsca w atakowanym RNA. Okazało się, że najbardziej efektywne pary oligonukleotydów są umiejscowione po przeciwnych stronach częściowo-dwuniciowych elementów strukturalnych. Były to pary: DNA_165 i helper *me_5*, DNA_213 i helper *me_8*, oraz DNA_420 i helper *me_9*.

Na podstawie tych wyników pozyskano odpowiednie narzędzia siRNA mające atakować 5'UTR w miejscach nowo udostępnianych do hybrydyzacji pod wpływem jednoczesnego wiązania oligomerów pomocniczych. W celu przetestowania zaprojektowanych narzędzi oligonukleotydowych w komórkach ludzkich skonstruowano nowe wektory plazmidowe zawierające sekwencję 5'UTR CVB-3 w bezpośrednim sąsiedztwie genu reporterowego białka zielonej fluorescencji – hrGFP. Przeprowadzono testy reporterowe w komórkach HeLa badając stopień ekspresji białka hrGFP przy udziale techniki Western blot jak również intensywność jego fluorescencji za pomocą czytnika płytek. Otrzymane wartości odzwierciedlały efektywność narzędzi siRNA w obecności i pod nieobecność oligomerów pomocniczych. Dla każdej z testowanych par zaobserwowano wzmocniony efekt wyciszania ekspresji hrGFP wynikający z aktywności oligomerów helperowych, w zakresie stężeń: 0,1-2 nM siRNA i 50 nM 2'-O-metylowanych 16-merów.



Rycina 2. Wyciszenie ekspresji konstruktu reporterowego hrGFP-5'UTRcvb3 za pomocą siRNA w obecności i pod nieobecność oligomerów pomocniczych. (A) Model struktury drugorzędowej region 5'UTR wirusa CVB3 wg (6). Wyniki badania struktury *in vivo* są przedstawione na modelu za pomocą kółek: czarne kółka – silna modyfikacja A lub C przez DMS, puste kółka – słaba modyfikacja. Grube szare linie wskazują miejsca docelowe dla oligomerów pomocniczych 2'-O-metylowanego 16-meru (jasnoszare), oraz dla siRNA (ciemnoszare). (B) Reprezentatywne skany Western blot pokazują obniżenie ekspresji konstrukt hrGFP-5'UTRcvb3 w komórkach HeLa. Komórki były współ-transfekowane kombinacjami: 50nM oligomerów pomocniczych (nazwa kursywą) oraz 0.1 lub 0.25 nM siRNA, (nazwa zwykłą czcionką), odpowiednio: si162—siRNA_162, si213—siRNA_213, si420—siRNA_420, jak pokazano na rycinie; GAPDH—kontrola nałożenia; hrGFP—białko reporterowe. (C) Wykresy obrazujące względną intensywność fluorescencji zmierzoną przez czytnik płytek, wykazywaną przez komórki HeLa współ-transfekowane zestawami oligomerów oraz fuzyjnym konstruktem reporterowym hrGFP-5'UTRcvb3. Składniki zastosowanych zestawów oligomerów zaznaczono na rycinie pod słupkami wykresów.

Według pomiaru intensywności fluorescencji, najlepszym narzędziem okazał się siRNA₁₆₅, który razem z pomocniczym oligomerem *me_5* wyciszał ekspresję genu reporterowego do poziomu ok. 10% kontroli (czyli z 90% efektywnością). Natomiast najwyraźniejszy spadek intensywności fluorescencji, aż o około 40%, odnotowano w przypadku zastosowania helpera *me_8* współpracującego z siRNA₂₁₃ (Rycina 2). Zaobserwowano także korelację umiejscowienia par narzędzi oligonukleotydowych w obrębie danego elementu strukturalnego 5'UTR z poziomem zarówno końcowego efektu wyciszenia jak i względnego wzmocnienia wyciszenia. I tak: te narzędzia, które hybrydyzowały do najmniej stabilnego elementu struktury – w domenie II, wykazały najsilniejszą redukcję ekspresji białka reporterowego, natomiast najłagodniejszą redukcję wykazały te, wiążące się do najbardziej stabilnego elementu – trzonu domeny IV.

Najwyraźniejszą pomoc w inhibicji ekspresji hrGFP zaobserwowano w przypadku pary oligomerów hybrydujących w obrębie domeny III, niemal naprzeciwko siebie, w przeciwieństwie do pary, której miejsca hybrydyzacji pokrywały się w niewielkim stopniu. Wyniki te są zgodne z naszymi przewidywaniami, gdyż po raz kolejny potwierdziła się pryncypalna rola struktury RNA dla efektywności działania narzędzi oligonukleotydowych. Dodatkowo potwierdziła się nasza hipoteza, że oligomer pomocniczy, poprzez hybrydyzację do elementu dwuniciowego, zmienia jego strukturę i poprawia dostępność komplementarnej strony trzonu do hybrydyzacji z innym narzędziem oligonukleotydowym.

Podsumowując, opracowaliśmy strategię atakowania mocno ustrukturyzowanych regionów RNA za pomocą starannie dobranych siRNA oraz pomocniczych oligomerów - modyfikowanych 2'-O-metylo-16-merów, które hybrydując po jednej stronie dwuniciowego trzonu elementu RNA czynią go bardziej dostępnym do związania kompleksu RISC, po drugiej stronie, i w ten sposób przyczyniają się do degradacji docelowego RNA. Wyniki te mogą być przydatne przy projektowaniu narzędzi oligonukleotydowych przeciwko innym wysoce uporządkowanym regionom/cząsteczkom RNA np. w zastosowaniach genomiki funkcjonalnej lub podczas atakowania innych wirusów. Dodatkowo, mogą zostać wykorzystane do skomponowania kilkuskładnikowego leku na bazie narzędzi oligonukleotydowych, przeciwko wirusowi CVB3.

AKTUALNE BADANIA I PERSPEKTYWY

Ostatnio, zajmowałam się realizacją projektu finansowanego przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej pt: „Genome-wide RNA secondary structure mapping of coxsackievirus B3”, jako jego kierownik. Projekt ma na celu poszukiwanie i charakterystykę struktury nowych elementów strukturalnych RNA wirusa CVB3 rozmieszczonych w różnych miejscach jego genomu. Poszukiwaliśmy dotąd nieodkrytych, stabilnych termodynamicznie i zachowawczych filogenetycznie elementów strukturalnych RNA. W

ramach projektu powstały między innymi: praca przeglądowa charakteryzująca dotąd poznane elementy RNA w genomach enterowirusów ich funkcje (H-VI) oraz dwie prace magisterskie (2, 3). W toku trwają prace nad charakterystyką struktury najbardziej terminalnego od strony 3', regionu kodującego poliproteinę, gdzie w przypadku innych enterowirusów znaleziono niedawno nowe elementy strukturalne RNA. Wyniki tych badań będą przedmiotem kolejnej pracy magisterskiej, jak również planowanej publikacji. Do tej pory zidentyfikowaliśmy kilkanaście konserwatywnych, pod względem zachowania struktury, elementów drugorzędowych RNA w obrębie dwudziestu różnych izolatów wirusa CVB3 oraz kilka wspólnych dla różnych enterowirusów. Taka zachowawczość struktury, pomimo pewnego stopnia zróżnicowania sekwencji nukleotydowej, wskazuje na możliwość pełnienia przez te motywy ważnej funkcji w cyklu życiowym CVB3 i innych enterowirusów. Aby potwierdzić tę hipotezę i przypisać funkcję do zaproponowanych elementów strukturalnych RNA, przygotowywany jest kolejny projekt – wniosek grantowy na realizację wyzwania, którego zamierzam się podjąć w niedalekiej przyszłości.

LITERATURA:

- H-I. Świątkowska A., **Dutkiewicz M.**, Ciesiołka J.* (2007) Structural features of target RNA molecules greatly modulate the cleavage efficiency of trans-acting delta ribozymes. *Biochemistry* 46, 5523-5533.
 - H-II. **Dutkiewicz M.**, Grunert H.-P., Zeichhardt H., Lena S.W., Wengel J., Kurreck J.* (2008) Design of LNA-modified siRNAs against the highly structured 5'UTR of coxsackievirus B3. *FEBS Letters* 582, 3061–3066.
 - H-III. **Dutkiewicz M.***, Swiatkowska A., Ojdowska A., Smólska B., Dymarek-Babś T., Jasińska A., Ciesiołka J. (2012) Molecular mechanisms of genome expression of coxsackievirus B3 that belongs to enteroviruses. *BioTechnologia* 93(4), 414-423 – praca przeglądowa,
 - H-IV. **Dutkiewicz M.***, Ojdowska A., Gorska A., Swiatkowska A. and Ciesiołka J. (2014) The structural and phylogenetic profile of the 3' terminus of coxsackievirus B3 negative strand. *Virus Res* 188: 81–89.
 - H-V. **Dutkiewicz M.***, Ojdowska A., Kuczyński J., Lindig V., Zeichhardt H., Kurreck J. and Ciesiołka J. (2015) Targeting Highly Structured RNA by Cooperative Action of siRNAs and Helper Antisense Oligomers in Living Cells. *PLoS ONE* 10: e0136395.
 - H-VI. **Dutkiewicz M.***, Stachowiak A., Swiatkowska A., Ciesiołka J. (2016) Structure and function of RNA elements present in enteroviral genomes. *Acta Bioch Pol* 63(4), 623-630 – praca przeglądowa,
-
- 1. Ojdowska Agata, 2011 „Charakterystyka strukturalna RNA terminalnego odcinka 3' nici replikacyjnej wirusa coxsackie B3”
 - 2. Kuczyński Jakub, 2015 „Badanie struktury drugorzędowej RNA genomu wirusa Cocksackie B3”
 - 3. Stachowiak Aleksandra, 2016 “Analiza struktury drugorzędowej RNA fragmentów genomu wirusa Cocksackie B3”
 - 4. Garmaroudi F.S., Marchant D., Hendry R., Luo H., Yang D., Ye X., Shi J., McManus B.M. (2015) *Future Microbiol* 10: 629–653.
 - 5. Racaniello V.R. (2007) Picornaviridae: the virus and their replication. In *Field's Virology*, Knipe HP, Howley DM eds, 5th edn. Lippincott Williams & Wilkins a Wolter Kulwer Business, 795–838.

6. Bailey, J.M. and Tappich, W.E. (2007) *J Virol* 81: 650–668.
7. Sean, P. and Semler, B.L. (2008) Coxsackievirus B RNA replication: lessons from poliovirus. In *Group B Coxsackieviruses*. Tracy, S., Oberste, M.S., Drescher, K., eds., pp 89–121 Springer, Berlin, Heidelberg.
8. Ooij, M.J., Vogt, D.A., Paul, A., Castro, C., Kuijpers, J., Kuppeveld, F.J., Cameron, C.E., Wimmer, E., Andino, R., Melchers, W.J. (2006) *J Gen Virol* 87: 103–113.
9. Townsend, H.L., Jha, B.K., Han, J.Q., Maluf, N.K., Silverman, R.H., Barton, D.J. (2008). *RNA* 14: 1026–1036.
10. Song, Y., Liu, Y., Ward, C.B., Mueller, S., Fitcher, B., Skiena, S., Paul, A.V., Wimmer, E. (2012) *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 14301–14307.
11. Burrill, C.P., Westesson, O., Schulte, M.B., Strings, V.R., Segal, M., Andino, R. (2013) *J Virol* 87: 11670–11683.
12. Kim, D.S. and Nam, J.H. (2011) *Hum Vaccin* 7: 410–6.
13. Ylä-Pelto, J., Tripathi, L., Susi, P. (2016) *Viruses* 57. doi: 10.3390/v8030057.
14. **Dutkiewicz, M.**, and Ciesiołka, J. (2005) *Nucleic Acids Res* 33, 693– 703.
15. Mir, K. U., and Southern, E. M. (1999) *Nat Biotech* 17, 788–792.
16. Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S., Khvorova, A. (2004) *Nat Biotech* 22: 326–330.
17. Kurreck, J., Bieber, B., Jahnel, R., Erdmann, V.A. (2002), *J Biol Chem.*; 277: 7099–7107.
18. Patzel, V., Rutz, S., Dietrich, I., Koberle, C., Scheffold, A. and Kaufmann, S.H. (2005) *Nat Biotech* 23, 1440–1444.
19. Schubert, S., Grunweller, A., Erdmann, V.A. and Kurreck, J. (2005) *J. Mol. Biol.* 348, 883–893.
20. Werk, D., Schubert, S., Lindig, V., Grunert, H.P., Zeichhardt, H., Erdmann, V.A. and Kurreck, J. (2005) *Biol Chem* 386, 857–863.
21. Merl, S. and Wessely, R. (2007) *Oligonucleotides* 17, 44–53.
22. Allawi, H.T., Dong, F., Ip, H.S., Neri, B.P., Lyamichev, V.I. (2001) *RNA* 7: 314–327.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.

5.1 Lista dodatkowych publikacji

A) Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC) :

- I. Swiatkowska A., Zydowicz P., Gorska A., Suchacka J., **Dutkiewicz M.**, Ciesiolka J.* (2015) The Role of Structural Elements of the 5'-Terminal Region of p53 mRNA in Translation under Stress Conditions Assayed by the Antisense Oligonucleotide Approach. *PLoS ONE* 10, e0141676; **IF₂₀₁₅=3.057**, **IF_{5year}=3.535**, liczba cytowań: **1**, punktacja **MNiSW = 40**
- II. Gorska A., Swiatkowska A., **Dutkiewicz M.**, Ciesiolka J.* (2013) Modulation of p53 Expression Using Antisense Oligonucleotides Complementary to the 5'-Terminal Region of p53 mRNA In Vitro and in the Living Cells. *PLoS ONE* 8, e78863; **IF₂₀₁₃=3.534**, **IF_{5year}=3.535** liczba cytowań: **7**, punktacja **MNiSW = 40**
- III. Gorska A., Blaszczyk L., **Dutkiewicz M.**, Ciesiolka J.* (2013) Length variants of the 5' untranslated region of p53 mRNA and their impact on the efficiency of translation

initiation of p53 and its N-truncated isoform $\Delta Np53$. *RNA Biology* 10: 1726-1740.
IF₂₀₁₃=5.377, IF_{5year}=4.755, liczba cytowań: **3**, punktacja **MNiSW = 35**

Pozycje I. - III. przedstawiają wyniki badań skupionych na strukturze i funkcji wariantów sekwencyjnych regionu niekodującego 5' mRNA p53. Uczestniczyłam w nich jako współwykonawca grantów prof. Jerzego Ciesiołki.

W jednej z publikacji (III.) scharakteryzowaliśmy strukturę drugorzędową wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53, będących rezultatem dwóch różnych miejsc startu transkrypcji oraz kodonów inicjujących syntezę białka p53 oraz izoformy $\Delta 40p53$ oraz określiliśmy wpływ różnych wariantów sekwencyjnych regionu terminalnego 5' mRNA p53 na inicjację procesu translacji *in vitro* w komórkach HeLa i MCF-7.

W kolejnej pracy (II.) zastosowano oligonukleotydy antysensowe skierowane przeciwko regionowi terminalnemu 5' mRNA p53 do inhibicji translacji białka p53 i izoformy $\Delta 40p53$ w warunkach *in vitro* oraz w komórkach MCF-7. Zbadano mechanizm inhibicji i zaproponowano, że jeden z badanych oligomerów mógłby być zastosowany jako czynnik wspomagający w radioterapii nowotworów.

Wykazaliśmy także, że struktura regionu terminalnego 5' mRNA p53, obejmująca element IRES stanowi istotny element regulatorowy w translacji białka p53 i izoformy $\Delta 40p53$ w warunkach stresu (I.).

- IV. Arora A., **Dutkiewicz M.**, Scaria V., Hariharan M., Maiti S., Kurreck J.* (2008) Inhibition of translation in living eukaryotic cells by an RNA G-quadruplex motif. *RNA*, 14, 1290-1296.
F1000Biology, IF₂₀₀₈=5.018, IF_{5year}=4.302, liczba cytowań: **114**, punktacja **MNiSW = 35**

Praca ta powstała podczas stażu podoktorskiego w zespole prof. Jensa Kurreck'a w Berlinie. Wzięłam udział w badaniach nad wpływem obecności struktury G-kwadrupleksu w regionie niekodującym 5' transkryptu komórkowego zic-1 na efektywność jego translacji.

Nasze badania potwierdziły obecność takiej struktury wewnątrz fragmentu mRNA zic-1 oraz wykazały po raz pierwszy, że G-kwadrupleks może inhibować proces translacji transkryptu, wewnątrz którego występuje.

- V. **Dutkiewicz M.**, Świątkowska A., Figlerowicz M., Ciesiołka J.* (2008) Structural domains of the 3'-terminal sequence of the HCV replicative strand. *Biochemistry* 47, 12197-12207. **IF₂₀₀₈=3.379, IF_{5year}=2.828**, liczba cytowań: **9**, punktacja **MNiSW = 25**
- VI. **Dutkiewicz M.**, Ciesiołka J.* (2005) Structural characterization of the highly conserved 98-base sequence at the 3' end of HCV RNA genome and the complementary sequence located at the 5' end of the replicative viral strand, *Nucleic Acids Research* 33, 693-703.
IF₂₀₀₅=7.552, IF_{5year}=8.647, liczba cytowań: **15**, punktacja **MNiSW = 40**

Pozycje: V. i VI. opisują duży fragment badań będący treścią mojej rozprawy doktorskiej pt. „Badanie struktury fragmentów niekodujących RNA wirusa zapalenia wątroby typu C”. Przedstawiamy w nich charakterystykę struktury drugorzędowej niekodujących fragmentów genomu wirusa HCV: 3' -terminalnego, 98-nukleotydowego odcinka nici plus, fragmentu o komplementarnej sekwencji, występującego na końcu 5' nici minus wirusa oraz obszernego fragmentu terminalnego 3' nici minus, który jak wykazaliśmy, przyjmuje strukturę domenową. Za pomocą technik badania struktury RNA *in vitro* w obecności jonów ołowiu, reagentów chemicznych jak DMS I DEPC oraz rybonukleaz T1 i S1 proponujemy możliwość utworzenia struktury typu pseudowęzła na końcu 3' nici plus, w obrębie tzw. regionu “X”.

- VII. Ciesiołka J.*, Wrzesiński J., Łęgiewicz M., Smólska B., **Dutkiewicz M.** (2001) Ribozymes of the hepatitis delta virus: Recent findings on their structure, mechanism of catalysis and possible applications. *Acta Biochimica Polonica* 48 (2) 409-418. praca przeglądowa, **IF₂₀₀₁=0.832, IF_{5year}=1.534**, liczba cytowań: **4**, punktacja **MNiSW = 15**

Jest to praca przeglądowa, opisująca ostatnie doniesienia dotyczące struktury i mechanizmu działania rybozymów *delta* z wiroidu HDV oraz ich możliwe wykorzystanie.

B) Monografie, publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie JRC

- I. Kowalczykiewicz D., **Dutkiewicz M.**, Ciesiołka J.* (2012) Isoforms of the p53 protein – the mechanism of their genesis and biological function. *Na Pograniczu Chemii i Biologii* XXVI, 51-74. praca przeglądowa
- II. Błaszczuk L., **Dutkiewicz M.**, Ciesiołka J.* (2007) Proces translacji zachodzący niezależnie od obecności kapu na końcu 5' eukariotycznych mRNA. *Postępy Biochemii* 53, 400-412. praca przeglądowa, punktacja **MNiSW = 5**
- III. **Dutkiewicz M.**, Świątkowska A., Ciesiołka J.* (2006) Struktura i funkcja regionów niekodujących RNA wirusa zapalenia wątroby typu C. *Postępy Biochemii* 52, 62-71. praca przeglądowa, punktacja **MNiSW = 5**
- IV. **Dutkiewicz M.**, Ciesiołka J.* (2002) Strategia ukierunkowanej degradacji RNA oraz wybrane przykłady jej wykorzystania w terapii przeciwwirusowej. *Biotechnologia* 1, 57-70. praca przeglądowa, punktacja **MNiSW = 13**
- V. Florek E.*, **Tądrowska M. (Dutkiewicz)**, Kokocha A., Szyfter K.* (2000) DNA lesions in blood lymphocytes of rat exposed to tobacco smoke studied by *comet assay*. Implications for reproduction. *Acta Poloniae Toxicologica* (późniejsze *Acta Toxicologica*) 8 (2) 255-261. punktacja **MNiSW= 0**, **MNiSW₂₀₁₀= 6**

Wyniki badań, których część była przedmiotem mojej pracy magisterskiej opublikowano w polskim czasopiśmie (V). Wykazaliśmy w nich, że ekspozycja szczurów na dym tytoniowy ma znaczący, szkodliwy wpływ na ich rozrodczość, oraz koreluje z poziomem uszkodzeń DNA limfocytów krwi obwodowej zaobserwowanych i zmierzonych metodą kometkową.

5.2 Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

W latach 1998-2016 wzięłam aktywny udział w **15** międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych, na których wygłosiłam **7** komunikatów ustnych. Szczegóły dotyczące tych konferencji oraz wygłoszonych komunikatów znajdują się w załączniku nr 3. Sumarycznie, jestem współautorem **40** komunikatów konferencyjnych, z których **8** zostało opublikowanych w formie abstraktu w czasopismach z listy JCR lub w ich suplementach.

Wykaz (40) komunikatów konferencyjnych:

- **M. Dutkiewicz** „Searching for new structural RNA elements in the genome of coxsackievirus B3” konferencja „Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący Konsorcjum Poznańskie: RNA RUSH”, (komunikat ustny), Poznań/Obrzycko 2016
- **M. Dutkiewicz** „Secondary structure of coxsackievirus B3 - RNA genome and its targeting with siRNA and helper antisense oligonucleotides” (komunikat ustny), konferencja partnerska Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN oraz Instytutu Pasteura w Paryżu, Paryż 2016
- A. Stachowiak, **M. Dutkiewicz** „Secondary structure of coxsackievirus B3 RNA genome and its targeting with siRNA and helper antisense oligonucleotides” (komunikat ustny), konferencja „Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący Konsorcjum Poznańskie: RNA GO” Poznań/Obrzycko 2015
- A. Swiatkowska, P. Zydowicz, A. Gorska, J. Suchacka, **M. Dutkiewicz**, J. Ciesiołka „The Role of Structural Elements of the 5'-Terminal Region of p53 mRNA in Translation under Stress Conditions Assayed by the Antisense Oligonucleotide Approach”. 20th Annual Meeting of the RNA Society, Madison, USA 2015
- **M. Dutkiewicz**, Agata Ojdowska, Jakub Kuczyński, Vanessa Lindig, Heinz Zeichhardt, Jens Kurreck and Jerzy Ciesiołka „Targeting Highly Structured RNA of Coxsackievirus B3 by siRNAs and Helper Antisense Oligomers”. EMBO Young Scientists' Forum, Warszawa 2014
- **M. Dutkiewicz** „Badanie struktury RNA wirusa Coxsackie B3 oraz opracowanie strategii atakowania wirusowego RNA za pomocą narzędzi oligonukleotydowych” (komunikat ustny), konferencja „Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący Konsorcjum Poznańskie: RNA START”, Poznań/Obrzycko 2014
- **M. Dutkiewicz** „Targeting the highly structured RNA regions of coxsackievirus B3 with oligonucleotide-based tools” (komunikat ustny). Konferencja jubileuszowa IChB PAN „Towards a new RNA world”, Poznań 2013

- **M. Dutkiewicz**, A. Ojdowska and J. Ciesiołka "Hybridization of complementary oligonucleotides in the 5'UTR of the coxsackievirus B3 genomic RNA and in the 3' terminal region of its replicative strand". Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting, *Acta Biochimica Polonica – vol. 59*, (2012) *Suplement 3*, p. 89, Poznań 2012
- **M. Dutkiewicz**, A. Ojdowska and J. Ciesiołka "Mapping of sites accessible to hybridization of complementary oligonucleotides in the terminal regions of the viral genomic and replicative RNA strands of coxsackievirus B3". *Acta Biochimica Polonica – vol. 58 (2011) Supplement 2*, p. 28; II Polish Congress of Biochemistry and Cell Biology, Kraków 2011
- **M. Dutkiewicz**, H.-P. Grunert, H. Zeichhardt, S.W. Lena, J. Ciesiolka, J. Wengel, J. Kurreck, "The 5' untranslated region (5' UTR) of coxsackievirus B3 as an object of structural investigation and as a target for oligonucleotide-based tools", ESF Research Conference on Antiviral Applications of RNA Interference, Sant Feliu de Guixols 2010
- **M. Dutkiewicz**, A. Ojdowska and J. Ciesiolka, "Structural features of the 3' terminal region of coxsackievirus B3 replicative strand", EURASNET Interdisciplinary Focus Meeting in Poznań "Frontiers in Structural Bioinformatics of RNAs and RNPs", Poznań 2010
- D. Rothe, D. Werk, H. Fechner, W. Poller, **M. Dutkiewicz**, H. Zeichhardt, H.-P. Grunert, V. A. Erdmann, J. Kurreck, "RNA interference approaches to inhibit cardiotropic viruses", RNAi Meeting „Gene Regulation by small RNAs“, *J RNAi Gene Silencing*. (2010) *May*, 6(1): p. 372; Oxford 2010
- **M. Dutkiewicz**, D. Werk, D. Rothe, H.-P. Grunert, S.W. Lena, J. Wengel, V.A. Erdmann, J. Kurreck, H. Zeichhardt: "Inhibition of coxsackievirus B3 by modified small interfering RNAs targeting the 5' untranslated region", The 19th Annual Meeting of GfV, Society for Virology, Leipzig 2009
- D. Rothe, D. Werk, S. Schubert, V. Lindig, S. Pinkert, H. Fechner, W. Poller, **M. Dutkiewicz**, H. Zeichhardt, H.-P. Grunert, V.A. Erdmann, J. Kurreck "RNA interference approaches to inhibit cardiotropic viruses", Annual Meeting on Medicinal Chemistry of SRC & KVCV, Brüssel 2009
- **M. Dutkiewicz**, A. Świątkowska, M. Figlerowicz, J. Ciesiołka, "Structural characterization of the 3'-terminal sequence of the HCV minus strand RNA". 13th Annual Meeting of the RNA Society", Berlin 2008
- A. Świątkowska, **M. Dutkiewicz**, M. Pieczyński, J. Ciesiołka, "Targeting the IRES element of HCV RNA with delta ribozymes and antisense oligonucleotides." 13th Annual Meeting of the RNA Society", Berlin 2008
- D. Rothe, D. Werk, **M. Dutkiewicz**, S. Schubert, H-P. Grunert, H. Zeichhardt, V.A Erdmann., H. Fechner, J. Kurreck; "Inhibition of picornaviruses by means of RNA interference". Round Table of Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, *Nucleic Acids Symposium Series* (2008) *No. 52* 63–64, Kyoto 2008
- **M. Dutkiewicz**, J. Ciesiołka, J. Kurreck; "Mapping of accessible sites of oligonucleotide hybridization on 5' Untranslated Region (5'UTR) of Hepatitis C – and Coxsackievirus B3 as preliminary step before siRNA design and application". 3rd Annual Meeting of Oligonucleotide Therapeutics Society, Berlin 2007
- A. Świątkowska, A. Gorska, M. Pieczyński, **M. Dutkiewicz**, J. Ciesiołka. „Element IRES wirusa HCV jako cel ataku dla potencjalnych inhibitorów procesu translacji wirusowego RNA.” III Krajowy Kongres Biotechnologii, Poznań 2007
- **M. Dutkiewicz**, A. Świątkowska, J. Ciesiołka; "Structural characterization of the 3' terminal region of the hepatitis C viral replicative strand, complementary to the IRES element"; 1st BioScience Partnering Event: Berlin-Brandenburg trifft Poznań", Poznań 2006

- A. Świątkowska, **M. Dutkiewicz**, J. Ciesiołka; „Structural features of target RNA molecules modulate the cleavage efficiency of trans-acting delta ribozymes”; Central European Scientists Meeting EMBO/HHMI, Dubrownik 2006
- **M. Dutkiewicz**, A. Świątkowska, J. Ciesiołka, "Structural characterization of the 5' untranslated region of the HCV RNA genome and the complementary sequence of the replicative viral strand." (komunikat ustny) XL Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, *Acta Biochimica Polonica*, vol. 52, (2005), 31,OP2.2, Lublin 2005
- J. Ciesiołka, **M. Dutkiewicz**, M. Łęgievicz, A. Świątkowska, A. Wichłacz, J. Wrzesiński, „Ribozymes: recent views on their biological functions and possible applications.” (referat na zaproszenie, wygłoszony przez J. C.) 40th Meeting of the Polish Biochemical Society, *Acta Biochimica Polonica*, vol. 52, (2005) s.31, L2.4, Lublin 2005
- A. Świątkowska, A. Wichłacz, **M. Dutkiewicz**, J. Wrzesiński, B. Smólska and J. Ciesiołka „The ability of delta ribozyme to cleave highly structured RNA molecules”, International Symposium on Phosphorus Chemistry Directed Towards Biology – 25 Years Later, Łódź 2005
- A. Świątkowska, A. Wichłacz, **M. Dutkiewicz**, J. Wrzesiński i J. Ciesiołka, "The use of *trans*-acting delta ribozymes in the strategy of directed degradation of RNA targets." FEBS Congress, *Eur J Biochem*, 271; (2004) Supplement I, p.57, Warszawa 2004
- **M. Dutkiewicz**, J. Ciesiołka, “Structure investigation of the 3' terminus of the hepatitis C virus genomic RNA”. 8th Annual Meeting of the RNA Society, Wiedeń 2003
- A. Świątkowska, **M. Dutkiewicz**, J. Ciesiołka, "Badanie struktury RNA regionu niekodującego 3' wirusa zapalenia wątroby typu C." XXXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Wrocław 2002
- **M. Dutkiewicz**, J. Ciesiołka, „Badanie struktury regionu X wirusa HCV oraz oligomerów RNA odpowiadających motywom jego struktury drugorzędowej” (komunikat ustny); XXXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Toruń 2001
- **M. Dutkiewicz**, J. Ciesiołka, „Structural probing of the highly conserved 3' end sequence of the HCV RNA genome”, Sixth International Symposium on Positive Strand RNA Viruses, Paryż 2001
- J. Ciesiołka, M. Łęgievicz, J. Wrzesiński, B. Smólska, **M. Dutkiewicz**, "Catalytic cleavage of antigenomic delta ribozymes in the presence of various divalent metal ions." Symposium on RNA Biology IV. RNA: Target and Tool, Chapel Hill 2001
- **M. Dutkiewicz**, J. Ciesiołka; „Analiza strukturalna regionu niekodującego 3' (3'UTR) wirusa HCV”, XXXVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Poznań 2000
- E. Florek, **M. Tądrowska**, A. Kokocha, K. Szyfter, „Lesion de l'ADN des lymphocytes ches le rat expose a la fumee du tabac. Effet de l'exposition sur la reproduction”. VIII Congres Annuel de la Societe Francaise de Toxicologie Analitique, Limoges 2000
- P. Jałoszyński, **M. Tądrowska**, M. Kujawski, M. Wąsowicz, R. Szulc, K. Szyfter; “Genotoxicity of inhalation anesthetics (halotane, isoflurane and sevoflurane) in human lymphocytes studied in vivo and in vitro.” Comet assay workshop, *Neoplasma* 46 (1999) Supplement 20-22; Smolenice 1999
- K. Szyfter, E. Florek, **M. Tądrowska**, A. Kokocha. „Zastosowanie techniki "comet assay" do badania genotoksyczności dymu tytoniowego”. VII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego. Międzyzdroje 1999
- E. Florek, **M. Tądrowska**, K. Szyfter. „Tobacco smoke-induced DNA strand breaks in rat estimated by comet assay”. Chemical Safety for the 21st Century. *Toxicol Lett* 1998: Vol. 95 suppl. 1, p. 186. Abstracts of the International Congress of Toxicology - ICT VIII, Paris 1998

- **M. Tądrowska**, K. Szyfter, E. Florek, A. Kokocha, R. Szulc, K. Szyfter; „Uszkodzenia DNA u szczurów eksponowanych na dym tytoniowy określane techniką elektroforezy pojedynczych komórek (comet assay)” (komunikat ustny); V Ogólnopolska Konferencja Naukowa pt. „Interakcje w Zatruciach”, Poznań/Kiekrz 1998
- P. Jałoszyński, M. Kujawski, **M. Tądrowska**, R. Szulc, K. Szyfter; „Genotoksyczność anestetyków wziewnych (halotanu, izofluranu i sewofluranu) oszacowana w systemie *in vitro*.” I Ogólnopolska Konferencja pt: „Stanowisko pracy anestezjologa: Problemy bezpieczeństwa i ekologii”, Poznań 1998

Mariola Dutkiewicz