

Wirus grypy typu A wciąż stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi. Co roku dotyka nas epidemia wirusa grypy powodowana grypą sezonową. Rocznie choruje na grypę około miliarda osób, w tym u 3-5 milionów ludzi obserwuje się ciężki przebieg choroby, natomiast 250-500 tysięcy umiera z powodu infekcji lub powikłań pogrypowych. Epidemia pandemicznej grypy zwana popularnie „Hiszpanką” panująca w latach 1918-1920 spowodowała śmierć blisko 20 milionów ludzi. Umarło na nią więcej ludzi niż wskutek działań wojennych podczas I wojny światowej. Istnieje zagrożenie pandemią grypy, która ma miejsce, gdy zwierzęcy wirus grypy (szczególnie ptasi) nabiera zdolność do transmisji pomiędzy ludźmi. Potencjał wirusów pandemicznym ma np. ptasi wirus typu A (H5N1) czy (H7N9). Zmienność genomowa wirusa grypy wynika z cech RNA polimerazy wirusowej, której mechanizm działania (brak sprawdzania transkrypcji) sprzyja pojawianiu się mutacji. Istnieje nieustanna potrzeba tworzenia szczepionek na nowe szczepy, szczególnie szczepy grypy pandemicznej.

Genom wirusa grypy stanowi osiem segmentów jednoniciowego RNA o ujemnej polarności. Cykl życiowy wirusa jest na każdym jego etapie zależny od RNA. Ostatnie badania pokazują, że wiedza o pofałdowaniu wirusowego RNA pozwala lepiej zrozumieć zależność struktury i funkcji RNA wirusa grypy oraz pomaga w projektowaniu skutecznych inhibitorów jego namnażania.

Ogólnym celem projektu jest porównanie struktury drugorzędowej w warunkach *in vitro* i *in vivo* wybranych segmentów RNA wirusa grypy oraz konserwatywnych motywów strukturalnych RNA występujących w tych segmentach. Na podstawie zebranych informacji o strukturze i oddziaływaniach wirusowego RNA proponujemy przeprowadzenie w liniach komórkowych MDCK badań dotyczących inhibicji namnażania wirusa grypy z pomocą modyfikowanych antysensowych oligonukleotydów (ASO), siRNA oraz niskocząsteczkowych ligandów. W szczególności planujemy: (1) odpowiedzieć na pytanie, jak na strukturę wybranych segmentów RNA wirusa grypy wpływają inne biomolekuły uczestniczące w cyklu życiowym wirusa (szczególnie białko NP) oraz/i warunki wewnątrzkomórkowe. Proponujemy porównanie struktury drugorzędowej RNA: (i) w komórkach (*in vivo*), (ii) w izolowanych z komórek kompleksach RNP, (iii) w RNA uzyskanym po odbiadczeniu kompleksu RNP w warunkach natywnych, (iv) w transkrybowanych *in vitro* RNA, (2) określić strukturę vRNA na różnych etapach cyklu życiowego wirusa, (3) zbadać udział struktury drugorzędowej (+)RNA wirusa grypy w regulacji procesu replikacji, dojrzewania pre-mRNA oraz translacji, (4) zaprojektować efektywne ASO, siRNA i niskocząsteczkowe ligandy w celu inhibicji namnażania wirusa, (5) określić molekularny mechanizm zaburzenia cyklu życiowego wirusa grypy przez inhibitorowe ASO i ligandy, (6) zaprojektować i określić właściwości inhibitorowe koniugatów powstałych z połączenia najlepszych ASO i ligandów. Oczekujemy, że zwiększy to specyficzność inhibicji oraz ułatwi przenikanie takich inhibitorów przez błonę komórkową.

Obiektami badań projektu będą vRNA, cRNA i mRNA segmentu 5, 7 oraz 8 wirusa grypy, a wybranymi szczepami będą A/VietNam/1203/2004 (H5N1) (badania *in vitro*) oraz A/California/04/2009 (H1N1) (badania *in vivo* i *in vitro*). Wybrane segmenty dają możliwość porównania mRNA ulegających (segment 8 i 7) i nieulegających składaniu (segment 5) podczas procesu dojrzewania. Proponowane do badań segmenty RNA są bardzo ważne w procesie namnażania wirusa. Segment 8 koduje niestrukturalne białka NS1 i NS2 (NEP) niezbędne dla replikacji wirusa. Z kolei segment 7 koduje białka M1 i M2, które wymagane są do formowania wirionu. Natomiast segment 5 koduje białko NP, które razem z odpowiednim vRNA oraz trzema podjednostkami polimerazy wirusowej tworzy kompleks replikacyjno-translacyjny RNP.