

Wirus kleszczowego zapalenia mózgu (TBEV, z ang. „tick-borne encephalitis virus”) jest czynnikiem etiologicznym groźnej, ciężkiej choroby ośrodkowego układu nerwowego przenoszonej przez kleszcze, zwanej kleszczowym zapaleniem mózgu (KZM). TBEV rozprzestrzeniony jest w obrębie 28 krajów Europy Środkowej i Wschodniej, Skandynawii oraz w wielu rejonach Azji. Badania nad izolatami wirusa z różnych obszarów geograficznych umożliwiły wyróżnienie trzech głównych podtypów TBEV: europejskiego (TBEV-Eu), dalekowschodniego (TBEV-FE) oraz syberyjskiego (TBEV-Sib). Na przełomie ostatnich 20 lat obserwuje się znaczący wzrost (ponad 400%) przypadków kleszczowego zapalenia mózgu. Każdego roku pojawiają się nowe ogniska wirusa, praktycznie we wszystkich krajach Europy, poza krajami śródziemnomorskimi. W ciągu ostatnich lat zarejestrowano około 200 tysięcy klinicznych przypadków KZM w Europie i Azji. Wiadomo jednak że podane dane są bardzo szacunkowe i mogą stanowić jedynie 30% wszystkich zakażeń TBEV, gdyż dotyczą tylko rejestrowanych = hospitalizowanych przypadków KZM. Do tej pory nie ma na rynku leku, który wykazywałby skuteczność przeciwko KZM.

Koncepcja proponowanych badań zrodziła się z wieloletniego doświadczenia Zakładu Szczepionek Rekombinowanych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w badaniu aktywności antywirusowej zaprojektowanych i zsyntetyzowanych w Polsce związków wobec wielu groźnych patogenów wirusowych. W przeprowadzonych badaniach określiliśmy mechanizm działania dla kilku wybranych związków, które wykazywały najsilniejsze działanie antywirusowe. Co bardzo istotne udowodniliśmy, że związki, które posiadamy są inhibitorami specyficznych białek wirusowych jak również inhibitorami procesu glikozylacji białek i wykazują aktywność wobec wielu wirusów. Aktywność antywirusowa kilku wybranych związków została również potwierdzona w badaniach wstępnych wobec TBEV z użyciem cząstek wirusopodobnych (VLPs) w owadzim systemie ekspresyjnym.

Pierwszym głównym celem projektu jest uzyskanie podstawowych informacji naukowych dotyczących wpływu zaburzenia różnych procesów cyklu życiowego wirusa na namnażanie wirusa kleszczowego zapalenia mózgu przy pomocy związków należących do analogów i mimetyków tunikamycyny posiadających odmienne mechanizmy działania. Wierzymy, że takie szerokie podejście eksperymentalne pozwoli nam na zaproponowanie nowych opcji terapeutycznych w leczeniu zakażeń TBEV. Zaproponowane badania mają na celu wyselekcjonowanie specyficznych, nietoksycznych związków o silnym działaniu antywirusowym wobec TBEV. W przedstawionym projekcie pragniemy w szczególności skupić się na badaniu aktywności związków, które w specyficzny sposób będą blokowały działanie białek wirusowych ale również zbadać aktywność antywirusową związków będących inhibitorami procesu N-glikozylacji białek. Wpływu zsyntetyzowanych związków na replikację TBEV, syntezę białek wirusowych, powstawanie, sekrecję i infekcyjność wirusowych cząsteczek potomnych zostanie zbadany z użyciem wielu metod z zakresu biologii molekularnej, biochemii i immunologii. W naszych badaniach zastosujemy test hamowania efektu cytopatycznego i test redukcji wielkości łyseinek wirusowych podczas namnażania TBEV *in vitro* na komórkach ssaczych. Ponadto, wykorzystamy nowoczesną aparaturę badawczą m.in. spektrometr masowy, cytometr przepływowy, aparat do real-time PCR czy mikroskop konfokalny, które pozwolą określić wpływ badanych związków na etap cyklu życiowego TBEV, kinetykę wzrostu wirusa czy właściwości biochemiczne glikoproteiny osłonkowej. Badanie wpływu związków na białka TBEV zostanie przeprowadzone z użyciem m.in. analizy Western blotting, immunoprecypitacji czy testu ELISA. Ponadto, projekt zakłada konstrukcję własnych linii komórkowych stabilnie ekspresujących białka wirusowe TBEV, które będą wykorzystywane do badania aktywności związków. Aktywność przeciwwirusowa będzie również badana z zastosowaniem cząstek VLPs.

TBEV na przełomie ostatnich lat rozprzestrzeniła się na nowe obszary. Obserwuje się nowe ogniska choroby wywołane przez nowe warianty wirusa. W najnowszych doniesieniach literaturowych wykazano, że pomiędzy poszczególnymi podtypami wirusa może zachodzić zjawisko rekombinacji. Hipotezą badawczą leżącą u podstaw przedstawionego projektu jest założenie, że nowe warianty wirusa TBEV mogą być bardziej patogenne, oraz dzięki nowym cechom będą w stanie unikać odpowiedzi immunologicznej gospodarza. W związku z tym drugim celem projektu jest poszukiwanie koinfekcji wirusowej u kleszczy oraz nowych wariantów TBEV w próbkach środowiskowych z różnych terenów występowania (Polska, Estonia, Szwecja), co pozwoli na poprawę specyficzności przyszłych szczepionek przeciwko temu patogenowi. W celu opracowania metody detekcji koinfekcji, po izolacji RNA z kleszczy, zastosujemy metody badawcze takie jak RT-PCR, RT-qPCR, dPCR, real-time PCR z użyciem sond typu TaqMan czy sekwencjonowanie. Wymienione metody wykorzystamy do potwierdzenia infekcji TBEV, ustalenia konkretnych szczepów lub gatunków czy potwierdzenia koinfekcji. Ponadto, badanie rekombinacji szczepów TBEV zostanie wzbogacone o badanie koinfekcji wirusowej *in vitro* i analizę kompletnych genomów przy użyciu metody NGS. Uważamy, że screening TBEV przeprowadzony w próbach środowiskowych z różnych terenów występowania kleszczy może przyczynić się do wykrycia nowych ognisk TBEV, nowych wariantów wirusa jak i uzupełnienia i uaktualnienia mapy terenów endemicznych, czyli terenów większego ryzyka zakażenia TBEV.