

Modyfikowane siRNA, rybozomy i system CRISPR/Cas jako strategie inhibicji namnażania wirusa grypy typu A. Zastosowanie i porównanie metod inhibicji nakierowanych na wirusowe RNA.

Wirus grypy typu A jest ludzkim patogenem stanowiącym poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego, wywołującym sezonowe epidemie i sporadyczne pandemie. Zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia zakaźna choroba układu oddechowego wywoływana przez wirusa grypy typu A rocznie powoduje 3-5 milionów ciężkich zachorowań oraz 250-300 przypadków śmiertelnych na świecie. Patogen łatwo rozprzestrzenia się i każdego roku dotyka około 5-10% populacji ludzkiej. Stanowi szczególne zagrożenie dla noworodków, małych dzieci, osób starszych oraz cierpiących z powodu innych poważnych zdrowotnych problemów. W tych przypadkach infekcja może prowadzić do ciężkich komplikacji, a nawet śmierci. Wirus stanowi także poważne zagrożenie dla przemysłu hodowlanego i spożywczego. Aktualnie istnieją dwie strategie zwalczania patogenu - profilaktyczne szczepienia oraz leki przeciwwirusowe, obie mają znaczące ograniczenia. Zmiany antygenowe wirusa oraz pojawienie się nowych szczepów zmniejsza efektywność szczepionek, a przygotowanie nowych, ulepszonych ich wariantów wymaga czasu. Terapia przeciwwirusowa opiera się głównie na inhibitorach białek wirusowych, jednakże ich zastosowanie jest limitowane przez mutacje wirusa powodujące oporność na leki. W ciągu ostatnich kilku lat opracowywane są nowe podejścia do terapii przeciwwirusowej oparte na inhibicji RNA, jednak żadne z nich nie jest bliskie zatwierdzenia przez *U.S. Food and Drug Administration* (FDA).

Badania podstawowe potencjalnych inhibitorów wirusa grypy są koniecznością. Głównym celem proponowanych badań jest opracowanie, optymalizacja i porównanie różnych strategii inhibicji namnażania wirusa grypy, z użyciem metod nakierowanych na wirusowe RNA. W szczególności chcielibyśmy zająć się następującymi zagadnieniami:

1. Inhibicją wirusa grypy za pośrednictwem siRNA oraz wpływem modyfikacji chemicznych wprowadzanych do siRNA na ten proces,
2. Zastosowaniem rybozymów do inhibicji wirusa grypy oraz poznanie zależności pomiędzy sekwencją/strukturą rybozomu typu *hammerhead*, a sekwencją docelowego fragmentu, jak również efektywnością degradacji wirusowego RNA przez rybozomy,
3. Oceną aktywności przeciwwirusowej strategii zakładającej jednoczesne stosowanie siRNA oraz rybozomu typu *hammerhead* (chimerycznego koniugatu shRNA-rybozym *hammerhead*),
4. Użytecznością systemu CRISPR/Cas nakierowanego na wirusowe RNA do inhibicji namnażania wirusa grypy.

W proponowanych badaniach stosowany będzie szczep pandemiczny A/California/04/2009 (H1N1), reprezentatywny dla szczepów podtypów (H1N1) aktualnie cyrkulujących wśród ludzi. Do zaprojektowania odpowiednich czynników inhibitorowych wdramy staranny dobór miejsc docelowych w (+)RNA segmentu 5 wirusa grypy, bazujący na strukturze drugorzędowej wirusowego RNA przewidywanej w analizach bioinformatycznych oraz określonej eksperymentalnie przez naszą grupę badawczą. Wyselekcjonowane rejony są wysoce strukturalnie konserwatywne wśród szczepów wirusa grypy typu A oraz szczególnie istotne z punktu widzenia jego namnażania. Wstępne wyniki naszych badań wskazują, że stanowią one optymalne miejsca oddziaływania wybranych czynników inhibitorowych. Ograniczenie rejonów docelowych do jednego segmentu RNA oraz wybór trzech konserwatywnych i funkcjonalnie istotnych motywów daje szansę na osiągnięcie znacznego efektu inhibicji i wartościowych porównań. Jeśli wszystkie zastosowane strategie nakierowane na te same motywy strukturalne wirusowego RNA wywołają efekt inhibicji namnażania wirusa będzie to stanowiło niepodważalny dowód ich ważnej funkcjonalnej roli w procesie namnażania wirusa.

Wszystkie zaproponowane badania podstawowe mają potencjał stanowienia fundamentu dla dalszych analiz pozwalających na projektowanie przez innych badaczy narzędzi o ulepszonych cechach dla celów terapeutycznych. Zaproponowane metody nie były dotąd stosowane do inhibicji namnażania wirusa grypy. Uzyskane wyniki pozwolą na zwiększenie potencjału strategii nakierowanych na wirusowe RNA oraz rozwinięcie wiedzy na temat czynników determinujących ich efektywność. Ponadto, zastosowanie kilku różnych strategii nakierowanych na te same regiony RNA wirusowego pozwoli na porównanie wydajności inhibicji RNA tymi metodami. Przeprowadzone badania dostarczą informacji, która z zastosowanych strategii jest bardziej efektywna (wywołuje wydajniejszą degradację RNA), specyficzna i przynosi długotrwałe efekty ich działania. A także, która z metod jest bardziej podatna na wprowadzenie chemicznych modyfikacji i poprawę właściwości, a która bardziej zależy od wyboru odpowiedniego miejsca docelowego w wirusowym RNA. Celowanie w konserwatywne strukturalnie i funkcjonalne motywy wirusowego RNA stanowi nową strategię, w szczególności istotną dla niebezpiecznych i szybko rozprzestrzeniających się pandemicznych szczepów wirusa grypy. Wyniki eksperymentów będą miały znaczący wpływ na zrozumienie biologii patogenu z punktu widzenia RNA i roli wybranych motywów strukturalnych RNA segmentu 5. Uzyskana wiedza będzie stanowiła istotny wkład w badania nad inhibicją namnażania wirusa grypy.