

Wirus grypy typu A wciąż zagraża zdrowiu i życiu ludzi. Coroczna epidemia wirusa grypy powoduje zachorowania około miliarda osób, w tym o ciężkim przebiegu u 3-5 milionów, natomiast 250-500 tysięcy umiera z powodu powikłań pogrypowych. Obecnie istnieje kilka podtypów wirusa grypy o potencjale pandemicznym. Wywoływane przez wirus grypy pandemie są jeszcze cięższe w przebiegu i leczeniu oraz powodują większą śmiertelność, przy czym charakteryzują się szybkim rozprzestrzenianiem choroby. Istnieje nieustanna potrzeba tworzenia szczepionek na nowe szczepy, a szczególnie na szczepy grypy pandemicznej. Genom wirusa grypy składa się z osiemiu segmentów jednoniciowego RNA o ujemnej polarności. Cykl życiowy wirusa jest zależny od RNA praktycznie na każdym jego etapie. Ostatnie badania pokazują istotność zależności struktury i funkcji RNA wirusa grypy oraz użyteczność tej wiedzy w projektowaniu skutecznych inhibitorów jego namnażania.

Proponowane badania będą dotyczyły RNA wirusa grypy typu A (szczep A/California/04/2009), a modelowym RNA będzie najmniejszy, 875 nukleotydowy, segment 8 tego wirusa [vRNA8(-)]. Projekt zawiera dwa główne cele badawcze: (1) opracowanie nowej metody określania struktury drugorzędowej RNA opartej o mapowanie docelowego RNA z użyciem PVP i analizę danych strukturalnych z wykorzystaniem metod głębokiego sekwencjonowania (NGS), (2) badania kotranskrypcyjnego fałdowania wirusowego RNA w warunkach *in vitro*, w lizatach wirusowo-komórkowych oraz w komórkach MDCK i wpływ na ten proces antysensowych oligonukleotydów. Ze względu na bardzo duże różnice w prędkości transkrypcji RNA i jego składania w strukturę drugorzędową zostało wykazane dla szeregu dużych RNA, że proces fałdowania RNA rozpoczyna się zanim transkrypcja zostanie zakończona. Mówimy wtedy o procesie kotranskrypcyjnego fałdowania się RNA. Od kilku lat zajmujemy się badaniami struktury drugorzędowej wybranych segmentów vRNA oraz inhibicją namnażania wirusa grypy w komórkach MDCK. Do inhibicji stosujemy różnego typu antysensowe oligonukleotydy (ASO) a celem ich działania jest vRNA. Uważamy, że w komórkach MDCK, w obecności dużego nadmiaru ASO, namnażający się vRNA ulega kotranskrypcyjnemu fałdowaniu. Proponujemy badanie tego procesu w warunkach *in vitro*, lizatach wirusowo-komórkowych i komórkach MDCK. W tym celu proponujemy szczegółowe badania zarówno całego vRNA8, jak i jego znacznie krótszych segmentowych fragmentów powstałych poprzez indukowaną terminację transkrypcji. Dla badań w komórkach MDCK proponujemy nową metodę strukturalnego sekwencjonowania (PVP-NGS) vRNA z wykorzystaniem głębokiego sekwencjonowania (NGS).

Badania kotranskrypcyjnego fałdowania się vRNA w obecności nadmiaru ASO i jego wpływu na namnażanie się wirusa grypy są głównym celem badawczym projektu grantowego. ASO mogą prowadzić do powstania „*termodynamicznie trwałych stanów przejściowych*” podczas kotranskrypcyjnego fałdowania vRNA, co w konsekwencji uniemożliwia osiągnięcie przez vRNA struktury natywnej i powstania wirionu. Proponowane badania mogą doprowadzić do całkowicie odmiennego i nowatorskiego sposobu projektowania ASO. Sądzymy, że najkorzystniej byłoby stosować takie ASO, które termodynamicznie bardzo silnie wiążą się do konserwatywnych fragmentów dwuniciowych vRNA uniemożliwiając utworzenie jego struktury natywnej i powstanie wirionu.

Jakkolwiek, wybranym obiektem badań będzie vRNA segmentu 8, ale genom wirusa grypy buduje osiem segmentów i proponowane badania mogą być rozszerzone na dowolny segment oraz na inne RNA wirusa grypy (mRNA i cRNA). Ponadto, badania zaproponowane w tym projekcie, mające w dużej części charakter badań metodycznych, mogą być rozszerzone na inne RNA, w tym także na skorelowane z wieloma chorobami człowieka.

Efektom realizacji projektu będzie nowa i usystematyzowana wiedza o strukturze i kotranskrypcyjnym fałdowaniu RNA wirusa grypy w warunkach *in vitro*, lizatach i liniach komórkowych. Jest to podstawowy problem związany z umiejętnym projektowaniem antysensowych oligonukleotydów, nakierowanych na vRNA i inhibicją jego namnażania. Proces kotranskrypcyjnego fałdowania się RNA wirusa grypy nie był badany i oczekujemy, że poznanie mechanizmu kotranskrypcyjnego fałdowania się vRNA pozwoli zaprojektować sposób skutecznej inhibicji namnażania vRNA poprzez zmianę jego struktury na etapie transkrypcji. Rezultaty przeprowadzonych badań będą miały fundamentalne znaczenie dla badań dotyczących wirusa grypy i poznania biologii wirusa grypy od strony wirusowego RNA, w tym także jego szczepów pandemicznych.