

Korelacje struktury i funkcji RNA są bardzo dobrze znane. Aby zmienić funkcje biologiczne RNA, w tym chorobotwórczych RNA człowieka, konieczna jest znajomość struktury natywnych RNA. Określanie struktury drugorzędowej RNA jest stosunkowo proste dla RNA w warunkach *in vitro* i opiera się na mapowaniu chemicznym, enzymatycznym i mikromacierzowym, a także na określaniu struktury RNA z zastosowaniem reguł termodynamicznych. Fałdowanie struktury drugorzędowej RNA opiera się na modelu najbliższego sąsiedztwa i wykorzystuje parametry termodynamiczne dla dupleksów oraz niehelikalnych motywów strukturalnych RNA określone w buforze zawierającym 1M chlorek sodu. Określenie struktury RNA, w środowisku komórkowym (*in vivo*, *in cellulo*) jest bardzo trudnym i długotrwałym procesem i obecnie opiera się głównie na mapowaniu chemicznym w komórkach i analizie wyników mapowania z wykorzystaniem metod głębokiego sekwencjonowania (NGS).

W przedstawionym projekcie proponujemy:

(1) określenie parametrów termodynamicznych dotyczących fałdowania się RNA w warunkach zbliżonych do warunków komórkowych (*in vivo-like*), co pozwoli przewidzieć składanie się RNA w warunkach natywnych. Aby osiągnąć ten cel, określimy trwałości termodynamiczną modelowych RNA w buforze komórkowym. Na podstawie wstępnych wyników postulujemy testowanie dwóch potencjalnych buforów komórkowych. Jedną z nich byłaby pożywka do hodowli komórek ssaczy z niską zawartością glukozy (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Low glucose, DMEM low glucose) i drugą ludzka surowica krwi rozcieńczona wymienioną pożywką DMEM. Skład obu płynów (soli mono- i dwuwartościowych kationów, aminokwasów, glukozy) jest bardzo podobny. Drastyczna różnica dotyczy jedynie stężenia białek, które w surowicy jest 175 razy wyższe.

(2) zaimplementować parametry termodynamiki komórkowej do programu RNAstructure (proponujemy nazwę cRNAstructure dla tego nowego programu). Pozwoli to określić fałdowanie się RNA w środowisku komórkowym oraz porównać stabilność termodynamiczną i strukturę RNA w warunkach *in vitro* i komórkowych,

(3) porównać fałdowanie się tych samych RNA określonych przez cRNAstructure i struktury w komórkach rozwiązanej na podstawie mapowania RNA z wykorzystaniem metody NGS. W tej grupie badań szczególnie skupimy się na segmencie 8 wirusa grypy vRNA (vRNA8)

Przedstawiony projekt jest bardzo istotny z dwóch powodów: (a) określenie natywnej struktury RNA pozwoli lepiej zrozumieć jego funkcję biologiczną oraz korelację pomiędzy strukturą i funkcją RNA w komórkach, (b) liczne RNA są bezpośrednio związane z wieloma chorobami człowieka i dla stosowania oligonukleotydów (antysensownych oligonukleotydów, siRNA, systemu CRISPR-Cas9) i niskocząsteczkowych ligandów, jako potencjalnych terapeutyków wiedza na temat fałdowania patogennego RNA jest absolutnie konieczna. Obecnie wszystkie parametry termodynamiczne, zawarte w różnych programach komputerowych służących przewidywaniu fałdowania się RNA, zostały określone w buforze opartym na 1M chlorku sodu. W projekcie postulujemy określenie termodynamicznych parametrów RNA w buforze komórkowym i ich implementację do programu RNAstructure. Zbiór parametrów termodynamicznych obejmuje parametry dla dupleksów RNA i motywów strukturalnych zawierających: pętle wewnętrzne, wybrzuszenia jednostronne, niesparowane końce, struktury spinkowe, pętle wieloramienne oraz oddziaływania współosiowe.

Po raz pierwszy proponujemy określenie parametrów termodynamicznych dotyczących fałdowania RNA w buforze komórkowym. W następnej kolejności parametry te zostaną zastosowane w programie komputerowym RNAstructure, który jest powszechnie stosowany do przewidywania fałdowania RNA. Implementacja do programu RNAstructure parametrów termodynamicznych określonych w buforze komórkowym pozwoli przewidzieć natywną strukturę RNA. Wiedza na temat struktury patogennych RNA człowieka umożliwi racjonalne projektowanie potencjalnych terapeutyków, w szczególności tych opartych na oligonukleotydach i niskocząsteczkowych ligandach.