

W okresie obecnej pandemii wywołanej wirusem SARS-CoV-2 jest dla każdego oczywiste, że infekcje wirusowe są bardzo groźne. Obiektem badawczym projektu jest wirus grypy typu A, a dokładnie jego RNA. Rocznie na grypę sezonową choruje około miliarda ludzi, z czego około 0.5 miliona umiera na skutek powikłań pogrypowych. Ocenia się, że na grypę Hiszpankę w latach 1918/19 zmarło 50-100 milionów ludzi. Częste mutacje RNA wirusa grypy sprawiają, że co roku konieczne jest przygotowanie nowych szczepionek, a stosowane leki są mało skuteczne. W projekcie badawczym skupiono się na wirusowym RNA (vRNA), jako obiekcie molekularnym mogącym być celem dla skutecznych inhibitorów namnażania wirusa grypy. Genom wirusa grypy składa się z ośmiu segmentów vRNA. Analiza bioinformatyczna vRNA wielu tysięcy szczepów wirusa grypy, wykazała blisko 90% konserwatywność strukturalną wirusowego vRNA. Dla wielu rejonów vRNA jest ona bliska 100%, co wskazuje na to, że są rejony RNA, na które może nakierować narzędzia terapeutyczne, aby uzyskać inhibicję replikacji wirusa grypy. Takie narzędzia terapeutyczne cechować będzie uniwersalność inhibitorowa na dowolny szczep wirusa grypy. Badania będą skupiać się na dziesięciu konserwatywnych motywach strukturalnych vRNA, istotnych dla replikacji wirusa. Projekt badawczy jest bardzo złożony, innowacyjny i multidyscyplinarny, a jego realizacja może doprowadzić do wyselekcjonowania niskocząsteczkowych ligandów spełniających rolę uniwersalnych terapeutyków prowadzących do inhibicji namnażania wirusa grypy. Poznany zostanie także mechanizm molekularny działania ligandów hamujących cykl replikacyjny wirusa i nowe funkcje vRNA związane z jego strukturą.

W szczególności projekt badawczy zakłada następujące zadania badawcze:

1/ z puli ponad 18400 niskocząsteczkowych ligandów, poprzez wysokoprzesiewową analizę wyszukane zostaną takie, które silnie wiążą się do jednego z 10 konserwatywnych motywów strukturalnych RNA wybranych z segmentów 8 7 i 5 wirusowego vRNA. Analiza wiązania się ligandu prowadzona będzie w oparciu o metodę FID, bazującą na wypieraniu przez specyficzny ligand fluorescencyjnego indykatora z danego motywu vRNA. Analiza wiązania się ligandów prowadzona będzie na trzech poziomach. Pierwszy poziom to analiza całych bibliotek ligandów. Kolejny poziom, to powtórna analiza pierwotnie wyselekcjonowanych ligandów w warunkach zaostrej selekcji. Trzeci poziom analizy prowadzony będzie w komórkach MDCK zainfekowanych wirusem grypy o właściwościach luminescencyjnych, poprzez posiadanie w segmencie 3 genu znacznika luminescencyjnego,

2/ dla wyselekcjonowanych ligandów będą określone ich stałe dysocjacji dla wiązania się do motywów strukturalnych RNA wirusa grypy oraz do całych segmentów vRNA i ich rybonukleoproteinowych (vRNP) kompleksów. Ponadto, zostaną określone miejsca wiązania się wybranych ligandów do wirusowego RNA,

3/ dla kilku najlepszych ligandów, w oparciu o metody dynamiki molekularnej, zostaną przeprowadzone badania struktury kompleksu vRNA-ligand. Pozwolą one na ocenę ich struktury i w oparciu o uzyskane wyniki tak chemicznie zmodyfikować strukturę ligandów, aby jeszcze mocniej wiązały się z docelowym RNA, a tym samym były lepszymi inhibitorami replikacji wirusa grypy,

4/ na puli wybranych ligandów przeprowadzone zostaną badania ich cytotoksyczności. Pomiary te poprzedzą badania inhibicji wirusa grypy szczepu A/California/04/2009 (H1N1) w komórkach MDCK i A549. Zostanie określony wpływ ligandu na miano wirusa. Zbadana zostanie zależność stosowanego stężenia ligandu i momentu jego podania od efektu inhibicji.

5/ zostaną przeprowadzone rozległe badania molekularne dotyczące mechanizmu inhibicji replikacji wirusa grypy poprzez niskocząsteczkowe ligandy. Określony zostanie wpływ ligandów na powstawanie wirusowego RNA, wirusowych białek i tworzenie się wirionu. Badania te pozwolą zrozumieć molekularny mechanizm inhibicji, poszerzyć wiedzę o procesach biologicznych towarzyszących namnażaniu się wirusa grypy. Wiedza ta jest bardzo ważna nie tylko do poznania mechanizmów molekularnych namnażania się wirusa grypy, ale pozwoli sformułować wnioski, prowadzące do efektywniejszej inhibicji jego namnażania.

6/ dla 4-5 najbardziej skutecznych inhibitorów replikacji wirusa grypy zostaną przeprowadzone badania na myszach laboratoryjnych. Badania zostaną przeprowadzone zgodnie z obowiązującymi regułami pracy na zwierzętach laboratoryjny przez profesjonalny personel. Badania pozwolą ocenić skuteczność terapeutyczną wybranych do badań ligandów, jak również dokonać histopatologicznej oceny ich wpływu na myszy laboratoryjne.

Projekt zakłada bardzo rozległe badania podstawowe, które mogą doprowadzić do skutecznych, uniwersalnych i tanich inhibitorów namnażania wirusa grypy nakierowanych na wirusowe RNA. Można je także traktować, jako badania modelowe, które mogą zostać wykorzystane podczas prac nad inhibicją namnażania innych RNA wirusów, chociażby wirusa SARS-CoV-2, Zika czy HIV.