

Grypa jest interesującym tematem w różnych badaniach biologicznych ze względu na poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego na świecie. Ogólnie wirus grypy jest patogenem ludzi i zwierząt, który powoduje sezonowe epidemie i sporadyczne pandemie. Potencjał pandemiczny wynika z dużej zmienności jego genomu i jest skorelowany z patogennością, replikacją czy kinetyką wzrostu. Procesy te mogą być kontrolowane przez strukturę RNA. Wirus grypy należy do wirusów RNA o genomie segmentowanym, który jest wykorzystywany przez cały cykl replikacyjny, co podkreśla jego fundamentalną rolę w biologii wirusa. Ponadto, wirusowy RNA (vRNA) bierze udział w wielu procesach poprzez przyjmowanie drugorzędowych i trzeciorzędowych struktur. Do tej pory stwierdzono, że sekwencje vRNA i mRNA tworzą złożone struktury drugorzędowe, które są konserwatywne dla różnych szczepów wirusa. Dodatkowo, wykazano, że określone motywy mogą pełnić ważne funkcje podczas replikacji. Stąd, poszukiwanie nowego potencjalnego celu w obrębie vRNA wydaje się być dobrym kierunkiem w rozwoju alternatywnych strategii terapeutycznych infekcji wirusowych.

Polimorficzny charakter RNA pozwala na przyjmowanie różnorodnych struktur drugorzędowych w zależności od sekwencji, lokalnego środowiska, obecności innych cząsteczek czy modyfikacji chemicznych. Wśród nich są niekanoniczne struktury zwane G-kwadruksami (G4s), które tworzą się w sekwencjach bogatych w G i są stabilizowane wiązaniami wodorowymi Hoogsteena. Co ważne, rośnie zainteresowanie tymi unikalnymi strukturami w genomach wirusowych. Obecność G4s potwierdzono w genomach wirusów RNA, takich jak: Zair ebolavirus (EBOV), wirus Zika, także w koronawirusie zespołu ostrej niewydolności oddechowej 2 (SARS-CoV-2). Niedawno nasza grupa opublikowała badania dotyczące G4s w wirusie grypy typu A (IAV).

Chociaż zbadano znaczną liczbę ligandów wiążących G4s, a niektóre z nich są uważane za potencjalne narzędzia terapeutyczne. Nadal istnieje potrzeba projektowania i opracowywania nowych narzędzi ukierunkowanych na dobrze zdefiniowane drugorzędowe motywy strukturalne, na przykład, związki specyficzne względem G4s. Odkrycia te zachęciły nas do opracowania narzędzi opartych na antysensowych oligonukleotydach (ASO) ukierunkowanych na sekwencje bogate w G z genomu IAV i zbadaniu ich potencjalnego wpływu na replikację wirusa.

W tym projekcie bierzemy pod uwagę fakt, że unikalne motywy strukturalne (G4s) znalezione w vRNA mogą odgrywać ważną rolę w replikacji wirusa i jak dotąd nie były uważane za cel molekularny. Dlatego, postulujemy: *i*) syntezę chemiczną szeregu ASOs, *ii*) określenie właściwości termodynamicznych i strukturalnych ASOs/docelowych sekwencji (część A), oraz *iii*) zbadanie potencjału biologicznego wybranych ASOs jako modulatorów proliferacji wirusa (część B).

Bardziej szczegółowo, w pierwszym etapie naszego projektu (część A) zsyntetyzujemy chemicznie niezmodyfikowane i zmodyfikowane ASO zawierające 2'-O-metoksyetylorybozę, usztywnione kwasy nukleinowe i peptydowe kwasy nukleinowe. Zaprojektujemy również i przygotujemy gapmerowe warianty ASOs. Następnie, zostaną określone właściwości termodynamiczne i strukturalne wariantów ASOs/docelowe sekwencje za pomocą metody topnienia UV, dichroizmu kołowego (CD) i magnetycznej spektroskopii jądrowej (NMR). Dodatkowo, scharakteryzujemy ich powinowactwo i specyficzność wiązania za pomocą eksperymentów elektroforetycznych i spektroskopii fluorescencyjnej. Na podstawie tych wyników uzyskamy więcej informacji na temat stabilizacji/destabilizacji G4s indukowanej przez ASOs i wybierzemy „najbardziej obiecujące” ASOs do badań biologicznych. W drugiej części (część B) planujemy przeprowadzenie badań biologicznych (*in vitro*) w celu zbadania wpływu wybranych ASOs na replikację wirusa. W skrócie, zbadamy stabilność ASOs w surowicy przez rozdział elektroforetyczny. Na koniec określimy wpływ ASO na cytotoksyczność, ilość kopii wirusowego RNA oraz miano wirusa w komórkach zakażonych wirusem grypy.

Według naszej wiedzy, użycie ASO nakierowanych na RNA G4s stanowi atrakcyjną, ale niezbadaną strategię. Zakładamy, że badania proponowane w tym projekcie dostarczą cennych informacji związanych nie tylko z właściwościami fizykochemicznymi ASOs/sekwencji docelowych, ale także z ich potencjalnymi zastosowaniami w walce z infekcją wirusową. Ponadto, zdajemy sobie sprawę, że przedstawione tutaj podejście można zastosować do innych RNA wirusa grypy (mRNA i cRNA), jak również do dowolnych RNA z różnych genomów wirusowych.

Prezentowany projekt koncentruje się na genomowym RNA wirusa grypy, szczególnie regionach bogatych w G, oraz zrozumieniu molekularnych mechanizmów replikacji wirusa, w których pośredniczą G4s. Ponadto, projekt ten podkreśla możliwość celowania w wirusowe konserwatywne motywy strukturalne (G4s) za pomocą narzędzi ASOs jako nowe podejście do walki z grypą.