

Pośród różnych wirusów RNA, wirusy grypy, SARS (w tym SARS-CoV-2), Ebola, Zika, MERS, Denga są stałymi zagrożeniami dla ludzi, powodującymi epidemie oraz globalne pandemie. Wirus grypy typu A (IAV) powoduje sezonowe epidemie grypy. Rocznie około 1 miliarda ludzi choruje na grypę a z powodu powikłań pogrypowych umiera 290000-650000 osób. Ze względu na pojawiającą się lekooporność, istnieje pilna potrzeba opracowania nowych strategii wykrywania wirusa i nowych leków przeciwwirusowych, a wirusowe RNA wydają się być optymalnym celem w opracowaniu lepszych biomarkerów i działań terapeutycznych. IAV należy do rodziny Orthomyxoviridae i posiada podzielony na osiem segmentów, jednoniciowy genom RNA o ujemnej polarności. Drugorzędowe motywy strukturalne RNA do których należą dupleksy, regiony jednoniciowe, wiele typów i rozmiarów pętli wewnętrznych i wybrzuszeń, niesparowane końce, struktury spinkowe oraz wiele typów pętli wieloramiennych, są obecne w RNA wirusa grypy. Wirusowe i komórkowe RNA mogą również zawierać motywy wyższego rzędu, takie jak: G-kwadrupleksy (G4), i-motywy oraz pseudowęzły (PK). Wiele z tych motywów strukturalnych RNA zostało już wcześniej wybranych, jako cele terapii z wykorzystaniem różnych narzędzi oligonukleotydowych i niskocząsteczkowych ligandów w leczeniu różnych chorób człowieka skorelowanych z RNA.

Ciągle poszerza się wiedza na temat struktury RNA wirusa grypy i powiązania tej struktury z funkcją biologiczną. Kilka grup badawczych, w tym nasza, poczyniło duże postępy w badaniu struktury vRNA, mRNA IAV w warunkach: *in vitro*, *in virio* i *in cellulo*. Wciąż jednak nowe motywy ważne dla namnażania się wirusa są odkrywane i intensywnie badane w kierunku poznania ich struktury i funkcji biologicznej. Genom wirusowego RNA ulega szybkim i częstym mutacjom. Badania konserwatywnych motywów strukturalnych RNA wirusa grypy dają możliwość modulacji lub hamowania replikacji wirusa; jednak precyzyjne narzędzia do regulacji tego procesu są nadal poszukiwane. G-kwadrupleksy i pseudowęzły zostały także wykryte w RNA wirusa grypy. Unikalne struktury obu tych motywów wymagają bardziej zaawansowanych narzędzi oligonukleotydowych i niskocząsteczkowych ligandów dla osiągnięcia wysokiej specyficzności i selektywności działania terapeutycznego. Z drugiej strony, G-kwadrupleksy i pseudowęzły są znacznie trudniejsze do zbadania i nakierowania na nie „celowanych terapeutyków” ze względu na złożoną strukturę.

Celem projektu są badania dynamiki konserwatywnych motywów strukturalnych RNA wirusa grypy, głównie pseudowęzłów i G-kwadrupleksów, w celu lepszego zrozumienia ich funkcji oraz inhibicji i modulacji replikacji wirusa z wykorzystaniem nowych peptydowych kwasów nukleinowych (PNA). Postulowane badania są ważne dla poznania biologii wirusa grypy i projektowania nowych, wydajnych i uniwersalnych leków przeciwwirusowych. Tradycyjne antysensowe peptydowe kwasy nukleinowe (asPNA) są przydatne jako sondy i narzędzia diagnostyczne ze względu na lepsze zdolności wiązania się do docelowych kwasów nukleinowych poprzez tworzenie dupleksów, a także stabilność chemiczną oraz odporność na działanie nukleaz i proteaz. Grupa badawcza Chen’a opracowała nowe, wiążące się do RNA i modyfikowane na zasadach heterocyklicznych monomery PNA (dbPNA), które wprowadzone do oligomeru wiążą się do dwuniciowych RNA wykazując wysoką specyficzność dla sekwencji i struktury dwuniciowego RNA. Grupy Chen’a i Kierzek niedawno wykorzystwały 10-merowy koniugat dbPNA-neamina, o lepszym wiązaniu i aktywności komórkowej i nakierowany na strukturę *panhandle* RNA wirusa grypy, do wysokiej inhibicji replikacji wirusa. Sądzymy, że połączenie asPNA i dbPNA (nazwane daPNA) będzie skutkować polepszeniem selektywnego wiązania się do RNA, które dodatkowo można wzmocnić poprzez koniugację z SM. Proponujemy użycie kilku daPNA nakierowanych na kilka konserwatywnych motywów RNA wirusa grypy, w szczególności na pseudowęzły i G-kwadrupleksy. Ponadto, badania z wykorzystaniem przesiewowych wysokoprzepustowych analiz (HTS) bibliotek niskocząsteczkowych ligandów pozwoli na wybór najlepszych ligandów do przygotowania koniugatów PNA-SM. Wiązanie się PNA z wybranymi motywami strukturalnymi RNA będzie badane z użyciem różnych metod biofizycznych. Na końcowym etapie postulowanych badań, efekt hamowania i modulacji najskuteczniejszych PNA i koniugatów PNA-SM zostanie określony w hodowlach komórkowych i na modelach mysich.

Do badań wybraliśmy szczep grypy A/California/04/2009 (H1N1), który jest szczepem obecnie występującym i cechującym się silnym potencjałem pandemicznym. Do niektórych badań użyte będą także szczepy A/WSN/1933 H1N1 (WSN) oraz A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8).