

Celem projektu jest znalezienie skutecznych inhibitorów replikacji SARS-CoV-2 nacelowanych na wirusowe RNA. SARS-CoV-2 jest wirusem RNA, którego jednoniciowy (+) genom zawiera 29 903 reszty nukleotydowe. Pierwsze dwie trzecie genomu koduje dwie poliproteiny związane z procesami replikacji i transkrypcji wirusa. Pozostała część genomu koduje cztery białka strukturalne: fuzyjne (ang. *spike*) (S), płaszcz (ang. *envelope*) (E), membrany (M) i nukleokapsydu (N). Od wielu lat zajmujemy się badaniami RNA wirusa grypy. W ciągu ostatnich dziesięć lat badaliśmy strukturę RNA wirusa grypy i hamowanie jego replikacji poprzez antysensowne oligonukleotydy (ASO), małe interferujące RNA (siRNA), peptydowe kwasy nukleinowe, system CRISPR/Cas, rybozomy i niskocząsteczkowe ligandy (SM). Proponujemy podjęcie podobnych badań w celu zahamowania replikacji SARS-CoV-2, co jest szczególnie ważne w czasie obecnej ogólnoświatowej pandemii wirusa. W badaniach zamierzamy skupić się na RNA SARS-CoV-2, a dokładnie na jego 5'- i 3'-końcowych regionach oraz na mRNA białka membrany (M) i nukleokapsydu (N). Analiza strukturalna tych czterech regionów wirusowego RNA wskazuje na ich wysoką zachowawczość sekwencyjną i strukturalną.

Celem tego projektu jest identyfikacja oligonukleotydowych i niskocząsteczkowych inhibitorów replikacji wirusa SARS-CoV-2. Potencjalne inhibitory oligonukleotydowe (ASO, siRNA i CRISPR/Cas13) zostaną zaprojektowane w oparciu o przewidywaną drugorzędową strukturę wirusowego RNA. SM zostaną wybrane z bibliotek ligandów, na podstawie ich zdolności wiązania się do wybranych konserwatywnych motywów struktury RNA SARS-CoV-2 z wykorzystaniem analizy wysokoprzepustowej (HTS) i wirtualnej analizy wysokoprzepustowej (HTVS). Skonstruujemy również nieinfekcyjny replikon SARS-CoV-2, który pozwoli na zbadanie aktywności inhibitorowej wybranych oligonukleotydów i SM w komórkach 293T. W obrębie czterech wybranych regionów wirusowego RNA wyselekcjonowaliśmy 28 strukturalnie konserwatywne motywy RNA SARS-CoV-2. Wybraliśmy również 8 konserwatywnych struktur spinkowych RNA SARS-CoV-2, jako cele dla analiz HTS i HTVS.

Zamierzamy przetestować trzy kategorie oligonukleotydów: ASO, siRNA i system CRISPR/Cas13. Aby zwiększyć ich skuteczność hamowania replikacji do badań użyjemy oligonukleotydy z modyfikacjami typu 2'-O-metylo, LNA, 2'-fluoro i tiofosforanowymi. Sekwencja tych potencjalnie terapeutycznych oligonukleotydów była wybrana na podstawie przewidywanej struktury drugorzędowej RNA fragmentów 5'- i 3'-końcowych, a także regionów M i N mRNA. Analizę sekwencji całego genomu RNA SARS-CoV-2 i tych czterech wybranych regionów wirusowego RNA przeprowadzono przez porównanie ponad dwóch tysięcy genomów SARS-CoV-2 zdeponowanych w bazie GISAID. Ponadto, planujemy wykonanie mapowania mikromacierzowego mRNA N i M, aby móc eksperymentalnie określić ich drugorzędowe struktury i na tej podstawie zaprojektować dodatkowe oligonukleotydy.

Aby wybrać SM zdolne do hamowania proliferacji SARS-CoV-2, dokonamy ich selekcji na podstawie analiz HTS i HTVS. HTS będzie oparty na teście wyparcia wskaźnika fluorescencji (FID). W tym teście wskaźnik staje się fluorescencyjny dopiero po związaniu z docelowym RNA, a gdy wskaźnik zostaje wyparty z RNA przez ligand silniej wiążący się z RNA następuje wygaszenie jego fluorescencji. Natomiast, analiza HTSV opiera się na bioinformatycznym wiązaniu ligandów do struktury trzeciorzędowej wybranych motywów czterech regionów RNA SARS-CoV-2.

Przygotujemy również nieinfekcyjny replikon SARS-CoV-2, który posłuży do określenia inhibitorowych aktywności wszystkich zaprojektowanych oligonukleotydów i wyselekcjonowanych SM. Przygotowanie takiego replikonu opiera się na obserwacji, że usunięcie genów S i E z genomu wirusa nie blokuje jego replikacji i transkrypcji, ale czyni go nieinfekcyjnym. Ponadto, gen białka zielonej fluorescencji (eGFP) zostanie wstawiony w pozycji genu S, aby utworzyć gen reporterowy namnażania replikonu. Po przygotowaniu replikonu, selekcji SM i syntezie zaprojektowanych ASO, siRNA i systemów CRISPR/Cas13 przetestujemy ich aktywność inhibitorową w komórkach 293T.

Zamierzamy wybrać 4-6 najbardziej efektywnych oligonukleotydów i niskocząsteczkowych ligandów do testów przeciwko natywnemu SARS-CoV-2 w komórkach. Eksperymenty z natywnym SARS-CoV-2 należy przeprowadzić w laboratorium BSL3 i z tego powodu testy zostaną przeprowadzone we współpracy z profesorem Luisem Martinez-Sobrido w Texas Biomedical Research Institute (San Antonio, USA). Najbardziej skutecznie, hamujące replikację wirusa oligonukleotydy i ligandy mogą być potencjalnymi środkami terapeutycznymi w leczeniu zachorowań na COVID-19 wywołanych przez wirusa SARS-CoV-2.