

Potencjalna strategia przeciw wirusowi SARS-Cov-2 oparta na zahamowaniu programowanej zmiany ramki odczytu podczas translacji genomu wirusa. Kierownik projektu: Prof. dr hab. Joanna Kufel.

Koronawirusy są to jednoniciowe wirusy RNA, co oznacza, że ich genom służy jako funkcjonalny mRNA, który podlega translacji. Koronawirusy stały się obiektem szerszego zainteresowania w wyniku epidemii zespołu ostrej i ciężkiej niewydolności oddechowej (SARS) w latach 2002-2003, spowodowanej przez SARS-CoV-1. Epidemia ta doprowadziła do znacznego postępu w badaniach nad biologią koronawirusów i opracowaniach ukierunkowanych strategii antywirusowych. Obecna pandemia COVID-19, której źródłem jest bardzo blisko spokrewniony podtyp koronawirusa SARS-CoV-2, wymaga wykorzystania tej wiedzy do opracowania podejść służących do hamowania rozprzestrzeniania się nowego koronawirusa.

Replikacja i namnażanie wirusa wymaga ściśle kontrolowanej ekspresji jego genomu. Niektóre wirusy RNA, w tym koronawirusy, stosują pomysłową strategię, polegającą na programowanej zmianie ramki odczytu, która umożliwi najbardziej efektywne wykorzystanie potencjału kodującego ich małego genomu. Ten zaprogramowany mechanizm pozwala na syntezę różnych białek z nakładających się otwartych ramek odczytu znajdujących się w jednej cząsteczce mRNA. Zwykle ciągłość otwartych ramek odczytu jest zachowywana przez rybosom, czyli maszynę molekularną odpowiedzialną za proces translacji. Specyficzne elementy sekwencyjne i strukturalne obecne w mRNA wirusa są jednak w stanie zablokować rybosom, powodując jego poślizg, przesunięcie o jeden nukleotyd wstecz i wznowienie translacji w innej ramce. Programowana zmiana ramki odczytu na ramkę -1 jest istotną cechą genomów koronawirusa i odpowiada za produkcję białka polimerazy RNA zależnej od RNA, niezbędnego do jego replikacji i rozprzestrzeniania. Ponieważ zahamowanie zachodzącej rybosomalnej zmiany ramki odczytu prowadzi do zmniejszenia zakaźności i produkcji wirusa, podejścia eksperymentalne oparte na tej koncepcji reprezentują potencjalnie skuteczne strategie przeciwwirusowe. W przypadku SARS-CoV-1 zaproponowano dwie potencjalne metody obniżania efektywności zmiany ramki, obie ukierunkowane na struktury RNA w regionie odpowiedzialnym za ten mechanizm. W pierwszej zastosowano antysensowne oligonukleotydy, które wzmacniają działanie struktury zapobiegającej dotarciu rybosomów do miejsca przesunięcia ramki. Drugie podejście opierało się na poszukiwaniu małych cząsteczek oddziałujących z zachowaną strukturą RNA, która stymuluje zmianę ramki, i doprowadziło do identyfikacji nowego ligandu zaburzającego tę strukturę i drastycznie hamującego ten proces.

Te obiecujące obserwacje stały się podstawą głównych założeń naszego projektu, którego celem jest wdrożenie i optymalizacja obu podejść dla SARS-CoV-2. W pierwszej kolejności zamierzamy zastosować modelowanie molekularne do zaprojektowania *in silico* skutecznych inhibitorów wirusowej rybosomalnej zmiany ramki na podstawie dostępnych danych literaturowych. Następnie cząsteczki te, wraz z bibliotekami antysensownych oligonukleotydów i związków niskocząsteczkowych, będą badane przesiewowo w ludzkich liniach komórkowych pod kątem aktywności blokującej proces zmiany ramki odczytu CoV-2. Na koniec zostaną przeprowadzone testy toksyczności dla cząsteczek o najlepszych właściwościach w celu wyłonienia bezpiecznych kandydatów do dalszych badań. Planujemy także zbadać bardziej podstawowe zagadnienia dotyczące mechanizmu rybosomalnej zmiany ramki odczytu przez koronawirusa, w tym wpływu szybkości inicjacji translacji na przebieg i wydajność tego procesu. Ponadto przeprowadzimy przesiewowy test mutagenyzy, aby ocenić znaczenie sekwencji i struktury elementów regulatorowych w wirusowym mRNA dla efektywności zmiany ramki odczytu. Podejście to pozwoli na określenie ewolucyjnej stabilności sekwencji regulatorowych i stworzy szczegółową mapę możliwych szkodliwych i wzmacniających mutacji.

Uważamy, że co najmniej kilka cząsteczek wyselekcjonowanych w wyniku modelowania i przeszukiwania bibliotek wykaże obiecujące właściwości inhibitorowe jako skuteczne potencjalne terapeutyki przeciw SARS-CoV-2. Badania nad mechanizmem działania tych inhibitorów dostarczą cennych informacji, które ułatwią bardziej skuteczne projektowanie leków przeciwwirusowych. W szczególności zastosowanie antysensownych oligonukleotydów może reprezentować konstruktywne podejście, w którym projektowanie leków opiera się wyłącznie na dostępności sekwencji genomu wirusowego, co upraszcza proces i obniża koszty jego wdrożenia. Stworzenie wydajnej procedury hamowania rybosomalnej zmiany ramki odczytu CoV-2 opartej na antysensownych oligonukleotydach umożliwi także zastosowanie tej metodologii do innych wirusów, w szczególności HIV lub HCV. Z kolei mapa zmian w regionie regulacyjnym CoV-2 posłuży do porównania z genomami wirusa w próbkach pobranych od pacjentów, stanowiąc cenne narzędzie do oceny oczekiwanej naturalnej ewolucji i zmienności tej części genomu SARS-CoV-2. Przedstawiony projekt dotyczy kluczowej problematyki związanej z zależnymi od translacji mechanizmami molekularnymi SARS-CoV-2, które przyczyniają się do zakaźności i rozprzestrzeniania wirusa. Obejmuje również ocenę perspektywy wykorzystania zidentyfikowanych inhibitorów, które mogą stać się podstawą nowych strategii terapeutycznych przeciwko COVID-19, zanim szczepionka stanie się dostępna.