

1. CEL NAUKOWY

Koronawirusy są oplaszczonymi wirusami RNA o genomie w postaci pojedynczej nici. Obecnie znanych jest sześć ludzkich koronawirusów (HCoV): HCoV-229E i HCoV-OC43 (rozpoznane już w latach 1960-tych), oraz cztery „nowe” patogeny: SARS-CoV (2003r.), HCoV-NL63 (2004r.), HCoV-HKU1 (2005r.) oraz HCoV-EMC (2012r.). Ludzkie koronawirusy powodują głównie zakażenia układu oddechowego, o różnym nasileniu w zależności od gatunku wirusa oraz stanu pacjenta.

Celem niniejszego projektu jest identyfikacja oraz charakteryzacja mechanizmów internalizacji koronawirusów do komórek gospodarza. Projekt dotyczy zarówno patogenów powodujących choroby układu oddechowego o stosunkowo łagodnym przebiegu (HCoV-NL63 i HCoV-HKU1), jak również szczepów wysoce patogennych (SARS-CoV, HCoV-EMC). Ludzkie koronawirusy powodują głównie zakażenia układu oddechowego i ich naturalnym miejscem replikacji jest nabłonek oddechowy. Aby uzyskane wyniki odzwierciedlały stan faktyczny, przy infekcji *in vivo*, wykorzystane zostaną hodowle *ex vivo* w pełni zróżnicowanego, ludzkiego nabłonka oddechowego (hodowle HAE).

Szczegółowe cele projektu:

- Opisanie mechanizmów internalizacji ludzkich koronawirusów do komórek gospodarza.
- Zrozumienie mechanizmów transportu wewnątrzkomórkowego koronawirusów.
- Identyfikacja oddziaływań pomiędzy rybonukleoproteiną a strukturami komórkowymi – charakterystyka transportu do miejsca replikacji.

2. METODA BADAWCZA

Najważniejsze metody:

- Wykorzystanie hodowli *ex vivo* ludzkiego nabłonka oddechowego.
- Obrazowanie w czasie rzeczywistym.
- Wykorzystanie kompletnych wirionów.

Szczegółowy opis:

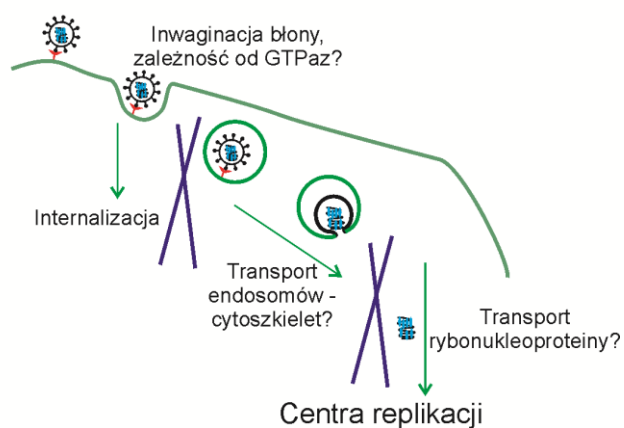
1. Rola poszczególnych ścieżek endocytozy w zakażeniu wirusowym (HCoV-NL63, HCoV-HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV) zostanie poddana ocenie z wykorzystaniem inhibitorów chemicznych oraz siRNA
2. Analiza wpływu inhibitorów zostanie przeprowadzona poprzez ocenę zahamowania replikacji, wizualizację wirusów z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej oraz wizualizację struktur subkomórkowych.
3. Wykazana zostanie ko-lokalizacja wirionów z markerami poszczególnych dróg internalizacji wirusów.
4. Mechanizmy wejścia do komórek gospodarza poddane zostaną ocenie z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej.
5. Przeprowadzona zostanie analiza internalizacji wirionów do żywych komórek z wykorzystaniem wysokorozdzielczej mikroskopii konfokalnej. Uzyskane wyniki pozwolą śledzić proces internalizacji wirionów w czasie rzeczywistym.
6. Z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej przeprowadzone zostaną badania dotyczące transportu wirusa i nukleoproteiny wewnątrz komórki.
7. Przeprowadzone zostaną badania dotyczące interakcji nukleoproteiny z białkami gospodarza.

3. WPŁYW REZULTATÓW

Wiedza o strategiach wejścia koronawirusów do komórek gospodarza jest bardzo ograniczona. Realizacja projektu doprowadzi do poszerzenia wiedzy na temat wejścia koronawirusów do komórek układu oddechowego i pozwoli zrozumieć, jakie mechanizmy odpowiedzialne są za zakażenie. Uzyskane wyniki pozwolą również w pewnym stopniu zrozumieć specyficzność tkankową i komórkową koronawirusów, jak również mogą dostarczyć informacji wyjaśniających różnice w patogenności pomiędzy różnymi gatunkami koronawirusów (np. koronawirus NL63 i SARS, wykorzystujące ten sam receptor komórkowy).

Uzyskane wyniki będą mogły również służyć, jako baza przy realizacji przyszłych projektów badawczo-rozwojowych (m.in. opracowanie nowych leków przeciwko nowym celom molekularnym, opracowanie i optymalizacja nowych wektorów wirusowych).

Replikacja zależna od pH?



Oczekiwany efekt naukowy:

- Identyfikacja mechanizmów endocytozy wykorzystywanych przez ludzkie koronawirusy NL63, HKU1, SARS oraz MERS.
- Identyfikacja mechanizmów odpowiedzialnych za transport wirionów wewnątrz komórki, zarówno w pęcherzykach endocytarnych, jak i w formie nukleoproteiny.
- Identyfikacja nowych molekularnych celów terapeutycznych.

Oczekiwany efekt pozanaukowy:

- Publikacje w dobrych czasopismach naukowych.
- Prezentacje na konferencjach międzynarodowych.