

Mgr Barbara Szutkowska

Streszczenie rozprawy doktorskiej zatytułowanej *‘Struktura drugorzędowa vRNA wirusa grypy typu A w warunkach biologicznych’*

## **Streszczenie**

Na dzień dzisiejszy scharakteryzowano cztery typy wirusa grypy - A, B, C i D. Spośród nich za najbardziej zagrażające człowiekowi uznaje się zoonotyczne szczepy wirusa grypy typu A (IAV), które mają duży potencjał do wywołania epidemii, a także pandemii. U podstaw wirulentności wirusa grypy leżą zjawiska skoku oraz dryfu genetycznego, które przyczyniają się do szybkiej ewolucji genetycznej. Szybka ewolucja jest możliwa dzięki niewielkiemu (13 kbp) genomowi, na który składają się jednoniciowe cząsteczki RNA (vRNA) zwane również segmentami. W przypadku szczepów wirusa typu A jest to 8 jednoniciowych segmentów vRNA, które wraz z kompleksem wirusowej polimerazy oraz wieloma kopiami stabilizującego je białka NP (nukleoproteina) tworzą kompleks rybonukleoproteinowy (RNP). Składające się na genom wirusa cząsteczki vRNA mają ujemną polarność. Oznacza to, że w czasie cyklu replikacyjnego wirusa są one przepisywane na komplementarne cząsteczki cRNA, które są matrycą do powstawania nowych cząsteczek vRNA. Cząsteczki vRNA są również matrycą do transkrypcji cząsteczek mRNA ulegających translacji na białka wirusowe.

Funkcja cząsteczek RNA jest warunkowana ich strukturą drugorzędową oraz możliwością tworzenia oddziaływań z innymi biomolekułami, takimi jak oddziaływania typu RNA-RNA czy RNA-białko. W przypadku vRNA wirusa grypy opisano szereg motywów strukturalnych pełniących funkcje na różnych etapach cyklu życiowego wirusa, których zaburzenie przyczyniało się do obniżenia namnażania wirusa. Chociaż na dzień dzisiejszy dysponujemy wiedzą dotyczącą fałdowania się wybranych segmentów vRNA wirusa grypy typu A w warunkach *in vitro* oraz opublikowano dane mapowania *in virio* dla niektórych szczepów, to nadal brakuje pełnej wiedzy dotyczącej formowania się struktur drugorzędowych vRNA w warunkach naturalnych.

Celem badań opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej było określenie struktur drugorzędowych vRNA w warunkach biologicznych: w lizacie komórkowo-wirusowym (*in vivo-like*), a także w zainfekowanych wirusem grypy komórkach (*in cellulo*) oraz w wirionie (*in virio*). Do badań wykorzystano szczep A/California/04/2009 (H1N1), który był odpowiedzialny za pandemię w latach 2009-2010.

W pierwszej kolejności określona została struktura segmentu 8 vRNA (vRNA8) w lizacie zainfekowanych wirusem grypy komórek MDCK (Madin Darby Canine Kidney). Do przewidywania struktur drugorzędowych wykorzystano program RNAStructure i dane eksperymentalne z mapowań chemicznych (DMS, 1M7). Wygenerowano strukturę globalną, a także strukturę lokalną, w której zastosowano dystans parowania zasad. Umożliwiło to określenie wpływu ograniczenia dystansu parowania zasad w przewidywaniu na generowaną strukturę drugorzędową oraz wykrycie motywów strukturalnych, które były przewidziane niezależnie od zastosowanych parametrów. Następnie obliczona została konserwatywność parowania zasad (na podstawie analizy sekwencyjno-strukturalnej wszystkich szczepów grypy typu A) w obrębie całej struktury vRNA8. Na podstawie analiz zostały wyłonione motywy strukturalne, które mają wysoką konserwatywność strukturalną wśród innych szczepów IAV.

W drugiej części niniejszej rozprawy doktorskiej zostały opisane badania skupiające się na poznaniu struktur drugorzędowych vRNA w warunkach *in virio* oraz *in cellulo*. W pierwszej kolejności zostały opracowane metody mapowania chemicznego vRNA w wirionie oraz w zainfekowanych wirusem grypy ludzkich komórkach płucnych (A549). Istotnym etapem było również opracowanie metody przygotowania bibliotek do sekwencjonowania NGS. Wyniki sekwencjonowania umożliwiły obliczenie reaktywności nukleotydów względem odczynników chemicznych (NAI, DMS) dla pełnej długości wszystkich segmentów vRNA w warunkach *in virio*, a także pełnej długości segmentów vRNA5, 7 i 8 w warunkach *in cellulo*. Uzyskane wyniki reaktywności dla trzech powtórzeń biologicznych wskazały na bardzo wysoką korelację, co świadczyło o powtarzalności wyników. Na podstawie wyników sekwencjonowania wyłoniono motywy strukturalne wspólne dla struktur drugorzędowych w warunkach *in virio* oraz *in cellulo*. Uzyskane wyniki porównano również do znanych struktur drugorzędowych vRNA innych szczepów wirusa grypy uzyskanych w badaniach *in virio* oraz *in vitro*, co umożliwiło wyłonienie lokalnych motywów strukturalnych wspólnych dla wielu szczepów IAV. Badania pokazały również istnienie nowych motywów strukturalnych dla poszczególnych segmentów vRNA.

Następnie porównano struktury drugorzędowe vRNA8 *in virio*, *in cellulo* ze strukturą drugorzędową uzyskaną w lizacie komórkowo-wirusowym. Porównanie struktur drugorzędowych wykazało, że część motywów była wspólna dla wszystkich trzech struktur vRNA8. Natomiast część motywów przewidzianych w vRNA8 w lizacie komórkowo-wirusowym była unikalna albo dla struktury drugorzędowej *in virio* albo struktury *in cellulo*. To wykazało, że struktura w lizacie jest strukturą pośrednią pomiędzy obiema strukturami.

Struktury drugorzędowe vRNA5, 7 oraz 8 o najniższej energii swobodnej (MFE) w warunkach *in virio* oraz *in cellulo* różnią się od siebie w ujęciu globalnym. Najwięcej różnic zaobserwowano w parowaniu zasad pomiędzy odległymi nukleotydami. Zmiany te sugerują dużą dynamikę struktur RNA w środowisku biologicznym. Jednocześnie część motywów strukturalnych, szczególnie tych lokalnych, została zachowana, co prawdopodobnie ma znaczenie funkcjonalne.

Opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej badania pozwoliły na bardzo szeroką analizę struktur drugorzędowych vRNA wirusa grypy typu A w różnych warunkach biologicznych. Po raz pierwszy określono struktury vRNA w warunkach *in cellulo*, a także porównano je ze strukturami vRNA w innych warunkach biologicznych. Badania przyczyniły się do lepszego poznania biologii wirusa od strony genomowego RNA. Opisane zachowawcze motywy strukturalne vRNA mogą stanowić idealny cel dla uniwersalnej, niezależnej od szczepu, inhibicji wirusa grypy typu A na poziomie RNA.