

## STRESZCZENIE

Wirus grypy typu A, wywołujący sezonowe epidemie oraz sporadyczne pandemie, stanowi istotny obiekt badań. Pomimo dużej zmienności genomu, struktury drugorzędowe wirusowego RNA (vRNA) posiadają wysoką konserwatywność strukturalną wśród różnych szczepów wirusa. Ponadto zidentyfikowane motywy strukturalne vRNA pełnią ważne funkcje w cyklu replikacyjnym wirusa, co czyni je atrakcyjnymi celami w opracowywaniu strategii terapeutycznych skierowanych przeciwko wirusowi grypy.

Do szczególnie interesujących struktur drugorzędowych kwasów nukleinowych należą G-kwadrupleksy (G4). Motywy G4 to niekanoniczne struktury DNA lub RNA tworzące się w obrębie regionów bogatych w reszty guanozyny. W rezultacie cząsteczki te pełnią istotne funkcje biologiczne, biorąc udział w wielu procesach komórkowych. W ostatnich latach wykazano, że tworzą się one również w obrębie wirusowego RNA, gdzie odgrywają kluczową rolę w przebiegu cyklu replikacyjnego. W związku z tym G-kwadrupleksy stanowią obiecujący cel w terapiach przeciwwirusowych.

Celem pierwszego etapu moich badań było określenie, czy sekwencje potencjalnie tworzące G-kwadrupleksy (PQSs) występują w obrębie genomu wirusa grypy typu A (szczep A/California/04/2009(H1N1)). W tym celu przeprowadziliśmy analizę bioinformatyczną, która umożliwiła identyfikację dwunastu takich sekwencji w vRNA wirusa grypy typu A. Ponadto sekwencje te wykazywały silną konserwatywność w różnych szczepach. W celu potwierdzenia, czy zidentyfikowane motywy PQS tworzą G-kwadrupleksy RNA, użyliśmy technik spektroskopowych oraz elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Na podstawie otrzymanych wyników wykazaliśmy, że trzy motywy PQS tworzą stabilne struktury RNA G4 *in vitro*. Dwa z tych motywów występują wewnątrz sekwencji kodujących podjednostki polimerazy, a jeden wewnątrz regionu kodującego hemagglutyninę, co sugeruje ich rolę w cyklu replikacyjnym wirusa.

W drugim etapie badań sprawdziliśmy, czy ligandy specyficzne względem cząsteczek G4 oddziałują z G-kwadrupleksami RNA z genomu wirusa grypy typu A. Nasze badania koncentrowały się na zaobserwowaniu różnic w sposobach wiązania ligandów (*in vitro*). W tym celu wybraliśmy dwa związki małowcząsteczkowe: TMPyP4 oraz BRACO-19. Powinowactwo ligandów do G-kwadrupleksów RNA określiliśmy, wykorzystując test zatrzymywania odwrotnej transkrypcji, kalorymetrię miareczkowania izotermicznego, dichroizm kołowy, spektroskopię fluorescencyjną, metodę topnienia UV. Co istotne, zaobserwowano różnice we właściwościach oddziaływań pomiędzy poszczególnymi G-

kwadrupleksami RNA a ligandami oraz zidentyfikowano odmienne mechanizmy wiązania dla TMPyP4 oraz BRACO-19. Ponadto przeprowadziliśmy badania biologiczne w hodowlach komórkowych w celu oceny wpływu ligandów TMPyP4 oraz jego analogu, TMPyP2, na aktywność minireplikonu wirusa grypy typu A. Wyniki eksperymentu wykazały znaczącą inhibicję replikacji wirusa w obecności ligandów, sugerując, że wybrane G-kwadrupleksy RNA mogą być potencjalnymi celami dla leków przeciwwirusowych. Aby uzupełnić nasze badania, zastosowaliśmy modelowanie molekularne do symulacji procesu tworzenia się wybranego G-kwadrupleksu RNA. Metoda ta umożliwiła uzyskanie dodatkowych informacji dotyczących topologii G4 i stabilności struktury.

Podsumowując, stwierdziliśmy, że G-kwadrupleksy RNA są obecne wewnątrz genomu wirusa grypy typu A, szczepu A/California/04/2009(H1N1), gdzie wykazują wysoki poziom konserwatywności w różnych szczepach. Motywy te mogą być celem dla małowymagających ligandów specyficznych względem G-kwadrupleksów. Ponadto replikacja wirusa jest skutecznie hamowana poprzez stabilizację tych struktur z wykorzystaniem ligandów TMPyP4 oraz TMPyP2. Wszystkie uzyskane przez nas dane wskazują, że wybrane motywy G4 z genomu wirusa grypy typu A mogą być potencjalnymi celami nowych terapii przeciwwirusowych.