

Streszczenie

Hemaglutynina (HA) jest jednym z głównych białek powierzchniowych wirusa grypy typu A. W trakcie dojrzewania HA jej prekursor HA0 ulega cięciu na podjednostki HA1 oraz HA2. Podjednostki pełnią różne funkcje: HA1 odpowiada za wiązanie receptora na powierzchni komórki gospodarza, natomiast HA2 jest zaangażowana w fuzję wirusa w późnych endosomach. N-końcowy fragment HA2, tzw. peptyd fuzyjny FP (ang. *fusion peptide*), eksponowany w wyniku niskiego pH w późnych endosomach, bierze udział w fuzji błon lipidowych. Z kolei C-końcowy fragment HA2 stanowi domena transbłonowa TMD (ang. *transmembrane domain*), odpowiedzialna za zakotwiczenie białka w błonie, a także prawdopodobnie uczestnicząca w fuzji. Dotychczas opisano 18 podtypów HA, sklasyfikowanych w dwóch grupach filogenetycznych na podstawie sekwencji aminokwasowej. Obecnie w populacji ludzkiej najczęściej występują wirusy grypy zawierające HA podtypu H1 (grupa 1) oraz H3 (grupa 2). Sekwencja FP jest zachowana w toku ewolucji, natomiast sekwencja TMD znacząco różni się wśród podtypów. Podczas gdy rola FP w procesie fuzji została dobrze scharakteryzowana, funkcja TMD pozostaje wciąż słabo poznana. Pokazano, że do pełnej fuzji otoczki wirusowej z błoną późnych endosomów obecność TMD jest niezbędna. Niektóre badania sugerują, że oddziaływanie pomiędzy FP i TMD umożliwia pełną fuzję. Jednak możliwość tego oddziaływania pozostaje kwestią sporną w literaturze.

Głównym celem niniejszej pracy było zbadanie oddziaływania pomiędzy FP i TMD. Aby to zrealizować przeprowadzono serię eksperymentów z użyciem syntetycznych peptydów oraz pełnej długości HA. Zastosowano peptydy odpowiadające sekwencjom aminokwasowym FP i TMD z podtypów H1 i H3. Wykorzystano syntetyczne peptydy odpowiadające TMD w dwóch wersjach: krótkiej (nazywane dalej jako H1, H3) oraz wydłużonej (nazywane dalej jako H1long, H3long). Dłuższe wersje zawierały dodatkowe reszty aminokwasowe mogące oddziaływać z cholesterolem. Wykorzystano również cząstki wirusopodobne VLP (ang. *virus-like particle*) zawierające pełnej długości HA podtypu H1 (H1-TMD-H1) lub HA podtypu H1 z wymienioną domeną TMD na pochodzącą z podtypu H3 (H1-TMD-H3). Eksperymenty prowadzono z użyciem liposomów oraz dwuwarstwy lipidowej na podłożu SLB (ang. *supported lipid bilayer*) o różnym składzie lipidowym. Wykorzystywano pojedyncze peptydy oraz mieszanki peptydowe FP:TMD do zbadania synergicznego działania peptydów w błonie. Praca miała na celu biofizyczne scharakteryzowanie ich aktywności w błonie. Do zbadania aktywności błonowej oraz fuzyjnej peptydów wykorzystano serię eksperymentów fluorescencyjnych. Zbadano także wpływ peptydów na uporządkowanie lipidów (ang. *membrane lipid order*) za pomocą mikroskopii czasów życia fluorescencji FLIM (ang. *fluorescence lifetime imaging*).

microscopy) z użyciem barwnika wrażliwego na uporządkowanie błony. W końcowym etapie przeprowadzano test na aktywność fuzyjną cząstek wirusopodobnych VLP z błoną SLB za pomocą metody FLIM-FRET. Metoda ta łączy mikroskopię czasów życia fluorescencji z fluorescencyjnym rezonansem przeniesienia energii (ang. *fluorescence lifetime imaging microscopy-fluorescence resonance energy transfer*).

Przeprowadzone badania wykazały brak oddziaływania pomiędzy FP i TMD. Wyniki pokazały jednak różnice w działaniu TMD z dwóch różnych grup filogenetycznych: TMD z H1 powodowała zwiększenie uporządkowania lipidów, natomiast z H3 jej spadek. Ponadto zaobserwowano, że TMD może wpływać na aktywność fuzyjną białka pełnej długości. W eksperymentach z VLP zaobserwowano tendencje sugerujące, że H1-TMD-H3 wykazywał wyższą aktywność fuzyjną niż H1-TMD-H1.

Abstract

Hemagglutinin (HA) is one of the major surface proteins of the influenza A virus. During maturation, HA0 precursor is cleaved into two subunits, HA1 and HA2 subunits. They perform different functions: HA1 is responsible for the receptor binding at the host cell surface, while HA2 mediates viral fusion in the late endosomes. The N-terminal part of the HA2 subunit acts as a fusion peptide (FP). Under low pH conditions in the late endosomes, FP is exposed and initiates fusion. The C-terminal part of the HA2 is transmembrane domain (TMD), which anchors the protein in the membrane and possibly performs an important function in the fusion process. So far, 18 subtypes of HA have been identified, classified into two phylogenetic groups based on the amino acid sequence of the protein. Currently, the most prevalent subtypes circulating in the human population are H1 (group 1) and H3 (group 2). While FP sequences are conserved between subtypes, TMD sequences diverge significantly. Although the role of FP in the fusion process has been well characterized, the function of TMD still remains poorly understood. It has been shown that the presence of TMD is essential for the complete fusion process of the viral envelope with late endosomal membranes. Some studies suggest that an interaction between FP and TMD is responsible for full fusion. However, the presence of this interaction remains a contentious issue in the literature.

The main aim of the dissertation was to examine the potential interaction between FP and TMD. To examine this, series of experiments with peptides and full-length HA were carried out. Peptides with amino acids sequences corresponding to FP and TMD from H1 and H3 subtypes were used in the studies. Synthetic peptides corresponding to TMD were utilized in two versions: shorter (H1, H3) and longer (H1long, H3long). The longer versions were extended with amino acids that can interact with cholesterol. In addition, virus-like particles (VLP) were used, with full-length HA of the H1 subtype (H1-TMD-H1) or HA of the H1 subtype with the TMD fragment replaced by that from the H3 subtype (H1-TMD-H3). Liposomes and supported lipid bilayers (SLB) with different lipid compositions were utilized as artificial lipid membrane models. To examine synergic interaction between peptides, individual peptides and FP:TMD mixtures were used. The work aimed to biophysically characterize the action of the peptides in the membrane. To measure the fusion activity, a series of fluorescence experiments was performed. Moreover, membrane lipid order was investigated by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) using a dye sensitive to membrane lipid order. Finally, the fusion activity test of VLP with SLB was carried out using FLIM-FRET (fluorescence lifetime imaging microscopy-fluorescence resonance energy transfer).

The research showed a lack of interaction between FP and TMD. However, differences were observed in the membrane activity of TMDs from divergent phylogenetic groups. While H1 induced membrane ordering, H3 caused a decrease in the lipid order. Moreover, the results

suggest that TMD affects the fusion activity of HA. Moreover, it was observed that TMD may influence the fusion activity of the full-length protein. The experiments with VLP revealed a tendency suggesting that H1-TMD-H3 exhibits higher fusion activity than H1-TMD-H1.