

Abstrakt

Virus chřipky napadá ptactvo a savce a způsobuje u nich závažnou infekci, která je ročně příčinou téměř půl milionu lidských obětí. Dodnes jsou terapeutickými cíly pouze dvě molekuly v životním cyklu viru – M2 protonový kanál a neuraminidasa. Vznik nových pandemických subtypů je současně s vývojem resistantních variant proti současným lékům závažným podnětem pro nalezení nových cílů a potenciálně jejich inhibitorů. V nedávné době byla pomocí strukturní krystalografie identifikována protein-proteinová interakce mezi PA a PB1 podjednotkou virové polymerasy jakožto zajímavý terapeutický cíl. Zajímavé je, že tato interakce je zprostředkována jen několika interagujícími aminokyselinovými zbytky. Další zajímavý fakt je, že tyto zbytky vykazují vysokou konzervovanost mezi variantami viru chřipky typu A, což by v případě nalezení inhibitoru mohlo umožnit zacílit širokospektrální léčbu proti všem kmenům tohoto typu viru.

V této práci jsem se zabýval expresí a purifikací dvou fúzních rekombinantních proteinových konstruktů C-terminální domény PA podjednotky (CPA) z pandemického subtypu viru chřipky A/California/07/2009 (H1N1). První konstrukt byl navrhnut k evaluaci kinetických vlastností interakce mezi PB1 peptidem a CPA proteinem. Dále byl tento konstrukt použit k vývoji vysoko-kapacitní testovací analýzy látek na bázi technologie AlphaScreen. Pomocí této analýzy jsme testovali zkracované PB1 peptidy s úmyslem vyhledat minimální peptid, který by si zachoval vazebné vlastnosti vůči proteinu CPA. Dále jsem navrhl druhý rekombinantní protein sestávající se z hexahistidinové kotvy spojené s proteinem SUMO zlepšujícím rozpustnost, vázaným na CPA protein. Tento protein byl po odštěpení fúzní kotvy následně využit pro krystalizační experimenty metodou difuze par, které vedly k získání 3D struktury poskytující informace využitelné v racionálním návrhu léčiv. Na závěr byla navržena další vysokokapacitní testovací metoda pro hledání sloučenin v knihovnách pro nalezení nových látek rozrušujících protein-proteinové interakce.

Klíčová slova: polymerasa viru chřipky, protein-proteinová interakce, vysokokapacitní testovací metoda pro hledání sloučenin, proteinová krystalografie, testovací metoda AlphaScreen, testovací metoda DIANA