

# Abstrakt

Virus chřipky způsobuje infekční onemocnění, postihující 3 až 5 milionů jedinců ročně. V současné době se k léčbě chřipkových infekcí používají dva druhy léčiv: inhibitory neuraminidasy a inhibitory iontového kanálu M2. Vzrůstající počet kmenů resistantních vůči těmto inhibitorům a riziko vzniku nových pandemických kmenů však vytvářejí dosud neuspokojenou potřebu nového typu inhibitorů.

RNA-dependentní RNA polymerasa viru chřipky je novým cílem pro vývoj inhibitorů směřovaných proti viru chřipky. Cílem této diplomové práce bylo vyvinout vysokokapacitní testovací metody pro nalezení potenciálních inhibitorů dvou aktivit chřipkové polymerázy – vazby 7-methylguanosinové čepičky hostitelských RNA a jejich endonukleasové štěpení. Pro doménu vázající 7-methylguanosinovou čepičku bylo testování založeno na metodě DIANA (DNA-linked Inhibitor ANtibody Assay), která byla nedávno vyvinuta v laboratoři školitele; testování inhibitorů endonukleasové domény pak bylo založeno na technologii AlphaScreen.

Pro potřeby vývoje velkokapacitních testovacích metod byla připravena rekombinantní doména vázající 7-methylguanosinovou čepičku z podjednotky PB2 a N-koncová doména PA podjednotky chřipkové polymerasy, nesoucí endonukleasovou aktivitu. Oba rekombinantní proteiny byly exprimovány s příslušnými afinitními značkami a vyčištěny metodami afinitní chromatografie a gelové filtrace. Sondy pro velkokapacitní testovací metody byly navrženy na základě struktur v literatuře popsaných inhibitorů a jejich vazebné charakteristiky byly ověřeny biofyzikálními metodami. Obě testovací metody byly optimalizovány a bylo provedeno pilotní testování metodou AlphaScreen.

Vyvinuté velkokapacitní metody dovolují rychlé, kvantitativní testování inhibitorů dvou nezbytných procesů zprostředkovaných virovou RNA polymerasou, které jsou považovány za potenciální cíle terapeutického zásahu, a mohou tak přispět k vývoji nových léčiv proti chřipkové infekci.