

Abstrakt

Koronaviry jsou obalené viry s genomem tvořeným jednovláknovou molekulou RNA v pozitivní formě. S velikostí genomu, u některých druhů, přesahující 30 kb představují největší známé RNA viry. Infikují ptáky a savce včetně člověka a způsobují široké spektrum onemocnění. Většina lidských koronavirů způsobuje převážně mírné respirační infekce. Za poslední dvě desetiletí však došlo ke dvěma rozsáhlým epidemiím a globální pandemii vážných respiračních onemocnění, v mnoha případech končících smrtí, způsobených koronaviry. Nejnovější a nejrozsáhlejší z nich byla způsobena koronavirem SARS-CoV-2 (z angl. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus). V genomu koronavirů se nachází gen kódující nestrukturní protein 14 (nsp14), který má 3'-5' exonukleázovou a metyltransferázovou enzymatickou aktivitu. Exonukleáza nsp14 se účastní oprav nesprávně zařazených nukleotidů během replikace virového genomu a její přítomnost je u RNA virů velmi výjimečná. Exonukleázová aktivita nsp14 je výrazně podpořena vazbou dalšího virového proteinu, nsp10, který nemá enzymatickou aktivitu, ale je významným kofaktorem pro několik enzymaticky aktivních koronavirových nsps. Nsp14 i nsp10 jsou vysoce konzervované a sekvenčně podobné mezi jednotlivými druhy koronavirů.

Pro charakterizaci exonukleázové aktivity nsp14 a její interakcí s nsp10 byly PCR mutagenézou vytvořeny mutované verze proteinů nsp14 i nsp10. Nemutované a mutované verze nsp14 a nsp10, stejně jako zkrácená verze nsp10 byly vyprodukovány v bakteriálním expresním systému využívajícím bakterie *E. coli*. Exonukleázová aktivita jednotlivých verzí nsp14 v přítomnosti i nepřítomnosti verzí nsp10 byla pozorována *in vitro* aktivními esejemi využívajícími ssRNA, dsRNA a dsRNA s nesprávným párováním báze jako substrát. Výsledky této práce přinesly poznatky o fungování exonukleázy nsp14 a její interakcích s nsp10, které mohou sloužit jako základ pro podrobnější charakterizaci v budoucím výzkumu.

Klíčová slova: Koronaviry, SARS-CoV-2, COVID-19, exonukleáza, nsp14, nsp10