

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Chemijos ir geomokslų fakultetas



Biochemijos studijų programos magistrantas

Tautvydas Paškevičius

Magistrinis darbas

**Gripo viruso nukleoproteinų gryninimas
rentgenostruktūrinei kristalografinai analizei**

Darbo vadovas:

Dr. Evaldas ČIPLYŠ

Vilnius 2017

The purification of influenza virus nucleoproteins for X-ray crystallography.

SUMMARY

The object of this work is three influenza virus nucleoproteins (NP). The two major surface glycoproteins, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), are currently the main vaccine targets. However, both HA and NA have high mutation rates and as a result the antigenic drift and/or shift allows the virus to escape from established humoral immunity in the host. Vaccines must then be reformulated. By contrast, internal viral proteins, such as NP, are considerably more conserved carrying out multiple functions in influenza virus life cycle, and consequently are ideal targets for T-cell-mediated immunity and antiviral drugs. In the search for new anti-influenza agents, the viral polymerase has often been targeted due to the involvement of multiple conserved proteins and their distinct activities. However, NP has recently emerged as a new potential target for anti-influenza drug development. In this context, an atomic resolution structure of NP is of crucial importance. This work focused on the development of influenza virus NP purification strategy using *S. cerevisiae* expression system. The three NP proteins (IBV-NP-L, IBV-NP-S, IAV-NP) were successfully purified handling newly developed effective and efficient strategy which included various purification steps.

SANTRAUKA

Šio darbo objektas – trys gripo viruso nukleoproteinai (NP). Šiuo metu gripo viruso hemagliutininas (HA) ir neuraminidazė (NA) yra pagrindiniai vakcinų taikiniai, šie glikoproteinai pasižymi dideliu kintamumu, kurių dėka virusas gali išvengti šeimininko anksčiau įgyto humoralinio imuninio atsako. Todėl vakcinos kaskart turi būti kuriamos naujai. Tačiau vidiniai viruso baltymai, tokie kaip NP, kurie pasižymi dideliu konservatyvumu, gali būti idealūs taikiniai ląstelinio T-ląstelių imuniteto generavimui bei priešvirusinių vaistų kūrimui. Naujų priešgripinių vaistų paieškose ilgą laiką figūravo cheminiai jungiai nukreipti prieš gripo viruso RNR polimerazę, kurią sudaro trys konservatyvūs baltymai turintys atskirus aktyvumus. Tačiau NP, kuris atlieka eilę funkcijų viruso gyvavimo ciklo eigoje ir pasižymi konservatyvia aminorūgščių seka, pastaruoju metu tapo vienu iš pagrindinių alternatyvių taikinių priešgripinių vaistų kūrimui. Dėl šių priežasčių gripo viruso NP aukštos skiriamosios gebos struktūros yra esminės svarbos. Darbo metu sukurta efektyvi gripo viruso IBV-NP-L, IBV-NP-S, IAV-NP baltymų gryninimo strategija bei optimizuotos sąlygos. Naudojant mielių *S. cerevisiae* rekombinantinių baltymų raiškos sistemą bei taikant įvairius gryninimo žingsnius, NP sėkmingai išgryninti.