

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Matthew Zagorey Todd

Strukturní a funkční charakterizace inhibice flavivirové  
methyltransferasy

Structural and functional characterization of a flaviviral methyltransferase

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. et Mgr. Evžen Bouřa, Ph.D.

Praha, 2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

podpis:

## **Abstrakt**

Viry rodu *flavivirus*, patřící do rodiny *Flaviviridae*, jsou rozšířenou skupinou virových patogenů, které představují globální hrozbu pro lidské zdraví. Následky infekce jsou neurologické nebo jiné onemocnění jako je encefalitida, meningitida, mikrocefalie nebo krvácivá horečka, přičemž přímá protivirová léčba existuje pouze proti některým členům flavivirů jako je Virus žluté zimnice (YFV) nebo Virus japonské encefalidity (JEV). Genom flavivirů je pozitivní jedno-vláknová RNA, po jejíž translaci vzniká dlouhý virový polyprotein štěpen hostitelskými a virovými proteasami na strukturální a nestrukturální proteiny. Nestrukturální protein 5 (NS5) je tvořen C-koncovou doménou s funkcí RNA-dependentní RNA-polymerasy (RdRp) a N-koncovou doménou s funkcí methyltransferasy (MTasa). Flavivirové MTasy katalyzují poslední krok v tvorbě čepičky genomové RNA, která hraje klíčovou roli v procesech virové translace, replikace a úniku před imunitním systémem hostitele. Kvůli její konzervativní povaze je flavivirová MTasa slibným cílem terapeutického zásahu. Analýza její struktury je nezbytná pro vývoj širokospektrálních inhibitorů a léčiv proti onemocněním způsobené flaviviry.

## **Klíčová slova**

Flaviviry, Virus St. Louiské encefalidity (SLEV), Flavivirová methyltransferasa (MTasa), N-7 methylace, 2'-O methylace.

## **Abstract**

Genus *flavivirus*, member of the *Flaviviridae* family, is a wide-spread group of viral pathogens that pose a global threat to human health. Infections result in neurological and other diseases such as encephalitis, meningitis, microcephaly or haemorrhagic fever with direct anti-viral treatment restricted to only a few members including Yellow Fever Virus (YFV) and Japanese Encephalitis Virus (JEV). The flaviviral genome consists of a positive sense single-strand RNA, translated into a long viral polyprotein cleaved by host and viral proteases into structural and non-structural proteins. Non-structural protein 5 (NS5) is a highly conserved viral protein consisting of a C-terminal RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) and N-terminal methyltransferase (MTase) domain. Flaviviral MTases catalyse the final step of genomic RNA cap formation, that plays a crucial role in viral translation, replication and host immune system evasion. Due to its conservative nature, the flaviviral MTase is a promising drug target. It's structural analysis is needed for the development of broad-spectrum inhibitors and anti-viral treatment.

## **Key words**

Flavivirus, St. Louis Encephalitis Virus, Flaviviral methyltransferase (MTase), N-7 methylation, 2'-O methylation.

## **Poděkování**

Zde bych rád poděkoval svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. et Mgr. Evženu Bouřovi, Ph.D. a odborné konzultantce Petře Krafčíkové, Ph.D. za cenné rady, podporu, ochotu, trpělivost a čas, který mi věnovali po celou dobu mé práce.

Rovněž bych chtěl také poděkovat Martinu Klímovi, Ph.D. za pomocnou ruku při řešení struktur a všem členům laboratoře za jejich ochotu pomoci a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

# Obsah

1	Literární přehled.....	9
1.1	Flaviviry .....	9
1.1.1	Dengue virus.....	9
1.1.2	Virus žluté zimnice .....	9
1.1.3	Zika virus .....	10
1.1.4	Virus japonské encefalitidy .....	10
1.1.5	Virus západonilské horečky.....	10
1.1.6	Virus klíšťové encefalitidy .....	10
1.2	Virus St. Louiské encefalitidy.....	11
1.2.1	Rozšíření.....	11
1.2.2	Klinické aspekty.....	12
1.3	Struktura virionu flavivirů .....	13
1.4	Genom flavivirů.....	14
1.5	Nestrukturní proteiny flavivirů .....	16
1.5.1	NS1 .....	16
1.5.2	NS2A.....	16
1.5.3	NS2B.....	17
1.5.4	NS3 .....	17
1.5.5	NS4A.....	18
1.5.6	NS4B .....	18
1.5.7	NS5 .....	18
1.5.7.1	N-terminální doména NS5: Flavivirová methyltransferasa .....	19
1.6	Mechanismus methylace flavivirové RNA.....	21
1.6.1	Organochemické aspekty methylačního procesu .....	23
1.7	Flavivirová methyltransferasa jako cíl terapeutického zásahu .....	25
1.7.1	Vazebné místo SAM .....	25
1.7.2	Vazebné místo GTP .....	26
1.7.3	Alternativní přístupy .....	26
2	Cíl práce.....	28
3	Materiály a metody.....	29
3.1	Laboratorní technika.....	29
3.1.1	Software .....	30
3.2	Chemikálie.....	31
3.2.1	Roztoky, pufrý a média .....	31
3.2.2	Složení gelů pro SDS-ELFO.....	32
3.2.3	Enzymy .....	32
3.3	Metody.....	33
3.3.1	Izolace a purifikace proteinu .....	33
3.3.1.1	Transformace kompetentních bakterií <i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL .....	33
3.3.1.2	Exprese rekombinantního proteinu v transformovaných bakteriích.....	33
3.3.1.3	Izolace proteinu.....	33
3.3.1.4	Chelatační afinitní chromatografie.....	34
3.3.1.5	Dialýsa a štěpení his-tagu SUMO proteasou .....	34

3.3.1.6	Reverzní chelatační afinitní chromatografie .....	34
3.3.1.7	Gelová permeační chromatografie (FPLC) .....	34
3.3.1.8	Diskontinuální elektroforesa v prostředí SDS.....	35
3.3.2	Diferenční skenovací fluorimetrie .....	35
3.3.2.1	Příprava proteinového komplexu s ligandy.....	35
3.3.2.2	DSF.....	35
3.3.3	Krystalizace proteinu.....	36
3.3.3.1	Příprava proteinového komplexu s ligandy.....	36
3.3.3.2	Krystalizace proteinu v komplexu s ligandy SAM a SAH.....	36
3.3.4	Rentgenová difraktometrie .....	36
4	Výsledky .....	38
4.1	Exprese, izolace a purifikace SLEV NS5 MTasy.....	38
4.2	Thermal shift assay (DSF) .....	40
4.3	Krystalizace SLEV NS5 MTasy s ligandy SAM a SIN .....	41
4.4	Struktura proteinu SLEV NS5 MTasy.....	42
5	Diskuse .....	46
	Závěr.....	48

## Seznam zkratek

ssRNA	Jednovláknová RNA z angl. single strand RNA
RNA	Ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina (z angl. messenger ribonucleic acid)
kb	Kilobáze z angl. Kilobase je jednotka počtu nukleotidů
ORF	Otevřený čtecí rámeček z angl. open reading frame
NCR	Nekódující oblasti nukleové kyseliny z angl. none coding region
nt	Nukleotid
sfRNA	Subgemonová flavivirová RNA
ER	Endoplazmatické retikulum
NS	Nestrukturální protein z angl. nonstructural protein
dsRNA	Dvouvláknová RNA z angl. double strand RNA
NTPasa	Nukleosid-trifosfatasa
RTPasa	Ribonukleosid-trifosfatasa
RdRp	RNA-dependentní-RNA-polymerasa
GTasa	Guanylyl transferasa
MTasa	Methyltransferasa
VP(s)	Vezikulární balíčky (z angl. vesicular packets)
SAM	S-adenosyl-methionin
SAH	S-adenosyl-homocystein
SIN	Sinefungin
GTP	Guanosin trifosfát
GMP	Guanosin monofosfát
RMP	Ribavirin 5'-monofosfát
IMP	Inosin 5'-monofosfát
AMP	Ampicilin
OD600	Optická denzita při vlnové délce 600 nm
His-tag	Poly-histidinová kotva
SDS-ELFO	Elektroforesa v prostředí SDS
DSF	Diferenční skenovací fluorimetrie

# 1 Literární přehled

## 1.1 Flaviviry

Viry z rodu *Flavivirus* z rodiny *Flaviviridae* představují velkou skupinu obalených +ssRNA virů, které jsou celosvětovou hrozbou pro lidské zdraví. Název byl odvozen z viru žluté zimnice (YFV, z angl. Yellow Fever Virus) od slova *Flavus* (žlutý), který je jeden z hlavních představitelů skupiny (Diosa-Toro et al., 2020). Mezi nejznámější zástupce této skupiny dále patří virus západonilské horečky (WNV, z angl. West Nile Virus), Dengue virus (DENV), Zika Virus (ZIKV), Virus japonské encefalitidy (JEV, z angl. Japanese Encephalitis Virus) a Virus klíšťové encefalitidy (TBEV, z angl. Tick-borne Encephalitis Virus) (Pierson and Diamond, 2020).

Flaviviry se dále dělí do čtyř skupin podle ekologických charakteristik, molekulární fylogenetické analýzy, vektorové specifity a životního cyklu virů v hostiteli. Většina známých zástupců patří do skupiny flavivirů přenášených komáry rodu *Aedes* a *Culex*. Další skupinou jsou flaviviry přenášeny klíšťaty. Jelikož viry přenáší členovci, jsou označovány také jako arboviry (z angl. Arthropod-borne virus) (Mavian et al., 2018; Pettersson and Fiz-Palacios, n.d.).

### 1.1.1 Dengue virus

DENV se dělí na čtyři virové sérotypy (DENV1 – DENV4), které způsobují velmi podobné onemocnění u lidí. Znovu se objevil na přelomu 20. a 21. století. Dnes se vyskytuje v tropických a subtropických oblastech po celém světě, kde způsobuje kolem 400 milionů případů horečky dengue ročně. Mezi příznaky patří vysoká horečka, bolesti, a další příznaky podobné chřipce. Ve vzácných případech může onemocnění způsobit smrtelnou krvácivou horečku. Dodnes není dostupná žádná vakcína (Barrows et al., 2018; Collins and Metz, 2017).

### 1.1.2 Virus žluté zimnice

YFV je dnes rozšířena především v oblastech Afriky a Jižní Ameriky. I přes existující vakcínu proti YFV je stále významnou hrozbou. V roce 2016 bylo v Demokratické republice Kongo potvrzeno přibližně 7 600 případů s úmrtností kolem 14 %. Nemoc se projevuje horečkou, zimnicí, bolestí hlavy a příznaky podobné chřipce. Příznaky po nějaké době zmírní do tzv. fáze úlevy. Většina infikovaných se v této fázi vyléčí. Čtvrtina

nemocných pak přechází do intoxikační fáze, kdy jsou přítomny symptomy krvácivé horečky. Pro zhruba jednu polovinu pacientů je tato fáze smrtelná (Barrows et al., 2018).

### **1.1.3 Zika virus**

ZIKV byl poprvé izolován v 50. letech 20. století v Ugandě. V roce 2015 byl po epidemii v Brazílii zaznamenán nárůst případů mikrocefalie u novorozenců. Přítomnost viru byla prokázána v těle matek ale také u postižených dětí. Několik studií *in vivo* a *in vitro* prokázalo teratogenní účinky ZIKV. Na rozdíl od ostatních zástupců flavivirů se ZIKV dokáže šířit i z člověka na člověka skrze sexuální kontakt. Průběh nemoci je ve většina případech bezpříznakový. S příznaky připomíná symptomy DENV. Dlouhodobé následky jsou často neurologické povahy. Neexistuje doposud žádná vakcína (Barrows et al., 2018; Collins and Metz, 2017).

### **1.1.4 Virus japonské encefalitidy**

JEV se v dnešní době vyskytuje v oblastech Indie, Indonésie, jihovýchodní Asie a Austrálie. Stejně jako ZIKV má JEV teratogenní účinky. Ve většině případů je nákaza smrtelná nebo zanechává chronické neurologické poškození. Existuje však efektivní vakcína (Barrows et al., 2018).

### **1.1.5 Virus západonilské horečky**

WNV je celosvětově rozšířený a udržovaný v prostředí ptactva a komárů. Zhruba čtvrtina náhodných infekcí lidí má nespecifické symptomy virového onemocnění. Malé procento infekcí způsobí trvalé neurologické poškození jako je encefalitida nebo meningitida. Závažnější průběh může být smrtelný či zanechat doživotní následky. Vakcíny a léčba proti WNV jsou stále v procesu vývoje (Barrows et al., 2018).

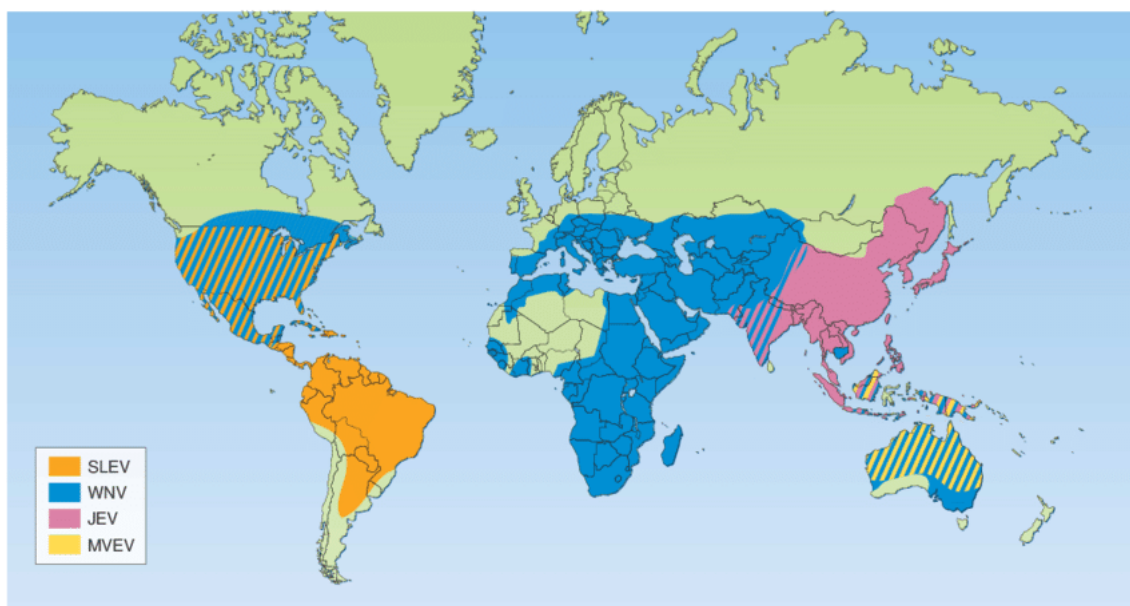
### **1.1.6 Virus klíšťové encefalitidy**

TBEV je nejčastější lidský patogen ze skupiny flavivirů přenášených klíšťaty, jehož výskyt je rozšířen po celé Evropě, Asii a Severní Americe, kde způsobují neurologická onemocnění, jako je encefalitida. Ročně je evidováno kolem 10 000 případů. I přes dostupné vakcíny je v důsledku jejich malého pokrytí TBEV stále hrozbou pro lidské zdraví (Barrows et al., 2018; Kubinski et al., 2020)

## 1.2 Virus St. Louiské encefalidity

### 1.2.1 Rozšíření

Virus St. Louiské encefalidity (SLEV) je neuroinvazivní arbovirus rodu *flavivirus* ze sérokomplexu JEV a blízkým příbuzným WNV. Oproti celosvětově rozšířenému WNV je výskyt SLEV soustředěn v oblastech severní a jižní Ameriky (viz Obr. 1.1), kde byl v průběhu 20. století v porovnání s jinými flaviviry nejvíce rozšířen a dodnes zde představuje důležité zdravotní riziko (Ciota et al., 2011; Oyer et al., 2014).



**Obr. 1.1 Globální distribuce a rozšíření virů JEV sérokomplexu:** *virus st. louiské encefalidity* (SLEV, oranžově), *virus západonislké horečky* (WNV, modře), *virus japonské encefalidity* (JEV, růžová), *virus encefalidity Murray-Valley* (MVEV z angl. *Murray-Valley encephalitis virus*, žlutě). Převzato z (Mackenzie et al., 2002).

Historicky byl SLEV spolu s dalšími arboviry nejspíše přítomen na tomto kontinentu již tisíce let, kde přežíval v tělech jeho hlavních hostitelů, ornitofilních komárů rodu *Culex* a v ptácích. Příchod Evropanů v průběhu 17. století odstartoval rozsáhlou zemědělskou přeměnu, kdy docházelo ke kultivaci obrovských ploch krajiny, která podpořila nárůst populace komárů. Vir se tak prostřednictvím komárů a městského ptactva dostával do kontaktu s lidmi, kdy kvůli tehdejší absenci laboratorních a diagnostických metod byly následky chybně přisuzovány jiným onemocněním centrální nervové soustavy (CNS) (Reisen, 2003).

První větší setkání proběhlo v roce 1933, kdy propukla ve městě St. Louis ve státě Missouri epidemie, podle které dostal virus své jméno. Během horkého léta došlo tehdy

k přemnožení komárů *Culex* ve vodách městského kanalizačního systému, které mělo za následek okolo 1 000 nakažených jedinců z toho 201 nákaze podleho. Později toho roku byl virus izolován ze vzorků mozkové tkáně obětí. V následujících letech byly pozorovány a evidovány vznikající ohniska a geografické rozšíření nákaz v USA, které měli za příčinu více než 1 000 obětí, 10 000 případů závažných infekcí a více než 1 000 000 případů infekcí mírných distribuovány po celém území spojených států. Poslední epidemie větších rozměrů proběhla v létě 1990 ve státě Florida v USA, kde vznikaly ložiska viru v oblastech kontaktu komárů se slepicemi. Laboratorně bylo tehdy potvrzeno 222 případů z toho 11 obětí (Reisen, 2003; Ridenour et al., 2021). Od roku 1999, kdy se v USA rozšířil WNV, výrazně klesl počet případů nákazy SLEV. Schopnost WNV tvořit větší genetickou různorodost a infikovat širší spektrum vektorů a hostitelů spolu s vytvořenou kolektivní imunitou je zodpovědná za geografické zaostření výskytu a poklesu případů SLEV (Ciota et al., 2011). Od roku 2010 bylo zaznamenáno celkem 97 infikovaných z toho 6 obětí (“Statistics & Maps | St. Louis Encephalitis | CDC,” 2021).

### 1.2.2 Klinické aspekty

Po kousnutí infikovaným komárem následuje inkubační doba 4-21 dnů, po které se u 1 z 300 případů projeví klinické symptomy. Poměr aparentních a inaparentních infekcí se může lišit v závislosti na virulenci mutantu a historické expozici populace. Symptomy, jako horečka a bolest hlavy, připomínající onemocnění chřipkou, jsou doprovázeny také nespecifickými příznaky, mezi které patří nevolnost, zvracení, kašel a bolest v krku (Oyer et al., 2014; Reisen, 2003).

Vážné následky onemocnění mohou být rozděleny do tří skupin podle klesající závažnosti (viz Tab. 1.2.2).

Skupina	Následky onemocnění
1	Encefalitida s vysokou horečkou (pozměněné vnímání, dezorientace)
2	Meningitida s vysokou horečkou a ztuhlým krkem
3	Bolesti hlavy (migrény) s horečkou bez poškození CNS

**Tab. 1.2.2: Vážné následky infekce SLEV rozdělené do skupin podle klesající závažnosti.**

Onemocnění může mít rychlý nástup vedoucí rovnou k vážným následkům nebo progresivní průběh všemi skupinami (viz Tab. 1.2.2). Nakažený se může za jakéhokoliv stádia vyléčit. Mezi další dlouhodobé následky, zejména akutních onemocnění, patří i chronický syndrom vyčerpání, pocit slabosti, deprese, ztráta paměti nebo neschopnost se

soustředit (Reisen, 2003). Mezi nejběžnější projevy encefalitidy způsobené SLEV patří snížená úroveň vnímání, letargie, třes, stahy svalů, kmitavý pohyb očí (nystagmus) a porucha koordinace pohybu (ataxie) (Oyer et al., 2014). Asi 80 % klinických případů trpí encefalitidou, přičemž 5-20 % z nich končí smrtí (Ridenour et al., 2021).

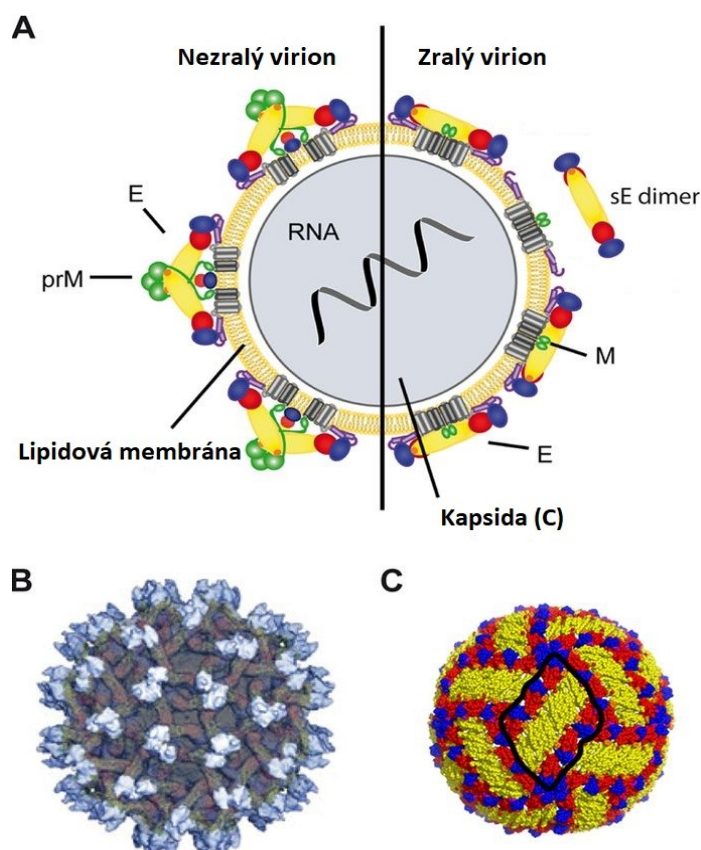
Člověk je pro SLEV definitivním hostitelem (z angl. dead-end host). V těle nedochází k dostatečně velkému namnožení viru pro jeho další šíření z člověka na člověka. Dodnes neexistuje specifická léčba nebo vakcína proti onemocnění způsobené SLEV. Důraz je kladen na podpůrnou léčbu (intravenózní podání tekutin a antipyretik) a prevence proti kousnutí komáry (repelenty a vhodné oblečení) (Simon et al., 2021).

### 1.3 Struktura virionu flavivirů

Flaviviry mezi sebou sdílí obdobnou strukturu virionů (Barrows et al., 2018). Částice mají sférický tvar velikosti o průměru přibližně 50 nm s elektronově hustým jádrem o průměru asi 30 nm. V jádru se nachází genomová +ssRNA, která je obalena vnitřní vrstvou kapsidového proteinu (C) (viz Obr. 1.3). Protein C tvoří dimery a má bazický charakter. Asymetrické rozpoložení náboje proteinu C napovídá, že vnitřní kladně nabitá strana interaguje se záporně nabitou genomovou RNA za tvorby komplexu zvaného ribonukleoprotein (RNP). Naopak záporně nabitá strana interaguje s membránou a virovými proteiny na povrchu částice. Vnější vrstva proteinu C je pokryta lipidovou dvojrstvou, která má původ v buněčné membráně hostitelské buňky (Barrows et al., 2018; Diosa-Toro et al., 2020; Lindenbach et al., 2006)

Zakomponovány do této membrány na povrchu částice jsou glykoproteiny E (z angl. envelope) a M (z angl. membrane). V dozrávajících virionech je glykoprotein M přítomen nejprve ve formě prM. V procesu zrání je v trans-Golgiho aparátu hostitelské buňky mírným poklesem pH (5,8-6,0) iniciována konformační změna a proteolýza hostitelskou proteasou furin, kdy se odštěpí pr-peptid za vzniku zralého M glykoproteinu (viz Obr. 1.3) (Diosa-Toro et al., 2020; Heinz and Allison, 2003).

Glykoprotein E, který hydrofobně interaguje s M, je hlavní antigenní determinant virionu, který zprostředkovává vazbu k receptorům hostitelské membrány a následnou fúzi membrán při vstupu do hostitelské buňky. V dozrávajících virionech je E chráněn glykoproteinem prM aby nedocházelo k předčasné fúzi membrán. Během dozrávání tvoří E na povrchu buňky celkem 90 dimerů, které po trojicích vytvoří povrch virionu z 30 „raftů“ a udávají částici charakteristickou ikosahedrální symetrií (viz Obr. 1.3) (Barrows et al., 2018; Dey et al., 2021; Lindenbach et al., 2006).

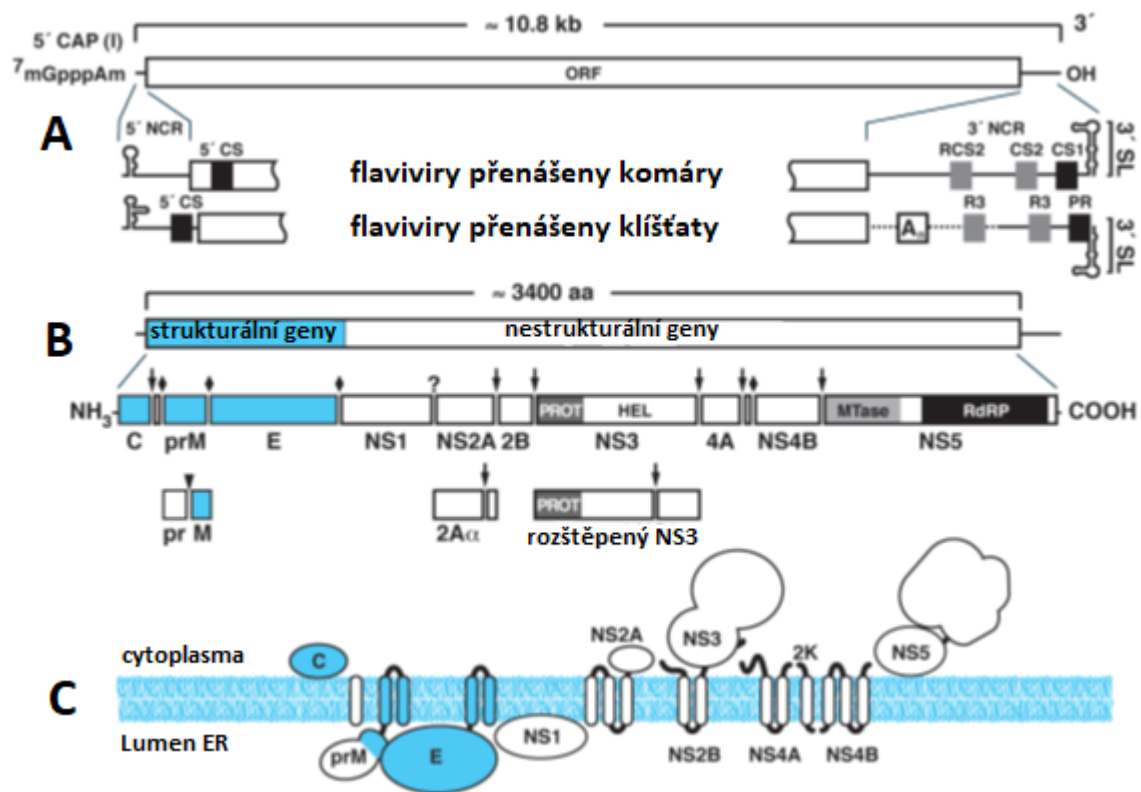


**Obr. 1.3 Schéma a modely zralého a nezralého virionu flaviviru. A:** Levá strana schématu znázorňuje nezralý virion s glykoproteiny E a prM. Pravá strana znázorňuje zralý virion s glykoproteiny E a M. **B:** Cryo-elektronová mikroskopie nezralého virionu DENV-2, kde na povrchu vyčnívá glykoprotein E (hnědá) v komplexu s prM (bílá). **C:** Trojice dimerů E tvořící rafty na povrchu zralého virionu DENV-2 (ohrazen černě). Převzato a upraveno z (Jarmer et al., 2014).

## 1.4 Genom flavivirů

Genom flavivirů je +ssRNA o velikosti přibližně 11 kb na jehož 5' konci je methylovaná „čepička typu I“ ( $m^7GpppAm$ -RNA). Jedním s charakteristických rysů flavivirové RNA je absence poly-A ocasu na jejím 3' konci. Genom kóduje jeden dlouhý ORF ohraničený NCR o velikosti přibližně 100 nt na 5' konci a 400-700 nt na 3' konci nukleové kyseliny, které jsou charakteristické pro vznik sekundárních struktur účinkujících při translaci, replikaci a sbalení virové RNA, přičemž část 3' koncové NCR není mezi flaviviry příliš konzervativní (viz Obr. 1.4). 5' koncová NCR tvoří sekundární strukturu smyčky, která slouží jako promotor virové polymerasy při iniciaci replikace na 3' konci 'kruhového' genomu. 3' koncová NCR tvoří několik pseudo-sekundárních struktur účinkujících při cyklizaci, replikaci a translaci virové RNA a interakcích s virovými a hostitelskými

proteiny. Pseudo-sekundární struktury hrají také roli v degradaci virové RNA, kde tvoří překážku hostitelské 5'→3' exoribonukleaze za vzniku sfRNA, která inhibuje imunitní odpovědi hostitele, zvyšuje replikační aktivitu a je konzervativní napříč flaviviry. Interakce komplementárních nt 5' a 3' koncových NCR jsou nezbytné pro cyklizaci a replikaci virové RNA. Translací kódující oblasti ORF genomu vzniká dlouhý virový polyprotein zabudovaný do membrány ER, který je ko- a post-translačně štěpen na strukturální (prM, E a C) a nestrukturální (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) proteiny (viz Obr. 1.4, kap. 1.5) (Barrows et al., 2018; Dioso-Toro et al., 2020; Lindenbach et al., 2006).



**Obr. 1.4** Struktura genomu flavivirů a jeho exprese. **A:** Struktura genomu je zde znázorněna s oblastmi kódující strukturální a nestrukturální proteiny, čepičkou typu I na 5' konci a NCR na 5' a 3' konci. Popsány jsou zde domény NCR, které tvoří významné sekundární a terciální struktury RNA. **B:** Polyprotein vznikající translací genomu, jeho štěpení a fragmenty. Rámečky pod genomem znázorňují prekurzory a zralé proteiny. Místa štěpení proteasami: ♦ (hostitelská proteasa), ↓ (virová serinová proteasa), ▼ (furin), ? (neznámá proteasa). **C:** Výsledné uspořádání produktů proteolýzy polyproteinu v membráně endoplazmatického retikula (ER) se zachovaným pořadím a proporcemi. Převzato a upraveno z (Lindenbach et al., 2006).

## 1.5 Nestrurní proteiny flavivirů

Translací genomu flavivirů vzniká dlouhý virový polyprotein zakomponovaný do membrány ER, který je ko- a post-translačně štěpen virovými a hostitelskými proteasami na 3 strurní proteiny (prM, E a C) a 7 nestrurních proteinů (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) (viz kap. 1.4) (Dey et al., 2021). Strurním proteinům byla věnována předchozí kapitola: 1.3 Struktura virionu flavivirů. V této kapitole se zaměříme na nestrurní proteiny (NS).

### 1.5.1 NS1

NS1 je vysoce konzervativní glykoprotein tvořen třemi doménami o celkové hmotnosti v rozmezí 46-55 kDa v závislosti na stupni jeho glykosylace, která je klíčová v replikaci, sekreci, virulenci a inhibici hostitelského imunitního systému. Podle stupně glykosylace tvoří NS1 dimer mNS1 (z angl. membrane-bound) zabudovaný v membráně ER, který v ranných stádiích replikace interaguje s dsRNA, NS4A, NS4B a hostitelskými proteiny kdy podporuje syntézu nové virové RNA. Spolu s NS4A a NS4B napomáhá tvorbě struktur odvozených od membrány ER nazývaných „vezikulární balíčky“ (VPs z angl. vesicular packets) při tvorbě virionu.

Hexamer sNS1 (z angl. secreted) je sekretován do extracelulárního prostoru kde reguluje imunitní odpověď hostitele a zvyšuje permeabilitu virionu skrz cévní stěnu (Dey et al., 2021; Rastogi et al., 2016, p. 1).

### 1.5.2 NS2A

NS2A je protein hydrofobního charakteru o celkové váze 22 kDa integrovaný do membrány ER tvořen celkem osmi doménami, z nichž pět je transmembránových. V kooperaci s NS3 a NS5 interaguje s dsRNA v procesu replikace. Podporuje tak syntézu nové virové RNA.

Prostřednictvím mezimolekulárních interakcí C-koncové transmembránové domény NS2A s NS3, strurními proteiny (prM, E a C) a nově syntetizovanou virovou RNA napomáhá při stavbě virionu. Reguluje proteolýzu komplexu C-prM a virové RNA skrze její 3' koncovou NCR jenž vede k vytvoření kapsidy s nově syntetizovanou virovou RNA (Dey et al., 2021; Gopala Reddy et al., 2018).

### 1.5.3 NS2B

NS2B je transmembránový protein o váze 15 kDa hydrofobního charakteru tvořen čtyřmi krátkými transmembránovými  $\alpha$  helixy propojené strukturami  $\beta$  listů a  $\beta$  kličky, které vytváří hydrofilní dutinu.

Interakcí hydrofilní dutiny s proteolytickou doménou NS3 vzniká heterodimer ukotvený do membrány ER pomocí transmembránové domény NS2B s funkcí serinové proteasy. Struktury  $\beta$  listů napomáhají ke správnému sbalení a aktivaci komplexu.  $\beta$  klička má pak funkci vazebné domény pro substrát. Proteasový komplex NS2B a NS3 hraje zásadní roli v rozpoznávání úseků virového polyproteinu a jejich následné štěpení.

Účinkuje také v procesu replikace virové RNA, kompletace virionu a inhibici imunitní odpovědi hostitele (Dey et al., 2021; Gopala Reddy et al., 2018).

### 1.5.4 NS3

NS3 o váze 69 kDa je druhý největší vysoce konzervativní nestrukturní protein kódovaný genomem flavivirů tvořen dvěma doménami zodpovědný za klíčové procesy v životním cyklu flavivirů.

N-koncová doména má v konjugaci s NS2B jako kofaktorem funkci serinové proteasy, která štěpí v několika místech nově syntetizovaného virového polyproteinu s charakteristickou sekvencí dvou bazických aminokyselin následovaných aminokyselinou s krátkým postranním řetězcem (viz Obr. 1.4) za tvorby příslušných strukturních a nestrukturních proteinů.

C-koncová doména má funkci NTPasa-dependentní RNA helikasy, která se podílí na replikaci a syntéze nové virové RNA rozpletením dsRNA. Kromě helikasy má také funkci RTPasy při tvorbě 5' koncové čepičky RNA, kdy vzniká komplex proteinů NS3 a NS5. Byla také pozorována schopnost syntézy dsRNA bez spotřeby ATP.

NS3 spolu s NS2A doprovází nově syntetizovanou virovou RNA a napomáhá tak k sbalení virové částice. NS3 je schopna také využívat hostitelskou synthasu mastných kyselin a podpořit tak produkci fosfolipidové dvojvrstvy při tvorbě virionu (Barrows et al., 2018; Dey et al., 2021; Li et al., 2014; Luo et al., 2015).

### **1.5.5 NS4A**

NS4A s váhou přibližně 16 kDa je transmembránový protein tvořen šesti  $\alpha$  helixy, který je důležitou součástí konstruktů replikačního komplexu spolu s NS2A, NS2B a NS4B. Z N-konce proteinu je během proteolýzy polyproteinu odštěpen fragment 2K zodpovědný za navigaci NS4B do membrány ER.

N-koncová část tří transmembránových domén amfipatického charakteru citlivá na zakřivení má schopnost vázat fosfolipidové membrány a tvořit oligomery NS4A proteinů. Díky těmto vlastnostem a interakcím s NS1 a NS4B modeluje v prostoru membránu ER za tvorby struktur vezikulárních balíčků (VP) zásadních při stavbě replikačního komplexu.

C-koncová část sestavena ze zbylých tří transmembránových domén je zodpovědná za oligomerizaci NS4A proteinů, interakci s NS4B a s helikasovou doménou NS3 regulující tak NTPasovou aktivitu NS3.

NS4A interaguje také s hostitelskými proteiny napomáhajících stavbě buněčných membrán (vimentin, reticulon 3). Spolu s jinými NS inhibuje imunitní odpověď hostitele. (Dey et al., 2021; Gopala Reddy et al., 2018).

### **1.5.6 NS4B**

NS4B s váhou 27 kDa tvořen jedenácti  $\alpha$  helixy je největší integrovaný NS do membrány ER zapojený do replikace a modulace hostitelského imunitního systému. Napříč flaviviry není sekvence aminokyselin NS4B velmi konzervativní, ale jeho sekundární struktury zůstávají zachovány. Části NS4B dynamicky podléhají konformačním změnám, které umožňují některým doménám procházet z lumenu ER skrze membránu do cytosolu a nazpět, kde interagují s proteiny virového replikačního komplexu (NS1, NS3, NS4A a NS5) a hostitelskými proteiny. Celkově tak přispívá k replikačnímu procesu a stavbě virionu. Slouží také jako supresor imunitního systému hostitele ve snaze utlumit produkci virové RNA (Dey et al., 2021; Gopala Reddy et al., 2018).

### **1.5.7 NS5**

NS5 vážící přibližně 103 kDa s délkou okolo 900 aminokyselin je největší vysoce konzervativní protein v arsenálu flavivirových NS, který je tvořen dvěma doménami propojené linkrem 9 aminokyselin s katalytickými aktivitami RdRp, MTasy a GTasy, které jsou esenciální v procesech translace a replikace virové RNA (Dey et al., 2021; Hercik et al., 2017) (Issur et al., 2009).

C-koncová doména (~74 kDa) tvořena dvěma třetinami proteinu NS5 (~600 aminokyselin) má funkci RdRp syntetizující nové vlákno virové RNA.

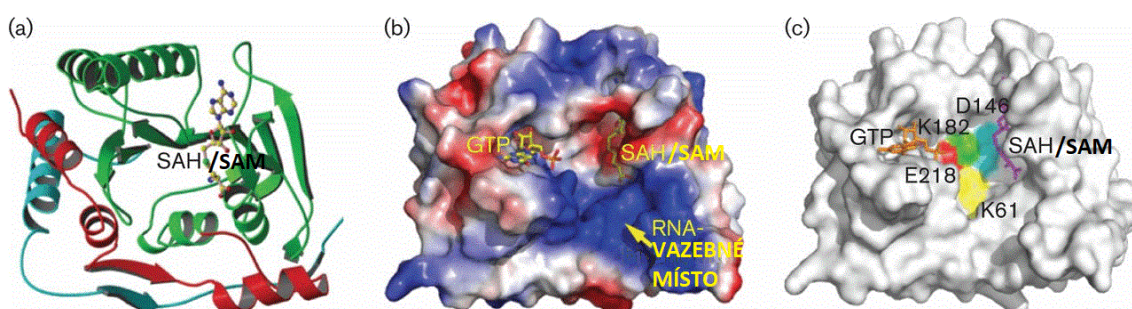
#### 1.5.7.1 N-terminální doména NS5: Flavivirová methyltransferasa

N-koncová doména, odpovídající jedné třetině (~300 aminokyselin, ~31 kDa) NS5, má funkci SAM dependentní MTasy, která v komplexu s NTPasovou aktivitou NS3 generuje stabilizující strukturu methylované čepičky na 5' konci nově syntetizované virové RNA ( $m^7GpppAm$ -RNA) ve snaze uniknout hostitelskému imunitnímu systému a zvýšit efektivitu její translace. SAM slouží jako donor methylové skupiny v procesu methylace. (Dey et al., 2021; Dong et al., 2008; Hercik et al., 2017; Liu et al., 2010).

Všechny flavivirové MTasy sdílí strukturu tří základních motivů: 1) Vysoce konzervativní subdoména v jádru proteinu tvořena  $\beta$  skládanými listy obklopené  $\alpha$  helixy typická pro rodinu SAM-dependentních MTas zvaná „SAM-dependent MTase fold“. 2) N-terminální subdoména. 3) C-terminální subdoména.

Dalším jejich sdíleným motivem napříč flaviviry je tetráda aminokyselin K-D-K-E. V sekvenci proteinu jsou aminokyseliny od sebe nejprve vzdáleny. Až ve sbaleném proteinu zaujímají blízké pozice v trojrozměrném prostoru a vytváří tak aktivní místo pro methylaci N-7 guanosinu a 2'-O adenosinu čepičky. Pro 2'-O-methylaci jsou potřebné všechny čtyři aminokyseliny. Pro N-7 methylaci je nezbytný pouze aspartát (D).

Analýzou struktur flavivirových MTas byly definovány vazebná místa pro molekuly SAM/SAH, GTP a pozitivně nabitá kanálovitá struktura pro vazbu virové RNA (viz Obr. 1.5.7.1) (Dong et al., 2008; Liu et al., 2010; Zhou et al., 2007).



**Obr. 1.5.7.1 Struktura flavivirové methyltransferasy. A:** Krystalová struktura WNV MTasy v komplexu se SAHem. Barevně je vyznačena N-terminální subdoména (červeně), C-terminální subdoména (modře) a jaderná subdoména (zeleně). **B:** Konzervativní vazebná místa SAH/SAM, GTP a RNA WNV MTasy. Povrch je zobrazen jako mapa elektrostatického potenciálu aminokyselin nabitých kladně (modrá), záporně (červená) a neutrálně (bílá). **C:**  $K_{61}$ (žlutá)- $D_{146}$ (modrá)- $K_{182}$ (zelená)- $E_{218}$ (červená) motiv WNV MTasy s GTP (oranžová) a SAH/SAM (fialová). Upraveno z (Dong et al., n.d.).

Flavivirové MTasy obsahují pouze jedno vazebné místo pro donor methylové skupiny SAMu (SAH, výchozí látka methylace) pro obě methylační reakce umístěné v jádře proteinu (viz Obr. 1.5.7.1). Bodové mutace v tomto vazebném místě znemožnily N-7 i 2'-O methylaci. Další analog SAMu, SIN, který byl původně izolován ze *Streptomyces griseoleus* jako antibiotikum, kompetitivně inhibuje vazebné místo a zabránil tak oběma methylacím. Tyto skutečnosti napovídají, že flavivirové MTasy používají pouze jedno vazebné místo pro dvě odlišné methylace. Znamená to, že 5'koncová čepička by v průběhu reakcí měla změnit svoji polohu (Dong et al., 2008; Hercik et al., 2017; Liu et al., 2010)

Vazebné místo pro GTP je dalším konzervativním místem všech flavivirových MTas. Aromatický postranní řetězec phenylalaninu zde patrově interaguje ( $\pi$ - $\pi$  stacking) s bází GTP. Bodové mutace vazebného místa selektivně inhibují pouze 2'-O methylaci. Vazba exogenního GTP opět selektivně inhibovala pouze 2'-O methylaci. Krystalizace flavivirové MTasy s analogem čepičky GpppA nastínila pravděpodobný mechanismus, kdy báze guanosinu patrově interaguje s phenylalaninem tak, že jsou fosfáty lokalizovány poblíž vazebného místa pro SAM, kde probíhá 2'-O methylace adenosinu. Prokázána byla také selektivní inhibice 2'-O methylace analogem GTP, ribavirin 5'-monofosfát (RMP), používaný jako antivirotikum v klinické praxi, který se váže do vazebného místa GTP (Benarroch et al., 2004; Dong et al., n.d.) (Dong et al., 2008).

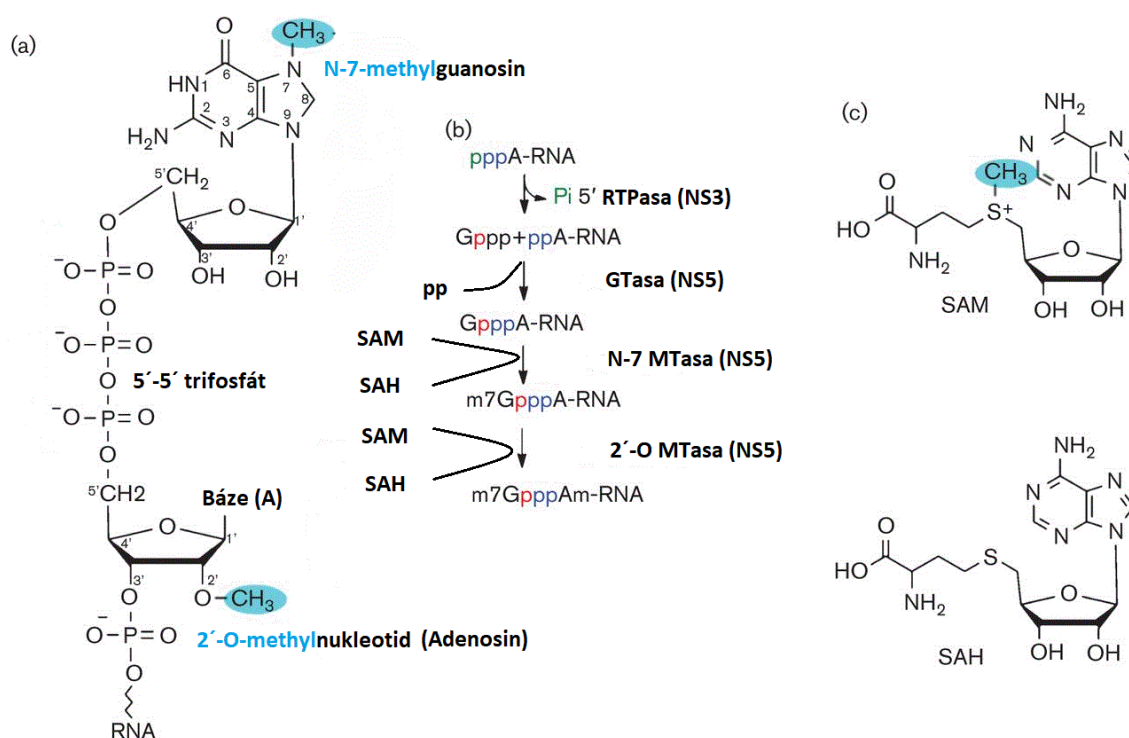
Další konzervovaná část flavivirových MTas je oblast v okolí vazebných míst SAM a GTP ve tvaru žlábků, která je tvořena převážně aminokyselinami s kladně nabitými postranními řetězci interagujícími s negativně nabitou kostrou RNA při tvorbě čepičky (viz Obr. 1.5.7.1). Výsledky mutagenetických studií flavivirových MTas poukázali na dva soubory residuí potřebných k N-7 a 2'-O methylacím. Efekty mutací těchto residuí na aktivitu MTasy mohou být rozděleny do následujících čtyř skupin: 1) Aminokyseliny kritické pro obě methylace. 2) Aminokyseliny potřebné pouze pro N-7 methylaci. 3) Aminokyseliny potřebné pouze pro 2'-O methylaci. 4) Aminokyseliny nepodstatné pro obě methylace.

Z výsledků bylo také patrné, že pro 2'-O methylaci bylo esenciálních více aminokyselin rozprostřených po větší ploše oproti residuím potřebných k N-7 methylaci. Ojedinelé bodové mutace neměli žádný efekt na obě methylace. Tyto skutečnosti napovídají, že mezi jednotlivými reakcemi dochází ke změně pozice řetězce RNA ve vazebné oblasti, kde s MTasou komplexuje skrze vícero bodových interakcí (Dong et al., 2008; Liu et al., 2010).

## 1.6 Mechanismus methylace flavivirové RNA

Větší část všech eukaryotických mRNA je na 5' konci opatřena stabilizační strukturou čepičky slouženou z *N*-7-methylguanositu propojeného 5'-5' trifosfátem k prvnímu 2'-O methylovanému nukleotidu mRNA ( $m^7\text{GpppNm-RNA}$ ) označovanou jako čepička typu I. Existují však i čepičky typu 0, kde nedochází k 2'-O methylaci nukleotidů za koncovým guanositem ( $m^7\text{GpppN-RNA}$ ) a čepička typu II, kde naopak dochází k 2'-O methylaci dvou následujících nukleotidů za guanositem ( $m^7\text{GpppNmNm}$ ).

Čepička chrání RNA před degradací exoribonukleasou a hraje významnou roli v buněčných procesech jako je štěpení, transport, rozpoznávání iniciačními faktory translace a translace mRNA. Nespočet virů včetně flavivirů si osvojilo svůj mechanismus syntézy 5' koncové čepičky virového genomu ve snaze napodobit buněčnou mRNA, zvýšit efektivitu translace a uniknout imunitnímu systému hostitele (Dong et al., n.d.; Hercik et al., 2017) (Liu et al., 2010).



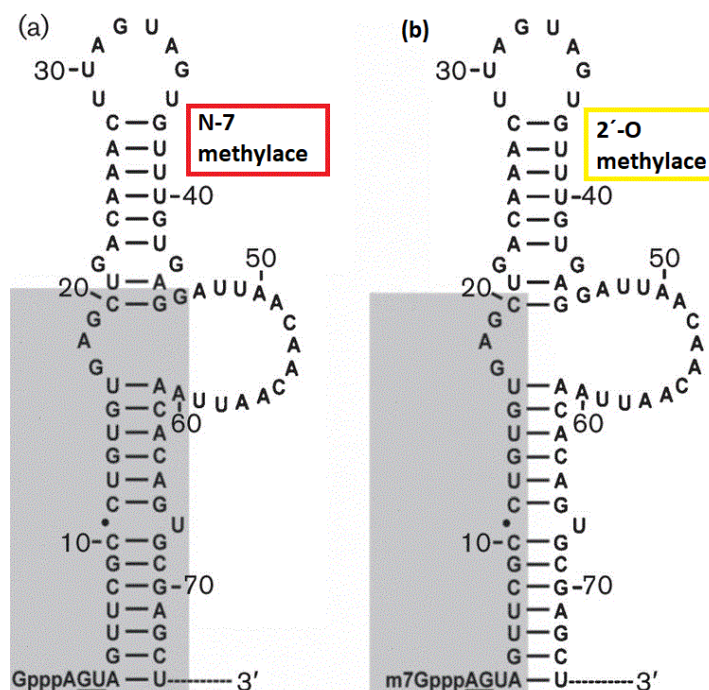
**Obr. 1.6a** Tvorba čepičky typu I virové RNA. **A:** Čepička tvořena *N*-7-methylguanositem a 2'-O-methyladenosinem propojených 5'-5' trifosfátovým můstkem. **B:** Kanonický mechanismus tvorby čepičky katalyzována 5' RTPasou, GTasou (NS5) a N-7/2'-O MTasou (NS5). Červené fosfáty mají původ v substrátu GTP. **C:** Struktura molekul donoru methylové skupiny SAM a produkt reakce SAH. Modře je zvýrazněna methylová skupina methylující čepičku. (viz níže) Převzato a upraveno z (Dong et al., n.d.).

Celý proces je sekvencí tří po sobě jdoucích enzymatických reakcí. Prvním krokem je NS3 a jeho C-koncová doména s funkcí RTPasy, která odštěpí  $\gamma$  fosfát z 5' koncového adenosinu nově syntetizovaného vlákna virové RNA (ppA-RNA).

Následuje GTasa NS5 hydrolyzující GTP na GMP za tvorby intermediátu GMP-NS5. Reakcí GMP a ppA-RNA vzniká základ struktury čepičky (GpppA-RNA).

Posledním krokem je N-7 methylace guanosinu ( $m^7$ GpppA-RNA, čepička typu 0) zakončený 2'-O methylací následujícího adenosinu ( $m^7$ GpppAm-RNA, čepička typu I), který je katalyzován MTasou NS5 (viz Obr. 1.6a) (Bradrick, 2017; Dong et al., n.d.; Issur et al., 2009).

Na rozdíl buněčné tvorby čepičky, kde methylace N-7 a 2'-O katalyzují dvě různé MTasy, používají flaviviry pouze jeden enzym pro obě reakce (NS5 MTasa) (Hercik et al., 2017). Buněčné MTasy nemají substrátovou specifitu a methylují čepičku bez ohledu na sekvenci nt za guanosinem. Katalýza methylace flavivirové RNA je ale substrátově specifická, kdy důležitou roli hraje 5' koncová sekvence prvních nukleotidů a sekundární struktura smyčky 5' koncové NCR. Obě tyto podmínky jsou konzervovány napříč flaviviry. Pro N-7 methylaci je vyžadována přítomnost nt G a U na pozicích 2 a 3 a sekundární struktura smyčky 5' koncové NCR. Pro 2'-O methylaci jsou směrodatné pouze nukleotidy A a G v pozicích 1 a 2 a minimální délka RNA 20 nt (viz Obr. 1.6b) (Bradrick, 2017; Dong et al., 2008, 2007, n.d.).



**Obr. 1.6b** Podmínky struktury a sekvencí pro N-7 a 2'-O methylace. A: Podmínky pro N-7 methylaci (červená). Na 5' konci jsou přítomny nt G(2) a U(3) následovány

sekundární strukturou RNA smyčky (šedé pole). **B:** Podmínky pro 2'-O methylaci (žlutá). Na 5' konci jsou přítomny nt A(1) a G(2) s délkou RNA přesahující 20 nt. Převzato a upraveno z (Dong et al., n.d.).

*In vitro* studie WNV, DENV-1 a YFV NS5 MTasy poukázaly na preferenci v pořadí jednotlivých methylací na základě jiných optimálních hodnot pH a druhů substrátů pro obě reakce. N-7 methylace probíhá při pH 7,0 se srovnatelnou efektivitou přeměny substrátů GpppA-RNA a GpppAm-RNA na m<sup>7</sup>GpppA(m)-RNA zatímco 2'-O methylace probíhá při pH ≥ 9,0 s preferencí m<sup>7</sup>GpppA-RNA jako substrát před GpppA-RNA. Nutnost rozdílných biochemických podmínek pro obě reakce naznačuje odlišný mechanismus methylací. Skutečnost, že substrát m<sup>7</sup>GpppA-RNA se váže na MTasu s větší afinitou než GpppA-RNA a je preferován pro 2'-O methylaci je důkazem pro pořadí N-7 a 2'-O methylací (Bradrick, 2017; Dong et al., 2008, n.d.) (Barrows et al., 2018).

Jak bylo již zmíněno (viz kap. 1.5.7.1) přítomnost jednoho vazebného místa pro SAM spolu se studii vazebného místa pro RNA napovídá, že by mělo docházet ke změně pozice řetězce při RNA mezi methylacemi. Byly navrženy tři různé mechanismy, jak by k tomuto kroku mohlo docházet.

V prvním scénáři je nejprve RNA v poloze, kdy N-7 guanosinu je umístěn poblíž methylové skupiny SAMu pro první methylaci (m<sup>7</sup>GpppA-RNA). Poté dochází k regeneraci SAMu a k přemístění 5' konce do vazebného místa GTP, které interaguje s m<sup>7</sup>Gppp a přiblíží tak adenosin k SAMu pro druhou methylaci (m<sup>7</sup>GpppAm-RNA).

V druhém scénáři je potřeba dvou molekul MTasy. Po N-7 methylaci je oddělen substrát od původního enzymu. Následuje vazba na druhý enzym, který zprostředkuje 2'-O methylaci.

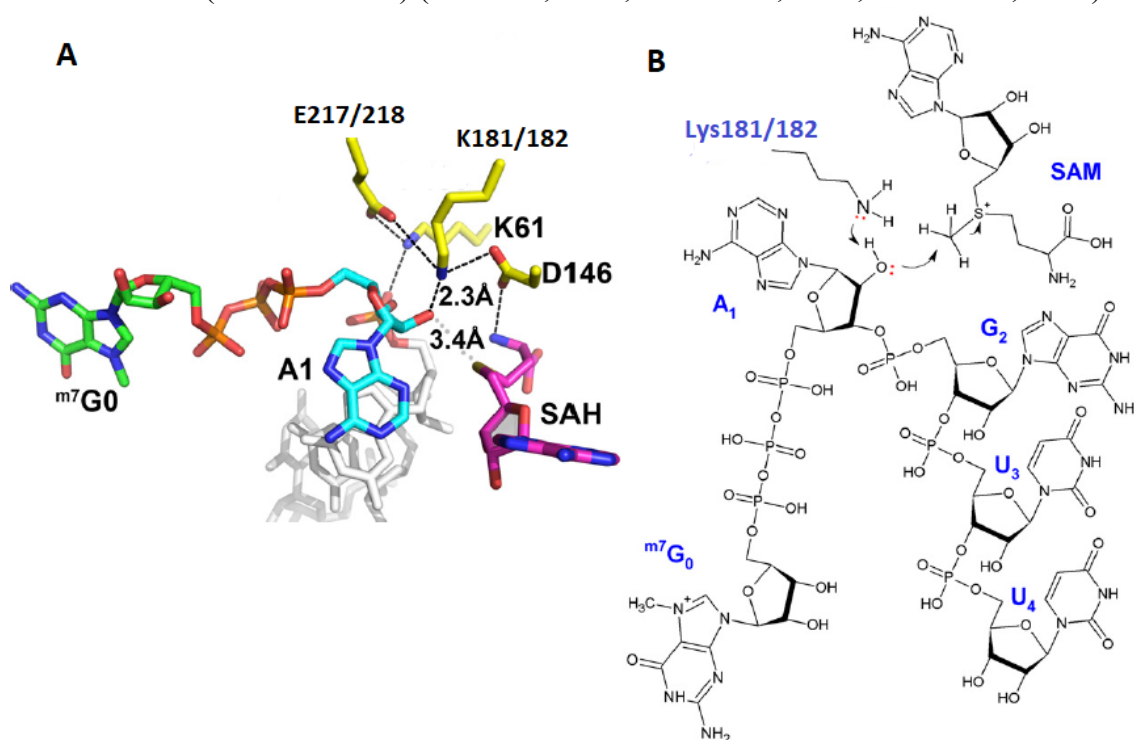
V třetím scénáři dochází k dimerizaci MTas. Substrát se nejdříve váže k první MTase do polohy výhodné pro N-7 methylaci. Následuje dimerizace MTas, kdy druhý enzym katalyzuje 2'-O methylaci (Dong et al., n.d.; Liu et al., 2010).

### 1.6.1 Organochemické aspekty methylačního procesu

Z mechanistického pohledu probíhá methylace klasickou S<sub>N</sub>2 substitucí nukleofilním atakem methylové skupiny SAMu, která je katalyzována konzervovanou tetradou aminokyselin K-D-K-E typickou pro MTasy. Superpozice struktur WNV a DENV-2 MTas s N-7 MTasou Ecm1 v komplexu se substrátem naznačila „in-line“ mechanismus N-7 methylace, kdy nebyl pozorován žádný přímý kontakt mezi rezidui MTasy,

nukleofilním atomem N-7 Guanosinu a methylovou skupinou SAMu. Reakce tak pravděpodobně probíhá v těsné blízkosti reagujících substrátů, jejich správnou prostorovou orientací a optimální geometrií (Fabrega et al., 2004; Liu et al., 2010).

Geometrie aktivního místa a mechanismus 2'-O methylace byl již dobře popsán ze struktur rozsáhle zkoumané VP39 MTasy v komplexu se substráty. Superpozice se strukturami flavivirových MTas poukázala na téměř identické umístění katalytické tetrády K-D-K-E. RNA je vázána k MTase tak, aby 2'-OH skupina adenosinu (1) byla poblíž SAMu a obklopena K-D-K-E tetradou. Lysin K181/K182 (DENV/WNV), který je obklopen kyselým aspartátem D146 a glutamátem E217/218 (DENV/WNV), při pH 8,5 deprotonuje na  $\epsilon$ -amino-skupině a následně aktivuje deprotonací 2'-OH skupinu adenosinu. Karboxylová skupina přilehlého aspartátu D146 mezitím stabilizuje elektrofilní atom síry SAMu a lysin K181/182. Aktivovaná 2'-O skupina atakuje methylovou skupinu vázanou ke kladně nabitě síře SAMu prostřednictvím nukleofilní  $S_N2$  substituce (viz. Obr. 1.6.1) (Liu et al., 2010; Zhao et al., 2015; Zhou et al., 2007).



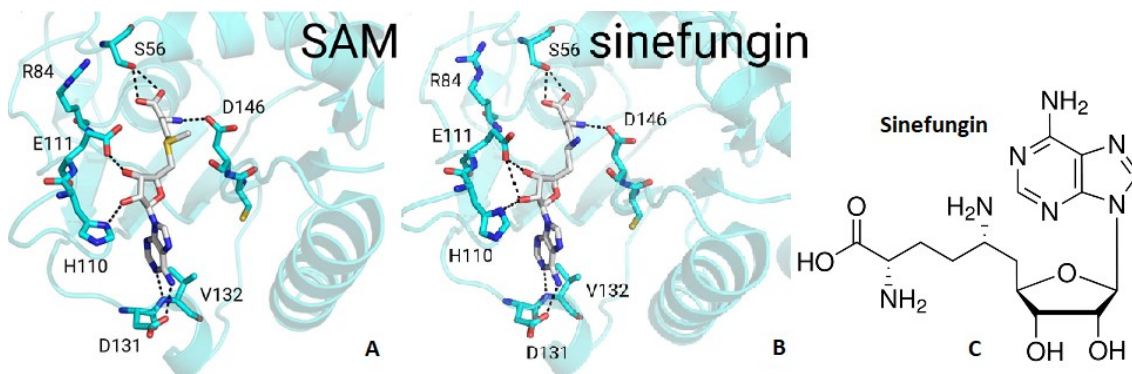
**Obr. 1.6.1 Mechanismus katalýzy 2'-O methylace NS5 MTasou flavivirů. A:** Aktivní místo NS5 MTasy s katalytickou tetradou K-D-K-E (žlutá) (DENV K181, E217; WNV K182, E218) v těsné blízkosti 2'-OH skupiny (červená) A1 (modrá) a methylové skupiny SAMu (fialová). Jednotlivé interakce a jejich vzdálenosti jsou vyznačeny čerchovanou čarou (černá). **B:** Komplex NS5 MTasy s čepičkou typu 0 a SAMem s vyznačeným mechanismem  $S_N2$  substituční reakce. Převzato a upraveno z (Zhao et al., 2015).

## 1.7 Flavivirová methyltransferasa jako cíl terapeutického zásahu

Flavivirová MTasa se ukázala být nepostradatelnou součástí životního cyklu flavivirů v procesu syntézy nové virové RNA. Vysokou konzervativností jejich strukturálních prvků, jako je aktivní místo s tetrádou aminokyselin K-D-K-A nebo vazebná místa pro SAM, GTP a RNA, se prezentuje jako atraktivní cíl terapeutického zásahu pro vývoj nových léčiv proti onemocněním způsobené flaviviry (Brecher et al., 2015; Liu et al., 2010).

### 1.7.1 Vazebné místo SAM

Studium struktury vazebného místa pro SAM je zásadní pro vývoj inhibitorů na základě struktury SAMu. SIN, analog SAMu, je širokospektrální inhibitor MTas, který tvoří dobrý odrazový můstek pro návrh nových léčiv. SIN se liší přítomností atomu uhlíku s amino skupinou v místě methylované síry SAMu. Do vazebného místa se váže s vyšší afinitou a přibližně stejným způsobem jako SAM prostřednictvím vodíkových vazeb a van der Waalových interakcí s rozdílem v konformacích některých okolních reziduí (viz Obr.1.7.1) (Fernandes et al., 2021; Hercik et al., 2017; Lim et al., 2015; Liu et al., 2010).



**Obr. 1.7.1** Krystalová struktura ZIKV MTasy v komplexu s ligandy. **A:** Krystalová struktura ZIKV MTasy (modrá) v komplexu se SAMem (bílá). **B:** Krystalová struktura ZIKV MTasy (modrá) v komplexu se SINem (bílá). Vyznačeny jsou také atomy kyslíku (červená), atomy dusíku (modrá) a polární interakce (černé čerchované čáry) **C:** Strukturální vzorec SINu. Převzato a upraveno z (Hercik et al., 2017; “Sinefungin 95% (HPLC), powder | Sigma-Aldrich,” n.d.).

Problém však nastává v identickém vazebném místě pro SAM u buněčných MTas methylující hostitelskou mRNA, kdy dochází k jejich nespecifické inhibici vedoucí ke

značné cytotoxicitě SINu. Je tedy potřeba najít odlišnosti flavivirových od buněčných MTas pro specifitější vývoj léčiv (Liu et al., 2010).

Jednou takovou odlišující charakteristikou je hydrofobní kapsa blízko vazebného místa pro SAM konzervativní napříč flaviviry. Látky odvozené od struktury SAHu s hydrofobními substituenty na N-6 dusíku adeninu, vměstnané do zmiňované kapsy, jevíly větší afinitu k vazebnému místu oproti SAHu a selektivitu vůči flavivirovým MTasam (Fernandes et al., 2021; Lim et al., 2015; Liu et al., 2010). Cílení takovýchto látek na strukturální odlišnosti flavivirových MTas představuje způsob vývoje selektivních inhibitorů bez efektu na buněčné MTasy (Dong et al., n.d.).

### 1.7.2 Vazebné místo GTP

Stejně, jako je to u vazebného místa pro SAM, je vazebné místo GTP dalším kandidátem pro vývoj inhibitorů flavivirových MTas. Bodové mutace v jeho reziduích značně ovlivnily efektivitu 2'-O methylace. Krystalové struktury MTas v komplexu s analogy čepičky naznačily mechanismus, kdy se m<sup>7</sup>GpppA-RNA váže do tohoto místa v průběhu 2'-O methylace. Inhibitory vazebného místa GTP by tedy měly selektivně inhibovat 2'-O methylaci (Lim et al., 2015).

RMP, analog guanosinu, byl používán k léčbě virových onemocnění už několik desetiletí. Působí jako inhibitor buněčné IMP dehydrogenasy. Vyčerpá tak buněčný pool guanosinu potřebného k tvorbě čepiček. Buněčné MTasy bojují o guanosine v převaze nad virovými MTasami a nepřímo působí jako antivirotikum. Výsledky krystalových struktur flavivirových MTas v komplexu s RMP poukázaly na jeho schopnost vázat se do vazebného místa GTP a inhibovat tím 2'-O methylaci. I přesto není stále objasněno, zda *in vitro* má RMP jako cíl flavivirovou MTasu (Benarroch et al., 2004).

V nedávné studii se podařilo pomocí *in-silico* screeningu, molekulárního dockingu a následné syntézy připravit analog acykloviru 1-TP, který je schopen inhibice DENV a ZIKV MTas prostřednictvím vazby k vazebnému místu GTP s potenciálem stát se širokospektrálním léčivem proti flavivirům (Thames et al., 2020).

### 1.7.3 Alternativní přístupy

Další zajímavý způsob inhibice flavivirových MTas přednesla skupina (Hercik et al., 2017) při studiích krystalové struktury ZIKV MTasy. Tým diskutoval o možnosti inhibice prostřednictvím simultánní okupace obou vazebných míst analogy látek SAM (SIN) a

GTP propojeny kovalentně vázaným linkrem. Hypotetický inhibitor by měl mít vysokou afinitu a selektivitu vůči flavivirovým MTasam (Hercik et al., 2017).

Selektivita je jedním z limitujících faktorů v návrhu nových inhibitorů cíleny na vazebná místa substrátů SAM a GTP. Pokrok v strukturální charakterizaci flavivirových MTas nastínil možnosti vývoje inhibitorů alosterických vazebných míst účinkujících v inter-doménových interakcích, dimerizaci a oligomerizaci NS5 a v interakcích s ostatními NS v arsenálu flavivirů. Cílení těchto míst může vést k novým látkám, které by vyřešily problémy cytotoxicity a selektivity současně používaných inhibitorů (Fernandes et al., 2021).

## 2 Cíl práce

Onemocnění způsobená flaviviry jsou globální hrozbou pro lidské zdraví. V současné době existují pouze vakcíny proti YFV, JEV a TBEV. Pro WNV, DENV a SLEV zatím neexistují žádné přímé léčebné prostředky. SAM-dependentní methyltransferasa flavivirů, která je esenciální pro jejich replikaci, je kvůli jejím konzervativním strukturálním prvkům významný cíl terapeutického zásahu. Její strukturální charakterizace je proto nezbytná pro vývoj širokospektrálních inhibitorů a léčiv.

Cílem této práce bylo vytvořit strukturální model flavivirové methyltransferasy Viru St. Louiské encefalitidy v komplexu s S-adenosyl-methioninem a sinefunginem.

## 3 Materiály a metody

### 3.1 Laboratorní technika

Inkubační třepačka	Incubating Mini Shaker, VWR (ČR)
Orbitální třepačka	Innova 44, New Brunswick Scientific (USA)
Orbitální třepačka	SHR/SHO-20, Witeg WiseShake(DE)
Válcová míchačka	TubeRoller R3005, Benchmark Scientific (USA)
Inkubátor	IPP 400, Memmert (DE)
Vodní lázeň	JB Aqua 2 Plus, Grant Instruments (GB)
Spektrofotometr	Biophotometer Plus, Eppendorf (DE)
Spektrofotometr	Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific (USA)
Předvážky	EMB 2000-2, KERN & SOHN (DE)
Sonikátor	Q700, QSonica (USA)
Sonda sonikátoru	CL-334, QSonica (USA)
Magnetická míchačka	KMO-2 Basic, IKA (USA)
Dounceho homogenzátor	P-Lab (ČR)
Koncentrátory	Vivaspin Turbo 4 (MWCO 10 000), (MWCO 3 000), Sartorius AG (DE)
DSF Mikroobjemová destička	Thermo Scientific (USA)
Sada pro vertikální SDS elektroforesu	Mini-Protean Tetra Systém, Bio-rad (USA)
Zdroj pro SDS elektroforesu	PowerPac HV Basic, Bio-rad (USA)
Centrifugy	Avanti J-26S XPI, fixed-angle rotor JLA-9.1000, Beckman Coulter (USA); Allegra X-15R, výkyvný rotor SX7450A, Beckman Coulter (USA); Avanti J-30I, fixed-angle rotor JA-30,50 Ti, Beckman Coulter (USA); Centrifuge 5418 R, fixed-angle rotor FA-45-18-11, Eppendorf (DE)

Mikroskop	Olympus SZX10, objektiv DF PL 2x, Olympus (JAP)
UV Fluorescenční mikroskop	UVEX-M, JANSi (USA)
Termocyklér	LightCycler 480II Block kit 384, Roche (DE)
FPLC	FPLC Chromatografy systém ÄKTA purifier 10, Cytiva (USA)
FPLC kolona	HiLoad Superdex 75pg, GE Healthcare (USA)
Sběrač frakcí pro FPLC	Fraction Collector F9-C, Cytiva (USA)
Krystalizační robot	Mosquito Crystal, TPP Labtech (GB)
Krystalizační destičky	Intelli-Plate 96-2 Shallow Well, ARI (USA)
Rentgenová difrakční stanice	<b>Optika:</b> VHF Arc)Sec Confocal Optical System with electronically adjustable divergence, VariMax™
MicroMax™-007 HF Microfocus, RIGAKU Corp.	<b>Goniometr:</b> AFC11 Partial- $\gamma$ 4-axis Goniometer, RIGAKU Corp.
	<b>Chlazení:</b> Cryo cooling: Oxford Cryosystems cooling system Cryostream 800, Oxford Cryosystems Ltd.
	<b>Detektor:</b> PILATUS 300K detector, Dectris Ltd.

### 3.1.1 Software

Zpracování difrakčních dat	XDS, Kabsch, W. <i>XDS. Acta Cryst. D66</i> , 125-132 (2010).
Molekulární nahrazení a refinement	Phenix, D. Liebschner, P.V. Afonine, M.L.
Modelování PDB struktury	Coot, (Emsley et al., 2010).
Zobrazení PDB struktury	PyMOL, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC

## 3.2 Chemikálie

Glycerol	Lach-Ner (ČR)
Sodná sůl ampicilinu (AMP)	Carl Roth (DE)
Izopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich (USA)
$\beta$ -merkapt ethanol ( $\beta$ -ME)	Carl Roth (DE)
Tris-Cl	Carl Roth (DE)
HisPur™ Ni-NTA Resin	Thermo Scientific (USA)
Dialyzační střívko MembraCel MD34 MWCO 14 000	Carl Roth (DE)
(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansuflonová kyselina (HEPES)	Fisher Scientific (USA)
Tris(2-carboxyethyl)fosfin hydrochlorid (T-CEP)	Sigma-Aldrich (USA)
Coomassie Brilliant Blue G 250	Sigma-Aldrich (USA)
Akrylamid / Bisakrylamid	Carl Roth (DE)
TEMED	Carl Roth (DE)
Dodecylsírán sodný (SDS)	Carl Roth (DE)
S-adenosyl-methionin (SAM)	Sigma-Aldrich (USA)
5'-deoxy-5'-(1,4-diamino-4-carboxybutyl)adenosine (sinefungin, SIN)	Sigma-Aldrich (USA)
Standard SDS elektroforézy PageRuler Plus (10-250 kDa)	Thermo Scientific (USA)
SYPRO Orange	Sigma-Aldrich (USA)

### 3.2.1 Roztoky, pufry a média

1 000× koncentrovaný roztok AMP	Vodný roztok AMP (100 mg/ml), 50% (v/v) EtOH
Lysační, dialyzační a ekvilibrační pufr	50mM Tris (pH 8,0), 500mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 20mM Imidazol (pH 8,0), 3mM $\beta$ -ME
Proplachovací pufr	20mM Tris (pH 8,0), 1mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 20mM Imidazol (pH 8,0), 3mM $\beta$ -ME
Eluční pufr	20mM Tris pH 8,0, 500mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 300mM Imidazol pH 8,0, 3mM $\beta$ -ME

FPLC pufr	25mM HEPES (pH 7,5), 500mM NaCl, 1mM T-CEP, 5% (v/v) Glycerol
Tris-glycinový pufr pro SDS-ELFO	25mM Tris NaCl, 0,25M Glycin, 0,1% (w/w) SDS pH 8,8
Vzorkový pufr pro SDS-ELFO	4x Roti Load®1, Carl Roth (DE)
LB medium podle Lennox	P-Lab (ČR)
ZY medium	1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 2,8mM Glukosa, 6mM laktosa, 0,5% (v/v) glycerol, 1mM MgCl <sub>2</sub> , 25mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 50mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Barvicí roztok pro SDS-ELFO	3mM Coomassie Brilliant Blue, 1,5M CH <sub>3</sub> COOH, 50% (v/v) Methanol
Sada krystalizačních podmínek	JCSG I-IV, Qiagen (DE)

### 3.2.2 Složení gelů pro SDS-ELFO

Zaostřovací gel	125mM Tris-Cl (pH 6,8), 4% (v/v) Akrylamid/Bisakrylamid (37,5:1), 0,1% (w/v) SDS, 0,005% (v/v) TEMED, 0,05% (w/v) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>
Separáční gel	375mM Tris-Cl (pH 8,8), 15% (w/v) Akrylamid / Bisakrylamid (37,5:1), 0,1% (w/v) SDS, 0,001% (v/v) TEMED, 0,05% (w/v) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>

### 3.2.3 Enzymy

SUMO proteasa	Připraveno v laboratoři
---------------	-------------------------

## 3.3 Metody

### 3.3.1 Izolace a purifikace proteinu

3.3.1.1 Transformace kompetentních bakterií *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL  
Kompetentní buňky *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL v mikrozkušavce, prezervované v -80 °C, byly rozmrazeny za laboratorní teploty a ponechány na ledu. Po asi 20 minutách k nim bylo přidáno 1,5 µl plasmidu MT2 K1 kódující gen pro SLEV NS5 MTasu s poly-histidinovou kotvou (His-tag). Buňky byly transformovány metodou tepelného šoku umístěním do vodní lázně s teplotou 42 °C po na asi 45 s a ihned vráceny zpět na led na dalších 50 s. Po přidání 500 µl LB media byly transformované buňky přesunuty do inkubátoru na 30 minut při 38,5 °C. Roztok byl převeden do 10ml plastové zkumavky, doplněn 5,0 ml LB media spolu s 5 µl 1 000× koncentrovaného AMP. Takto připravený roztok byl ponechán přes noc s povoleným víčkem na inkubační třepačce při 37,0 °C a 220 rpm.

#### 3.3.1.2 Exprese rekombinantního proteinu v transformovaných bakteriích

Po aerobní inkubaci byl roztok rozpipetován do čtyř dvoulitrových Erlenmayerových baněk naplněny 1 litrem ZY media. Do každé baňky bylo přidáno po 1,0 ml 1 000× koncentrovaného AMP. Následně byly umístěny do orbitální třepačky s teplotou 37,0 °C a 220 rpm, kde byla průběžně měřena OD600. Při hodnotě OD600 rovné přibližně 0,55 byly suspenze bakterií zaočkovány přídatkem 250 µl IPTG do každé baňky a vráceny do orbitální třepačky při 18 °C a 220 rpm a ponechány třepat přes noc.

#### 3.3.1.3 Izolace proteinu

Buněčné suspenze byly převedeny do kyvet a centrifugovány (Avanti J-26S XPI, fixed-angle rotor JLA-9.1000) při 10 °C a 6 000×g po dobu 6 minut. Následně byl odlit supernatant a pelety resuspendovány v asi 40 ml lysačního pufru (každá). Od této chvíle bylo manipulováno se vzorky v chladu nebo na ledu. K lýze bakteriálních buněk byl použit Dounceho homogenizátor a sonikátor (parametry: up-time 8 minut, amplituda 70 Hz, puls 2 s ON a 3 s OFF). Lysát byl převeden do kyvet a centrifugován (Avanti J-30I, fixed-angle rotor JA-30,50 Ti) při 4 °C a 30 000×g po dobu 30 minut. Po centrifugaci byl přelit supernatant do 50ml odměrných zkumavek a odstraněny pelety.

#### 3.3.1.4 Chelatační afinitní chromatografie

Asi 8 ml chromatografického nosiče Ni-NTA bylo propláchnuto v koloně ekvilibračním pufrům a rovnoměrně rozděleno do zkumavek se vzorky, které pak byly ponechány inkubovat na válcové míchačce při 4 °C po dobu 30 minut. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány (Allegra X-15R, výkyvný rotor SX7450A) při 4 °C a 1 620 rpm po dobu 3 minut. Po centrifugaci byl odlit od vzorků supernatant, sedimenty resuspendovány v 40 ml proplachovacího pufru (každý) a centrifugovány za stejných podmínek. Následně byly sedimenty resuspendovány v ekvilibračním pufru a stáčeny za stejných podmínek celkem třikrát za průběžného odlívání supernatantu a převádění nosiče do jedné 50 ml odměrné zkumavky. Po finálním odlití supernatantu byl sediment suspendován v 10 ml ekvilibračního pufru a převeden do kolony s fritou. Po odkapání byla kolona propláchnuta elučním pufrům a jímán spodek do 50 ml odměrné zkumavky.

#### 3.3.1.5 Dialýsa a štěpení his-tagu SUMO proteasou

K 25 ml eluátu byl přidán jeden alikvót (asi 400  $\mu$ l) roztoku SUMO proteasy. Vzorek byl převeden do dialýsačního střívka (MWCO 14 000) a dialýsován na magnetické míchačce oproti 1 litru dialýsačního pufru při 4 °C přes noc. Po dialýse byl vzorek převeden do 50 ml odměrné zkumavky.

#### 3.3.1.6 Reverzní chelatační afinitní chromatografie

Chromatografický nosič Ni-NTA byl suspendován v 10 ml ekvilibračního pufru a přidán ke vzorku, který byl následně inkubován na válcové míchačce při 4 °C po dobu 30 minut. Obsah zkumavky byl převeden do kolony s fritou a jímán spodek do 50 ml odměrné zkumavky.

#### 3.3.1.7 Gelová permeační chromatografie (FPLC)

Vzorek byl převeden do koncentrátoru (MWCO 10 000) a zakoncentrován na objem 5 ml opakovanou centrifugací (Allegra X-15R, výkyvný rotor SX7450A) při 4 °C a 3 500 rpm po desetiminutových intervalech. Koncentrát byl před nástřikem pro jistotu centrifugován při 4 °C a 5000 $\times$ g na 10 minut pro případnou sedimentaci nečistot. Čistá kolona (HiLoad Superdex 75pg) a systém byl propláchnut a ekvilibrován HEPES pufrům. Následně byl nadávkován vzorek do přístroje. Průběh separace a sběr frakcí byl monitorován spektrofotometricky při 254 a 280 nm. Frakce proteinu SLEV MTasy v HEPES pufru byly převedeny do odměrné zkumavky a uchovány v chladu.

### 3.3.1.8 Diskontinuální elektroforesa v prostředí SDS

Pro diskontinuální SDS elektroforesu byl použit 10% separační gel s 4% zaostřovacím gelem. Do jamek bylo nanášeno celkem 5 frakcí v roztoku se vzorkovým pufrům pro SDS elektroforesu spolu s proteinovým standardem. Aparatura byla naplněna Tris-glycinovým pufrům. Průběh elektroforesy byl přibližně 40 minut při napětí 220 V.

## 3.3.2 Diferenční skenovací fluorimetrie

### 3.3.2.1 Příprava proteinového komplexu s ligandy

Část vzorku po gelové permeační chromatografii byla převedena do koncentrátoru (MWCO 3 000), opakovaně centrifugována (Allegra X-15R, výkyvný rotor SX7450A) při 4 °C, 3 500 rpm po desetiminutových intervalech a průběžně měřena na spektrofotometru (Nanodrop ND-1000) s finální koncentrací 1,2 mg/ml (38,7 nM).

Poté byly připraveny triplikáty roztoků proteinu s ligandy SAM a SIN (10 mM zás. roztoky) a fluorescenčním barvivem SYPRO orange v HEPES pufru do mikroobjemové destičky.

	V(NS5 MTasa) [μl]	V(SIN) (10mM) [μl]	V(SAM) (10mM) [μl]	5 000× konc. SYPRO orange [μl]	HEPES pufr [μl]
Slepý vzorek	2,2	-	-	1,0	11,8
Roztok č. 1	2,2	-	0,8	1,0	11,0
Roztok č. 2	2,2	0,8	-	1,0	11,0

**Tab. 3.3.2.1 Pipetované objemy zásobních roztoků proteinu (34,3 nM), ligandů SAM/SIN (10 mM) a barviva SYPRO orange (5 000× konc.) pro přípravu roztoků pro DSF.**

Destička byla překryta hliníkovou folií a centrifugována (Allegra X-15R, výkyvný rotor SX7450A) při 4 °C a 1 000 rpm po dobu 2 minut.

### 3.3.2.2 DSF

Destička byla vložena do termocykléru (LightCycler 480II Block kit 384). Měření probíhalo v teplotním rozmezí 25-75 °C.

Metodou DSF lze porovnat stabilitu proteinu s různými ligandy. Zvyšováním teploty dochází k postupné denaturaci a rozvolnění struktury proteinu do stavu roztavené globule (z angl. molten globule), kdy jsou zpřístupněny hydrofobní části jinak sbaleného

proteinu, se kterými interaguje barvivo SYPRO orange. Dochází tak k prudkému nárůstu intenzity fluorescence.

### 3.3.3 Krystalizace proteinu

#### 3.3.3.1 Příprava proteinového komplexu s ligandy

Vzorek byl převeden do koncentrátoru (MWCO 3 000), opakovaně centrifugován (Allegra X-15R, výkyvný rotor SX7450A) při 4 °C, 3 500 rpm po desetiminutových intervalech a průběžně měřen na spektrofotometru (Nanodrop ND-1000). Finální koncentrát měl objem asi 300  $\mu$ l a koncentraci přibližně 18,6 mg/ml. Poté byly připraveny do mikrozkušavek roztoky proteinu s ligandy z jejich 10mM zásobních roztoků.

	V(SIN) (10mM) [ $\mu$ l]	V(SAM) (10mM) [ $\mu$ l]	V(NS5 MTasa) [ $\mu$ l]
<b>Roztok č. 1</b>	-	15	135
<b>Roztok č. 2</b>	15	-	135

**Tab. 3.3.2.1 Pipetované objemy zásobních roztoků proteinu a ligandů SAM/SIN pro přípravu roztoků jejich komplexů.**

#### 3.3.3.2 Krystalizace proteinu v komplexu s ligandy SAM a SAH

Připravené roztoky komplexů proteinu s ligandy SAM a SAH byly pomocí krystalizačního robota (Mosquito Crystal) rozkapány do krystalizačních destiček (Intelli-Plate 96-2 Shallow Well) s krystalizačními podmínkami (JCSG I-IV) (0,2  $\mu$ l komplexu protein-ligand s 0,2  $\mu$ l krystalizační podmínky) do individuálních jamek a převrstveny fólií pro krystalizaci metodou sedící kapky s difusí par.

Krystalizace probíhala při konstantní teplotě 18 °C po dobu asi 2 měsíců. Krystaly byly hledány optickým mikroskopem a rozlišovány od krystalů anorganických látek fluorescenčním UV mikroskopem.

### 3.3.4 Rentgenová difraktometrie

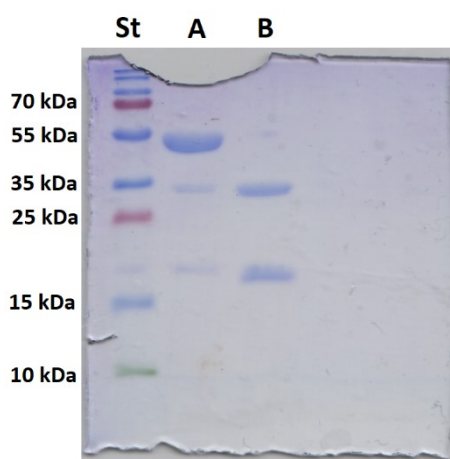
Po krystalizaci byly krystaly ručně vyloveny z jamek, přenášeny do kryoprotektivní podmínky a zmrazeny v kapalném dusíku. Následně byl krystal umístěn do rentgenové difrakční stanice, kde proběhl difrakční experiment za neustálého chlazení krystalu parami kapalného dusíku (provedení: Mgr. et Mgr. Evžen Bouřa, Ph.D., Petra Krafčíková, Ph.D. a Jan Šilhán, Ph.D.). Naměřená data byly integrovány v softwaru XDS. Fázový problém byl vyřešen metodou molekulárního nahrazení prostřednictvím

programu Phenix (Phaser). Refinement a modelování struktur bylo provedeno v programech Phenix a Coot.

## 4 Výsledky

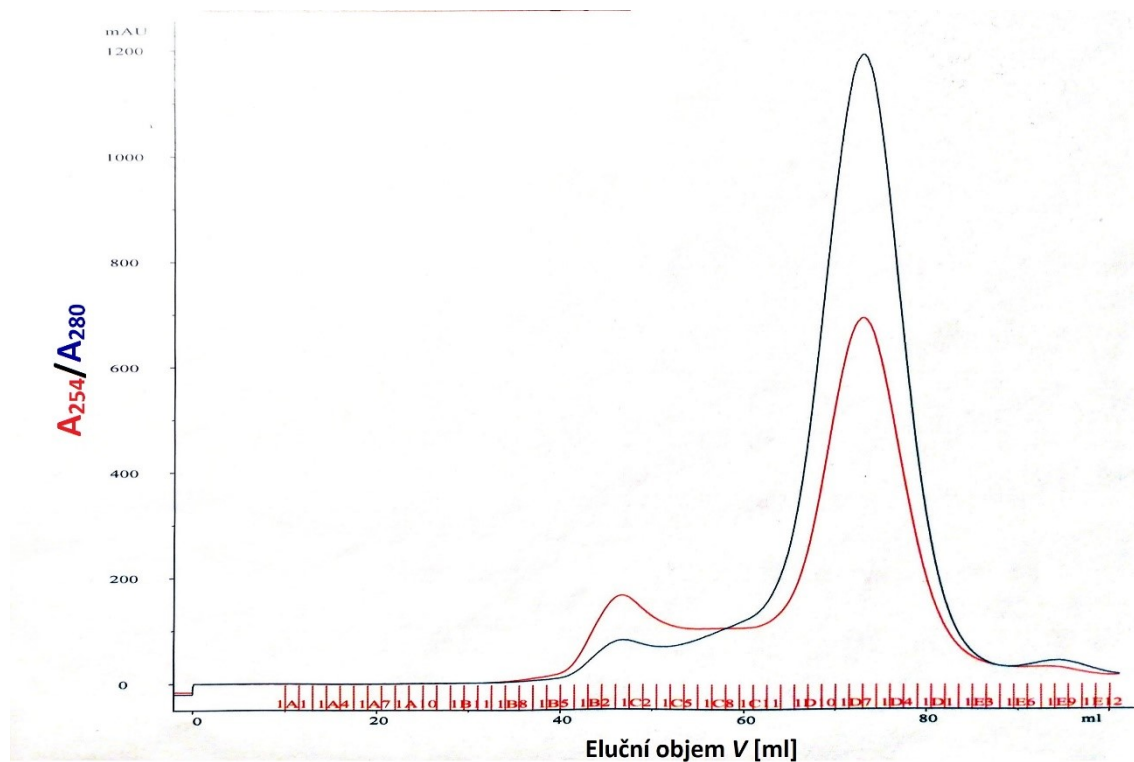
### 4.1 Exprese, izolace a purifikace SLEV NS5 MTasy

Plasmid MT2 K1 nesoucí gen kódující protein SLEV NS5 MTasy s his-tagem byl transformován do kompetentních bakterií *E. coli* BL21-CodonPlus a exprimován v ZY mediu. Separační metodou chelatační afinitní chromatografie byl izolován protein SLEV NS5 MTasy se SUMO his-tagem. His-tag byl odštěpen SUMO proteasou během dialyzy (viz Obr. 4.1a).

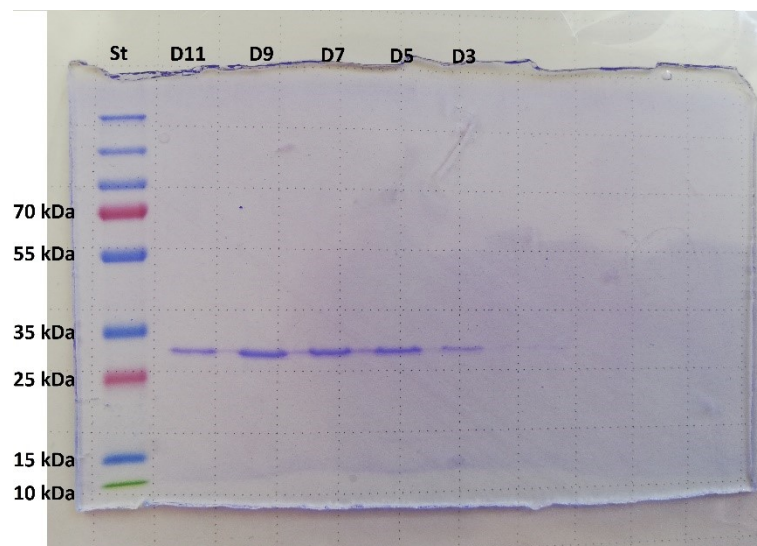


**Obr. 4.1a SDS-PAGE v průběhu izolace a purifikace SLEV NS5 MTasy.** Do prvního sloupce byl pipetován proteinový standard (*St*) pro SDS-ELFO. Do dráhy A byl pipetován vzorek proteinu po chelatační afinitní chromatografii. Proužek u 55 kDa odpovídá konstruktu SUMO SLEV NS5 MTasy s histidinovou kotvou. Sloupec B odpovídá vzorku po štěpení a dialyze, kde proužek těsně pod 35 kDa odpovídá proteinu SLEV NS5 MTasy (~31 kDa) a proužek pod ním SUMO protease. Použit byl 15% polyakrylamidový gel.

Po dialyze a štěpení SUMO proteasou byl vzorek purifikován metodou reverzní chelatační afinitní chromatografie pro odstranění SUMO proteasy a SUMO his-tagu. Následně byl vzorek proteinu zakoncentrován na objem 5 ml a dále purifikován metodou gelové permeační chromatografie (FPLC) (viz Graf 4.1, Obr. 4.1b).



**Graf. 4.1** Závislost absorbance na elučním objemu. Závislost absorbance při vlnových délkách 254 (červená) a 280 nm (modrá) na elučním objemu [ml]. Červeně jsou podél osy x zobrazeny jednotlivé frakce. Eluční pufr: HEPES pufr. Kolona: HiLoad Superdex 75pg.

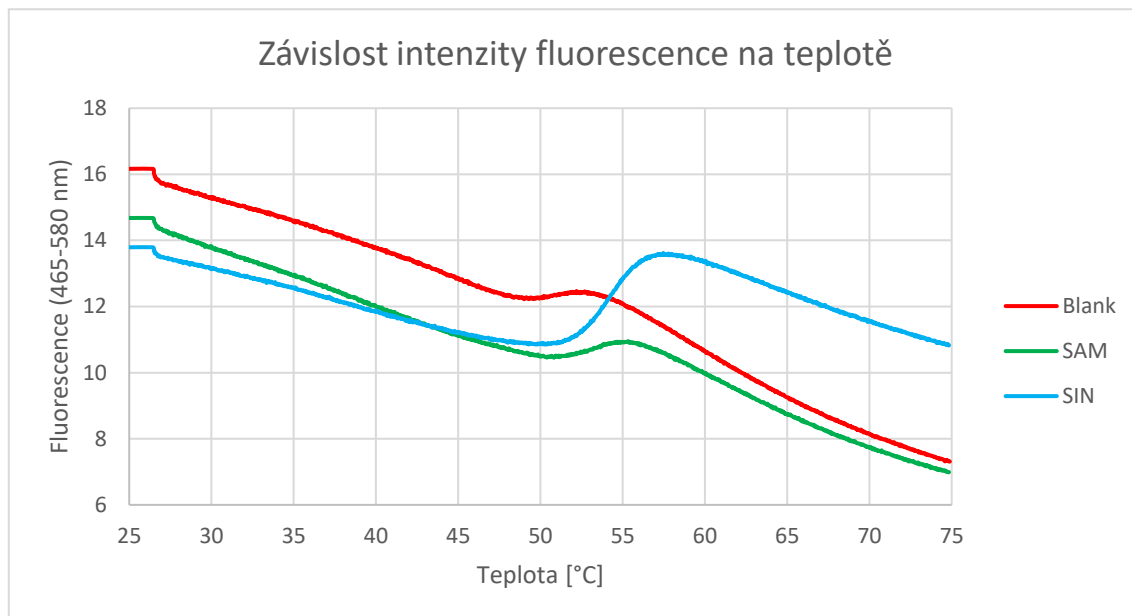


**Obr. 4.1b** SDS-PAGE frakcí proteinu SLEV NS5 MTasa po FPLC. První sloupec odpovídá proteinovému standardu (St) pro SDS-PAGE. Pro SDS-PAGE byly vybrány frakce D11, D9, D7, D5 a D3. Ve všech frakcích je přítomen proužek odpovídající hmotnosti proteinu SLEV NS5 MTasa (~31 kDa). Použit byl 15% polyakrylamidový gel.

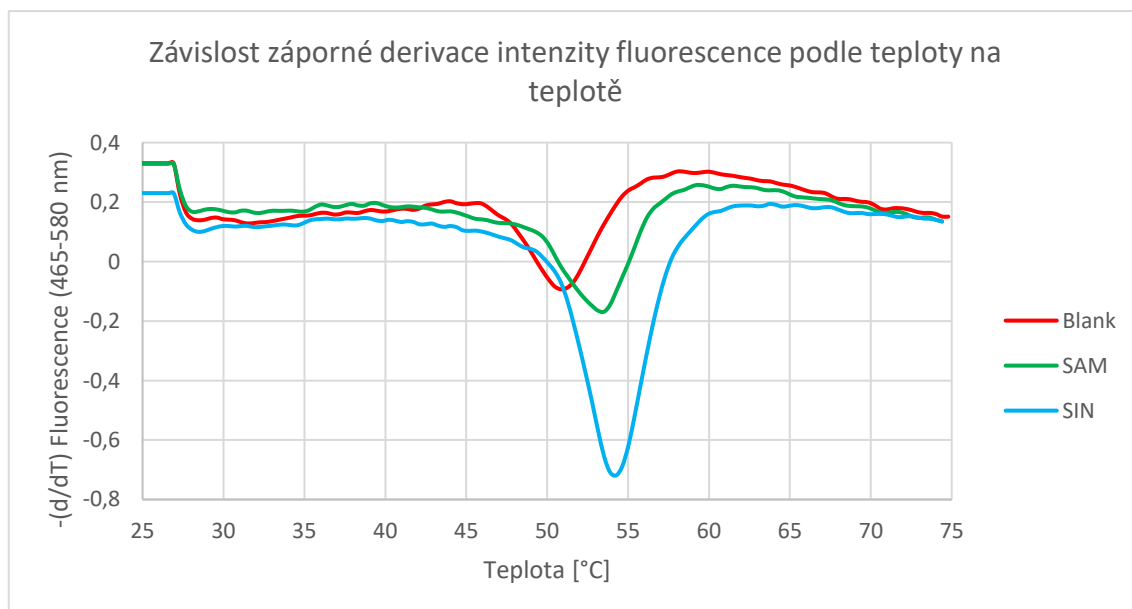
Na základě výsledků z SDS-PAGE po FPLC (viz. Obr. 4.1c) bylo dále pracováno se vzorkem z frakcí v rozmezí D11-D3.

## 4.2 Thermal shift assay (DSF)

Část vzorku proteinu SLEV NS5 MTasy z FPLC byla zakoncentrována a použita pro přípravu slepých vzorků a komplexů s ligandy SAM a SIN (v triplicátech) pro DSF. Stabilita komplexů protein-ligand byly měřeny v teplotním rozsahu 25-75 °C (viz. Graf 4.2a, 4.2b a Tab. 4.2). Naměřené hodnoty intenzit byly pro každý triplicát zprůměrovány.



**Graf 4.2a Závislosti intenzity fluorescence (465-580 nm) na teplotě.** Teplotní stability čistého proteinu SLEV NS5 MTasa (Blank, červeně), komplexu SLEV NS5 MTasa-SAM (zeleně) a komplexu SLEV NS5 MTasa-SIN (modře).



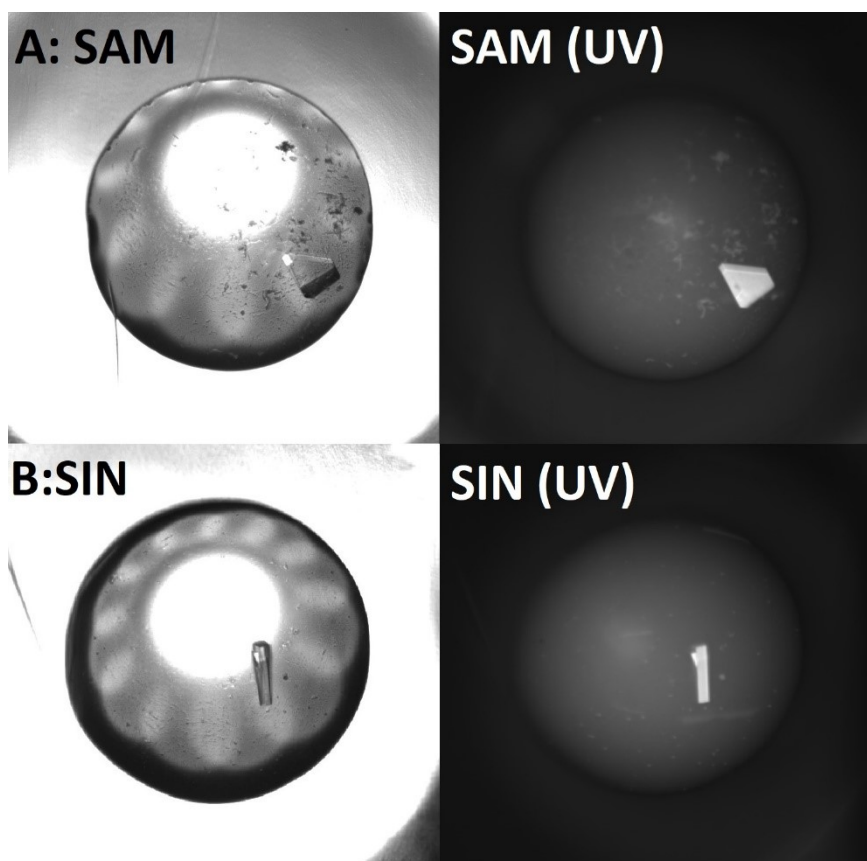
**Graf 4.2b Závislost záporné derivace intenzity fluorescence (465-580 nm) podle teploty na teplotě.** Teplotní stability čistého proteinu SLEV NS5 MTasa (Blank, červeně), komplexu SLEV NS5 MTasa-SAM (zeleně) a komplexu SLEV NS5 MTasa-SIN (modře).

Vzorek	$T_{M1}$ [°C]	$T_{M2}$ [°C]	$T_{M3}$ [°C]	$\bar{T}_M \pm \sigma$ [°C]
Blank	51,41	50,90	50,90	51,07 ± 0,24
SAM	53,57	53,34	53,34	53,42 ± 0,11
SIN	54,67	54,36	53,97	54,33 ± 0,29

Tab. 4.2 Teploty tání ( $T_M$ ) SLEV MTasy a jejích komplexů s ligandy SAM a SIN.

### 4.3 Krystalizace SLEV NS5 MTasy s ligandy SAM a SIN

Vzorek proteinu SLEV NS5 MTasy z FPLC byl zakoncentrován na 18,6 mg/ml a krystalizován s ligandy SAM a SIN metodou sedící kapky s difusí par. V sadě JSCG II byly úspěšně vykrystalizovány oba komplexy SLEV NS5 MTasy s ligandy v podmínce obsahující 1,0M LiCl, 0,1M MES (pH 6,0) a 20% (w/v) PEG 6 000 (viz Obr. 4.3).



Obr. 4.3 Krystaly proteinu SLEV NS5 MTasy v komplexu s ligandy SAM a SIN. Snímky pořízeny při 10× zvětšení. Na levé straně jsou černobílé snímky krystalů. Na pravé straně jsou snímky pořízeny fluorescenčním UV mikroskopem. Krystalizační podmínka JSCG II E3: 1,0M LiCl, 0,1M MES (pH 6,0) a 20% (w/v) PEG 6 000 **A:** Krystal proteinu SLEV NS5 MTasy v komplexu se SAMem. **B:** Krystal proteinu SLEV NS5 MTasy v komplexu se SINem.

## 4.4 Struktura proteinu SLEV NS5 MTasa

Po vylovení byly krystaly suspendovány v kryoprotektivní podmínce, zmraženy v kapalném dusíku a podrobeny difrakčnímu experimentu. Při vlnové délce použitého záření 1 Å difraktoval krystal komplexu SLEV NS5 MTasa-SAM k rozlišení 1,8 Å a krystal komplexu SLEV NS5 MTasa-SIN k rozlišení 2,1 Å (viz Tab. 4.4a, 4.4b).

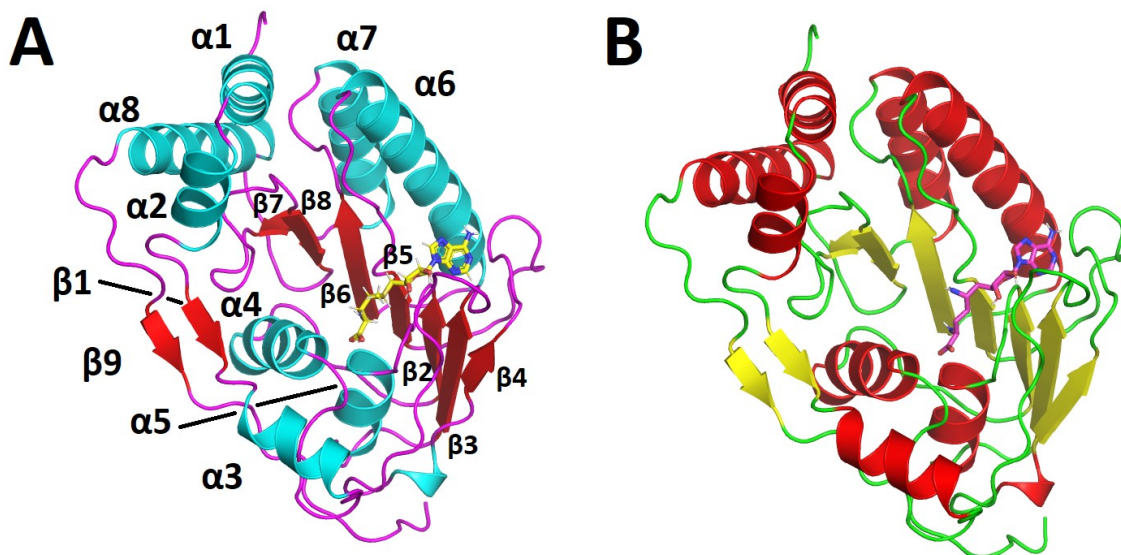
Naměřené data byly integrovány v programu XDS. Fázový problém byl vyřešen metodou molekulárního nahrazení (z angl. molecular replacement) programem Phaser v prostředí programu Phenix použitím vyřešené struktury JEV MTasy [PDB ID: 4K6M (Lu and Gong, 2013)] pro obě struktury. Modelování a refinement byl proveden v programech Coot a Phenix.

Vlnová délka [Å]	1 Å	Počet nevodíkových atomů	4499
Rozpětí rozlišení [Å]	36,21-1,802 [Å]	Makromolekuly	4124
Prostorová grupa	P1	Ligandy	2
Elementární buňka	45.53 57.38 65.31 116.092 99.687 93.18	Molekuly rozpouštědla	319
Celkový počet reflexí	48595	Počet reziduí	526
Jedinečné reflexe	3982	RMS (vazby)	0,015
Kompletnost	90,78	RMS (úhly)	1,21
Wilsonův B-factor	24,68	Ramachandran favored (%)	98,47
R-work (%)	20,34 (33,98)	Ramachandran outliers (%)	0,00
R-free (%)	24,27 (37,60)	Rotamer outliers (%)	0,23
		Kolizní skóre	5,03
		Průměrný B-faktor	32,97

**Tab. 4.4a** Statistické zpracování naměřených dat a modelu krystalové struktury SLEV NS5 MTasy v komplexu se SAMem.

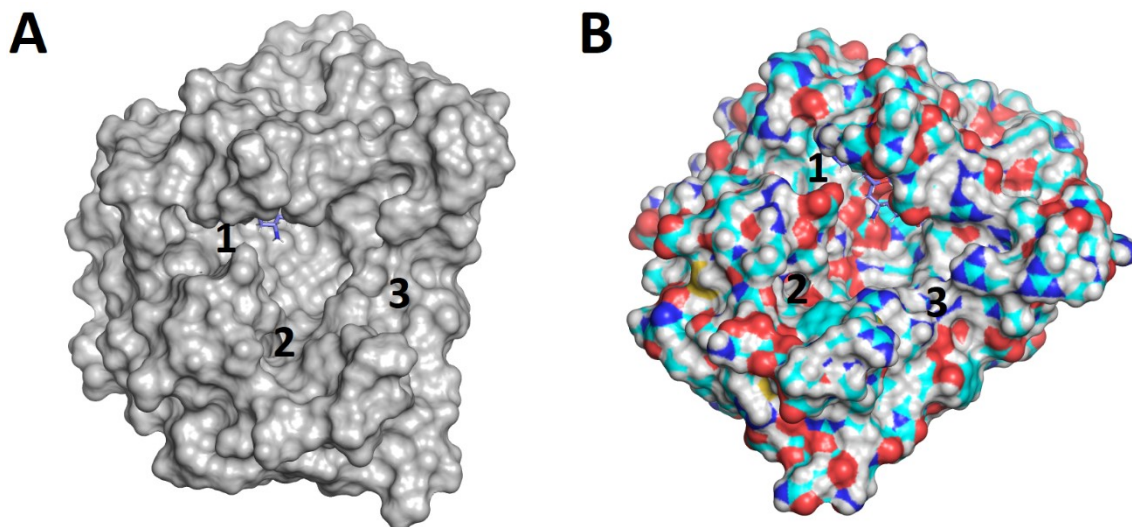
Vlnová délka [Å]	1 Å	Počet nevodíkových atomů	4562
Rozpětí rozlišení [Å]	34,42-2,10 [Å]	Makromolekuly	4104
Prostorová grupa	P1	Ligandy	2
Elementární buňka	47.9 56.87 65.42 115.85 100.344 96.352	Molekuly rozpouštědla	402
Celkový počet reflexí	33872	Počet reziduí	526
Jedinečné reflexe	3013	RMS (vazby)	0,017
Kompletnost	97,12	RMS (úhly)	1,63
Wilsonův B-factor	12,37	Ramachandran favored (%)	98,08
R-work (%)	0,2236 (0,2926)	Ramachandran outliers (%)	0,00
R-free (%)	0,2849 (0,3313)	Rotamer outliers (%)	0,69
		Kolizní skóre	4,93
		Průměrný B-faktor	17,87

Tab. 4.4b Statistické zpracování naměřených dat a modelu krystalové struktury SLEV NS5 MTasy v komplexu se SINem.

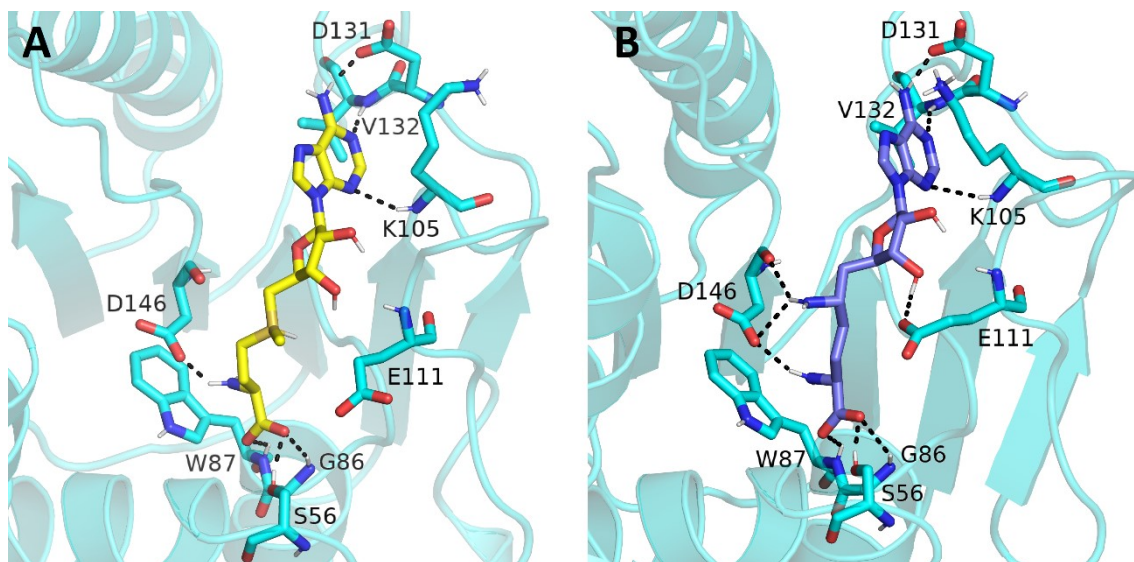


Obr. 4.4a Krystalová struktura SLEV NS5 MTasy s ligandy. *A:* Struktura komplexu SLEV NS5 MTasa-SAM. Zvýrazněny a popsány  $\alpha$  helixy (modrá),  $\beta$  listy (červená) a SAM (žlutá). *B:* Struktura komplexu SLEV NS5 MTasa-SIN. Zvýrazněny a popsány  $\alpha$  helixy (červená),  $\beta$  listy (žlutá) a SIN (růžová).

Krystalovou strukturu SLEV NS5 MTasy tvoří osm  $\alpha$  helixů a devět  $\beta$  listů.  $\beta$  listy  $\beta$ 4- $\beta$ 7 tvoří centrální motiv. Vazebné místo pro SAM (SIN) tvoří  $\beta$  listy  $\beta$ 2- $\beta$ 5 a  $\alpha$  helixy  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4 a  $\alpha$ 5.  $\beta$ 6- $\beta$ 8 spolu s  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 6,  $\alpha$ 7 a  $\alpha$ 8 tvoří C-koncovou a N-koncovou subdoménu (viz Obr. 4.4a).

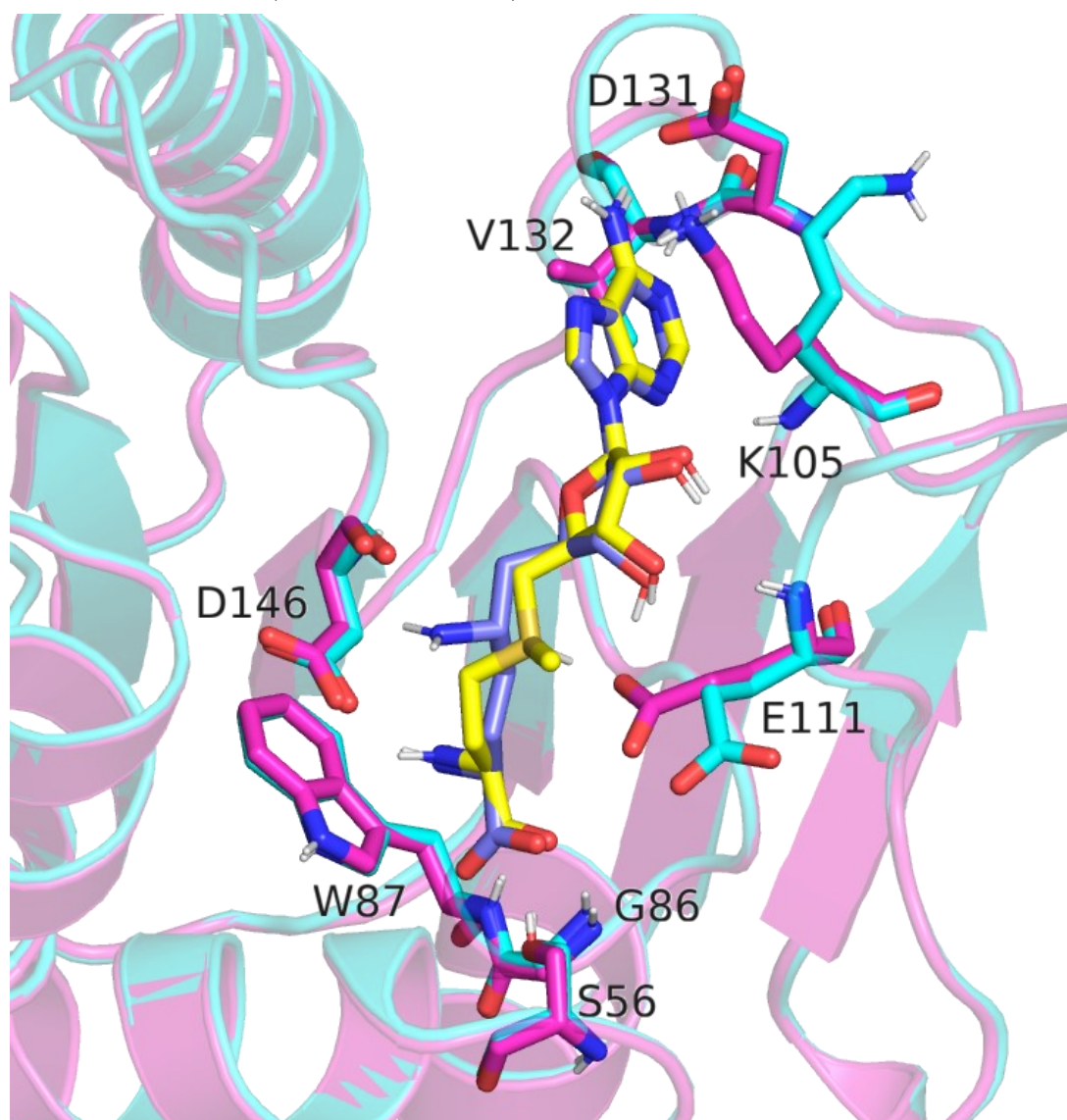


**Obr. 4.4b Komplex SLEV MTasy-SIN se zobrazením povrchu.** Na obou obrázcích jsou vyznačeny vazebná místa SINu (SAMu) (1), GTP (2) a RNA (3). Na pravé straně je dodatečně zobrazena mapa elektrostatického potenciálu, kde červená značí oblasti se záporným nábojem, modrá s nábojem kladným a bílá oblasti neutrální.



**Obr. 4.4c Vazebná místa komplexů SLEV NS5 MTasy a jejich interakce s ligandy.** SLEV NS5 MTasy (světle modrá), SAM (žlutá), SIN (fialová), kyslíky (červená), dusíky (modrá), síra (tmavě žlutá), polární interakce (černá čerchovaná čára) s rezidui proteinu (lékořice, světle modrá). **A:** Vazebné místo komplexu MTasy a SAMu. **B:** Vazebné místo komplexu MTasy a SINu.

SAM i SIN jsou ve vazebném místě pro SAM vázány prostřednictvím vodíkových vazeb k reziduíům D146, S56, D131 (postranní řetězce) a W87, G86, K105, V132 („back-bone“ proteinu), přičemž SIN tvoří oproti SAMu další vazebné interakce s E111 (postranní řetězec) a D146 („back-bone“ proteinu), které jsou důsledkem odlišné konformace hlavního řetězce a prostorovou orientací 5-amino skupiny SINu. V krystalové struktuře proteinu v komplexu se SAMem mají rezidua E111 a K105 odlišné konformace (viz Obr. 4.4c, 4.4d)



**Obr. 4.4d** Superpozice krystalových struktur SLEV NS5 MTasy v komplexu se SIN a SAM. Komplex SLEV NS5 MTasy-SIN (růžová, fialová), komplex SLEV NS5 MTasy-SAM (světle modrá, žlutá), kyslíky (červená), dusíky (modrá), síra (tmavě žlutá).

## 5 Diskuse

Flaviviry jsou skupina virových patogenů způsobující závažné onemocnění převážně neurologické povahy. Zatím neexistují přímé léčebné prostředky proti onemocněním způsobené většinou jejich zastupitelů.

Ve snaze napodobit hostitelskou mRNA, která je zakončena strukturou čepičky typu I, si osvojili svůj způsob syntézy čepičkové struktury, která napomáhá virům při translaci, replikaci a úniku před hostitelským imunitním systémem. Finální krok v syntéze čepičky je methylace na N-7 dusíku guanosinu a 2'-OH hydroxylové skupině adenosinu, který katalyzuje N-terminální doména NS5, methyltransferasa.

Cílem této práce bylo vytvoření strukturního modelu flavivirové methyltransferasy a objasnit strukturu a interakce vazebné domény s ligandy SAM a SIN a jejich rozdíly, které mohou přispět k vývoji nových inhibitorů.

Prvně byl protein exprimován v buňkách bakterií *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) RIL transformované plasmidem MT2 K1 a purifikován metodou chelatační afinitní chromatografie (viz Obr. 4.1a, str. 38), kde intenzivní pruh ve sloupci A (~55 kDa) odpovídá izolovanému proteinu s his-tagem. Následně byla během dialyzy štěpena poly-histidinová kotva enzymem SUMO proteasa. Pruh ve sloupci B (viz. Obr. 4.1a, str. 38) s hmotností těsně pod 35 kDa odpovídá proteinu SLEV NS5 MTasa (~31 kDa) a pruh pod ním enzymu SUMO proteasa. Přítomnost identických pruhů v dráze A je pravděpodobnou příčinou vylití vzorku B do dráhy A při pipetování.

Finálním krokem purifikace byla gelová permeační chromatografie. Protein byl úspěšně purifikován ve velkém množství. Eluován byl v rozmezí (viz Graf. 4.1, str. 39) elučních objemů ~ 65-85 ml v HEPES pufru. Jeho přítomnost byla potvrzena elektroforesou v prostředí SDS (viz Obr. 4.1b, str. 39), kde pruhy těsně pod 35 kDa ve všech frakcích odpovídají čistému proteinu SLEV NS5 Mtasa (~31 kDa).

Dalším krokem bylo měření termo-stability SLEV NS5 MTasy v komplexu s ligandy SAM a SIN metodou DSF. U čistého protein (viz. Graf 4.2a, 4,2b a Tab. 4.2, str. 40, 41) docházelo k denaturaci při teplotě  $51,07\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,24$ , u komplexu se SAMem při  $53,42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,11$  a u komplexu se SINem při  $54,33 \pm 0,29$ . Z výsledků je patrné, že přítomnost ligandu ve vazebném místě přispívá k celkové stabilitě proteinu. Dále vyplývá, že SIN se oproti SAMu váže do vazebného místa s větší afinitou prostřednictvím vícero interakcí (viz Obr. 4.4c, str. 44). K denaturaci proteinu tak dochází při vyšší teplotě.

Krystalizace proteinu metodou sedící kapky s difusí par proběhla úspěšně u obou komplexů v podmínce s 1,0M LiCl, 0,1M MES (pH 6,0) a 20% (w/v) PEG 6 000 (viz Obr. 4.3, str. 41). Oba krystaly byly podrobeny difrakčnímu experimentu s velmi dobrým výsledným rozlišením (viz Tab. 4.4a, 4.4b, str. 42, 43).

Z výsledných struktur je patrné, že se oba ligandy váží k vazebné doméně hlavně skrze vodíkové vazby s okolními rezidui D146, S56, D131 (postranní řetězce) a W87, G86, K105, V132 („back-bone“ proteinu) (viz. Obr. 4.4c, str. 44). SIN navíc tvoří další interakce s E111 (postranní řetězec) a D146 („back-bone“ proteinu), které jsou důsledkem odlišné konformace hlavního řetězce ligandu a prostorovou orientací 5-amino skupiny SINu. Ze superpozice struktur (viz. Obr. 4.4d, str. 45) je vidět, že reziduum E111 v komplexu MTasy se SAMem zaujímá odlišnou konformaci. Další méně podstatný rozdíl je v konformaci rezidua K105. Tyto dodatečné vazebné interakce SINu s vazebnou doménou jsou pravděpodobnou příčinou větší termo-stability proteinu v porovnání se SAMem (viz. Graf 4.2a, 4,2b a Tab. 4.2, str. 40, 41).

## Závěr

Protein SLEV NS5 MTasa byl úspěšně exprimován, izolován a purifikován. Následně byla měřena jeho teplotní stabilita s ligandy SAM a SIN, kde z výsledků bylo patrné, že se SIN, v porovnání se SAMem, váže k proteinu s vyšší afinitou a přispívá tak k celkové stabilitě komplexu.

Protein byl také úspěšně vykryštalizován. Krystaly byly podrobeny rentgenovému difrakčnímu experimentu s velmi dobrým výsledným rozlišením.

Z naměřených dat byly vyřešeny struktury obou komplexů, které nastínily geometrii a interakce vazebné domény s ligandy SAM a SIN. Získané informace mohou přispět k vývoji nových inhibitorů a léčiv specifických pro flavivirové MTasy.

## Seznam použité literatury

- Barrows, N.J., Campos, R.K., Liao, K.-C., Prasanth, K.R., Soto-Acosta, R., Yeh, S.-C., Schott-Lerner, G., Pompon, J., Sessions, O.M., Bradrick, S.S., Garcia-Blanco, M.A., 2018. Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chem. Rev.* 118, 4448–4482. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00719>
- Benarroch, D., Egloff, M.-P., Mulard, L., Guerreiro, C., Romette, J.-L., Canard, B., 2004. A Structural Basis for the Inhibition of the NS5 Dengue Virus mRNA 2'-O-Methyltransferase Domain by Ribavirin 5'-Triphosphate\*. *J. Biol. Chem.* 279, 35638–35643. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400460200>
- Bradrick, S.S., 2017. Causes and Consequences of Flavivirus RNA Methylation. *Front. Microbiol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02374>
- Brecher, M., Chen, H., Li, Z., Banavali, N.K., Jones, S.A., Zhang, J., Kramer, L.D., Li, H., 2015. Identification and Characterization of Novel Broad-Spectrum Inhibitors of the Flavivirus Methyltransferase. *ACS Infect. Dis.* 1, 340–349. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00070>
- Ciota, A.T., Koch, E.M., Willsey, G.G., Davis, L.J., Jerzak, G.V.S., Ehrbar, D.J., Wilke, C.O., Kramer, L.D., 2011. Temporal and spatial alterations in mutant swarm size of St. Louis encephalitis virus in mosquito hosts. *Infect. Genet. Evol.* 11, 460–468. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.12.007>
- Collins, M.H., Metz, S.W., 2017. Progress and Works in Progress: Update on Flavivirus Vaccine Development. *Clin. Ther.* 39, 1519–1536. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2017.07.001>
- Dey, D., Poudyal, S., Rehman, A., Hasan, S.S., 2021. Structural and biochemical insights into flavivirus proteins. *Virus Res.* 296, 198343. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198343>
- Diosa-Toro, M., Prasanth, K.R., Bradrick, S.S., Garcia Blanco, M.A., 2020. Role of RNA-binding proteins during the late stages of Flavivirus replication cycle. *Viol. J.* 17, 60. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01329-7>
- Dong, H., Fink, K., Züst, R., Lim, S.P., Qin, C.-F., Shi, P.-Y., 2014, n.d. Flavivirus RNA methylation. *J. Gen. Virol.* 95, 763–778. <https://doi.org/10.1099/vir.0.062208-0>
- Dong, H., Ray, D., Ren, S., Zhang, B., Puig-Basagoiti, F., Takagi, Y., Ho, C.K., Li, H., Shi, P.-Y., 2007. Distinct RNA Elements Confer Specificity to Flavivirus RNA Cap Methylation Events. *J. Virol.* 81, 4412–4421. <https://doi.org/10.1128/JVI.02455-06>
- Dong, H., Zhang, B., Shi, P.-Y., 2008. Flavivirus methyltransferase: A novel antiviral target. *Antiviral Res.* 80, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.05.003>
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K., 2010. Features and development of *Coot*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 486–501. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
- Fabrega, C., Hausmann, S., Shen, V., Shuman, S., Lima, C.D., 2004. Structure and Mechanism of mRNA Cap (Guanine-N7) Methyltransferase. *Mol. Cell* 13, 77–89. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00522-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00522-7)
- Fernandes, P.O., Chagas, M.A., Rocha, W.R., Moraes, A.H., 2021. Non-structural protein 5 (NS5) as a target for antiviral development against established and emergent flaviviruses. *Curr. Opin. Virol.* 50, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.07.001>
- Gopala Reddy, S.B., Chin, W.-X., Shivananju, N.S., 2018. Dengue virus NS2 and NS4: Minor proteins, mammoth roles. *Biochem. Pharmacol.* 154, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.04.008>

- Heinz, F.X., Allison, S.L., 2003. Flavivirus Structure and Membrane Fusion, in: *Advances in Virus Research*. Academic Press, pp. 63–97. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)59003-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)59003-0)
- Hercik, K., Brynda, J., Nencka, R., Boura, E., 2017. Structural basis of Zika virus methyltransferase inhibition by sinefungin. *Arch. Virol.* 162, 2091–2096. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3345-x>
- Issur, M., Geiss, B.J., Bougie, I., Picard-Jean, F., Despins, S., Mayette, J., Hobdey, S.E., Bisaillon, M., 2009. The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA* 15, 2340–2350. <https://doi.org/10.1261/rna.1609709>
- Jarmer, J., Zlatkovic, J., Tsouchnikas, G., Vratskikh, O., Strauß, J., Aberle, J.H., Chmelik, V., Kundi, M., Stiasny, K., Heinz, F.X., 2014. Variation of the Specificity of the Human Antibody Responses after Tick-Borne Encephalitis Virus Infection and Vaccination. *J. Virol.* 88, 13845–13857. <https://doi.org/10.1128/JVI.02086-14>
- Kubinski, M., Beicht, J., Gerlach, T., Volz, A., Sutter, G., Rimmelzwaan, G.F., 2020. Tick-Borne Encephalitis Virus: A Quest for Better Vaccines against a Virus on the Rise. *Vaccines* 8, 451. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030451>
- Li, K., Phoo, W.W., Luo, D., 2014. Functional interplay among the flavivirus NS3 protease, helicase, and cofactors. *Virol. Sin.* 29, 74–85. <https://doi.org/10.1007/s12250-014-3438-6>
- Lim, S.P., Noble, C.G., Shi, P.-Y., 2015. The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. *Antiviral Res.* 119, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.010>
- Lindenbach, B.D., Thiel, H.-J., Rice, C.M., 2006. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication* 52.
- Liu, L., Dong, H., Chen, H., Zhang, J., Ling, H., Li, Z., Shi, P.-Y., Li, H., 2010. Flavivirus RNA cap methyltransferase: structure, function, and inhibition. *Front. Biol.* 5, 286–303. <https://doi.org/10.1007/s11515-010-0660-y>
- Lu, G., Gong, P., 2013. Crystal Structure of the Full-Length Japanese Encephalitis Virus NS5 Reveals a Conserved Methyltransferase-Polymerase Interface. *PLOS Pathog.* 9, e1003549. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003549>
- Luo, D., Vasudevan, S.G., Lescar, J., 2015. The flavivirus NS2B–NS3 protease–helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral Res.* 118, 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.014>
- Mackenzie, J. S., Barrett, A. D. T., Deubel, V., 2002. The Japanese Encephalitis Serological Group of Flaviviruses: a Brief Introduction to the Group, in: Mackenzie, John S., Barrett, Alan D. T., Deubel, Vincent (Eds.), *Japanese Encephalitis and West Nile Viruses, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–10. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-59403-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-59403-8_1)
- Mavian, C., Dulcey, M., Munoz, O., Salemi, M., Vittor, A.Y., Capua, I., 2018. Islands as Hotspots for Emerging Mosquito-Borne Viruses: A One-Health Perspective. *Viruses* 11, 11. <https://doi.org/10.3390/v11010011>
- Oyer, R.J., David Beckham, J., Tyler, K.L., 2014. West Nile and St. Louis encephalitis viruses. *Handb. Clin. Neurol.* 123, 433–447. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53488-0.00020-1>
- Pettersson, J.H.-O., Fiz-Palacios, O. 2014, n.d. Dating the origin of the genus Flavivirus in the light of Beringian biogeography. *J. Gen. Virol.* 95, 1969–1982. <https://doi.org/10.1099/vir.0.065227-0>

- Pierson, T.C., Diamond, M.S., 2020. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat. Microbiol.* 5, 796–812. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>
- Rastogi, M., Sharma, N., Singh, S.K., 2016. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Viol. J.* 13, 131. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>
- Reisen, W.K., 2003. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. *Adv. Virus Res.* 61, 139–183. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)61004-3](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)61004-3)
- Ridenour, C.L., Cocking, J., Poidmore, S., Erickson, D., Brock, B., Valentine, M., Roe, C.C., Young, S.J., Henke, J.A., Hung, K.Y., Wittie, J., Stefanakos, E., Sumner, C., Ruedas, M., Raman, V., Seaton, N., Bendik, W., Hornstra O’Neill, H.M., Sheridan, K., Centner, H., Lemmer, D., Fofanov, V., Smith, K., Will, J., Townsend, J., Foster, J.T., Keim, P.S., Engelthaler, D.M., Hepp, C.M., 2021. St. Louis Encephalitis Virus in the Southwestern United States: A Phylogeographic Case for a Multi-Variant Introduction Event. *Front. Genet.* 12, 667895. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.667895>
- Simon, L.V., Kong, E.L., Graham, C., 2021. St. Louis Encephalitis, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Sinefungin 95% (HPLC), powder | Sigma-Aldrich [WWW Document], n.d. URL <http://www.sigmaaldrich.com/> (accessed 8.13.21).
- Statistics & Maps | St. Louis Encephalitis | CDC [WWW Document], 2021. URL <https://www.cdc.gov/sle/statistics/index.html> (accessed 8.9.21).
- Thames, J.E., Waters, C.D., Valle, C., Bassetto, M., Aouadi, W., Martin, B., Selisko, B., Falat, A., Coutard, B., Brancale, A., Canard, B., Decroly, E., Seley-Radtke, K.L., 2020. Synthesis and biological evaluation of novel flexible nucleoside analogues that inhibit flavivirus replication in vitro. *Bioorg. Med. Chem.* 28, 115713. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115713>
- Zhao, Y., Soh, T.S., Lim, S.P., Chung, K.Y., Swaminathan, K., Vasudevan, S.G., Shi, P.-Y., Lescar, J., Luo, D., 2015. Molecular basis for specific viral RNA recognition and 2'-O-ribose methylation by the dengue virus nonstructural protein 5 (NS5). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 14834–14839. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514978112>
- Zhou, Y., Ray, D., Zhao, Y., Dong, H., Ren, S., Li, Z., Guo, Y., Bernard, K.A., Shi, P.-Y., Li, H., 2007. Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase. *J. Virol.* 81, 3891–3903. <https://doi.org/10.1128/JVI.02704-06>