

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Hugo Kocek

SARS-CoV-2 methyltransferázy jako cíl terapeutického zásahu
SARS-CoV-2 methyltransferases as druggable targets

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Radim Nencka, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně a uvedl všechny zdroje. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 06. 05. 2021

.....

Hugo Kocek

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli Mgr. Radimu Nenckovi, Ph.D. za to, že mi umožnil stát se součástí jeho laboratoře a za vedení bakalářské práce. Chtěl bych poděkovat také Ing. Tomáši Otavovi za kritické přečtení práce a cenné rady. Též bych rád poděkoval rodině a přátelům za podporu při studiu.

Abstrakt

Nový koronavirus SARS-CoV-2 (z počátku též označovaný „nCoV2019“) se stal od března roku 2020 součástí našich životů a téměř přes noc obrátil naše životy „vzhůru nohama“. Tento vir se přenáší kapénkami a způsobuje respirační onemocnění COVID-19, které může mít v komplikovaných případech velmi závažný až fatální průběh. Doposud nebyla vynalezena žádná efektivní léčebná metoda a vakcíny jsou momentálně velkou nadějí. Ačkoli poskytují vysokou míru ochrany vůči SARS-CoV-2, je důležité podotknout, že nemusí být plně efektivní vůči stále se objevujícím novým mutacím SARS-CoV-2.

V průběhu pandemie byla vyzkoušena řada již schválených léků (např. favipiravir, toremifen či hydroxychlorochin), ale žádný z těchto léků v klinických studiích neprokázal signifikantní účinnost proti SARS-CoV-2. Jediným schváleným antivirotikem pro použití u hospitalizovaných pacientů je v současné době nukleotidový analog remdesivir, jehož účinnost byla prokázána v klinických testech, ale je patrně značně závislá na době podání a celkovém stavu pacienta. Vývoj nových antivirotik je proto nezbytný, neboť se jedná již o třetí koronavirus od počátku 21. století s pandemickým potenciálem, a proto můžeme očekávat příchod dalších variant v budoucnosti.

Tato práce se zaměřuje na *S*-adenosylmethionin-dependentní methyltransferázy nsp14 a nsp16 viru SARS-CoV-2, neboť hrají klíčovou roli v životním cyklu viru a jedná se o potenciální cíl vývoje nových antivirotik.

Klíčová slova

SARS-CoV-2; nsp14; nsp16; methylace; *S*-adenosylmethionin; návrh léčiv

Abstract

Novel coronavirus (earlier referred to as „nCoV2019“) became part of our lives in March 2020 and overnight turned everything upside-down. This virus is transmitted via respiratory droplets and causes respiratory diseases COVID-19 which can be severe and even fatal. So far, no effective treatment has been discovered and vaccination is our biggest hope thanks to its high efficacy. It is important to point out, that new mutations may possess problems and escape immunity induced by the vaccination.

During the whole pandemic, many approved drugs were tested against SARS-CoV-2 (for example favipiravir, toremifene, and hydroxychloroquine) but none of those drugs showed to be effective against SARS-CoV-2 in clinical trials. The only approved antiviral drug is nucleotide analog remdesivir which showed significant efficacy against SARS-CoV-2 in clinical trials. However, timing and overall patient's health condition play a key role. Development of new antiviral drugs is necessary given the fact that this is the third time we face coronavirus with the potential to cause pandemic since the beginning of the 21st century. Therefore, it is likely that another new coronavirus will emerge.

This thesis focuses on *S*-adenosylmethionine-dependent methyltransferases nsp14 and nsp16 from SARS-CoV-2 because they play a key role in the viral life cycle and could be used as a drug target.

Key words

SARS-CoV-2; nsp14; nsp16; methylation; *S*-adenosylmethionine; drug design

Seznam zkratek

| | |
|------------|--|
| ACE2 | angiotenzin-konvertující enzym 2 |
| ATA | kyselina aurintrikarboxylová (z ang. <i>aurintricarboxylic acid</i>) |
| ATP | adenosintrifosfát |
| bat-CoV | netopýří koronavirus |
| bat-SL-CoV | netopýří koronavirus podobný SARS |
| bp | pár bází |
| COMT | katechol-O-methyltransferáza |
| COVID-19 | koronavirová nemoc 2019 (z ang. <i>coronavirus disease 2019</i>) |
| CTP | cytidintrifosfát |
| DENV | virus dengue |
| dGTP | deoxyguanosintrifosfát |
| DMVs | dvoumembránové váčky |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| E | obalový protein (z ang. <i>envelope</i>) |
| ER | endoplazmatické retikulum |
| ERGIC | přechodná organela mezi ER a Golgiho aparátem (z ang. <i>ER–Golgi intermediate compartment</i>) |
| FCoV | kočičí koronavirus |
| FDA | Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z ang. <i>Food and Drug Administration</i>) |
| GMP | guanosinmonofosfát |
| GTP | guanosintrifosfát |
| HBS | vysokoafinitní vazebné místo (z ang. <i>high-affinity binding site</i>) |
| HCE | lidský čepičkující enzym (z ang. <i>human capping enzyme</i>) |

| | |
|----------|--|
| HCoV | lidský koronavirus |
| HIOMT | hydroxyindol-O-methyltransferáza |
| HIV | virus lidské imunitní nedostatečnosti (z ang. <i>human immunodeficiency virus</i>) |
| HMT | histonmethyltransferáza |
| hMTr1 | pro čepičku specifická lidská nukleosid-2'-O-methyltransferáza |
| IBV | virus infekční bronchitidy |
| IFIT | interferonem indukovaný protein s tetratrikopeptidovým opakováním (z ang. <i>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats</i>) |
| INMT | indolethylamin N-methyltransferáza |
| IRES | vnitřní místo pro vstup ribozomu (z ang. <i>internal ribosome entry site</i>) |
| ISG | interferony stimulované geny |
| kb | kilobáze |
| LBS | nízkoafinitní vazebné místo (z ang. <i>low-affinity binding site</i>) |
| M | membránový glykoprotein |
| MAT | methionin adenosyltransferáza |
| Mda5 | protein 5 asociovaný s diferenciací melanomu (z ang. <i>melanoma differentiation-associated protein 5</i>) |
| MERS | blízkovýchodní respirační syndrom |
| MERS-CoV | Koronavirus související s respiračním syndromem na Středním východě (z ang. <i>Middle East respiratory syndrom</i>) |
| MHV | virus myši hepatitidy |
| MTáza | methyltransferáza |
| N | nukleokapsidový protein |
| NiRAN | nidovirus RdRp-asociovaná nukleotidyltransferáza |
| NS5 | nestrukturní protein 5 |

| | |
|------------|--|
| nsp | nestrukturní protein |
| ORF | otevřený čtecí rámec (z ang. <i>open reading frame</i>) |
| PAMP | molekulární vzor spojený s patogeny (z ang. <i>pathogen-associated molecular pattern</i>) |
| PNMT | fenylethanolamin N-methyltransferáza |
| pre-mRNA | primární transkript |
| PRR | receptor rozpoznávající vzory (z ang. <i>pattern recognition receptor</i>) |
| RdRp | RNA-dependentní RNA polymeráza |
| RIG-I | gen 1 indukovaný kyselinou retinovou (z ang. <i>retinoic acid-inducible gene</i>) |
| RLR | receptory podobné RIG-I (z ang. <i>RIG-I-like receptors</i>) |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| RNMT | guanin N7-methyltransferáza (též RG7MT1) |
| S | povrchový glykoprotein (z ang. <i>spike</i>) |
| SAH | S-adenosylhomocystein |
| SAM | S-adenosylmethionin |
| SARS | těžký akutní respirační syndrom |
| SARS-CoV | Koronavirus související s těžkým akutním respiračním syndromem |
| SARS-CoV-2 | Koronavirus 2 související s těžkým akutním respiračním syndromem |
| sgRNA | subgenomová RNA |
| SIN | sinefungin |
| ss | jednořetězcová (z ang. <i>single-stranded</i>) |
| Tat | trans-aktivátor transkripce |
| TGEV | přenosný virus gastroenteritidy (z ang. <i>transmissible gastroenteritis virus</i>) |

| | |
|------|--|
| TLR | receptor podobný Toll (z ang. <i>Toll-like receptor</i>) |
| UTP | uridintrifosfát |
| UTR | nepřekládaná oblast (z ang. <i>untranslated region</i>) |
| WHO | Světová zdravotnická organizace (z ang. <i>World Health Organization</i>) |
| WNV | virus západonilské horečky (z ang. <i>West Nile virus</i>) |
| ZF | zinkový prst (z ang. <i>zinc finger</i>) |
| ZIKV | virus zika |

Součástí textu jsou jednopísmenné a třípísmenné zkratky pro aminokyseliny. V textu se také vyskytují jednopísmenné označení bází nukleových kyselin, písmeno „p“ označující fosfátovou skupinu a „m“ methylovou skupinu.

Obsah

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | Úvod..... | 1 |
| 2. | Eukaryotická mRNA čepička..... | 2 |
| 2.1. | Struktura mRNA čepičky | 2 |
| 2.2. | Syntéza čepičky lidské mRNA | 3 |
| 2.3. | Funkce čepičky | 3 |
| 3. | Molekulární charakteristika SARS-CoV-2 | 4 |
| 3.1. | Struktura virionu a genomu | 4 |
| 3.2. | Životní cyklus SARS-CoV-2..... | 5 |
| 3.3. | Syntéza virové čepičky | 6 |
| 4. | <i>S</i> -adenosylmethionin a methyltransferázy | 7 |
| 4.1. | <i>S</i> -adenosylmethionin | 7 |
| 4.2. | Methyltransferázy | 7 |
| 4.3. | Nestrukturní protein 14..... | 9 |
| 4.3.1. | Methyltransferázová aktivita..... | 9 |
| 4.3.2. | Exonukleázová aktivita | 10 |
| 4.4. | Nestrukturní protein 16..... | 12 |
| 5. | Inhibitory methyltransferáz | 14 |
| 5.1. | <i>In silico</i> inhibitory SARS-CoV-2 | 15 |
| 5.2. | Návrh analogů <i>S</i> -adenosylmethioninu..... | 16 |
| 5.2.1. | Modifikace báze | 17 |
| 5.2.2. | Modifikace ribózy | 17 |
| 5.2.3. | Modifikace aminokyselinového zbytku | 18 |
| 5.3. | Dinukleosidové inhibitory | 19 |
| 5.4. | Inhibitory flavivirových MTáz..... | 20 |
| 5.5. | Inhibice protein-proteinových interakcí v komplexu nsp10-nsp16..... | 23 |
| 6. | Závěr..... | 24 |

| | |
|-----------------|----|
| 7. Zdroje | 25 |
|-----------------|----|

1. Úvod

SARS-CoV-2 je virus patřící do čeledi *Coronaviridae* a rodu *Betacoronavirus*. Určité koronaviry se běžně vyskytují v populaci a společně s rhinoviry způsobují sezonní respirační infekce („rýmu“) s obvykle mírným průběhem – jedná se např. o HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 a HCoV-HKU1.

Od počátku 21. století se však lidstvo potkalo s dalšími třemi koronaviry, které jsou vysoce patogenní a život ohrožující. V roce 2002 se v Číně objevil SARS-CoV způsobující onemocnění nazývané „těžký akutní respirační syndrom“ z anglického *Severe Acute Respiratory Syndrome* neboli SARS. Následně se v roce 2012 v Saudské Arábii vyskytl virus MERS-CoV způsobující tzv. „blízkovýchodní respirační syndrom“ z anglického *Middle East Respiratory Syndrome* známý pod zkratkou MERS. Díky včasné izolaci nakažených a lidí, kteří se setkali s infikovanými, došlo k zabránění masivního rozšíření těchto dvou virů. SARS-CoV-2 byl poprvé identifikován v prosinci 2019 v čínském městě Wu-čan a 11.3.2020 Světová zdravotnická organizace (WHO) označila šíření viru za pandemii.

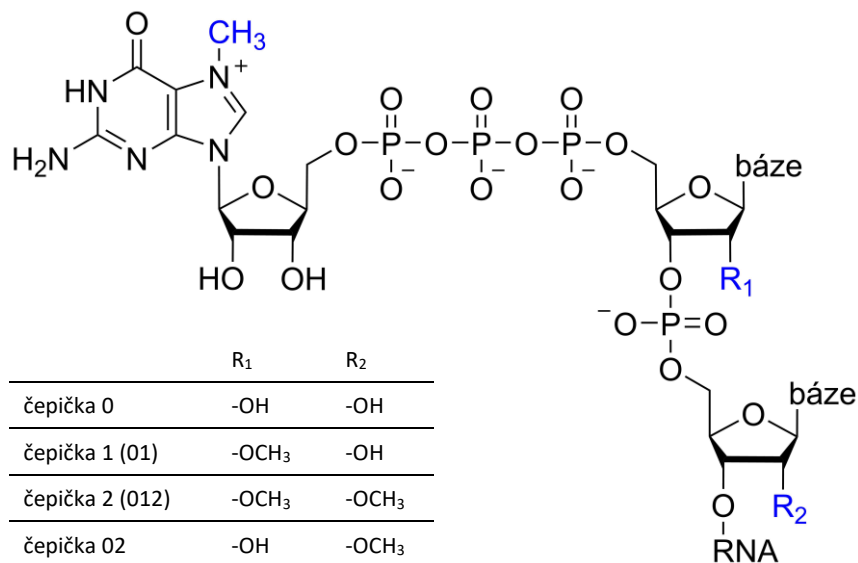
SARS-CoV-2 způsobuje onemocnění COVID-19. Průběh infekce může být mírný a doprovázený např. kašlem, bolestí v krku, únavou či dočasnou ztrátou čichu a chutě. Ve vážných případech je nutná hospitalizace a případně i připojení na plicní ventilátor v důsledku zápalu plic. Nejzávažnější případy mohou mít bohužel i fatální následky a k 2.5.2021 bylo podle WHO nakaženo 151 803 822 lidí a celkem 3 186 538 infikovaných zemřelo.

Cílem této práce je shrnout současné znalosti o SAM-dependentních methyltransferázach (MTázách) viru SARS-CoV-2 (nsp14 a nsp16) a zaměřit se na vývoj antivirotik působícím proti těmto enzymům.

2. Eukaryotická mRNA čepička

2.1. Struktura mRNA čepičky

Na 5' konci mRNA se nachází struktura nazývaná „čepička“. Základem čepičky je N7 metylovaný guanosin připojený 5'-5' trifosfátovým můstkem k molekule RNA. Tuto strukturu označujeme jako „čepička 0“. Následnou modifikací (methylací) ribóz v cukr-fosfátové kostře transkribované mRNA vznikají různé typy čepiček, což znázorňuje obrázek 1.



Obrázek 1: Struktura mRNA čepičky. Vytvořeno v ChemDraw (2017).

Kvasinky a nižší eukaryota mají mRNA pouze s čepičkou 0 (Sripati et al., 1976). U vyšších eukaryotických organismů, včetně člověka, musí mRNA obsahovat na svém 5' konci čepičku 1 ($m^7GpppN_{m^2}opNpRNA$) nebo čepičku 2 ($m^7GpppN_{m^2}opN_{m^2}opRNA$), která se nachází přibližně v 50 % mRNA (Desrosiers et al., 1974; Furuichi et al., 1975; Wei et al., 1975). Podmínky vzniku čepičky 2 nejsou jasné. Perry a kol. (1976) uvádí, že mRNA s čepičkou 2 mají vysokou frekvenci pyrimidinových bází v pozici 2 – tj. druhý transkribovaný nukleotid v mRNA. Nicméně doposud nebyl nalezen žádný specifický motiv, který by spojoval mRNA s čepičkou 2 (Werner et al., 2011). Molekuly mRNA s čepičkou 2 se však zdají být stabilnější a zároveň jsou více zastoupené v polyribosomech. Je možné, že mají vyšší afinitu pro ribozomy, nebo že vznik čepičky 2 nastává až po nasednutí polyribosomů na mRNA (Perry et al., 1976). Zmíněné mRNA čepičky nejsou jediné – např. u *Trypanosoma brucei* byla identifikována mRNA s čepičkou 4 (01234) (Freistadt et al., 1987; Bangs et al., 1992).

2.2. Syntéza čepičky lidské mRNA

Po zahájení syntézy pre-mRNA dochází k syntéze čepičky. První dvě reakce zajišťuje bifunkční lidský čepičkující enzym (HCE). Jeho N-koncová trifosfatázová doména zajišťuje první reakci a odstraňuje γ -fosfát z pre-mRNA. C-koncová doména s guanylyltransferázovou aktivitou katalyzuje druhou reakci – připojení GMP – za vzniku GpppRNA (Furuichi et al., 1976; Yamada-Okabe et al., 1998). Tento proces zřejmě probíhá ko-transkripčně na pre-mRNA o délce cca. 20 až 30 nukleotidů (Coppola et al., 1983; Hagler et al., 1992; Rasmussen & Lis, 1993), neboť HCE interaguje s fosforylovanou RNA polymerázou II (Cho et al., 1997).

Takto vzniklý prekurzor v podobě GpppRNA podléhá následným methylovaním nukleobáze a hydroxylových skupin cukerných jednotek. Ačkoliv by se dalo očekávat, že methylace budou mít jasně dané pořadí, současná data tento předpoklad nepotvrzují. Naopak se zdá, že pořadí methylovaní může být náhodné díky relativní nespecifitě zúčastněných MTáz (Werner et al., 2011).

Methylovaní guaninu na pozici N7 katalyzuje guanin N7-methyltransferáza (RNMT) (Ensinger & Moss, 1976), jež oproti HCE neinteraguje s RNA polymerázou II, ale interaguje s HCE, což naznačuje ko-transkripční průběh vzniku čepičky 0 (Pillutla et al., 1998).

Methylovaní 2'-hydroxylové skupiny prvního transkribovaného nukleotidu zajišťuje jaderný enzym hMTr1 (Bélanger et al., 2010), který interaguje s RNA polymerázou II (Haline-Vaz et al., 2008), což opět naznačuje, že tato methylace je ko-transkripční. Není však nezbytně nutné, aby následoval až po N7-methylovaní, neboť hMTr1 umí methylovat čepičku s i bez N7-methylovaného guaninu (Langberg & Moss, 1981). Kromě toho hMTr1 může využít jako substrát i čepičku 02, a to se stejnou účinností jako čepičku 0 (Werner et al., 2011).

Methylovaní druhého transkribovaného nukleotidu zajišťuje hMTr2. Tento enzym je přítomný v jádře i cytoplazmě (Langberg & Moss, 1981; Werner et al., 2011) a může methylovat tři různé substráty: GpppRNA, m^7 GpppRNA (čepička 0) a m^7 GpppN_{m2'}opRNA (čepička 1). Methylovaní čepičky 0 vzniká čepička 02 (m^7 GpppNpN_{m2'}opRNA), nicméně tento proces je méně efektivní oproti methylovaní čepičky 1 za vzniku čepičky 2 (Werner et al., 2011).

2.3. Funkce čepičky

Čepička na 5' konci mRNA má klíčovou roli pro správnou funkci mRNA. Podporuje sestavení spliceosomu a následný sestřih pre-mRNA (Konarska et al., 1984). Zvyšuje též

stabilitu mRNA, neboť chrání 5' konec před degradací exonukleázami (Furuichi et al., 1977) a umožňuje transport mRNA do cytoplazmy skrz jaderný pór (Izaurre et al., 1992). V cytoplazmě dochází k translaci mRNA, což opět vyžaduje přítomnost čepičky a při její absenci nedochází k translaci mRNA (Muthukrishnan et al., 1975).

Přítomnost čepičky slouží také jako „identifikátor“ a mRNA bez čepičky jsou rozpoznány receptory nespecifické imunity, neboť takovéto RNA patří mezi „molekulární vzory spojené s patogeny“ z anglického *pathogen-associated molecular pattern* neboli PAMP. Tyto vzory jsou rozeznávány receptory PRR (z ang. *pattern recognition receptor*), mezi které patří Toll-like receptory (TLR) či RIG-I-like receptory (RLR) (Akira et al., 2006). Pokud se v cytoplazmě buňky ocitne RNA bez čepičky (pppNpRNA), dochází k jejímu rozeznání pomocí RIG-I (Hornung et al., 2006) či IFIT (Pichlmair et al., 2011). Detekci čepičky 0 ($m^7GpppRNA$) zajišťuje Mda5 (Züst et al., 2011), TLR7, TLR8 (Rimbach et al., 2015) a IFIT (Daffis et al., 2010). Pokud výše zmíněné receptory (kromě IFIT) rozpoznají pppNpRNA nebo $m^7GpppRNA$, dochází k přenosu signálu do jádra a transkripci interferonu typu I a následně i interferony stimulovaných genů (ISG), včetně IFIT (Akira et al., 2006; Zhou et al., 2013).

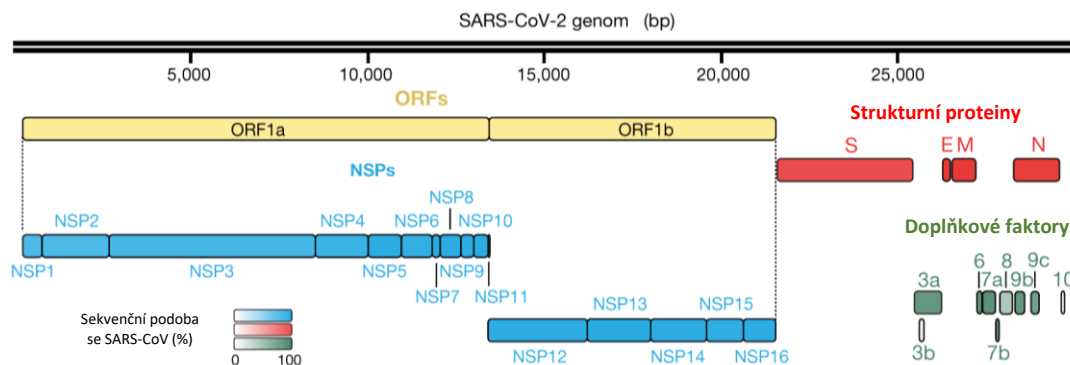
Důležitým faktorem v životě mRNA je také poly-A konec, který nebude v této práci podrobně diskutován. Alternativní cestou, která též nebude v této práci rozebírána, je struktura IRES (z ang. *internal ribosome entry site*) na 5' konci mRNA jakožto substituent klasické čepičky.

3. Molekulární charakteristika SARS-CoV-2

3.1. Struktura virionu a genomu

Virion SARS-CoV-2 má sférický tvar s vnitřním průměrem kolem 80 nm (Yao et al., 2020). Jedná se o obalený virus, přičemž jeho lipidová dvojvrstva je odvozena z přechodné organely mezi endoplazmatickým retikulem a Golgiho aparátem – tzv. ERGIC (Haan & Rottier, 2005; Klein et al., 2020). Uvnitř viru se nachází velký genom tvořený jednořetězcovou RNA s pozitivní polaritou (+ssRNA) o velikosti přibližně 29,9 kb (Obrázek 2). RNA je obalena nukleoproteinem N, jenž zároveň funguje jako RNA chaperon (Baric et al., 1988; Zúñiga et al., 2007). Na obou koncích genomu se nachází nepřekládané oblasti (UTR), přičemž na 5' konci je čepička 1 a na 3' konci poly-A sekvence (Spagnolo & Hogue, 2000). Dvě třetiny genomu jsou tvořeny ORF1ab, jenž kóduje nestrukturní proteiny nsp1 až nsp16. Zbývá třetina genomu

kóduje strukturní proteiny (S, E, M, N) a doplňkové faktory (Khailany et al., 2020). Genom vykazuje 88% podobnost s netopýřními koronaviry (bat-SL-CoVZC45 a bat-SL-CoVZXC21), 79% shodnost se SARS-CoV a 50% s MERS-CoV (Lu et al., 2020).



Obrázek 2: Struktura genomu SARS-CoV-2 a míra podobnosti se SARS-CoV. Upraveno podle Gordon a kol. (2020).

3.2. Životní cyklus SARS-CoV-2

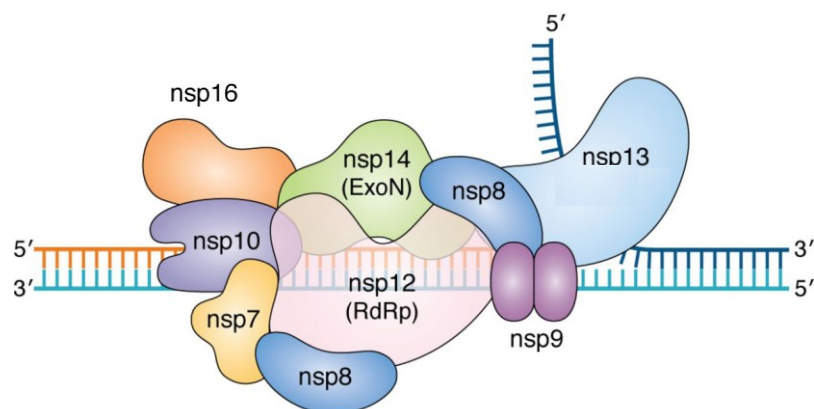
Na povrchu SARS-CoV-2 se nachází homotrimery glykoproteinů S (Walls et al., 2020), jež využívá pro vstup do buněk, obdobně jako SARS-CoV, díky interakci s angiotenzin-konvertujícím enzymem 2 – ACE2 (P. Zhou et al., 2020). Po interakci viru s receptorem dochází ke klathrinem zprostředkované endocytóze (Bayati et al., 2021) a postupnému zrání endozomálního vaku. S postupným snižováním pH dochází ke konformační změně proteinu S a expozici jeho fúzní domény, což umožní „únik“ RNA do cytoplazmy (T. Zhou et al., 2020).

V cytoplazmě dochází k translaci čtecích rámců ORF1a a ORF1b z genomové (+)ssRNA. Vznikající polyproteiny jsou rozštěpeny za vzniku nsp1 až nsp16. Díky nimž dochází k modifikaci endoplazmatického retikula (ER) a vzniku dvoumembránových váček (DMVs). Na těchto váčkách dochází k sestavení replikačních komplexů a replikaci virové RNA. Genomová (+)ssRNA je přepsána do antigenomové (-)ssRNA, jež slouží jako templát pro syntézu nových genomových RNA. Molekuly mRNA vznikají též z genomové RNA a to procesem diskontinuální transkripce za vzniku subgenomových RNA (sgRNA) negativní polarity. Tyto (-)sgRNA jsou přepsány do (+)sgRNA a translatovány do strukturních proteinů potřebných pro sestavení virionu. Virion je sestaven na membráně ERGIC a buňku opouští pomocí exocytózy (Hartenian et al., 2020).

3.3. Syntéza virové čepičky

Koronaviry mají oproti ostatním RNA virům relativně velký replikační komplex, jenž se skládá z několika proteinů. Kromě RNA dependentní RNA polymerázy (RdRp) a pomocných proteinů jsou součástí komplexu i proteiny nezbytné pro syntézu čepičky. Syntézu čepičky zajišťují virové proteiny, neboť replikace probíhá v cytoplazmě (přesněji v DMVs) a není možné využít jaderné MTázy. Nsp13 je bifunkční enzym, který funguje jako helikáza a 5'-RNA trifosfatáza. Katalyzuje odštěpení γ -fosfátu z pppRNA za vzniku ppRNA (Ivanov & Ziebuhr, 2004). Klíčovým proteinem replikačního komplexu je bifunkční nsp12 s RdRp doménou a NiRAN doménou, jež zajišťuje vznik prekursoru čepičky v podobě GpppRNA díky guanylyltransferázové aktivitě (Yan et al., 2021). Dalším důležitým proteinem v tomto procesu je bifunkční enzym nsp14. Ten katalyzuje vystřížení nesprávně zařazených nukleotidů díky 3'→5' exonukleázové aktivitě (Minskaia et al., 2006) a také metylaci GpppRNA za vzniku čepičky 0 (Chen et al., 2009). Posledním krokem v syntéze čepičky je 2'-O-methylace, kterou katalyzuje nsp16 (Decroly et al., 2008) za spoluúčasti nsp10 (Bouvet et al., 2010).

Nsp14 i nsp16 tvoří komplex s nsp10 a podle Romano a kol. (2020) je možné, aby vznikal komplex nsp14-nsp10-nsp16. Nsp10 by tímto spojoval tři katalytická místa do jednoho komplexu. Tento heterotrimer je zřejmě součástí ještě většího komplexu zahrnujícího mimo jiné nsp12 a nsp13 (Obrázek 3).



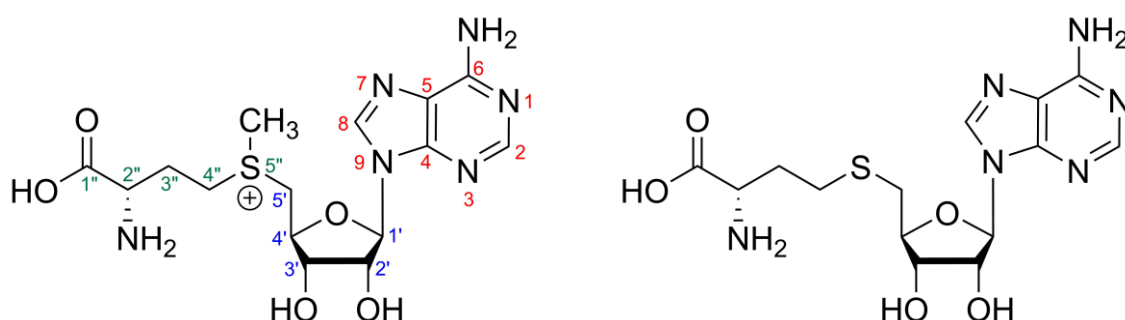
Obrázek 3: Replikační komplex. Upraveno podle Hartenian a kol. (2020).

4. S-adenosylmethionin a methyltransferázy

4.1. S-adenosylmethionin

S-Adenosylmethionin neboli SAM či AdoMet je klíčová molekula řady různých biochemických drah. Biologický poločas jaterního SAM se pohybuje mezi 2,4 až 5,9 minutami a člověk denně vyprodukuje 6 až 8 g SAM (Mato et al., 1997). Syntézu SAM zajišťuje SAM syntetáza (též methionin adenosyltransferáza či MAT), která katalyzuje reakci methioninu s ATP (Cantoni, 1952).

SAM je zapojen v jednovláknovém metabolismu a funguje jako donor methylové skupiny pro řadu molekul – např. lipidy, nukleové kyseliny či proteiny. SAM však neslouží pouze jako methylační činidlo a je zapojen také např. do syntézy polyaminů. Vedlejším produktem SAM-dependentní methylace je S-adenosylhomocystein (SAH), jenž funguje jako kompetitivní inhibitor MTáz (Obrázek 4). SAH hydroláza štěpí SAH na homocystein a adenosin. Homocystein může být znovu methylován za vzniku methioninu a případně i SAMu v rámci tzv. „methioninového cyklu“ (Fontecave et al., 2004).



Obrázek 4: Vlevo: očíslovaná molekula SAM; vpravo: SAH. Vytvořeno v ChemDraw (2017).

4.2. Methyltransferázy

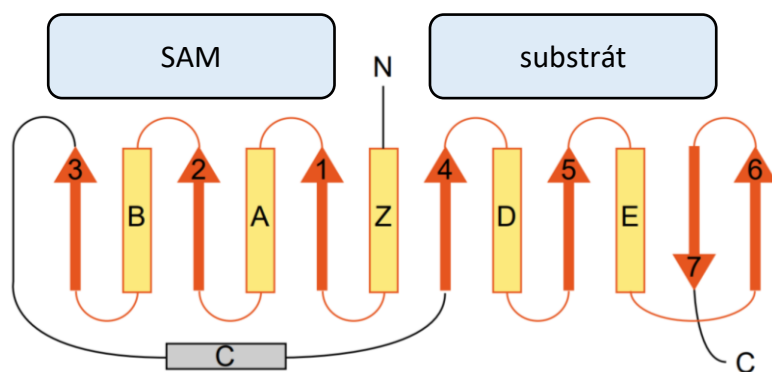
MTázy tvoří velkou rodinu proteinů a jejich soubor lze nazvat též „methyltransferazom“. V lidském genomu bylo identifikováno přes 200 různých MTáz a majoritní většina z nich patří do „skupiny I“ neboli do „superrodiny se sedmi β -skládanými listy“ též označované jako „MTázy s Rossmannovým záhybem“ (Petrossian & Clarke, 2011).

MTázy lze rozdělit na dvě velké skupiny podle donoru methylové skupiny. První skupinou jsou SAM-dependentní MTázy, které využívají SAM. Druhou skupinou jsou

SAM-independentní MTázy, které jako zdroj methylové skupiny používají např. methylamin, methyltetrahydrofolát, betain či *S*-methylmethionin (Fenwick & Ealick, 2018). MTázy můžeme také rozdělit podle mechanismu, kterým methylují svůj substrát. Methylace totiž může probíhat mechanismem nukleofilní substituce ale i radikálovým mechanismem (Boal et al., 2011; Schwalm et al., 2016).

Primární struktura SAM-dependentních MTáz není nikterak konzervována ani v případě SAM-vazebného místa. Vysoce konzervována je však supersekundární struktura těchto enzymů. Na jejím základě rozeznáváme několik typů MTáz, přičemž nejrozšířenějším typem jsou MTázy s Rossmannovým záhybem, což je široce rozšířená a evolučně stará proteinová struktura. Skládá se z α -helixů (označovány αZ a αA až αE), β -skládaných listů (označovány $\beta 1$ – $\beta 6$; obvyklé pořadí: 3-2-1-4-5-6) a vytváří β - α - β uspořádání s paralelními β -skládanými listy. Výsledkem je struktura podobná sendviči, ve kterém jsou β -listy obklopeny α -helixy. V některých případech může být poslední skládaný list protáhnutý a tvořit další $\beta 7$ -list, což je případ SAM-MTáz s Rossmannovým záhybem (Obrázek 5). U nich pozorujeme na C-konci vedle sebe dva β -skládané listy (pořadí 3-2-1-4-5-7-6) v antiparalelní pozici (Martin & McMillan, 2002; Chouhan et al., 2018).

Enzymy s Rossmannovým záhybem, jež váží nukleosidy (včetně SAM-MTáz), mají společný vazebný motiv. Ten je založen na glycin-bohaté smyčce mezi $\beta 1$ a αA s motivem xGxG a přítomnosti kyselých aminokyselin Asp nebo Glu na vrcholu $\beta 1$. Kyselina asparagová a glutamová díky své γ -/ δ -karboxylové skupině interaguje s hydroxylovými skupinami ribózy. (Kozbial & Mushegian, 2005; Gana et al., 2013; Chouhan et al., 2018).



Obrázek 5: Uspořádání α -helixů a β -listů MTáz s Rossmannovým záhybem. Upraveno podle Martin & McMillan (2002).

4.3. Nestruturní protein 14

Nsp 14 je bifunkční enzym s guanin N7-MTázovou doménou v C-terminální oblasti (Chen et al., 2009) a 3' → 5' exonukleázovou aktivitou v doméně ExoN, jež je lokalizována v N-terminální oblasti nsp14 (Minskaia et al., 2006). Porovnání sekvencí mezi SARS-CoV-2 a SARS-CoV (izolát „Wuhan-1“ vs. „Frankfurt“) ukázalo 95% shodu (Ogando et al., 2020; Shannon et al., 2020).

Domény jsou propojeny pantovou oblastí (z ang. *hinge region*), která umožňuje pohyb jednotlivých domén. Aminokyselinové složení této oblasti není náhodné a ve skutečnosti se jedná o konzervovanou oblast u *Coronaviridae* (Ferron et al., 2018). Stejně tak jsou vysoce zachovalé aminokyseliny, které zajišťují hydrofobní interakce mezi doménami, a stabilizují tak N7-MTázovou doménu (Chen et al., 2013; Ma et al., 2015).

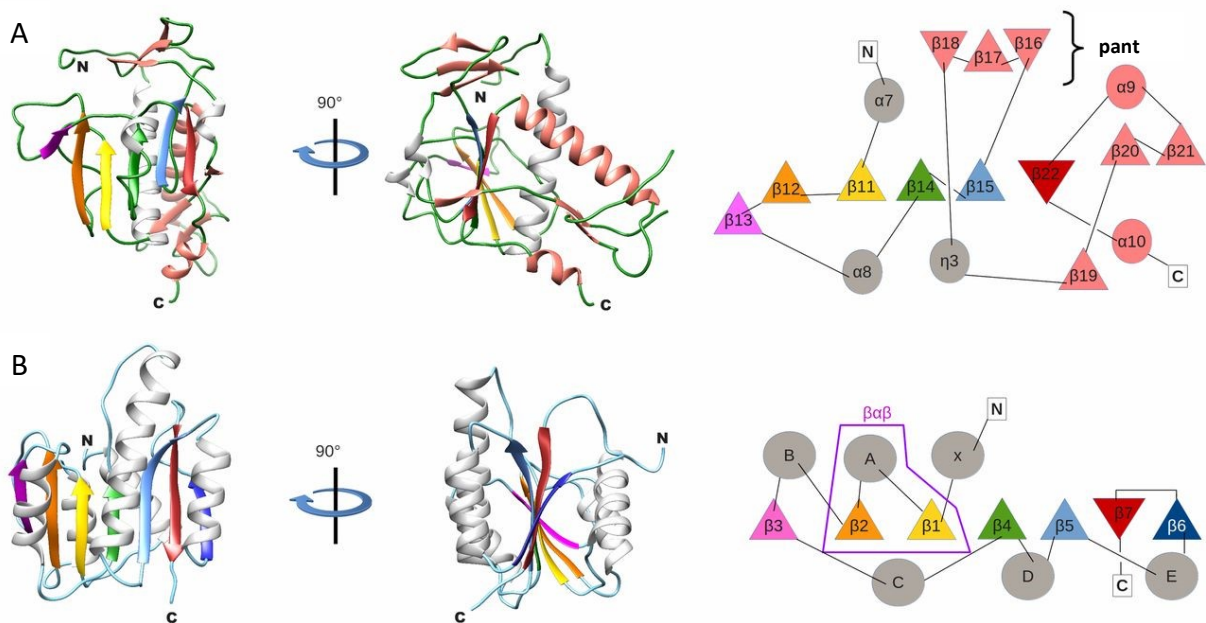
Další součástí nsp14 jsou zinkové prsty (ZF1 – ZF3). Dva jsou lokalizovány v ExoN doméně a oba jsou důležité právě pro exonukleázovou funkci nsp14. Třetí zinkový prst se nachází v N7-MTázové doméně, ale mimo aktivní místo a jeho mutace měly minimální dopad na MTázovou aktivitu. Jeho funkce není jasná, ale je možné, že hraje roli v protein-proteinové interakci s nsp10-nsp16 komplexem (Ma et al., 2015; Becares et al., 2016; Ogando et al., 2020).

Nsp14 asociuje s nsp10 a vytváří heterodimerní komplex, což je klíčové pro funkci ExoN domény. U SARS-CoV dochází díky asociaci k přibližně 35násobnému nárůstu exonukleázové aktivity. Naopak asociace nsp10 s nsp14 nemá žádný vliv na N7-MTázovou aktivitu (Bouvet et al., 2012).

4.3.1. Methyltransferázová aktivita

Kromě methylace GpppRNA bylo prokázáno, že nsp14 ze SARS-CoV, MHV (virus myší hepatitidy) a TGEV (přenosný virus gastroenteritidy) je schopen methylovat GTP a dGTP. Toto naznačuje, že schopnost methylovat volného GTP či dGTP je konzervována napříč koronaviry. Ostatní nukleotidy – ATP, CTP a UTP – nsp14 nebyl schopen methylovat (Jin et al., 2013). Tyto výsledky připomínají proces tvorby čepičky u *Alphaviridae*. Zástupci této čeledě methylojí GTP a vzniklý ^{m7}GTP je poté kovalentně navázán na guanylyltransferázu, jež ho přenesou na ppRNA za vzniku čepičky 0 (Aholá & Ahlquist, 1999). Jin a kol. (2013) exprimovali všechny nestruturní proteiny SARS-CoV a žádný z nich neměl schopnost kovalentně vázat ^{m7}GTP či GTP. Toto zjištění ukazuje, že ačkoliv je nsp14 schopen methylovat volného GTP, tvorba čepičky neprobíhá jako u *Alphaviridae*.

Ačkoliv je Rossmannův záhyb nejběžnější strukturou MTáz, u nsp14 se nenachází. Místo toho je katalytické centrum tvořeno pěti β -skládanými listy (paralelní β 11, β 12, β 14, β 15 a antiparalelní β 22) a zbytek pomyslného sendviče tvoří pouze jeden α -helix (α 7) společně se třemi dlouhými smyčkami, jež obsahují dva malé helixy (η 3 a α 8). Tato supersekundární struktura (Obrázek 6) představuje zcela nový typ uspořádání MTázy oproti klasickému MTázovému uspořádání se sedmi β -skládanými listy v β - α - β uspořádání (Ferron et al., 2018).



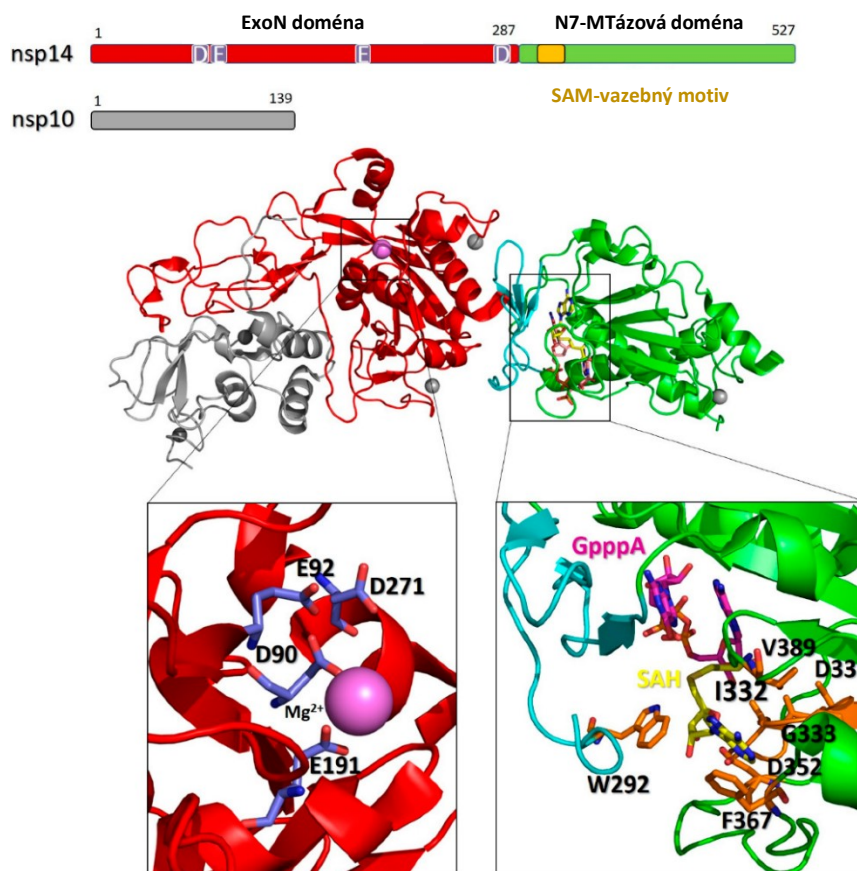
Obrázek 6: Porovnání MTázové domény nsp14 ze SARS-CoV (A) a MTázové domény FtsJ s klasickým Rossmannovým záhybem (B). Upraveno podle Ferron a kol. (2018).

4.3.2. Exonukleázová aktivita

RNA viry mají vysokou mutační rychlost a během infekce jedné buňky dochází k 10^{-6} až k 10^{-4} substitucím (Sanjuán et al., 2010). Dochází tak ke vzniku populace tzv. „kvazisppecies“ neboli spektru mutantů daného viru (Domingo & Perales, 2019). To umožňuje virům adaptovat se a stát se rezistentními vůči léčivům díky primárním až terciárním mutacím.

ExoN doména obsahuje tři konzervované motivy: motiv I (Asp, Glu), motiv II (Glu) a motiv III (Asp) společně s hořčičným kationtem (Obrázek 7). Ačkoliv obsahuje tetradu DEED (Asp, Glu, Glu, Asp), řadí se do superrodiny DEDD exonukleáz. Terciární struktura

ExoN je založena stejně jako ostatních DEDD exonukleáz na α/β záhybu, přičemž pět β -skládaných listů (kromě $\beta 3$) je obklopeno α -helixy (Romano et al., 2020).



Obrázek 7: 3D uspořádání komplexu nsp10-nsp14. Upraveno podle Romano a kol. (2020).

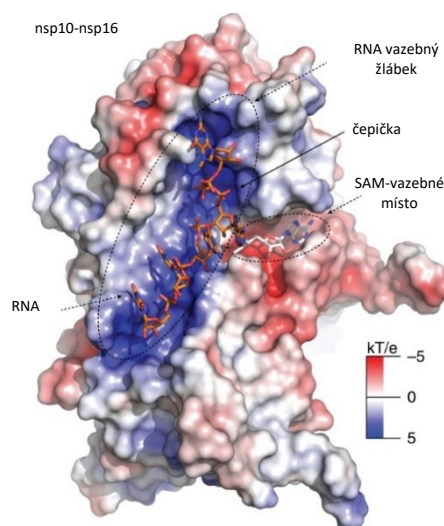
ExoN doména chrání genom před mutacemi a analogy nukleotidů, které jsou využívány jako antivirotika. Replikace RNA za pomoci nsp14 ze SARS-CoV a MHV bez exonukleázové aktivity vedla k akumulaci mutací (Eckerle et al., 2007; Eckerle et al., 2010). Tvrzení též potvrzuje zvýšení antivirové aktivity remdesiviru a 5-fluorouracilu u mutantů bez aktivní ExoN domény (Smith et al., 2013; Agostini et al., 2018). Také sekvenční analýza patientských vzorků SARS-CoV-2 odhalila korelaci mezi mutacemi v nsp14 a zvýšeným množstvím mutací v genomu. Tři nejběžnější mutace nsp14 jsou lokalizovány právě v ExoN doméně, nicméně pouze jedna z těchto mutací je nesynonymní (F233L) (Eskier et al., 2020).

Exonukleázová aktivita nsp14 značně komplikuje použití stávajících a vývoj nových antivirotických analogů nukleotidů. Je proto nutné najít rovnováhu mezi dostatečnou inkorporací do vznikající RNA a rezistencí vůči exonukleázové aktivitě nsp14 (Shannon et al., 2020).

Ogando a kol. (2020) testovali vliv absence funkční ExoN domény (mutace katalytických aminokyselin – D90A a E92A) u řady koronavirů, přičemž zjistili, že SARS-CoV a MHV byl stále schopen replikace. Ačkoliv se sekvence nsp14 mezi SARS-CoV a SARS-CoV-2 z 95 % shoduje, SARS-CoV-2 s nefunkční ExoN doménou nebyl schopen replikace. Stejný výsledek pozorovaly dvě skupiny, které zkoumaly TGEV (Becares et al., 2016) a HCoV-229E (Minskaia et al., 2006). Inaktivovaná ExoN doména byla letální též pro MERS-CoV (Ogando et al., 2020).

4.4. Nestrukturní protein 16

Nsp16 je SAM-dependentní 2'-O-MTáza, jejíž rolí je methylace prvního transkribovaného nukleotidu ssRNA s čepičkou 0, čímž dokončuje proces syntézy čepičky 1 (Decroly et al., 2008). Na rozdíl od nsp14, nsp16 má klasickou strukturu MTázy typu I. Katalytické centrum je založeno na Rossmannově záhybu s kanonickým pořadím β -skládaných listů (3-2-1-4-5-7-6), přičemž jediný β 7 má antiparalelní uspořádání. Primární proteinová struktura nsp16 ze SARS-CoV-2 vykazuje vysokou sekvenční podobnost (99 % sekvence) s netopýřím koronavirem Bat-CoV-RaTG13. Se SARS-CoV sdílí 93 % sekvence a s MERS-CoV pouze 66 %. SARS-CoV a SARS-CoV-2 se liší v lokalizaci smyčky 1 a helixu η 3. V případě SARS-CoV je smyčka uzavřená a flexibilní, ale u SARS-CoV-2 je více otevřená. V důsledku odlišného aminokyselinového složení má helix η 3 u SARS-CoV strukturu smyčky. Ostatní změny v sekvenci aminokyselin neovlivňují SAM-vazebné místo a jsou lokalizovány na povrchu proteinu (Rosas-Lemus et al., 2020).



Obrázek 8: Struktura nsp10-nsp16. Upraveno podle Krafcikova a kol. (2020).

Stejně jako v případě SARS-CoV (Bouvet et al., 2010; Decroly et al., 2011), nsp16 ze SARS-CoV-2 funguje jako heterodimer ve spojení s nsp10 (Obrázek 8). Nsp16 ze SARS-CoV vyžaduje asociaci s nsp10, aby byl schopen navázat SAM a RNA. Díky nsp10 pravděpodobně dochází k prodloužení vazebného žlábků pro RNA a ke stabilizaci SAM-vazebného místa (Chen et al., 2011). Vazba mezi proteiny v heterodimeru je zprostředkována klastry aminokyselin. Na povrchu nsp16 je celkem pět klastrů označovaných jako A–D a na povrchu

nsp10 jsou tři klastry označované jako I–III. Interakce v heterodimeru jsou především hydrofobní (klastr I, A, B a D). Zbylé interakce jsou zprostředkovány vodíkovými můstky, přičemž pět jich je tvořeno přímou interakcí mezi aminokyselinami a osm je zprostředkováno přes molekuly vody (Rosas-Lemus et al., 2020). Aminokyseliny zúčastněné v interakci nsp10-nsp16 u SARS-CoV-2 vykazují 100% sekvenční shodu se SARS-CoV. Což představuje potenciální cíl pro vývoj širokospektrálních inhibitorů protein-proteinové interakce (Rosas-Lemus et al., 2020).

Vazebné místo pro SAM má negativní náboj a krystalografická analýza komplexu nsp10-nsp16 ukázala, že SAH i sinefungin (SIN) se vážou do aktivního centra přes téměř stejné aminokyselinové zbytky jako SAM a nezpůsobují změnu struktury enzymu (Rosas-Lemus et al., 2020). MTázová aktivita je zajištěna kanonickou katalytickou tetradou K-D-K-E a to S_N2 mechanismem (Hodel et al., 1998; Hager et al., 2002; Decroly et al., 2011).

Čepička se váže do kladně nabitého vysokoafinitního vazebného místa (HBS), jež je lokalizováno na povrchu nsp16. Naopak zbytek RNA se váže do kladně nabitého nízkoafinitního místa (LBS). Na základě vazby síranových aniontů (Li_2SO_4 byl využit jako kryoprotektivní látka) do krystalu nsp10-nsp16, lze předpokládat, že do daných míst se vážou fosfátové skupiny RNA. Žlábek by měl být schopen pojmout 4 až 5 nukleotidů a mohl by sloužit jako cíl pro nízkomolekulární nabitě inhibitory, které by blokovaly vazbu RNA a zároveň měly nízký potenciál pro nechtěné inhibice buněčných MTáz (Rosas-Lemus et al., 2020).

Ve struktuře nsp16 se nachází dvě flexibilní tzv. „bránové smyčky“ (z ang. *gate loop*). Vazba čepičky 0 vede k otočení smyček o cca. 180° směrem ven (Obrázek 9), čímž dojde k rozšíření kavity pro substrát (RNA). Kromě toho dochází k rotaci některých postranních řetězců aminokyselin směrem do tohoto vazebného místa. Výsledkem je pevnější interakce mezi nsp16 a substrátem. Stabilizace těchto smyček by mohla být klíčová při vývoji vysoce účinných antivirotik (Viswanathan et al., 2020; Rosas-Lemus, 2020).

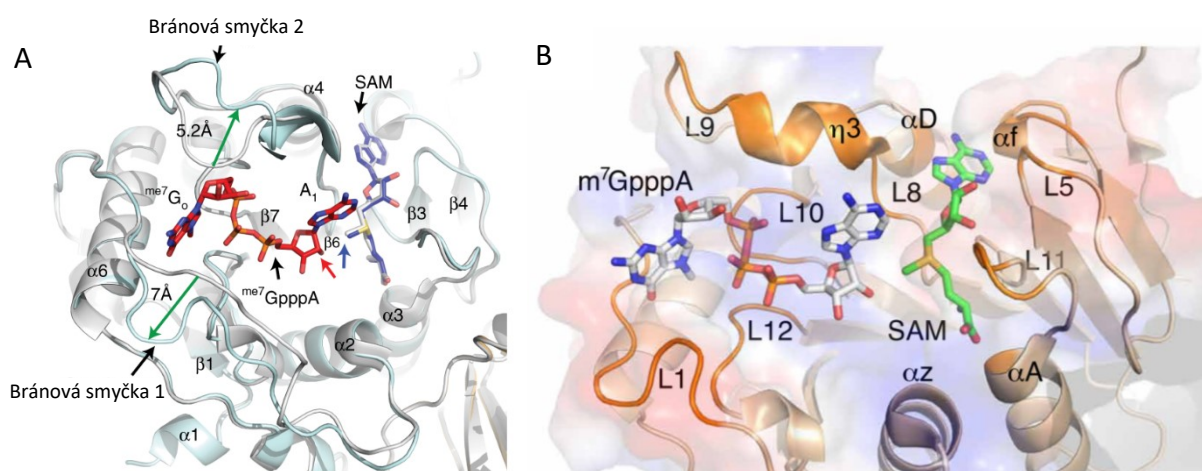
Kromě vazebného místa pro SAM a RNA byla na nsp16 identifikována další tři vazebná místa pro nukleotidy mimo katalytické centrum. Je možné, že se jedná pouze o krystalizační artefakt, případně o místa, do kterých by se vážala RNA, jež je právě methylována. Dopady obsazení či neobsazení těchto vazebných míst nejsou zatím známy (Rosas-Lemus et al., 2020).

Jako součást krystalové struktury nsp16-nsp10 s m^7GpppA a SAM byla pozorována také jedna molekula vody, která by se mohla účastnit stabilizace přechodného stavu během methylace (Rosas-Lemus, et al. 2020).

Nsp16 ze SARS-CoV není schopen methylace samotných nukleotidů (Jin et al., 2013) a standardní MTázová aktivita byla pozorována na RNA s ekvivalentem pěti transkribovaných nukleotidů (Bouvet et al., 2010), což se shoduje s předchozími poznatky, neboť nsp16 z FCoV (kočičí koronavirus) nebyl schopen navázat RNA kratší než tři nukleotidy – tj. $m^7GpppAC_{1-2}$ (Decroly et al., 2008). Oproti hMTr1, jež nevykazuje preferenci pro žádný nukleotid (Langberg & Moss, 1981), nsp16 upřednostňuje RNA, jež obsahuje adenosin na pozici prvního transkribovaného nukleotidu – tj. $m^7GpppARNA$ (Viswanathan et al., 2020).

Rozsáhlé mutace, jež by měly výrazný vliv na nsp16 nebyly ve vzorcích získaných od pacientů detekovány. Možným vysvětlením je, že bez účinného aparátu pro sestavení čepičky nebude infekce závažná, neboť bude rozpoznána imunitním systémem. Na přelomu března a dubna v roce 2020 byl New York City těžce zasažen pandemií a sekvenace patientských vzorků odhalila vysoký výskyt mutace S33R v bránové smyčce 1, nicméně přesný dopad této mutace zatím není znám (Viswanathan et al., 2020).

Bouvet a kol. (2010) charakterizovali nsp16 ze SARS-CoV jako Mg^{2+} -dependentní MTázu, nicméně Rosas-Lemus a kol. (2020) na základě svých dat nedošli k závěru, že by byl přítomen hořčnatý kationt. Zmiňují však, že je možné, že Mg^{2+} je součástí tranzitního stavu methylace, nebo že stabilizuje RNA.



Obrázek 9: (A) znázornění pohybu bránových smyček a vazebných míst pro m^7GpppA a SAM. Převzato od Viswanathan a kol. (2020). (B) ilustrace vazebných míst pro m^7GpppA a SAM. Převzato od Rosas-Lemus a kol. (2020).

5. Inhibitory methyltransferáz

SARS-CoV-2 je nový virus a v současné době nejsou k dispozici léky určené specificky proti němu. Vzhledem k vážnosti situace byli lékaři nuceni použít již schválené léky, které se však za standardních situací používají k léčbě jiných onemocnění – v anglické literatuře

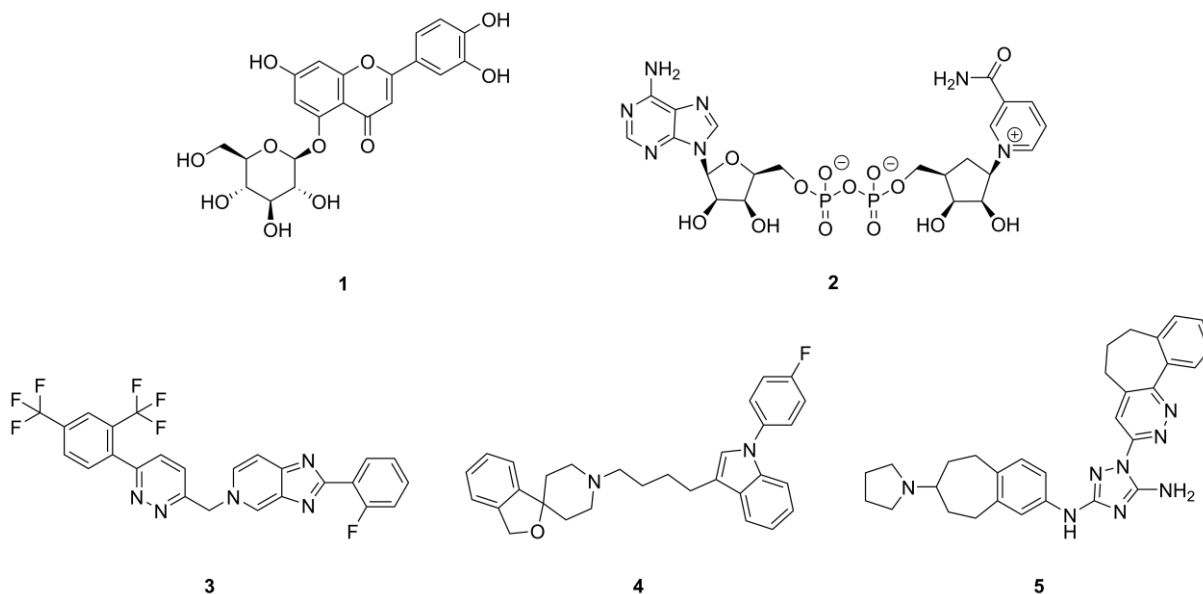
označováno jako tzv. „*drug repurposing*“. Momentálně je největší nadějí vakcinace, nicméně vývoj nových širokospektrálních antivirotik je nezbytný pro další nové viry, které se mohou objevit v budoucnosti.

5.1. *In silico* inhibitory SARS-CoV-2

Počítačové programy umožňují virtuální *in silico* analýzy celých databází látek za účelem nalezení inhibitoru určitého proteinu. Díky těmto metodám lze identifikovat potenciální inhibitory, které mohou být použity jako „odrazový můstek“ při vývoji nových antivirotik.

Vijayan a kol. (2020) podrobili 4100 různých sloučenin *in silico* screeningu s cílem najít inhibitor nsp16. U sedmi sloučenin byla pozorována inhibiční aktivita, přičemž nejlepší výsledky poskytly sloučeniny DB02498 a galuteolin (**1**, **2**, Obrázek 10).

Encinar & Menendez (2020) *in silico* analyzovali cca. 9000 léčiv schválených americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) s cílem inhibovat nsp16. Identifikovali řadu léků, např. tegobuvir, siramesin či bemcentinib (**3**, **4**, **5**, Obrázek 10), jako potenciální inhibitory vzniku nsp10-nsp16 komplexu. V současné době není žádná z těchto látek vedena v databázi klinických studií ClinicalTrials.gov (n.d.).

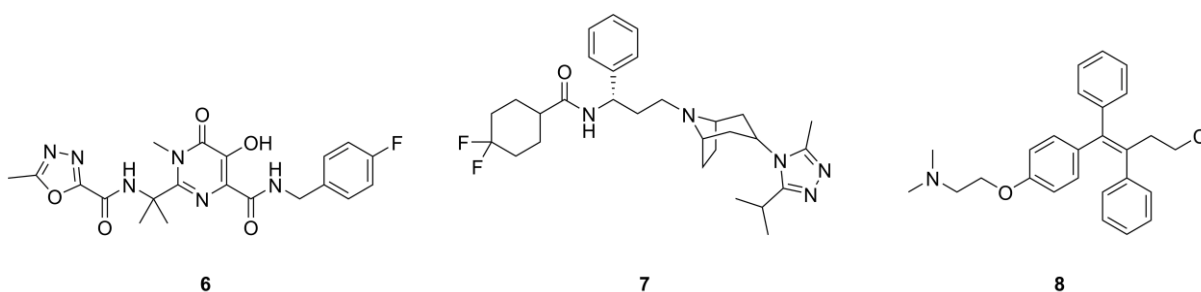


Obrázek 10: Inhibitory nsp16 (**1**, **2**). Léčiva schválená FDA s potenciálem inhibovat tvorbu komplexu nsp10-nsp16 (**3-5**). Vytvořeno v ChemDraw (2017).

Tazikeh-Lemeski a kol. (2020) vybrali z 1516 FDA schválených léčiv takové molekuly, jež se svým tvarem podobají sinefunginu. Na základě dalších rozsáhlejších *in silico* výpočtů identifikovali jako potenciální inhibitory nsp16 raltegravir a maravirok (**6**, **7**), jež se vážou silně

do SAM-vazebního místa MTázy. Podle ClinicalTrials.gov (n.d.) je maravirok ve druhé fázi klinických zkoušek jakožto lék proti COVID-19.

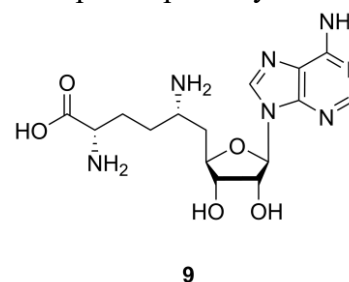
Martin & Cheng (2020) *in silico* identifikovali toremifen (**8**, Obrázek 11) jako potenciální inhibitor nsp14, neboť podle simulací dochází k silné interakci toremifenu s N7-MTázovou doménou. Inhibice by mohla být způsobena buď blokováním vazebního místa pro SAM, nebo blokováním katalytické části nsp14, ve které interaguje SAM s GpppRNA. Pro přesnější určení mechanismu inhibice by bylo potřeba provést ko-krytalizaci nsp14 s toremifenem. Kromě inhibice MTázy by měl být schopen interagovat s povrchový proteinem SARS-CoV-2, a zabránit tak fúzi virové a endozomální membrány. Toremfifen je také podle ClinicalTrials.gov (n.d.) v současné době ve druhé fázi klinických zkoušek proti COVID-19.



Obrázek 11: FDA schválené sloučeniny s potenciálem inhibovat nsp16 (**6**, **7**) a nsp14 (**8**). Vytvořeno v ChemDraw (2017).

5.2. Návrh analogů *S*-adenosylmethioninu

Využití SAMu jakožto methylačního činidla není specifické pouze pro viry. SAM je využíván i buněčnými enzymy, a proto je potřeba vyvinout SAM analogy specifické pro MTázy SARS-CoV-2. Z pohledu medicínské chemie lze molekulu SAM rozdělit na tři části – adenin, derivovaný tetrahydrofuran a aminoalkylový řetězec (Morales et al., 2020).



Obrázek 12: Sinefungin. Vytvořeno v ChemDraw (2017).

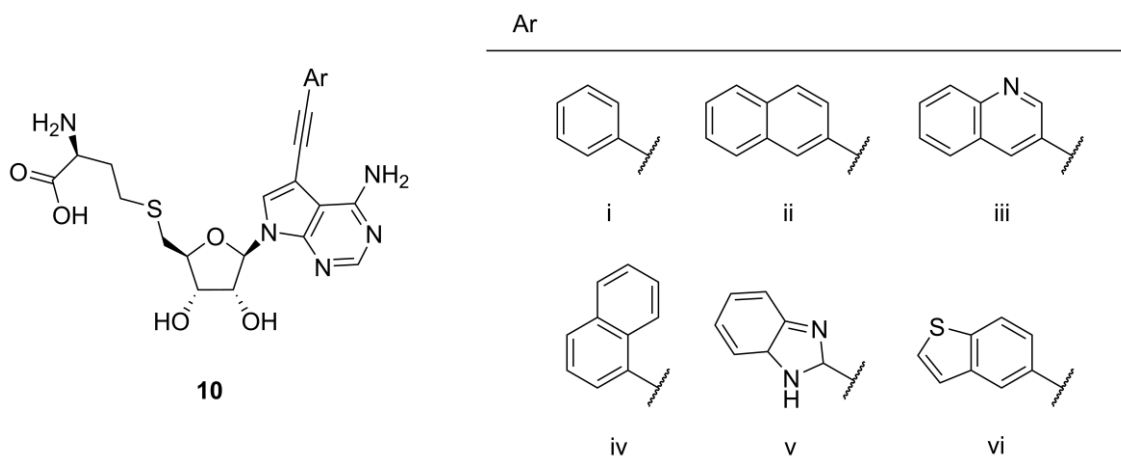
Molekule SAM jsou velmi podobné dva přírodní inhibitory MTáz. *S*-adenosylhomocystein je vedlejší produkt SAM-dependentní methylace a funguje jako kompetitivní inhibitor MTáz (Glick et al., 1975). Sinefungin (**9**, Obrázek 12) byl poprvé izolován z bakterie *Streptomyces griseolus* a prezentován jakožto antimykotikum (Hamill & Hoehn, 1973). Mechanismus účinku SIN je založen na schopnosti inhibovat MTázy. Ke kvasinkové MTáze Abd1 má 900x vyšší afinitu než SAM či SAH (Zheng et al., 2006).

Problém je, že SIN inhibuje virové i lidské MTázy a může sloužit pouze jako výchozí molekula při vývoji antivirotik (Pugh et al., 1978; Tao et al., 2018).

5.2.1. Modifikace báze

Borchardt a kol. (1974b) studovali vliv změny struktury SAH na jeho inhibiční aktivitu vůči čtyřem lidským MTázám. Jednalo se o katechol-O-methyltransferázu (COMT), fenylethanolamin N-methyltransferázu (PNMT), histonmethyltransferázu (HMT) a hydroxyindol-O-methyltransferázu (HIOMT). Deriváty SAH s pyrimidinovou bází místo adeninu ztratily svoji inhibiční aktivitu. Stejně tak deriváty SAH s $-\text{NH}_2\text{CH}_3$, $-\text{NH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{OH}$ či $-\text{Cl}$ místo aminoskupiny nukleobáze v poloze 6 nebyly účinnými inhibitory. Autoři došli k závěru, že vodíkový můstek mezi aminoskupinou SAH a enzymem hraje významnou roli při vazbě SAH do aktivního místa.

Otava a kol. (2021) využili kavitu nad SAM-vazebným místem v nsp14 a připravili řadu 7-deazaadeninových derivátů SAH s různými aromatickými substituenty v poloze 7, přičemž obecná struktura (**10**) je uvedena níže na obrázku 13 společně s různými substituenty (i-vi). Syntetizované molekuly úspěšně inhibovaly nsp14, nicméně jejich iontový charakter představuje problém pro vstup do buněk a další vývoj vhodných proléčiv je nezbytný.



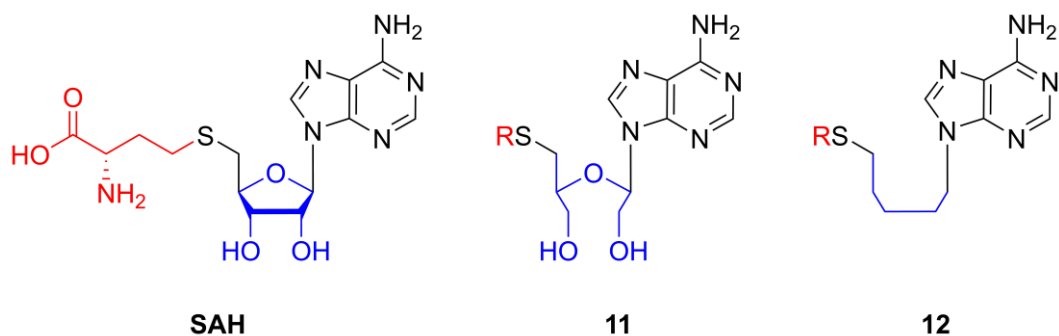
Obrázek 13: Obecná struktura inhibitoru nsp14 (**10**) s různými substituenty (i-vi), jenž cílí na kavitu nad SAM-vazebným místem. Vytvořeno v ChemDraw (2017) podle Otava a kol. (2021).

5.2.2. Modifikace ribózy

Acyklické formy nukleotidů se osvědčily jako potentní inhibitory virové replikace. Jako příklad lze uvést tenofovir používaný při léčbě HIV-1. Tenofovir cílí na reverzní transkriptázu HIV a po inkorporaci do virové DNA znemožňuje přidání dalšího nukleotidu, neboť nemá potřebnou 3' hydroxylovou skupinu (Chapman et al., 2003). Ribóza přítomná v SAM, se na rozdíl od zmíněného tenofoviru, přímo nezapojuje do procesu methylace. Cyklická a rigidní

ribóza pravděpodobně zajišťuje správnou orientaci molekuly v aktivním centru MTáz. Toto podporují práce dvou skupin, které publikovaly inhibiční schopnost SAH analogů s 1',4'- a 2',3'-acyklickou ribózou (**11**, **12**, Obrázek 14). Acyklické formy vykazovaly vůči lidským MTázám výrazně nižší inhibiční schopnost vůči svým cyklickým protějškům (Coward & Sweet, 1972; Borchardt et al., 1978).

Borchardt a kol. (1975) připravili 2'-deoxy-SAH, 3'-deoxy-SAH a 2',3'-dideoxy-SAH a opět testovali jejich inhibiční aktivitu na COMT, PNMT, HMT a HIOMT. Experimenty poukázaly na to, že důležitost přítomnosti hydroxylových skupin ribózy záleží na dané MTáze.



Obrázek 14: Porovnání struktury SAH a základní struktury 2',3' acyklických derivátů (**11**) podle Borchardt a kol. (1978) a 1',4' acyklických derivátů (**12**) podle Coward & Sweet (1972). Červeně označené R odpovídá červené části SAH. Vytvořeno v ChemDraw (2017).

5.2.3. Modifikace aminokyselinového zbytku

Běžnou modifikací, která se objevuje v publikacích, je výměna atomu síry za atom dusíku za účelem vytvoření analogů odolných vůči MTázové aktivitě díky silnější vazbě N-C oproti S-C (Davis et al., 1983). Změna oxidačního stavu síry molekuly SAH – výměna sulfoniové funkční skupiny za sulfoxidovou či sulfonovou – vedla u COMT, PNMT, HMT a HIOMT ke snížení až ztrátě afinity vůči svému vazebnému místu, což by mohlo být způsobeno změnou polarity nebo sterickým bráněním (Borchardt et al., 1974a).

Zkrácení aminokyselinového řetězce SAH o jednu -CH₂- skupinu za vzniku *S*-adenosylcysteinu vedlo ke snížení až ztrátě inhibiční aktivity SAH vůči COMT, PNMT, HMT, HIOMT a INMT (indolethylamin N-methyltransferáza). Autoři toto vysvětlují ztrátou schopnosti derivátů SAH interagovat se SAM-vazebným místem (Borchardt et al., 1976).

SAH analogy bez či s acetylovanou 2" aminoskupinou měly minimální či žádnou inhibiční aktivitu vůči COMT, PNMT, HMT a HIOMT. Stejný efekt byl pozorován u dekarboxylovaných analogů. Z toho vyplývá, že tyto skupiny jsou esenciální pro vazbu SAM

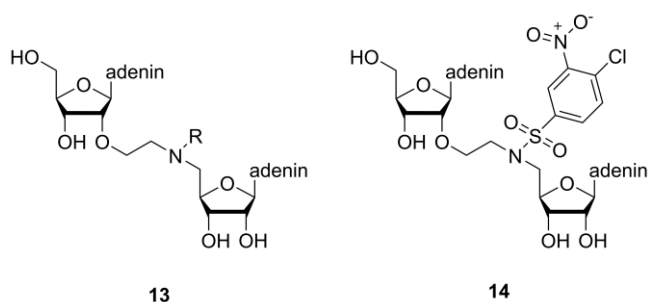
a SAH k výše zmíněným enzymům (Borchardt et al., 1976). Kromě možnosti vytvořit vodíkový můstek s vazebným místem je důležitá i *S*-konfigurace $-NH_2$ skupiny v molekule SAH. *R*-konfigurace aminoskupiny SAH vedla u HMT ke zvýšení inhibiční aktivity, ale u COMT, PNMT a HIOMT došlo k pravému opaku, neboť záleží na konkrétní struktuře MTázy (Borchardt et al., 1974a).

5.3. Dinukleosidové inhibitory

Vzhledem k tomu, že SAM-dependentní MTázy tvoří velkou rodinu proteinů, cílená inhibice jednoho vybraného enzymu pomocí derivátu SAM či SAH se zdá být nepravděpodobná. Bisubstrátové analogy představují propojení obou substrátů dané MTázy, což by mělo vést k výraznému zvýšení specifity inhibitoru. Benghiat a kol. (1986) syntetizovali první bisubstrátové analogy za účelem inhibice N7-MTázy viru vakcinie.

Nsp14 ze SARS-CoV jako substrát akceptuje RNA s adeninem a guaninem jakožto první transkribovanou bázi – tzn. GpppARNA a GpppGRNA (Chen et al., 2009). Otázkou je, zda je tato vlastnost zachovaná i u SARS-CoV-2. Nsp16 ze SARS-CoV-2 vyžaduje jako substrát SAM a mRNA s čepičkou 0, která má na první pozici adenosin – tzn. m^7 GpppARNA (Rosas-Lemus et al., 2020). Při vývoji bisubstrátových analogů substrátů nsp14 a nsp16, je proto potřeba tyto nukleobáze zachovat, nebo nahradit vhodným bioisosterem.

Ahmed-Belkacem a kol. (2019) připravili na základě racionálního návrhu 5 různých dinukleosidových analogů, které napodobovaly tranzitní stav 2'-O methylace RNA čepičky. Připravené sloučeniny jsou složeny ze dvou nukleosidů navzájem propojených sírným linkerem, nicméně výsledky o inhibiční aktivitě těchto sloučenin nebyly zatím publikovány. Možný je vliv pandemie SARS-CoV-2, neboť Ahmed-Belkacem a kol. (2020) publikovali 16 různých adeninových dinukleosidů, které opět napodobovaly tranzitní stav 2'-O methylace RNA čepičky. Nukleosidy dohromady propojili tentokrát přes linker obsahující dusík (**13**, Obrázek 15). Žádná ze 16 sloučenin nebyla účinným inhibitorem vůči 2'-O-MTázám několika virů z čeledi *Poxviridae*, rodu flavivirů a SARS-CoV. Sedm sloučenin však inhibovalo N7-MTázu nsp14 ze SARS-CoV. Šest z nich v mikromolárních koncentracích



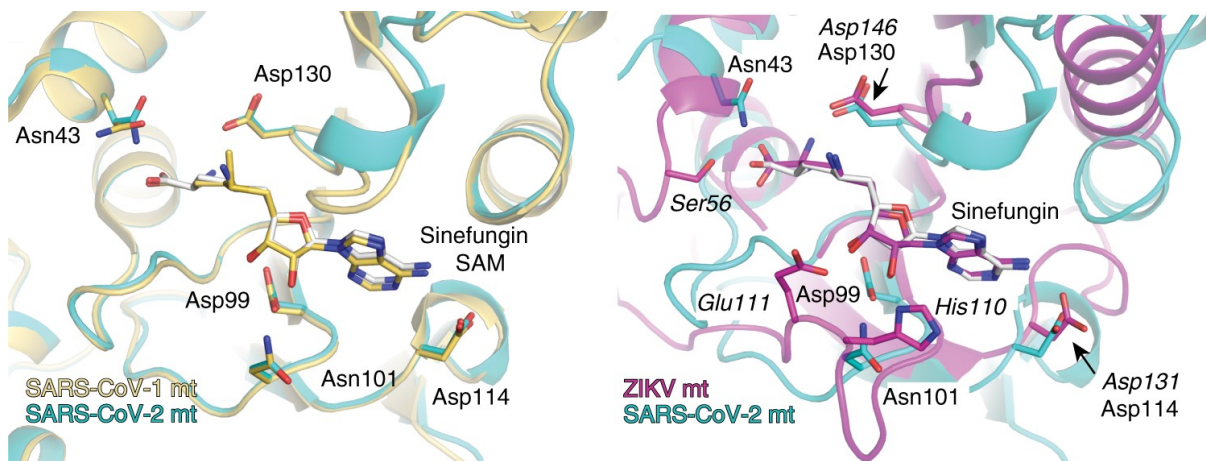
Obrázek 15: Obecná struktura dinukleosidového inhibitoru (**13**) a nejúčinnější inhibitor N7-MTázy SARS-CoV (**14**) podle Ahmed-Belkacem a kol. (2019). Vytvořeno v ChemDraw (2017).

obsahující dusík (**13**, Obrázek 15). Žádná ze 16 sloučenin nebyla účinným inhibitorem vůči 2'-O-MTázám několika virů z čeledi *Poxviridae*, rodu flavivirů a SARS-CoV. Sedm sloučenin však inhibovalo N7-MTázu nsp14 ze SARS-CoV. Šest z nich v mikromolárních koncentracích

a jedna dokonce v submikromolární koncentraci. A naopak při testech s lidskou N7-MTázou (RNMT) se tyto látky ukázaly být velmi špatnými inhibitory, což je velmi dobrá zpráva z pohledu nechtěných vedlejších účinků léčiv. Součástí nejúčinnějšího inhibitoru (**14**, Obrázek 15) byl N-arylsulfonamid (přesněji 4-chlor-3-nitrobenzensulfonamid), jenž je součástí několika schválených léčiv včetně antivirotik, např. tipranaviru pro léčbu HIV (Liu et al., 2020).

5.4. Inhibitory flavivirových MTáz

Před propuknutím pandemie SARS-CoV-2 nebyly koronaviry v popředí farmaceutického výzkumu, neboť způsobovaly jen lehčí respirační onemocnění. Při výskytu koronaviru s pandemickým potenciálem došlo k jeho rychlé eliminaci díky izolaci nakažených a lidí, kteří s nimi přišli do kontaktu. Naopak viry z rodu flavivirů – např. virus zika (ZIKV), dengue (DENV) či virus západonilské horečky (WNV) – jsou známé již dlouhou dobu a stále způsobují život ohrožující nemoci (Issur et al., 2011). Tyto viry mají multifunkční protein NS5, jenž má aktivitu RdRp a SAM-dependentní N7- i 2'-O-MTázy (Ray et al., 2006). Porovnání aktivního místa MTázy NS5 viru zika a nsp16 SARS-CoV-2 ukázalo nízkou homologii (Obrázek 16). Shodují se však v hydrofobní kavitě nad vazebným místem pro adenin (Krafcikova et al., 2020).

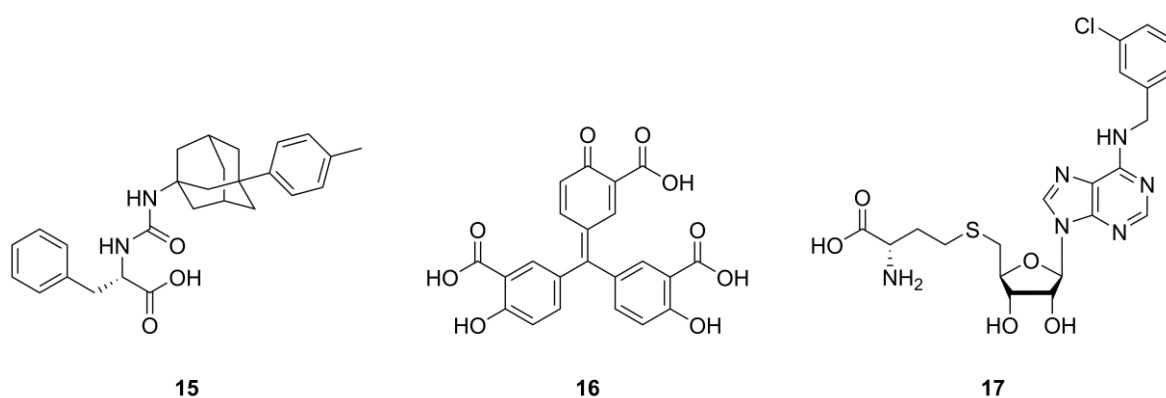


Obrázek 16: Vlevo: porovnání vazby SIN a SAM do vazebného místa nsp16 SARS-CoV a SARS-CoV-2; vpravo: porovnání vazby SIN do vazebného místa nsp16 SARS-CoV a NS5 ZIKV. Převzato od Krafcikova a kol. (2020).

Luzhkov a kol. (2007) provedli *in silico* screening 2,1 milionů molekul. *In vitro* poté otestovali inhibiční aktivitu 15 nejlepších kandidátů vůči 2'-O-MTáze NS5 DENV. Nejlepší výsledky měl derivát močoviny s adamantanem (**15**, obrázek 17), jež se váže do SAM-vazebného místa. Autoři navrhují využít kostru této molekuly jako základ pro vývoj nových antivirotik.

He a kol. (2004) pozorovali po přidání kyseliny aurintrikarboxylové neboli ATA (**16**, Obrázek 17) do buněčné kultury společně se SARS-CoV výraznou inhibicí replikace viru (oproti kontrole klesla virová produkce 1000x). Autoři publikace však uvedli, že mechanismus účinku není znám. Kromě účinku na SARS-CoV, Milani a kol. (2009) identifikovali ATA jako vysoce potentní inhibitor MTázy flavivirů, jenž se váže do katalytického centra. Je tedy možné, že by to mohlo být vysvětlení pro inhibiční aktivitu vůči SARS-CoV.

Lim a kol. (2011) připravili potenciální inhibitory DENV MTázy na základě struktury molekuly SAH. Celkem připravili 12 různých derivátů, přičemž všechny modifikace byly lokalizovány na aminoskupině adeninu v poloze 6. Touto modifikací se autoři snažili vyplnit kavitu nad vazebným místem pro SAM. Díky této substituci došlo u většiny molekul ke zvýšení inhibiční aktivity vůči virové MTáze a ke snížení inhibiční aktivity vůči hRNMT. Jako optimální se ukázalo přidání benzylu s malým substituentem v poloze meta. Prodloužení řetězce, jenž spojuje benzenové jádro s adeninem, vedlo ke snížení inhibiční aktivity. Autoři toto vysvětlují možným zvýšením flexibility benzenového jádra či neschopností kavity pojmout takto zvětšenou molekulu. Stejně tak fenyl s přímou vazbou na aminoskupinu nezvýšil inhibiční aktivitu. Nejúčinnějším inhibitorem byla sloučenina s 3-chlorbenzylem (**17**, Obrázek 17). Ačkoliv autoři připravovali inhibitory MTázy DENV, sloučenina **10** byla 18x účinnějším inhibitorem 2'-O-MTázy WNV. Opak byl však pozorován u N7-MTázové aktivity. Tento fakt autoři připisují rozdílným mechanismům 2'-O- a N7-methylace.



Obrázek 17: Inhibitory MTázy DENV (**15**, **17**) a SARS-CoV (**16**). Vytvořeno v ChemDraw (2017).

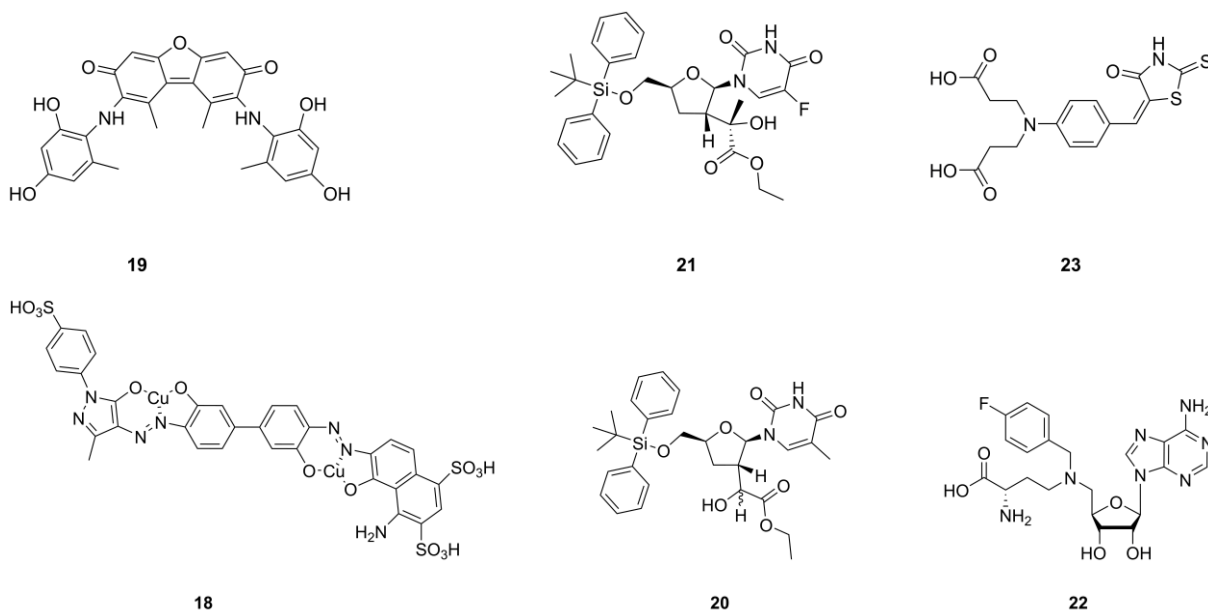
Brecher a kol. (2015) na základě *in silico* analýzy identifikovali 13 potenciálních inhibitorů MTáz flavivirů, jenž následně otestovali *in vitro*. Nejaktivnější látky inhibovaly MTázy několika různých virů. Dvě sloučeniny – NSC306711 (**18**) a NSC610930 (**19**) – při inkubaci s viry v buněčné linii úspěšně potlačily virovou replikaci a zároveň byly relativně

netoxické. Potenciální inhibitor **18** by měl podle predikcí interagovat s aminokyselinami mimo SAM-vazebné místo, což by mohl být důvod pro jeho specifitu vůči NS5.

Chen a kol. (2013) syntetizovali řadu analogů nukleosidů jakožto potenciálních inhibitorů MTázy WNV. Ve své publikaci představili pět molekul, přičemž GRL-002 (**20**) a GRL-003 (**21**) se ukázaly být velmi slibné. Specificky totiž inhibovali virový protein NS5 v mikromolárních koncentracích, ale neinhibovali hRNMT. Antivirová aktivita GRL-002 je možná ve skutečnosti pouze cytotoxická aktivita. Autoři připouští, že molekuly mohou interagovat s jinými virovými či buněčnými proteiny.

Jain a kol. (2017) publikovali strukturu molekuly MS2042 (**22**) – potenciálního inhibitoru NS5 ZIKV. MS2042 má místo síry s methylovou skupinou dusík s 4-fluorobenzylovým substituentem. Cílem výměny malé -CH₃ skupiny za objemný substituent bylo „zaplnit“ nepolární vazebné místo pro RNA. Data z krystalografie využil Santos a kol. (2020) a na základě *in silico* analýzy 42 390 molekul došli k závěru, že sloučenina ZINC1652386 (**23**) představuje lepšího kandidáta na potenciální inhibitor NS5 než MS2042.

Struktury výše zmíněných molekul 18–23 jsou uvedené na obrázku 18.



Obrázek 18: Inhibitory MTáz flavivirů (**18** – **23**) identifikované za základě *in silico* analýzy. Vytvořeno v ChemDraw (2017).

5.5. Inhibice protein-proteinových interakcí v komplexu nsp10-nsp16

Interakce v komplexu nsp10-nsp16 je komplexní a zajištěna plochou o rozloze 1983 \AA^2 . Rozrušení této interakce pomocí malé molekuly je nepravděpodobné (Krafcikova et al., 2020). Nicméně fakt, že proteiny nsp10 a nsp16 jsou vysoce konzervované napříč linií B u β -koronavirů, mezi které patří např. Bat-SL-CoV, SARS-CoV či SARS-CoV-2 (Rosas-Lemus et al., 2020), umožňuje vývoj širokospektrálního antivirotického peptidu.

Wang a kol. (2015) toto potvrdili s pomocí peptidu (P29), jenž byl tvořen částí nsp10 (aminokyselinami 68 – 96) z viru myši hepatitidy (MHV). Při *in vitro* inkubaci komplexu nsp10-nsp16 z MHV, IBV (virus infekční bronchitidy), SARS-CoV a MERS-CoV společně s P29 došlo k signifikantní inhibici MTázové aktivity o více než 50 %. Pro účinnost P29 v buňkách bylo nutné spojit P29 s proteinem Tat z HIV (TP29), neboť Tat umožnil přechod peptidu přes cytoplazmatickou membránu. Buněčná kultura byla infikována kmenem A59 viru MHV (MHV-A59) a jednu hodinu po infekci byl přidán TP29. Analýza po 20 hodinách ukázala o 80 % nižší titer viru oproti kontrole. Autoři si myslí, že peptid inhibuje formaci nsp10-nsp16, což vede k deficienci čepiček na RNA a tudíž inhibice replikace genomu. Bez čepičky následně nedochází k řádné translaci a cytosolické receptory mRNA s čepičkou 0 spustí buněčnou odpověď v podobě produkce interferonu. Výhodou použití TP29 je fakt, že cílí na strukturu, která je specifická pro koronavirový nsp16. Díky tomu by léčba měla mít málo nežádoucích účinků.

6. Závěr

MTázy nsp14 a nsp16 hrají klíčovou roli v životním cyklu SARS-CoV-2, neboť zajišťují metylaci RNA za vzniku čepičky 1. Ta hraje klíčovou roli v translaci mRNA, ochraně RNA před degradací a rozpoznáním cytosolickými receptory vrozené imunity.

SAM-dependentní MTázy tvoří velkou rodinu buněčných enzymů, které zajišťují metylaci širokého spektra sloučenin. Ačkoliv MTázy nemají konzervovanou primární strukturu, jejich sekundární struktura je konzervovaná a nejtypičtějším motivem je Rossmannův záhyb.

Nsp14 je bifunkční enzym s N7-MTázovou a exonukleázovou aktivitou. Interaguje s nsp10, ale tato interakce je nezbytná pouze pro funkci ExoN domény. Velmi zajímavou vlastností nsp14 je to, že supersekundární struktura katalytického jádra neodpovídá typickým strukturám známých MTáz. Nsp16 disponuje 2'-O-MTázovou aktivitou a pro funkci vyžaduje interakci s nsp10, jež tuto MTázu stabilizuje. Oproti nsp14 má tento enzym katalytické jádro odpovídající kanonickému Rossmannovu záhybu.

V současné době je k dispozici pouze velmi omezený počet léčiv určených pro léčbu COVID-19, jenž je způsoben virem SARS-CoV-2. Koronavirové MTázy se dostaly do popředí farmaceutického výzkumu až minulý rok, nicméně studium inhibitorů MTáz flavivirů probíhá již dlouho. Ačkoliv mají tyto skupiny virů odlišnou strukturu MTáz, lze se inspirovat podobnými úseky, které sdílí (např. kavitou nad SAM-vazebným místem). Díky vysoké evoluční zachovalosti SAM-vazebného místa u koronavirů a částečné podobnosti s flaviviry se vývoj širokospektrálního antivirotika zdá možný.

Řada výzkumných skupin publikovala data *in silico* analýzy širokého spektra sloučenin a výsledky těchto studií lze využít při návrhu nových antivirotik. Na základě rozsáhlého výzkumu Borchardt a kol. ze 70. let minulého století víme, jak reagují lidské methyltraferázy COMT, PNMT, HMT a HIOMT na jednotlivé modifikace SAM. Ačkoliv se jedná o limitovaný vzorek MTáz, dávají nám alespoň částečnou představu, co lze očekávat.

Vzhledem k aktuálnosti tématu lze očekávat řadu nových informací v blízké budoucnosti, jež upřesní naše současné znalosti a umožní vývoj nových antivirotik.

7. Zdroje

1. Agostini, M. L., Andres, E. L., Sims, A. C., Graham, R. L., Sheahan, T. P., Lu, X., ... & Denison, M. R. (2018). Coronavirus susceptibility to the antiviral remdesivir (GS-5734) is mediated by the viral polymerase and the proofreading exoribonuclease. *MBio*, 9(2).
2. Ahmed-Belkacem, R., Ortiz, P. S., Decroly, E., Vasseur, J. J., & Debart, F. (2019). Synthesis of adenine dinucleosides 2', 5'-bridged by sulfur-containing linkers as bisubstrate SAM analogues for viral RNA 2'-O-methyltransferases. *European Journal of Organic Chemistry*, 2019(38).
3. Ahmed-Belkacem, R., Sutto-Ortiz, P., Guiraud, M., Canard, B., Vasseur, J. J., Decroly, E., & Debart, F. (2020). Synthesis of adenine dinucleosides SAM analogs as specific inhibitors of SARS-CoV nsp14 RNA cap guanine-N7-methyltransferase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 201, 112557.
4. Ahola, T., & Ahlquist, P. (1999). Putative RNA capping activities encoded by brome mosaic virus: methylation and covalent binding of guanylate by replicase protein 1a. *Journal of Virology*, 73(12), 10061-10069.
5. *Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.
6. Bangs, J. D., Crain, P. F., Hashizume, T., McCloskey, J. A., & Boothroyd, J. C. (1992). Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *Journal of Biological Chemistry*, 267(14), 9805-9815.
7. Baric, R. S., Nelson, G. W., Fleming, J. O., Deans, R. J., Keck, J. G., Casteel, N., & Stohlman, S. A. (1988). Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: implications for viral transcription. *Journal of Virology*, 62(11), 4280-4287.
8. Bayati, A., Kumar, R., Francis, V., & McPherson, P. S. (2021). SARS-CoV-2 infects cells after viral entry via clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100306.
9. Becares, M., Pascual-Iglesias, A., Nogales, A., Sola, I., Enjuanes, L., & Zuñiga, S. (2016). Mutagenesis of coronavirus nsp14 reveals its potential role in modulation of the innate immune response. *Journal of Virology*, 90(11), 5399-5414.
10. Bélanger, F., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E., & Pelletier, J. (2010). Characterization of hMTr1, a human Cap1 2'-O-ribose methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 285(43), 33037-33044.
11. Benghiat, E., Crooks, P. A., Goodwin, R., & Rottman, F. (1986). Inhibition of vaccinia RNA guanine 7-methyltransferase by compounds designed as multisubstrate adducts. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(2), 142-145.
12. Boal, A. K., Grove, T. L., McLaughlin, M. I., Yennawar, N. H., Booker, S. J., & Rosenzweig, A. C. (2011). Structural basis for methyl transfer by a radical SAM enzyme. *Science*, 332(6033), 1089-1092.
13. Borchardt, R. T., & Wu, Y. S. (1974a). Potential inhibitors of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. 1. Modification of the amino acid portion of S-adenosylhomocysteine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 17(8), 862-868.
14. Borchardt, R. T., & Wu, Y. S. (1975). Potential inhibitors of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. 3. Modifications of the sugar portion of S-adenosylhomocysteine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 18(3), 300-304.

15. Borchardt, R. T., Huber, J. A., & Wu, Y. S. (1974b). Potential inhibitors of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. 2. Modification of the base portion of S-adenosylhomocysteine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 17(8), 868-873.
16. Borchardt, R. T., Huber, J. A., & Wu, Y. S. (1976). Potential inhibitors of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. 4. Further modifications of the amino acid and base portions of S-adenosyl-L-homocysteine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 19(9), 1094-1099.
17. Borchardt, R. T., Wu, Y. S., & Wu, B. S. (1978). Potential inhibitors of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. 7. Role of the ribosyl moiety in enzymatic binding of S-adenosyl-L-homocysteine and S-adenosyl-L-methionine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 21(12), 1307-1310.
18. Bouvet, M., Debarnot, C., Imbert, I., Selisko, B., Snijder, E. J., Canard, B., & Decroly, E. (2010). In vitro reconstitution of SARS-coronavirus mRNA cap methylation. *PLoS Pathog*, 6(4), e1000863.
19. Bouvet, M., Imbert, I., Subissi, L., Gluais, L., Canard, B., & Decroly, E. (2012). RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(24), 9372-9377.
20. Brecher, M., Chen, H., Liu, B., Banavali, N. K., Jones, S. A., Zhang, J., ... & Li, H. (2015). Novel broad spectrum inhibitors targeting the flavivirus methyltransferase. *PLoS One*, 10(6), e0130062.
21. Cantoni, G. L. (1952). The nature of the active methyl donor formed enzymatically from l-methionine and adenosinetriphosphate, 2. *Journal of the American Chemical Society*, 74(11), 2942-2943.
22. Cao, B., Wang, Y., Wen, D., Liu, W., Wang, J., Fan, G., ... & Wang, C. (2020). A trial of lopinavir–ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19. *New England Journal of Medicine*.
23. Clinicaltrials.gov (n.d.). Search of: Covid19 - List Results - ClinicalTrials.gov. [online] Dostupné na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Covid19&term=&cntry=&state=&city=&dist=> [Datum přístupu: 1. 5. 2021].
24. Coppola, J. A., Field, A. S., & Luse, D. S. (1983). Promoter-proximal pausing by RNA polymerase II in vitro: transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(5), 1251-1255.
25. Cordero, B., Gómez, V., Platero-Prats, A. E., Revés, M., Echeverría, J., Cremades, E., ... & Alvarez, S. (2008). Covalent radii revisited. *Dalton Transactions*, (21), 2832-2838.
26. Coward, J. K., & Sweet, W. D. (1972). Analogs of S-adenosylhomocysteine as potential inhibitors of biological transmethylation. Synthesis and biological activity of homocysteine derivatives bridged to adenine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 15(4), 381-384.
27. Daffis, S., Szretter, K. J., Schriewer, J., Li, J., Youn, S., Errett, J., ... & Diamond, M. S. (2010). 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*, 468(7322), 452-456.
28. Davis, M., Dudman, N. P. B., & White, H. F. (1983). The synthesis of the N-methyl analogue of S-adenosylmethionine; NMR observation of diastereomers. *Australian Journal of Chemistry*, 36(8), 1623-1627.
29. Decroly, E., Debarnot, C., Ferron, F., Bouvet, M., Coutard, B., Imbert, I., ... & Canard, B. (2011). Crystal structure and functional analysis of the SARS-coronavirus RNA cap 2'-O-methyltransferase nsp10/nsp16 complex. *PLoS Pathog*, 7(5), e1002059.

30. Decroly, E., Imbert, I., Coutard, B., Bouvet, M., Selisko, B., Alvarez, K., ... & Canard, B. (2008). Coronavirus nonstructural protein 16 is a cap-0 binding enzyme possessing (nucleoside-2' O)-methyltransferase activity. *Journal of Virology*, *82*(16), 8071-8084.
31. Desrosiers, R., Friderici, K., & Rottman, F. (1974). Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *71*(10), 3971-3975.
32. Domingo, E., & Perales, C. (2019). Viral quasispecies. *PLoS genetics*, *15*(10), e1008271.
33. Eckerle, L. D., Becker, M. M., Halpin, R. A., Li, K., Venter, E., Lu, X., ... & Denison, M. R. (2010). Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog*, *6*(5), e1000896.
34. Eckerle, L. D., Lu, X., Sperry, S. M., Choi, L., & Denison, M. R. (2007). High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exonuclease mutants. *Journal of Virology*, *81*(22), 12135-12144.
35. Encinar, J. A., & Menendez, J. A. (2020). Potential drugs targeting early innate immune evasion of SARS-coronavirus 2 via 2'-O-methylation of viral RNA. *Viruses*, *12*(5), 525.
36. Ensinger, M. J., & Moss, B. (1976). Modification of the 5'terminus of mRNA by an RNA (guanine-7)-methyltransferase from HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry*, *251*(17), 5283-5291.
37. Eskier, D., Suner, A., Oktay, Y., & Karakülah, G. (2020). Mutations of SARS-CoV-2 nsp14 exhibit strong association with increased genome-wide mutation load. *PeerJ*, *8*, e10181.
38. *Fenwick, M. K., & Ealick, S. E. (2018). Towards the structural characterization of the human methyltransferase. *Current Opinion in Structural Biology*, *53*, 12-21.
39. Ferron, F., Subissi, L., De Morais, A. T. S., Le, N. T. T., Sevajol, M., Gluais, L., ... & Imbert, I. (2018). Structural and molecular basis of mismatch correction and ribavirin excision from coronavirus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(2), E162-E171.
40. *Fontecave, M., Atta, M., & Mulliez, E. (2004). S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends in Biochemical Sciences*, *29*(5), 243-249.
41. Freistadt, M. S., Cross, G. A., Branch, A. D., & Robertson, H. D. (1987). Direct analysis of the mini-exon donor RNA of *Trypanosoma brucei*: detection of a novel cap structure also present in messenger RNA. *Nucleic Acids Research*, *15*(23), 9861-9879.
42. Furuichi, Y., LaFiandra, A., & Shatkin, A. J. (1977). 5'-Terminal structure and mRNA stability. *Nature*, *266*(5599), 235-239.
43. Furuichi, Y., Morgan, M., Shatkin, A. J., Jelinek, W., Salditt-Georgieff, M., & Darnell, J. E. (1975). Methylated, blocked 5 termini in HeLa cell mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *72*(5), 1904-1908.
44. Furuichi, Y., Muthukrishnan, S., Tomasz, J., & Shatkin, A. J. (1976). Mechanism of formation of reovirus mRNA 5'-terminal blocked and methylated sequence, m7GpppGmpC. *Journal of Biological Chemistry*, *251*(16), 5043-5053.
45. Gana, R., Rao, S., Huang, H., Wu, C., & Vasudevan, S. (2013). Structural and functional studies of S-adenosyl-L-methionine binding proteins: a ligand-centric approach. *BMC Structural Biology*, *13*(1), 1-14.
46. Glick, J. M., Ross, S., & Leboy, P. S. (1975). S-adenosylhomocysteine inhibition of three purified tRNA methyltransferases from rat liver. *Nucleic Acids Research*, *2*(10), 1639-1652.
47. Gordon, D. E., Jang, G. M., Bouhaddou, M., Xu, J., Obernier, K., White, K. M., ... & Krogan, N. J. (2020). A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*, *583*(7816), 459-468.

48. Haan, C. A., & Rottier, P. J. (2005). Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 64, 165-230.
49. Hager, J., Staker, B. L., Bügl, H., & Jakob, U. (2002). Active site in RrmJ, a heat shock-induced methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41978-41986.
50. Hagler, J., & Shuman, S. (1992). A freeze-frame view of eukaryotic transcription during elongation and capping of nascent mRNA. *Science*, 255(5047), 983-986.
51. Haline-Vaz, T., Silva, T. C. L., & Zanchin, N. I. (2008). The human interferon-regulated ISG95 protein interacts with RNA polymerase II and shows methyltransferase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(4), 719-724.
52. Hamill, R. L., & Hoehn, M. M. (1973). A9145, a new adenine-containing antifungal antibiotic I. Discovery and isolation. *The Journal of Antibiotics*, 26(8), 463-465.
53. *Hartenian, E., Nandakumar, D., Lari, A., Ly, M., Tucker, J. M., & Glaunsinger, B. A. (2020). The molecular virology of coronaviruses. *Journal of Biological Chemistry*, 295(37), 12910-12934.
54. He, R., Adonov, A., Traykova-Adonova, M., Cao, J., Cutts, T., Grudesky, E., ... & Li, X. (2004). Potent and selective inhibition of SARS coronavirus replication by aurintricarboxylic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(4), 1199-1203.
55. Hodel, A. E., Gershon, P. D., & Quijcho, F. A. (1998). Structural basis for sequence-nonspecific recognition of 5'-capped mRNA by a cap-modifying enzyme. *Molecular Cell*, 1(3), 443-447.
56. Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., ... & Hartmann, G. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*, 314(5801), 994-997.
57. Chapman, T. M., McGavin, J. K., & Noble, S. (2003). Tenofovir disoproxil fumarate. *Drugs*, 63(15), 1597-1608.
58. ChemDraw (Professional 16.0). (2017). [Počítačový program]. PerkinElmer. <https://perkinelmerinformatics.com/>
59. Chen, H., Liu, L., Jones, S. A., Banavali, N., Kass, J., Li, Z., ... & Li, H. (2013). Selective inhibition of the West Nile virus methyltransferase by nucleoside analogs. *Antiviral Research*, 97(3), 232-239.
60. Chen, Y., Cai, H., Xiang, N., Tien, P., Ahola, T., & Guo, D. (2009). Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3484-3489.
61. Chen, Y., Su, C., Ke, M., Jin, X., Xu, L., Zhang, Z., ... & Guo, D. (2011). Biochemical and structural insights into the mechanisms of SARS coronavirus RNA ribose 2'-O-methylation by nsp16/nsp10 protein complex. *PLoS Pathog*, 7(10), e1002294.
62. Chen, Y., Tao, J., Sun, Y., Wu, A., Su, C., Gao, G., ... & Guo, D. (2013). Structure-function analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA cap guanine-N7-methyltransferase. *Journal of Virology*, 87(11), 6296-6305.
63. Cho, E. J., Takagi, T., Moore, C. R., & Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes & Development*, 11(24), 3319-3326.
64. Chouhan, B. P. S., Maimaiti, S., Gade, M., & Laurino, P. (2018). Rossmann-fold methyltransferases: taking a “β-Turn” around their cofactor, S-adenosylmethionine. *Biochemistry*, 58(3), 166-170.
65. *Issur, M., Picard-Jean, F., & Bisailon, M. (2011). The RNA capping machinery as an anti-infective target. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2(2), 184-192.

66. Ivanov, K. A., & Ziebuhr, J. (2004). Human coronavirus 229E nonstructural protein 13: characterization of duplex-unwinding, nucleoside triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities. *Journal of Virology*, 78(14), 7833-7838.
67. Izaurralde, E., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E., & Mattaj, I. W. (1992). A cap binding protein that may mediate nuclear export of RNA polymerase II-transcribed RNAs. *The Journal of Cell Biology*, 118(6), 1287-1295.
68. Jain, R., Butler, K. V., Coloma, J., Jin, J., & Aggarwal, A. K. (2017). Development of a S-adenosylmethionine analog that intrudes the RNA-cap binding site of Zika methyltransferase. *Scientific Reports*, 7(1), 1-8.
69. Jin, X., Chen, Y., Sun, Y., Zeng, C., Wang, Y., Tao, J., ... & Guo, D. (2013). Characterization of the guanine-N7 methyltransferase activity of coronavirus nsp14 on nucleotide GTP. *Virus Research*, 176(1-2), 45-52.
70. Khailany, R. A., Safdar, M., & Ozaslan, M. (2020). Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Reports*, 19, 100682
71. Klein, S., Cortese, M., Winter, S. L., Wachsmuth-Melm, M., Neufeldt, C. J., Cerikan, B., ... & Chlanda, P. (2020). SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nature Communications*, 11(1), 1-10.
72. Konarska, M. M., Padgett, R. A., & Sharp, P. A. (1984). Recognition of cap structure in splicing in vitro of mRNA precursors. *Cell*, 38(3), 731-736.
73. Kozbial, P. Z., & Mushegian, A. R. (2005). Natural history of S-adenosylmethionine-binding proteins. *BMC Structural Biology*, 5(1), 1-26.
74. Krafcikova, P., Silhan, J., Nencka, R., & Boura, E. (2020). Structural analysis of the SARS-CoV-2 methyltransferase complex involved in RNA cap creation bound to sinefungin. *Nature Communications*, 11(1), 1-7.
75. Langberg, S. R., & Moss, B. (1981). Post-transcriptional modifications of mRNA. Purification and characterization of cap I and cap II RNA (nucleoside-2'-)-methyltransferases from HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry*, 256(19), 10054-10060.
76. Lim, S. P., Sonntag, L. S., Noble, C., Nilar, S. H., Ng, R. H., Zou, G., ... & Shi, P. Y. (2011). Small molecule inhibitors that selectively block dengue virus methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 286(8), 6233-6240.
77. *Liu, Z., Ebadi, A., Toughani, M., Mert, N., & Vessally, E. (2020). Direct sulfonamidation of (hetero) aromatic C-H bonds with sulfonyl azides: a novel and efficient route to N-(hetero) aryl sulfonamides. *RSC Advances*, 10(61), 37299-37313.
78. Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., ... & Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565-574.
79. Luzhkov, V. B., Selisko, B., Nordqvist, A., Peyrane, F., Decroly, E., Alvarez, K., ... & Åqvist, J. (2007). Virtual screening and bioassay study of novel inhibitors for dengue virus mRNA cap (nucleoside-2' O)-methyltransferase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(24), 7795-7802.
80. Ma, Y., Wu, L., Shaw, N., Gao, Y., Wang, J., Sun, Y., ... & Rao, Z. (2015). Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14–nsp10 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(30), 9436-9441.

81. *Martin, J. L., & McMillan, F. M. (2002). SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(6), 783-793.
82. Martin, W. R., & Cheng, F. (2020). Repurposing of FDA-approved toremifene to treat COVID-19 by blocking the Spike glycoprotein and NSP14 of SARS-CoV-2. *Journal of Proteome Research*, 19(11), 4670-4677.
83. Mato, J., Alvarez, L., Ortiz, P., & Pajares, M. A. (1997). S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacology & Therapeutics*, 73(3), 265-280.
84. Milani, M., Mastrangelo, E., Bollati, M., Selisko, B., Decroly, E., Bouvet, M., ... & Bolognesi, M. (2009). Flaviviral methyltransferase/RNA interaction: structural basis for enzyme inhibition. *Antiviral Research*, 83(1), 28-34.
85. Minskaia, E., Hertzog, T., Gorbalenya, A. E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B., & Ziebuhr, J. (2006). Discovery of an RNA virus 3'→ 5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(13), 5108-5113.
86. Morales, P., Curtis, N. L., Zárate, S. G., Bastida, A., & Bolanos-Garcia, V. M. (2020). Interfering with mRNA Methylation by the 2' O-Methyltransferase (NSP16) from SARS-CoV-2 to Tackle the COVID-19 Disease. *Catalysts*, 10(9), 1023.
87. Muthukrishnan, S., Both, G. W., Furuichi, Y., & Shatkin, A. J. (1975). 5'-Terminal 7-methylguanosine in eukaryotic mRNA is required for translation. *Nature*, 255(5503), 33-37.
88. Ogando, N. S., Zevenhoven-Dobbe, J. C., van der Meer, Y., Bredenbeek, P. J., Posthuma, C. C., & Snijder, E. J. (2020). The enzymatic activity of the nsp14 exoribonuclease is critical for replication of MERS-CoV and SARS-CoV-2. *Journal of Virology*, 94(23).
89. Otava, T., Šála, M., Li, F., Fanfrlík, J., Devkota, K., Pakarian, P., ... & Nencka, R. (2021). The Structure-Based Design of SARS-CoV-2 Nsp14 Methyltransferase Ligands Yields Nanomolar Inhibitors. *ChemRxiv. Preprint. 14075408. v1.*
90. Panagopoulos, P., Petrakis, V., Panopoulou, M., Trypsianis, G., Penlioglou, T., Pnevmatikos, I., & Papazoglou, D. (2020). Lopinavir/ritonavir as a third agent in the antiviral regimen for SARS-CoV-2 infection. *Journal of Chemotherapy*, 1-5.
91. Perry, R. P., & Kelley, D. E. (1976). Kinetics of formation of 5' terminal caps in mRNA. *Cell*, 8(3), 433-442.
92. Petrossian, T. C., & Clarke, S. G. (2011). Uncovering the human methyltransferasome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(1), M110-000976.
93. Pichlmair, A., Lassnig, C., Eberle, C. A., Gónna, M. W., Baumann, C. L., Burkard, T. R., ... & Superti-Furga, G. (2011). IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nature Immunology*, 12(7), 624-630.
94. Pillutla, R. C., Yue, Z., Maldonado, E., & Shatkin, A. J. (1998). Recombinant human mRNA cap methyltransferase binds capping enzyme/RNA polymerase IIo complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(34), 21443-21446.
95. Pugh, C. S., Borchardt, R. T., & Stone, H. O. (1978). Sinefungin, a potent inhibitor of virion mRNA (guanine-7-)-methyltransferase, mRNA (nucleoside-2'-)-methyltransferase, and viral multiplication. *Journal of Biological Chemistry*, 253(12), 4075-4077.
96. Rasmussen, E. B., & Lis, J. T. (1993). In vivo transcriptional pausing and cap formation on three Drosophila heat shock genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), 7923-7927.

97. Ray, D., Shah, A., Tilgner, M., Guo, Y., Zhao, Y., Dong, H., ... & Shi, P. Y. (2006). West Nile virus 5'-cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylations by nonstructural protein 5. *Journal of Virology*, 80(17), 8362-8370.
98. Rimbach, K., Kaiser, S., Helm, M., Dalpke, A. H., & Eigenbrod, T. (2015). 2'-O-Methylation within bacterial RNA acts as suppressor of TLR7/TLR8 activation in human innate immune cells. *Journal of Innate Immunity*, 7(5), 482-493.
99. Romano, M., Ruggiero, A., Squeglia, F., Maga, G., & Berisio, R. (2020). A structural view of SARS-CoV-2 RNA replication machinery: RNA synthesis, proofreading and final capping. *Cells*, 9(5), 1267.
100. Rosas-Lemus, M., Minasov, G., Shuvalova, L., Inniss, N. L., Kiryukhina, O., Brunzelle, J., & Satchell, K. J. (2020). High-resolution structures of the SARS-CoV-2 2'-O-methyltransferase reveal strategies for structure-based inhibitor design. *Science Signaling*, 13(651).
101. Sanjuán, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., & Belshaw, R. (2010). Viral mutation rates. *Journal of Virology*, 84(19), 9733-9748.
102. Santos, F. R., Lima, W. G., Maia, E. H., Assis, L. C., Davyt, D., Taranto, A. G., & Ferreira, J. M. (2020). Identification of a potential Zika Virus inhibitor targeting NS5 methyltransferase using virtual Screening and molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(2), 562-568.
103. Selvaraj, C., Dinesh, D. C., Panwar, U., Abhirami, R., Boura, E., & Singh, S. K. (2020). Structure-based virtual screening and molecular dynamics simulation of SARS-CoV-2 Guanine-N7 methyltransferase (nsp14) for identifying antiviral inhibitors against COVID-19. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-12.
104. Shannon, A., Le, N. T. T., Selisko, B., Eydoux, C., Alvarez, K., Guillemot, J. C., ... & Canard, B. (2020). Remdesivir and SARS-CoV-2: Structural requirements at both nsp12 RdRp and nsp14 Exonuclease active-sites. *Antiviral Research*, 178, 104793.
105. Schwalm, E. L., Grove, T. L., Booker, S. J., & Boal, A. K. (2016). Crystallographic capture of a radical S-adenosylmethionine enzyme in the act of modifying tRNA. *Science*, 352(6283), 309-312.
106. Smith, E. C., Blanc, H., Vignuzzi, M., & Denison, M. R. (2013). Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: evidence for proofreading and potential therapeutics. *PLoS Pathog*, 9(8), e1003565.
107. *Spagnolo, J. F., & Hogue, B. G. (2000). Host protein interactions with the 3' end of bovine coronavirus RNA and the requirement of the poly (A) tail for coronavirus defective genome replication. *Journal of Virology*, 74(11), 5053-5065.
108. Sripati, C. E., Groner, Y., & Warner, J. R. (1976). Methylated, blocked 5'termini of yeast mRNA. *Journal of Biological Chemistry*, 251(10), 2898-2904.
109. Tao, Z., Cao, R., Yan, Y., Huang, G., Lv, K., Li, W., ... & Liu, M. (2018). Design, synthesis and in vitro anti-Zika virus evaluation of novel Sinefungin derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 157, 994-1004.
110. Tazikeh-Lemeski, E., Moradi, S., Raoufi, R., Shahlaei, M., Janlou, M. A. M., & Zolghadri, S. (2020). Targeting SARS-COV-2 non-structural protein 16: a virtual drug repurposing study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-14.
111. Vijayan, V., Pant, P., Vikram, N., Kaur, P., Singh, T. P., Sharma, S., & Sharma, P. (2020). Identification of promising drug candidates against NSP16 of SARS-CoV-2 through computational drug repurposing study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-15.

112. Viswanathan, T., Arya, S., Chan, S. H., Qi, S., Dai, N., Misra, A., ... & Gupta, Y. K. (2020). Structural basis of RNA cap modification by SARS-CoV-2. *Nature Communications*, *11*(1), 1-7.
113. Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Velesler, D. (2020). Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, *181*(2), 281-292.
114. Wang, Y., Sun, Y., Wu, A., Xu, S., Pan, R., Zeng, C., ... & Guo, D. (2015). Coronavirus nsp10/nsp16 methyltransferase can be targeted by nsp10-derived peptide in vitro and in vivo to reduce replication and pathogenesis. *Journal of Virology*, *89*(16), 8416-8427.
115. Wang, Z., Chen, X., Lu, Y., Chen, F., & Zhang, W. (2020). Clinical characteristics and therapeutic procedure for four cases with 2019 novel coronavirus pneumonia receiving combined Chinese and Western medicine treatment. *Bioscience Trends*.
116. Wei, C. M., Gershowitz, A., & Moss, B. (1975). Methylated nucleotides block 5' terminus of HeLa cell messenger RNA. *Cell*, *4*(4), 379-386.
117. Werner, M., Purta, E., Kaminska, K. H., Cymerman, I. A., Campbell, D. A., Mitra, B., ... & Bujnicki, J. M. (2011). 2'-O-ribose methylation of cap2 in human: function and evolution in a horizontally mobile family. *Nucleic Acids Research*, *39*(11), 4756-4768.
118. World Health Organization. (n.d.). *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. World Health Organization. <https://covid19.who.int/>.
119. Yamada-Okabe, T., Doi, R., Shimmi, O., Arisawa, M., & Yamada-Okabe, H. (1998). Isolation and characterization of a human cDNA for mRNA 5'-capping enzyme. *Nucleic Acids Research*, *26*(7), 1700-1706.
120. Yan, L., Ge, J., Zheng, L., Zhang, Y., Gao, Y., Wang, T., ... & Lou, Z. (2021). Cryo-EM structure of an extended SARS-CoV-2 replication and transcription complex reveals an intermediate state in cap synthesis. *Cell*, *184*(1), 184-193.
121. Yao, H., Song, Y., Chen, Y., Wu, N., Xu, J., Sun, C., ... & Li, S. (2020). Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus. *Cell*, *183*(3), 730-738.
122. Zhao, Y., Soh, T. S., Lim, S. P., Chung, K. Y., Swaminathan, K., Vasudevan, S. G., ... & Luo, D. (2015). Molecular basis for specific viral RNA recognition and 2'-O-ribose methylation by the dengue virus nonstructural protein 5 (NS5). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(48), 14834-14839.
123. Zheng, S., Hausmann, S., Liu, Q., Ghosh, A., Schwer, B., Lima, C. D., & Shuman, S. (2006). Mutational analysis of *Encephalitozoon cuniculi* mRNA cap (guanine-N7) methyltransferase, structure of the enzyme bound to sinefungin, and evidence that cap methyltransferase is the target of sinefungin's antifungal activity. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(47), 35904-35913.
124. Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., ... & Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, *579*(7798), 270-273.
125. Zhou, T., Tsybovsky, Y., Gorman, J., Rapp, M., Cerutti, G., Chuang, G. Y., ... & Kwong, P. D. (2020). Cryo-EM structures of SARS-CoV-2 spike without and with ACE2 reveal a pH-dependent switch to mediate endosomal positioning of receptor-binding domains. *Cell Host & Microbe*, *28*(6), 867-879.
126. Zhou, X., Michal, J. J., Zhang, L., Ding, B., Lunney, J. K., Liu, B., & Jiang, Z. (2013). Interferon induced IFIT family genes in host antiviral defense. *International Journal of Biological Sciences*, *9*(2), 200.
127. Zúñiga, S., Sola, I., Moreno, J. L., Sabella, P., Plana-Durán, J., & Enjuanes, L. (2007). Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology*, *357*(2), 215-227.

128. Züst, R., Cervantes-Barragan, L., Habjan, M., Maier, R., Neuman, B. W., Ziebuhr, J., ... & Thiel, V. (2011). Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nature Immunology*, 12(2), 137.

* sekundární citace