Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program Biochemie

Studijní obor Biochemie

Pavel Novotný

Studium proteas virů Zika a Dengue

Analysis of Zika and Dengue virus proteases

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Konzultantka: RNDr. et PharmDr. Taťána Majerová, Ph.D.

Praha, 2019

Charles University

Faculty of Science

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

Místo a datum: Podpis:

Rád bych na tomto místě poděkoval všem, kteří mají zásluhu na vzniku této práce. Především bych chtěl poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc., své konzultantce RNDr. et PharmDr. Taťáně Majerové, Ph.D. a RNDr. Milanovi Kožíškovi, Ph.D. za poskytnutí flavonoidních inhibitorů a plodnou diskuzi. Také bych chtěl poděkovat celému laboratornímu týmu za vytvoření výborných pracovních podmínek.

Abstrakt

Zika a Dengue jsou flaviviry šířící se v lidských populacích obývající tropické oblasti skrze komáří mezihostitele. Flaviviry způsobují horečky, které se mohou v případě Dengue rozvinout až do život ohrožující hemorrhagické formy. Existuje možná souvislost mezi těhotnými ženami nakaženými virem Zika a zvýšeným rizikem vzniku mikrocefalie u novorozenců. Flavivirové horečky se v dnešní době léčí hlavně symptomaticky, nicméně je zde snaha o vývoj látek blokující životní cyklus virů a jejich šíření v organismu. Vhodným cílem takových látek jsou specifické virové enzymy, například flavivirová proteasa. Tato serinová proteasa chymotrypsinového typu je tvořena heterodimerem flavivirových nestrukturních proteinů NS2B a NS3. Doména NS3 obsahuje také helikasu, tu je však možné pro studii samotné proteasy rekombinantně odstranit. Protein NS2B je transmembránový, s doménou NS3 však interaguje pouze hydrofilní, 40 aminokyselinový peptid. Ten funguje jako chaperon a podílí se na vazbě substrátu v aktivním místě. V této práci bylo studováno šest variant rekombinantních proteinů obsahující aktivační peptid NS2B a proteasovou doménu NS3. Tyto proteiny byly exprimovány a purifikovány. Čtyři varianty byly charakterizovány v enzymologických studiích, včetně testování možných inhibitorů. Toto testování odhalilo inhibici variant Zika proteas dipeptidem navrženým jako analog substrátu proteasy viru Dengue.

Abstract in English

Zika and Dengue flaviviruses are transmitted by mosquitoes in human populations living in tropical areas. They cause fevers which in the case of Dengue can lead to life threatening haemorrhagic form. There is a possible relationship between pregnant women being infected by Zika virus and higher risk of microcephaly in new-borns. The infection is currently treated mainly symptomatically. However, there is an effort to develop compounds which block viral life cycle and viral spread through organism. Viral enzymes, such as flaviviral proteases, are regarded as suitable targets for this effort. These serine proteases with chymotrypsin fold are heterodimers which consist of flaviviral non-structural proteins NS2B and NS3. NS3 domain also contains a helicase, which can be removed by gene recombination for study purposes. NS2B is a transmembrane protein, but only a hydrophilic 40 amino acid peptide is important for the interaction with NS3 domain. This peptide has a chaperon function and participates in substrate binding to the active site. In this study, six variants of recombinant proteins containing activating peptide of NS2B and protease domain of NS3 were expressed and purified. Four variants were characterized in enzymologic studies including testing of possible inhibitors. A dipeptide formally prepared as inhibitor of Dengue protease active site was identified as Zika protease inhibitor as well. (in Czech)

Obsah:

Abstrakt 4

Abstract in English 5

Seznam zkratek: 8

1 Úvod 1

1.1 Flaviviry Zika a Dengue 1

1.2 Nemoci spojené s flaviviry 3

1.3 Prevence a léčba flavivirových onemocnění 5

1.4 Flavivirový heterodimerní enzym NS2B-NS3 7

1.5 Inhibitory virových proteas 11

1.5.1 Inhibitory Dengue proteasy 11

1.5.2 Inhibitory Zika proteasy 12

2 Cíle práce 13

3 Použité chemikálie a přístroje 14

4 Metody 16

4.1 Příprava expresních vektorů 16

4.1.1 Transformace plasmidové DNA 16

4.2 Exprese a purifikace virových proteas 16

4.2.1 Exprese fúzních proteinů 16

4.2.2 Lyze bakterií 17

4.2.3 Purifikace na Ni-NTA 17

4.2.4 Dialýza a štěpení TEV proteasou 17

4.2.5 Purifikace iontově výměnnou chromatografií 17

4.2.6 Purifikace pomocí gelové permeační chromatografie 18

4.2.7 Proteinová elektroforéza 18

4.2.8 Barvení gelu stříbrem 19

4.3 Měření enzymové aktivity 19
4.3.1 Fluorometrické stanovení aktivity flavivirových proteas 19
4.4 Vyhodnocování získaných dat a použití softwaru 20
4.4.1 Použitý software 20
4.4.2 Měření enzymové kinetiky 20
4.4.3 Vyhodnocování inhibice proteolytické reakce 21
5 Výsledky 23
5.1 Exprese proteas ve formě fúzních proteinů 23
5.2 Purifikace fúzních proteinů 26
5.2.1 Varianty se štěpným místem pro TEV proteasu mezi doménami NS2B a NS3 31
5.3 Charakterizace dvojice enzym-substrát 32
5.3.1 Stanovení Michaelisovy konstanty 33
5.3.2 Stanovení katalytické konstanty k_{cat} 34
5.4 Testování potenciálních inhibitorů proteas 36
5.4.1 Dimethylsulfoxid 36
5.4.2 Inhibitory serinových a aspartátových proteas 37
5.4.3 Flavonoidy 38
5.4.4 Inhibitor aktivního místa proteasy viru Dengue MH-ZD1 40
6 Diskuze 42
7 Závěr 47
Použitá literatura: 49

Seznam zkratek:

+ssRNA	pozitivní jednořetězcová RNA (z angl. single strand RNA)
ADE	zesílení závislé na protilátkách (z angl. antibody dependent enhancement)
Akt	proteinkinasa B (zkratka z anglického výrazu thymomas of AKR mice)
APS	peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulphate)
ATPasa	adenosin trifosfatasa
AXL	tyrosin-protein kinasový receptor UFO (podle genu UFO, z angl. unidentified function), využívaný flaviviry pro vstup do buněk
bp	pár nukleotidových bází
BPTI	aprotinin (z angl. bovine pancreatic trypsine inhibitor)
C	kapsidový protein flavivirů (z angl. capsid)
CD-14	receptor makrofágů využívaný flaviviry (z angl. cluster of differenciation 14)
CYD-TDV	tetravalentní vakcína proti viru Dengue tvořená chimérickým virem žluté zimnice a Dengue (z angl. chimeric yellow fever virus-Dengue virus tetravalent Dengue vaccine)
DC-SIGN	receptor dendritických buněk využívaný flaviviry (z angl. dendritic cell specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin)
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTPs	směs deoxyribonukleotid trifosfátů
DHF	hemorrhagická horečka dengue (z angl. Dengue haemorrhagic fever)
DSS	Dengue šokový syndrom
E	obálkový glykoprotein flavivirů (z angl. envelope)
ER	endoplasmatické retikulum
FPLC	kapalinová chromatografie sloužící k rychlému čištění proteinů (z angl. fast protein liquid chromatography)
FRET	Försterův resonanční přenos energie (z angl. Förster resonance energy transfer)
GAPDH	glyceraldehydfosfát dehydrogenasa (z angl. glyceraldehydphosphate dehydrogenase)
GRP78/BiP	membránový chaperon využívaný flaviviry (z angl. glucose-regulating protein 78/binding immunoglobulin protein)

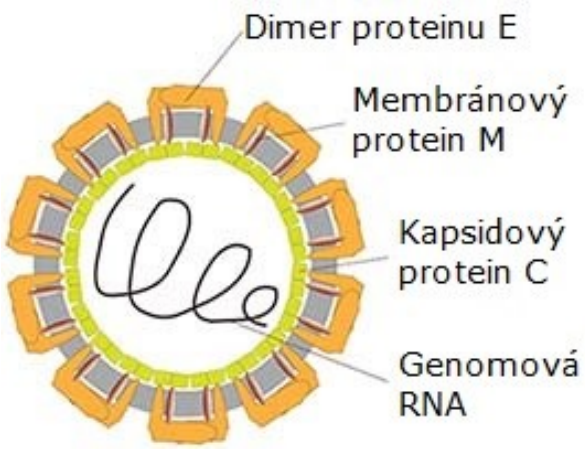
HisTag	histidinová afinitní kotva, tzn. obvykle 6 nebo 10 histidinových zbytků spojených kovalentní peptidovou vazbou (z angl. histidine tag)
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid
JAK1	Janusova kinasa 1
M	membránový protein flavivirů (z angl. membrane)
MAVS	mitochondriální antivirový signalizační protein
MTasa	methyltransferasa
mTOR	savčí serin/threoninová kinasa důležitá pro růst organismu (z angl. mammalian target of rapamycin)
NSx	nestrukturní protein flavivirů (x = 1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B, 5)
OD	optická hustota (z angl. optical density)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid (z angl. phenylmethylsulfonyl fluoride)
RdRp	RNA-dependentní RNA-polymerasa
RIG-I	z angl. retinoic acid-inducible gene I, enzym hostitelské buňky blokovaný proteiny Zika
RLR	z angl. RIG-I like receptor
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. sodium dodecylsulphate)
SDS-PAGE	gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s využitím dodecylsulfátu sodného (z angl. sodium dodecylsulphate – polyakrylamid gel electrophoresis)
STING	z angl. stimulator of interferon genes
TAE	Tris-acetát-EDTA – používaný pufr (40 mM Tris.HCl, 20 mM kyselina octová, 1 mM kyselina ethylendiamintetraoctová)
TBK1	TANK-vázající kinasa 1 (z angl. TANK (gen kódující NFκB aktivátory z rodiny TRAF) binding kinase 1)
TEMED	N,N,N‘,N‘-tetramethylethylen-1,2-diamin
TEV	virus leptané tabákové mozaiky (z angl. Tobacco etch virus)

1 Úvod

1.1 Flaviviry Zika a Dengue

V této práci byly studovány proteasy virů Zika a Dengue. Tyto viry jsou zástupci rodu *Flavivirus*, kam se řadí také virus žluté zimnice, viry klíšťových encefalitid nebo virus západonilské horečky [1]. Jsou to obalené viry z čeledi *Flaviviridae*, kam patří i veterinárně významný virový rod *Pestivirus* či rod lidských patogenů *Hepacivirus*, mezi něž patří virus hepatitidy C.

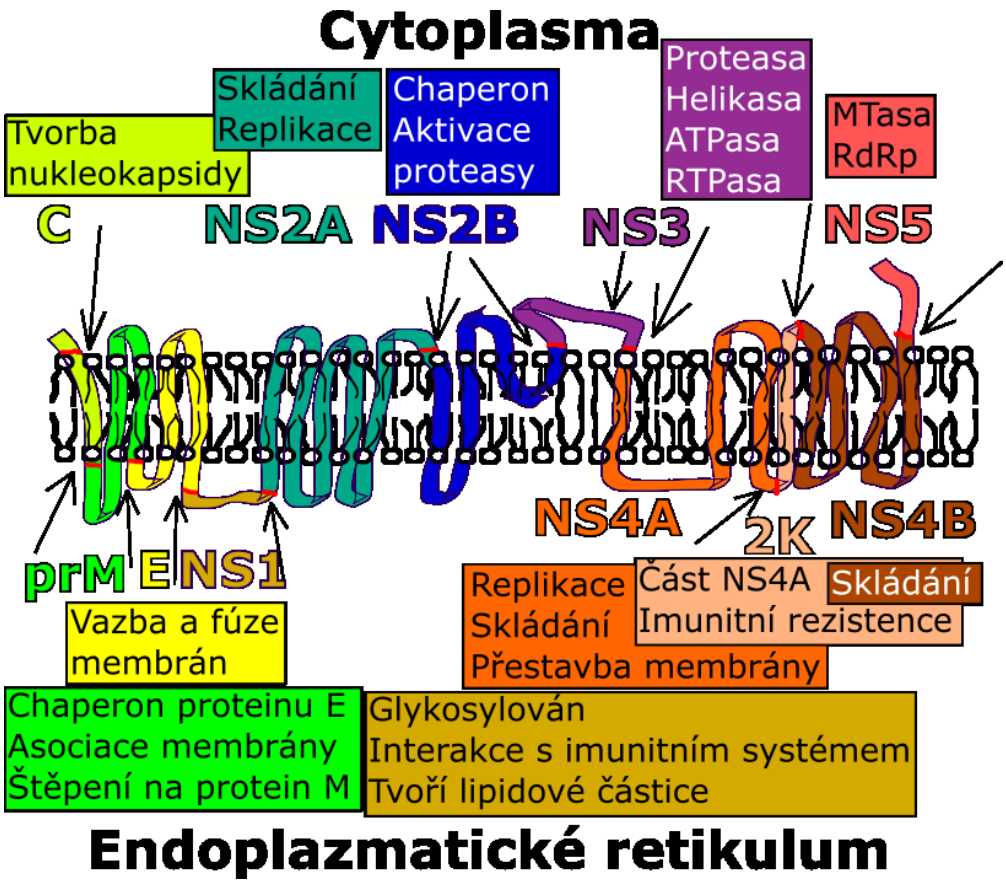
Virion flavivirů je tvořen lipidovou dvojvrstvou, do které je vnořen glykoprotein E (z angl. envelope – obálka) společně s transmembránovým proteinem M (z angl. membrane). Kapsida je vystavěna z proteinu C (z angl. capsid) v komplexu s jednořetězcovou pozitivní RNA (+ssRNA) [2]. Stavba virové částice je znázorněna na obr. 1.



Obr. 1: Stavba flavivirové částice. Pod obálkovým proteinem E asociovaným na membránu skrze membránový protein M je vystavěna virová kapsida z proteinu C ukrývající +ssRNA (převzato a upraveno z [3]).

Flaviviry vstupují do hostitelských buněk receptory zprostředkovanou endocytózou. Virus Dengue využívá širokou škálu receptorů, například receptor dendritických buněk DC-SIGN (z angl. dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin) [4], makrofágový receptor CD-14 [5] nebo membránový chaperon GRP78/BiP (z angl. glucose-regulating protein 78/binding immunoglobulin protein) [6]. Kyselé prostředí endosomu spouští přestavbu virionu a fúzi virové a buněčné membrány. Tím je virová částice rozvolněna a do cytoplasmy se dostává virová RNA, která může být

přepsána na negativní vlákno a poté zpět na pozitivní nebo slouží jako templát pro tvorbu virového polyproteinu hostitelským translačním aparátem [7]. Nově syntetizovaný virový polyprotein je propleten membránou endoplasmatického retikula (ER). Na vnitřní straně ER je štěpen hostitelskými proteasami a na cytosolické virovou proteasou na tři strukturní proteiny (C, E, prM) a sedm nestrukturních proteinů s různou funkcí (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) [8, 9]. Jejich funkce a membránová orientace polyproteinu je vyobrazena na obr. 2.



Obr. 2: Membránová orientace flavivirového polyproteinu s vyobrazenými štěpnými místy a funkcemi jednotlivých produktů štěpení. MTasa = methyltransferasa, RdRp = RNA-dependentní RNA-polymerasa. Vytvořeno pro [10] a upraveno.

Na membráně endoplasmatického retikula se štěpené proteiny skládají v nezralou virovou částici, která dozrává při transportu přes Golgiho aparát štěpením proteinu prM na M hostitelskou proteasou furin. Infekční viriony jsou z buňky vyloučeny exocytózou [7].

1.2 Nemoci spojené s flaviviry

Nákaza virem Dengue je často asymptomatická [11]. Pokud se projeví, tak jako kopřivka či horečnaté onemocnění s mírným průběhem, vyskytnout se může i bolest svalů [12]. Může se však rozvinout až do hemorrhagické formy ohrožující život, kdy dochází k rozsáhlému krvácení až k orgánovému selhání [13–15]. Při nákaze virem Zika zůstává 60–80 % případů asymptomatických, zbylá procenta se projevují zvýšenou teplotou, bolestí kloubů či vyrážkou, která se z obličeje postupně rozšiřuje po celém těle [16, 17]. Nemoci způsobené flaviviry mají tedy podobný průběh, odhadnout původce nemoci můžeme dle místa, kde k nákaze došlo [17]. Spolehlivější metodou je RT-PCR [18] nebo stanovení pomocí protilátek, kde je však omezující podobná reaktivita protilátek proti obalovým proteinům Dengue a Zika [19].

Většina flavivirů je přenášených komáry nebo klíšťaty, řadí se tak mezi arboviry [2]. Nejvýznamnějším zástupcem virů přenášenými klíšťaty je virus klíšťové encefalitidy (TBEV, z angl. tick-borne encephalitis virus), který se vyskytuje v mírném pásu, od pobřeží západní Evropy až po Japonsko [20]. Flaviviry přenášené komáry jsou doménou tropických oblastí, nicméně občas se infekce vyskytne i jinde, většinou v souvislosti s cestováním z postižených oblastí. Některé flaviviry se sporadicky přenášejí i v mírném pásmu komáry (např. Usutu virus napadající ptáky [21] nebo virus západonilské horečky (WNV, z angl. West Nile virus) na jižní Moravě [22]). Viry Dengue a Zika, jejichž proteiny jsou studovány v této práci, jsou výhradně přenášeny komáry rodu *Aedes* [23, 24]. Tento komár má původ v tropických oblastech, jeho sporadický výskyt je však znám i v Evropě [25]. Navzdory sporadickému výskytu tohoto komára je datována epidemie Dengue ve 20. letech 20. století v Řecku [15] či menší lokální výskyt v roce 2010 ve Francii [26]. Před nákazou virem Zika vinou rozšíření komárů *Aedes* následkem globálního oteplování v Evropě varovala Světová zdravotnická organizace v roce 2016 [27].

První ze zkoumaných virů, Zika, byl objeven v Ugandě roku 1947 [23]. První větší výskyt je však datován na rok 2007, kdy byla propukla epidemie v africkém Gabonu a na ostrově Spojených států Mikronézie Yap [28, 29], později (2013) ve Francouzské polynézii [16].

V Brazílii (2015) byla epidemie největší a v souvislosti s ní bylo poukázáno na možnou souvislost s mikrocefalií novorozenců a Guillain-Barrého syndromem [30].

Ukazuje se, že ne ve všech případech těhotenství s nákazou virem Zika se vyskytne defekt, záleží nejspíše na dalších faktorech [31, 32]. Virus napadá radiální glie v mozku prostřednictvím receptoru AXL [33], dále neurální progenitorové buňky a fibroblasty [34]. Virový NS5 protein blokuje TBK1 (TANK-vázající kinasu 1, z angl. TANK-binding kinase), důležitou pro mitotickou, apoptickou i imunní signalizaci a produkci interferonu 1 [35–37], jehož indukce může být dále zablokována mutovaným NS1 proteinem [38]. NS4A protein blokuje signalizaci pomocí RLR (z angl. RIG-I (z angl. retinoic acid-inducible gene I) like receptor) a MAVS (mitochondriální antivirový signalizační protein) a společně s NS2B blokuje dráhu Akt-mTOR důležitou při vývoji gliových buněk a neuronů [39, 40]. Dále bylo prokázáno štěpení hostitelských proteinů STING a JAK1 virovou proteasou [41, 42]. Všechny tyto děje jsou pathogenní a mohou přispívat ke vzniku mikrocefalie, i když onemocnění je pravděpodobně multifaktoriální.

Druhým zkoumaným virem v této práci je virus Dengue. První písemné zmínky o horečkách Dengue (jakožto „kloubních horečkách“) jsou z asijského ostrova Jakarta a egyptské Káhiry, kde nemoc propukla na konci 18. století [9, 43]. Největší popsané epidemie však proběhly ve 20. letech 20. století v USA (postiženo 1 až 2 miliony lidí), Řecku a Austrálii a dále ve 40. letech v Japonsku [9, 44]. Nyní se rozlišují čtyři sérotypy, které se vyskytují v tropických oblastech Ameriky, Asie a Afriky [45, 46].

Molekulární podstata onemocnění je dána interakcemi virových proteinů s hostitelskými a ovlivnění některých biochemických drah důležitých pro organismus. Protein NS3 viru Dengue reaguje s hostitelskou GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa), čímž zabraňuje glykolýze, a vede k akumulaci intermediátů glykolýzy, především glyceraldehyd-3-fosfátu [47]. Virus Dengue také způsobuje relokalizaci synthasy mastných kyselin do místa replikace viru [48] a ohýbá membránu pomocí NS4A, čímž ustanovuje vlastní replikační komplex, omezuje tím však metabolismus hostitelské buňky [49]. Avšak nejvíce interaguje s buňkami strukturní protein E, který je zodpovědný za vazbu na receptory, způsobuje hemaglutinaci erythrocytů a brání virus před imunitním systémem [12]. Dengue virus také může vstupovat do mozku a způsobovat encefalitidu

[50]. Velkým problémem je nákaza člověka vyléčeného z nemoci způsobené jedním sérotypem viru Dengue sérotypem odlišným. B lymfocyty tak produkují protilátky, které nejsou schopny virus neutralizovat, ale vážou se na jeho povrch. Opsonizovaný virus se snadno dostává do makrofágů, uniká z fagosomu a množí se. Tento zhoršený průběh onemocnění se nazývá ADE (z angl. Antibody Dependent Enhancement, zesílení závislé na protilátkách). Zejména u malých dětí tak souvisí sekundární nákaza s projevem nemoci známým jako tzv. DSS (z angl. Dengue shock syndrom) [51].

1.3 Prevence a léčba flavivirových onemocnění

Proti viru Zika zatím neexistuje vakcína, proto je nejúčinnější prevencí nákazy vyhýbání se hmyzím vektorům šířícím virus a také vyhýbání se oblastem jejich zvýšeného výskytu [52]. Vakcíny jsou nicméně intenzivně vyvíjeny [53, 54]. I přes to, že nemoc se v současné době léčí symptomaticky, jsou usilovně vyvíjena virostatika cíleně bránící viru Zika v expanzi v hostitelském organismu. Podporují imunitní systém pacienta, cílí na hostitelské biochemické dráhy důležité pro životní cyklus viru nebo blokují specifické virové proteiny. Imunitní systém například podporují interferony, po jejich podání se zdravotní stav pacientů zlepšuje [55]. Důležitým procesem pro množení virů je jejich vstup do buněk. Pokud by se tento mechanismus zablokoval, virus se nemůže dále množit a onemocnění nemusí vůbec propuknout. Tyto inhibiční vlastnosti byly zjištěny u flavonoidů baicalein, baicalin [56] a isokvercitrin [57]. Vstupu virionů do buněk také zamezují anorganické polyoxometaláty [58] či peptidové inhibitory [59]. Blokátory vstupu byly též objeveny testováním knihoven nízkomolárních látek [60]. Virus potřebuje pro svoji replikaci dostatek vhodných nukleotidtrifosfátů. Inhibice hostitelské inosinmonofosfát dehydrogenasy, zprostředkující jejich přeměnu, množení viru blokuje [61]. Další skupinou léků, které by mohly být použity na různé cílové molekuly důležité pro virus, jsou látky, které již byly schváleny k užívání, ale jsou používány k léčení jiných chorob. Pokud by byly odhaleny jejich funkce v blokaci viru Zika, mohlo by být jejich používání převedeno do praxe rychleji než používání látek zcela nových, které by bylo potřeba vyvíjet a testovat. Dobrým cílem inhibice životního cyklu viru jsou virové enzymy vzniklé štěpením polyproteinu, NS5 protein [62, 63] a NS3 protein [64, 65]. Proti

helikasové doméně proteinu NS3 viru Zika byl úspěšně testován inhibitor RNA polymerasy z HCV Sofosbuvir [66]. Inhibiční vlastnosti dalších látek blokujících NS5 RNA polymerasu příbuzného viru hepatitidy C byly studovány *in silico* [67]. Testována byla i léčiva jiných, nepříbuzných chorob [68–70].

Vakcína proti Dengue v uspokojivé formě také neexistuje, nicméně jsou zde jisté požadavky na to, jaké by měla mít vlastnosti. Měla by být tetravalentní, tzn. pokrývat všechny čtyři sérotypy tohoto viru, kvůli komplikacím při nákaze jiným sérotypem vinou ADE efektu. Dále by měla být bezpečná pro děti od 9 do 12 měsíců, což je riziková skupina, kterou nejčastěji postihují nejhorší projevy nemoci. Taková vakcína byla vyvíjena [71–75]. Výsledkem těchto snah je vakcína CYD-TVD [76] s licencí k plošnému použití, která však také není ideální. Při testování této vakcíny v postižených oblastech bylo zjištěno, že tato látka spolehlivě nechrání organismus proti sérotypu DENV-2, což může být způsobeno lišícími se mutacemi antigenu ve vakcíně a antigenu vyskytujícího se na povrchu viru ve zkoumané geografické oblasti [77]. Látka také není vhodná pro osoby, které infekci ještě neprodělaly, jelikož u nich po vakcinaci hrozí horší průběh onemocnění v případě styku s virem [78]. Látka se doporučuje podávat osobám, které již virem Dengue nakaženy byly. První nákaza bývá asymptomatická či je spojená s nízkou horečkou, hemorrhagická forma se většinou vyvine po druhé nákaze virem, proto má smysl tuto látku podávat pouze séropozitivním pacientům. Další vyvíjené vakcíny jsou TV003 [79] a TAK-003 [80]. Tyto látky jsou vyvíjeny s použitím antigenu prM/E. Dalším antigenem využívaným ve vakcínách je NS1 [81, 82]. Při nasazení vakcíny je třeba vzít v potaz fakt, že organismus dříve vystavený viru Zika je náchylnější k nákaze virem Dengue, vakcína tak může působit neadekvátně v oblastech, kde se oba tyto arboviry vyskytují zároveň [83]. Organismus vystavený nejprve viru Dengue a pak viru Zika však reaguje standardně [84].

Horečka Dengue a její projevy (DHF, DSS) se, podobně jako Zika, léčí zatím pouze symptomaticky [85]. Nicméně je snaha i o vývoj antivirotik zabraňující množení tohoto viru v hostitelském organismu. Jako jeden ze zdrojů potenciálních inhibitorů virových enzymů slouží i v tomto inhibitory proti jiným příbuzným virům, např. proti viru hepatitidy C. Testováním vlivu látek z těchto knihoven vůči enzymům viru Dengue byly

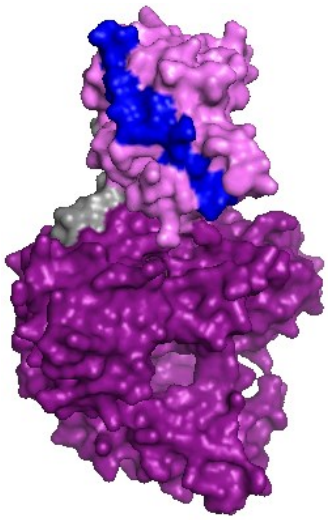
právě objeveny výše zmíněné inhibitory RNA-dependentní RNA-polymerasy (RdRp) z domény NS5 [86–90], z nichž některé jsou právě společné s virem hepatitidy C. Z léčiv nepříbuzných chorob byl proti flavivirům účinný například ivermectin, který je původně vyvinut jak antihelminticum [91]. Dále se podařilo inhibovat ATPasovou doménu proteinu NS3 [92, 93] a s ní úzce spjatou helikasovou domény tohoto proteinu [94]. Potenciálně využitelnými látkami jsou látky vázající se na E protein [95, 96] nebo látky zabraňující interakci methyltransferasy a helikasy [97, 98]. Studie vazeb nízkomolekulárních látek a proteinů odhalily vazbu inhibitoru Q63 na RdRp doménu [99] či methyltransferasu [100] NS5 proteinu, pro který byly nalezeny i další inhibitory vázající se na jiná místa [101–103]. Využitím znalosti aktivních míst a alosterických vazebných míst virových proteinů byly navrženy látky, které by se mohly vázat na tato místa, konkrétně byly testovány látky vázající NS5 protein [104–106] a C protein [107]. Řada inhibitorů byla navržena *in silico* [87, 108–112], a to nejen pro NS5 protein, ale i pro helikasovou doménu NS3 proteinu [113]. V neposlední řadě sloužily ke zjištění blokátorů životního cyklu viru Dengue pokusy na buněčných liniích [114–129] a pokusy s analogy nukleosidů [130–133].

Velmi atraktivním cílem antivirové terapie je, jak se ukázalo při vývoji léčiv onemocnění způsobených hepatitidou C či HIV, virová proteasa [134, 135]. Proteasovou aktivitu v případě virů Zika a Dengue vykazuje heterodimer NS2B-NS3. I to je jeden z důvodů, proč je zajímavé tento enzym zkoumat.

1.4 Flavivirový heterodimerní enzym NS2B-NS3

Jedním z virových enzymů je heterodimer NS2B-NS3. Tento enzym vykazuje proteasovou, helikasovou, ATPasovou a RNA 5‘-trifosfatasovou aktivitu. Protein NS3 lze na základě struktury a enzymové aktivity rozdělit na dvě domény: na N-konci lze rozpoznat proteasovou doménu a na C-konci helikasovou doménu vykazující také všechny zbylé zmíněné enzymové aktivity. Obě funkční domény lze rekombinantně připravit odděleně, aniž by ztratily na funkčnosti. Proteasa však vyžaduje pro svoji aktivitu NS2B [136]. NS2B protein má na svém N-konci dvě transmembránové šroubovice a na svém C-konci jednu doménu zakotvenou v membráně. Mezi nimi je 40

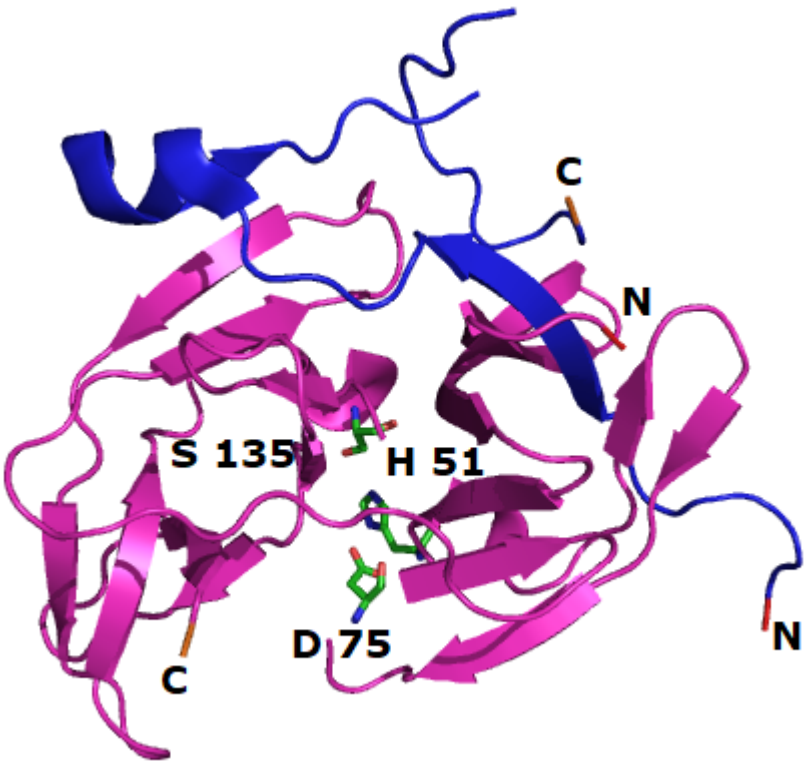
aminokyselinový hydrofilní peptid, který interaguje s NS3, a to s proteasovou doménou. Prvních 20 aminokyselin od N-konce funguje jako chaperon, pomáhá zaujmout správnou konformaci proteasy. Druhých dvacet aminokyselin participuje v aktivním místě proteasy [137]. Celý protein je znázorněn na obrázku 3 na následující straně.



Obr. 3: Flavivirový heterodimer NS2B-NS3 (DENV4) [138]. Horní, světle fialová doména je proteasová doména NS3 obalená aktivačním 40 aminokyselinovým peptidem NS2B v modré barvě. Spodní, tmavě fialová doména vykazuje helikasovou, ATPasovou a RNA 5'-trifosfatasovu aktivitu. Šedě je vyobrazena 10 aminokyselinová spojka, která nezaujímá strukturně důležitou funkci pro žádný z enzymů, ale zprostředkovává interakci mezi oběma doménami. Struktura byla obarvena v programu PyMOL, v PDB je uvedena pod kódem 2VBC.

Jak již bylo řečeno v kapitole 1.1, proteasa je důležitá pro maturaci virové částice, a to kvůli štěpení polyproteinu na jednotlivé funkční proteiny, včetně proteasy samotné.

Proteasa viru Zika i proteasa viru Dengue se řadí mezi serinové proteasy. Aktivní místo, které se nalézá na proteinu NS3, obsahuje katalytické zbytky serin 135, histidin 51 a aspartát 75. NS3 protein stabilizovaný hydrofilním 40 aminokyselinovým peptidem z NS2B zaujímá strukturu podobnou chymotrypsinu [137]. Aktivační peptid je mezi flaviviry silně konzervovaný [139]. I v NS3 proteasové doméně lze u obou flavivirů nalézt podobné prvky. Proteiny obou virů jsou tvořeny dvěma β-barely, mezi nimiž se nachází katalytická triáda. Oba β-barely jsou tvořeny šesti β-listy, přičemž mezi třetím a čtvrtým β-listem se nachází α-helix [140] (Obr. 4 na následující straně).



Obr. 4: Struktura proteasy viru Dengue 2 (v PDB pod kódem 2FOM) [141]. Fialově je znázorněn protein NS3, modře pak NS2B aktivační peptid. Oranžově jsou zvýrazněny oba konce NS3 proteinu a jsou i popsány. Stejně jsou značeny a popsány konce NS2B aktivačního peptidu. Katalytická triáda proteasy je popsána a obarvena dle atomů v reziduích, které jsou vykresleny. Obrázek byl pořízen v aplikaci PyMOL.

Pokud enzym není v komplexu se substrátem či inhibitorem, zaujímá tzv. otevřenou konformaci. To znamená, že struktura NS2B je rozvolněna a nemá rigidní strukturu. Po vazbě substrátu či inhibitoru aktivního místa se však aktivační peptid ovine kolem NS3 a zaujme své místo v aktivním místě [142, 143]. Po rozštěpení polyproteinu nemá NS3 transmembránovu doménu, NS3 je však držen u membrány ER právě pomocí proteinu NS2B, který má 3 transmembránové domény [144]. Dalšími důvody, proč se enzym vyskytuje jako heterodimer, můžou být jeho rozdílné funkce v buňce. Samotný NS3 protein bez svého aktivačního peptidu váže synthasu mastných kyselin, což má pozitivní efekt pro udržení replikačního komplexu [145].

Proteasa štěpí substráty s bazickými aminokyselinami [146–149]. Výsledkem reakce jsou dva produkty, z nichž jeden má na svém C-konci kombinace aminokyselin Arg-Arg, Arg-Lys, Lys-Arg nebo Gln-Arg a druhý na N-konci obsahuje Gly, Ala nebo Ser. Typickým substrátem je tak například sekvence Lys-Thr-Gly-Lys-Arg-Ser-Gly, což je štěpné místo

nacházející se mezi NS2B a NS3 proteinem viru Zika. Proteasa vytváří mezi argininem a serinem [149].

Proteasová a helikasová doména je spojena kovalentně desetiaminokyselinovou spojkou, takto je propojen C-konec proteasy a N-konec helikasy (obr. 3 na str. 8). Tyto aminokyseliny se přímo nepodílejí na jednotlivých enzymových aktivitách, mohou však mít důležitý vliv na správnou enzymovou funkci helikasové domény zprostředkováváním elektrostatických interakcí [150].

Helikasová doména hraje důležitou roli při replikaci virové genetické informace. Je součástí replikačního komplexu, kde interaguje s NS5 proteinem [151]. Helikasová aktivita je spojena s ATPasovou aktivitou, energie uvolněná během hydrolýzy ATP je využita pro rozplétání dvouvláknové RNA vzniklé během replikace [152]. Dvouvláknová RNA vzniká z jednovláknového templátu neseného virem pomocí RNA dependentní RNA polymerasy proteinu NS5 [153]. Právě ta je rozplétána helikasou a na budoucí genomové pozitivní jednovláknové RNA je tvořena čepička společnou aktivitou enzymů NS3 a NS5 [151]. RNA 5'-trifosfatasová aktivita NS3 zajišťuje odštěpení jednoho ze tří fosfátů na 5' konci této RNA [154] a guanylyl transferasa proteinu NS5 pak z GTP odštěpuje pyrofosfát a guanylyl monofosfát připojuje k 5' konci RNA [155]. Následná dvojitá methylace první (postreplikačně připojený guanin) a druhé báze je zprostředkována methyltransferasou NS5 proteinu [156].

V této práci je studována pouze proteasová doména obou flavivirů. Ke zkoumání proteolytické aktivity tato doména zcela postačuje (aminokyselinové zbytky 1-177 NS3). Ke správné funkci však vyžaduje aktivační peptid (zbytky 45-96 NS2B) [138]. Proteasa viru Dengue byla nejprve připravena jako varianta s kovalentní spojkou mezi doménami [141, 157]. To znamená, že C-konec aktivačního peptidu NS2B je spojen s N-koncem NS3 proteinu kovalentně sekvencí čtyř glycinů, serinu a dalších čtyř glycinů (sekvence G_4SG_4). Výsledkem je fúzní protein, ve kterém mezi oběma proteiny není přirozené štěpné místo. Protein je exprimován jako jedna dlouhá aminokyselinová sekvence, což zabraňuje disociaci obou domén. Takové konstrukty byly později připraveny i pro proteasu viru Zika [158]. Pro virus Zika byly také studovány varianty fúzního proteinu bez kovalentní spojky se zachovaným přirozeným štěpným místem [156]. Další možnou

variantou je použití bicistronního plasmidu. V bakteriálních buňkách je tak exprimován hydrofilní fragment NS2B, tj. aktivační peptid nezávisle na NS3 a následnými nekovalentními interakcemi je složen funkční protein [160, 161].

1.5 Inhibitory virových proteas

Jak již bylo řečeno, proteasy hrají důležitou roli v životním cyklu flavivirů. Jejich inhibice tak může vést k zastavení replikace viru a je jednou z možných cest léčení flavivirových onemocnění. Cesty k vývoji proteasových inhibitorů mohou být různé: lze použít léčiva původně vyvinutá pro jiné účely, navrhnout inhibitor na základě znalosti aktivního nebo alosterického místa či náhodně testovat knihovny již připravených sloučenin a takto získané struktury posléze optimalizovat.

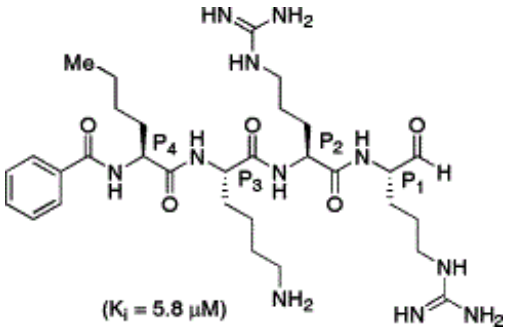
Logickým místem vazby potenciálního inhibitoru je aktivní místo. Blokováním tohoto místa je zabráněno vazbě a zpracování substrátu, proto bylo navrženo několik modifikovaných peptidů podobných substrátu schopných vázat a blokovat aktivní místo [162–167]. Aktivní místo flavivirových proteas je ploché, váže dvě bazické aminokyseliny následované malou nenabitou aminokyselinou [158], což je třeba vzít v potaz při návrhu inhibitorů cílených do aktivního místa těchto proteas. Znalosti aktivního místa lze využít i při návrhu inhibitorů *in silico* [168–172].

Před vyštěpením NS3 z polyproteinu vykazuje proteasa aktivitu také, i když značně sníženou oproti volné formě NS2B-NS3. Tato prekurzorová forma proteasy však také nabízí další možnost blokace [173]. Jinou zajímavou možností je vývoj aptamerů (oligonukleotidové sekvence vázající proteiny). Testováním knihoven aptamerů byla získána struktura, která byla úspěšně testována proti NS3 proteinu viru hepatitidy C [174].

1.5.1 Inhibitory Dengue proteasy

Pro Dengue proteasu NS2B-NS3 bylo publikováno několik inhibitorů [165, 175–184]. Funkční skupiny, které se vyskytují na těchto peptidových inhibitorech, tvoří s katalytickým serinem flavivirové proteasy kovalentní vazbu, a jsou tedy zodpovědné za

ireverzibilní inhibici. Jeden takový tetrapeptidový aldehyd inhibující aktivitu proteasy viru Dengue je vyobrazen na obr. 5 na následující straně.



Obr. 5: Aldehydový tetrapeptid užívaný k inhibici proteasy viru Dengue [167]. Inhibiční konstanta tohoto inhibitoru byla stanovena na 5,8 μM.

Obecné inhibitory serinových proteas (leupeptin, PMSF atd.) Dengue proteasu neinhibují, vyjma aprotininu [185].

Navrženy byly také nízkomolekulární inhibitory vázající se mimo aktivní místo [186], další byly získány testováním velkých knihoven různých látek [184]. Jako alosterické inhibitory byly identifikovány některé flavonoidy [187].

1.5.2 Inhibitory Zika proteasy

Proteasa viru Zika se začala studovat poměrně nedávno, proto je známo i méně inhibitorů. Navzdory tomu, že flavivirové proteasy jsou serinového typu, je proteasa viru Zika inhibována, podobně jako proteasa viru Dengue, pouze aprotininem – jiné obecné inhibitory serinových proteas nejsou schopny tyto enzymy vázat a blokovat [142]. Byly navrženy a testovány peptidové inbitory vázající aktivní místo [163, 188]. Novým přístupem je použití metalopeptidů [189]. Mimo látky vázající aktivní centrum začaly vyvíjet i látky vyhledávající jiná vazebná místa. Alosterická místa nalezená na povrchu Zika proteasy jsou vázána cyklickými peptidy, pro které byly naměřeny nanomolární inhibiční konstanty [190]. Testovány byly také i některé flavonoidy, které jsou známy, že tlumí flavivirové horečky. Flavonoid myricetin byl úspěšně testován jako inhibitor proteasy [191]. Berberin, užívaný jako potravinový doplněk, zlepšuje stav pacientů postižených horečkami způsobených virem Zika, důvodem je nejspíše inhibice proteasy [192].

2 Cíle práce

- Navrhnout možnosti purifikace šesti fúzních rekombinantních variant flavivirových proteas
- Charakterizovat purifikované enzymy metodami enzymové kinetiky
- Otestovat potenciální inhibitory flavivirových proteas

3 Použité chemikálie a přístroje

96jamková destička s rovným dnem (Greiner)

Akrylamid (Sigma-Aldrich)

Ampicilin (Biotika)

APS (Sigma-Aldrich)

BioPhotometer D30 (Eppendorf)

Bisakrylamid (Sigma-Aldrich)

Bromfenolová modř (Serva)

Emulsiflex C3 (Avestin)

Glycin (Sigma-Aldrich)

HiLoad Superdex 75 prepgrade (GE Healthcare Life Sciences)

Kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma-Aldrich)

Kyselina octová (Penta)

Milli-Q Advantage A10 (Merck Millipore)

Mono Q 5/50 GL (Sigma-Aldrich)

NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific)

Precision Plus Protein™ All Blue (Bio-Rad) marker

Quantum ST4-1100 (Vilber)

Sacharosa (Lach-ner)

SDS (Sigma-Aldrich)

Sorvall Evolution RC (Thermo Scientific)

Tecan Infinite M1000 (Tecan Group Ltd.)

TEMED (Sigma-Aldrich)

Trio 48 – Analytik Jena (Biometra)

Tris (Promega)

Tween 20 (USB Corporation)

4 Metody

4.1 Příprava expresních vektorů

Plasmidy pET-16b s genetickou informací pro expresi požadovaného fúzního proteinu byly připraveny dříve - v rámci mé bakalářské práce Příprava expresních vektorů pro produkci fúzního proteinu NS2-NS3 virů Zika a Dengue, která vznikla na Ústavu organické chemie a biochemie pod vedením doc. Jana Konvalinky.

4.1.1 Transformace plasmidové DNA

Vybraný vektor pET-16b obsahující genetickou informaci pro fúzní protein a ampicilinovou rezistenci byl transformován do bakterií *E. coli* BL21(DE3)RIL metodou tepelného šoku (z angl. heat shock). Plasmid byl přidán k roztoku s bakteriemi a směs byla ponechána na ledu po 30 min. Následně byla směs přesunuta do inkubátoru o 42 °C na 90 s. Po vyjmutí z inkubátoru a 5 min chlazení na ledu bylo ke směsi přidáno 200 µl LB média a po 1 h v 37 °C byla bakteriální směs rozetřena na agarosové plotny obsahující LB medium a ampicilin. Přes noc vyrostlé bakteriální kolonie byly očkovány do LB media obsahujícího 100 µg/ml ampicilinu (Biotika).

4.2 Exprese a purifikace virových proteas

4.2.1 Exprese fúzních proteinů

Plasmidy obsahující sekvenci pro fúzní proteiny byly pro expresi transformovány do bakterií *E. coli* BL21(DE3)RIL metodou teplotního šoku popsanou výše. Plotny s narostlými koloniemi byly setřeny a suspendovány ve sterilním LB mediu (objem 1–2 l) obsahující 100 µg/ml ampicilinu. Bakterie byly inkubovány v 37 °C po cca 2 h, průběh růstu byl sledován měřením optické hustoty (neboli OD, z angl. optical density) při vlnové délce 600 nm na spektrometru BioPhotometer D30 (Eppendorf). Po dosažení OD_{600} 0,6 – 0,8 byla indukována exprese proteinů přidáním IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid) do konečné koncentrace 1 mM. Po indukci byla teplota snížena na 20 °C po 3 h a poté na 12 °C přes noc. Druhý den byla suspenze stočena při 6000x g 10 min při 20 °C na centrifuze Thermo Scientific Sorvall Evolution RC a peleta suspendována v lyzačním pufru (50 mM Tris.HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7,6).

4.2.2 Lyze bakterií

Bakterie byly po nárůstu homogenizovány Elvehjem-Potterovým homogenizátorem a rozbity přístrojem Emulsiflex C3 (Avestin) při tlakových rázech 1100 bar. Lyzát byl stočen při 20 000x g po 20 min při 4 °C a supernatant obsahující rozpuštěné proteiny byl dále zpracován.

4.2.3 Purifikace na Ni-NTA

Všechny fúzní proteiny obsahovaly na svém N-konci histidinovou kotvu (HisTag). Proto prvním purifikačním krokem byla aplikace buněčného lyzátu na nosič s navázaným nitrilotrisacetátem chelatující nikelnatý kation (Ni-NTA), na který se histidinová kotva afinitně vázala. Po 1 h byla směs stočena, lyzát byl odstraněn (frakce FT, z angl. flow-through) a nosič s afinitně vázanými proteiny byl promyt deseti objemy (10 x 5 ml) promývacího pufru (50 mM Tris.HCl, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,6). Eluce probíhala minimálně 1 h v elučním pufru (50 mM Tris.HCl, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,6).

4.2.4 Dialýza a štěpení TEV proteasou

Proteinová frakce získaná elucí z Ni-NTA byla před dalším zpracováním dialyzována, roztok tak byl zbaven imidazolu a převeden do stejného pufru, ve kterém byla ekvilibrována chromatografická kolona pro následný purifikační krok (50 mM Tris.HCl, 14 mM β-merkaptoethanol, pH 7,6, Milli-Q voda pro iontově výměnnou chromatografii, stejný pufr s přídavkem 150 mM NaCl pro gelovou permeační chromatografii). Během dialýzy, která probíhala 24 – 72h při 4 °C, byla odštěpena afinitní kotva TEV proteasou. Po štěpení byly nepotřebné části (odštěpená histidinová kotva, zbylý, dokonale neštěpený protein s histidinovou kotvou a TEV proteasa – obsahuje také histidinovou kotvu) odstraněny navázáním na Ni-NTA (viz výše), dále zpracovávanou částí byla tentokrát frakce, která vytekla (=FT). Ta byla dále purifikována.

4.2.5 Purifikace iontově výměnnou chromatografií

Dalším purifikačním krokem byla iontově výměnná chromatografie s gradientem iontové síly. Ten byl získán použitím dvou pufrů o rozdílné koncentraci NaCl (0 M a 2 M). Zbylé složení bylo stejné: 50 mM Tris.HCl, 14 mM β-merkaptoethanol, pH 7,6, Milli-Q voda. Výměna probíhala na koloně Mono Q 5/50 GL (Sigma-Aldrich). Vzorek

byl na kolonu přiváděn systémem FPLC (z angl. fast protein liquid chromatography), frakce byly analyzovány spektrofotometricky absorbancí při vlnové délce 280 nm. Výsledné proteinové frakce byly zamraženy v 50 % glycerolu v -80 °C nebo byly rovnou použity k měření aktivity.

4.2.6 Purifikace pomocí gelové permeační chromatografie

Alternativou k iontově výměnné chromatografii byla gelová chromatografie. Využívána byla kolona HiLoad Superdex 75 prepgrade (GE Healthcare Life Sciences) s gelem na bázi dextranu. Zfiltrovaný a odvzdušněný pufr, kterým se kolona promývala, byl stejný, jako dialyzační (50 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, 14 mM β-merkaptoethanol, pH 7,6, Milli-Q voda). K aplikaci na kolonu sloužilo FPLC (kapalinová chromatografie sloužící k rychlému čištění proteinů, z angl. fast protein liquid chromatography), koncentrace proteinu byla v průběhu sledována spektrometricky při vlnové délce 280 nm.

4.2.7 Proteinová elektroforéza

K analýze průběhu purifikace byly odebírány vzorky z jednotlivých frakcí získaných po každém purifikačním kroku. Ty byly povařeny s pufrem (0,35 M Tris.HCl, 10 % (w/v) dodecylsulfát sodný (SDS), 30 % (v/v) glycerol, 0,012 % (w/v) bromfenolová modř, 4 % (v/v) β-merkaptoethanol, pH 6,8) a analyzovány metodou SDS-PAGE (gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s využitím dodecylsulfátu sodného, z angl. sodium dodecylsulphate – polyacrylamid gel electrophoresis). Používán byl 5% zaostřovací gel (0,1 % N,N‘-methylenbisakrylamid, 4,9 % akrylamid, 0,1 % SDS, 0,1 % peroxodisíran amonný (APS), 250 mM Tris.HCl pH 6,8, 13 mM N,N,N‘,N‘-tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)) a dělící 16% gel (0,5 % N,N‘-methylenbisakrylamid, 15,5 % akrylamid, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 375 mM Tris.HCl pH 8,8, 6,7 mM TEMED). Po aplikaci na gel proteiny denaturované SDS putovaly v chlazeném pufru (25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS) mezi elektrodami s napětím 200 V minimálně 1 h. K porovnání molekulových hmotností sloužil marker Precision Plus Protein™ All Blue (Bio-Rad). Gel byl následně zpracováván a barven pomocí stříbra.

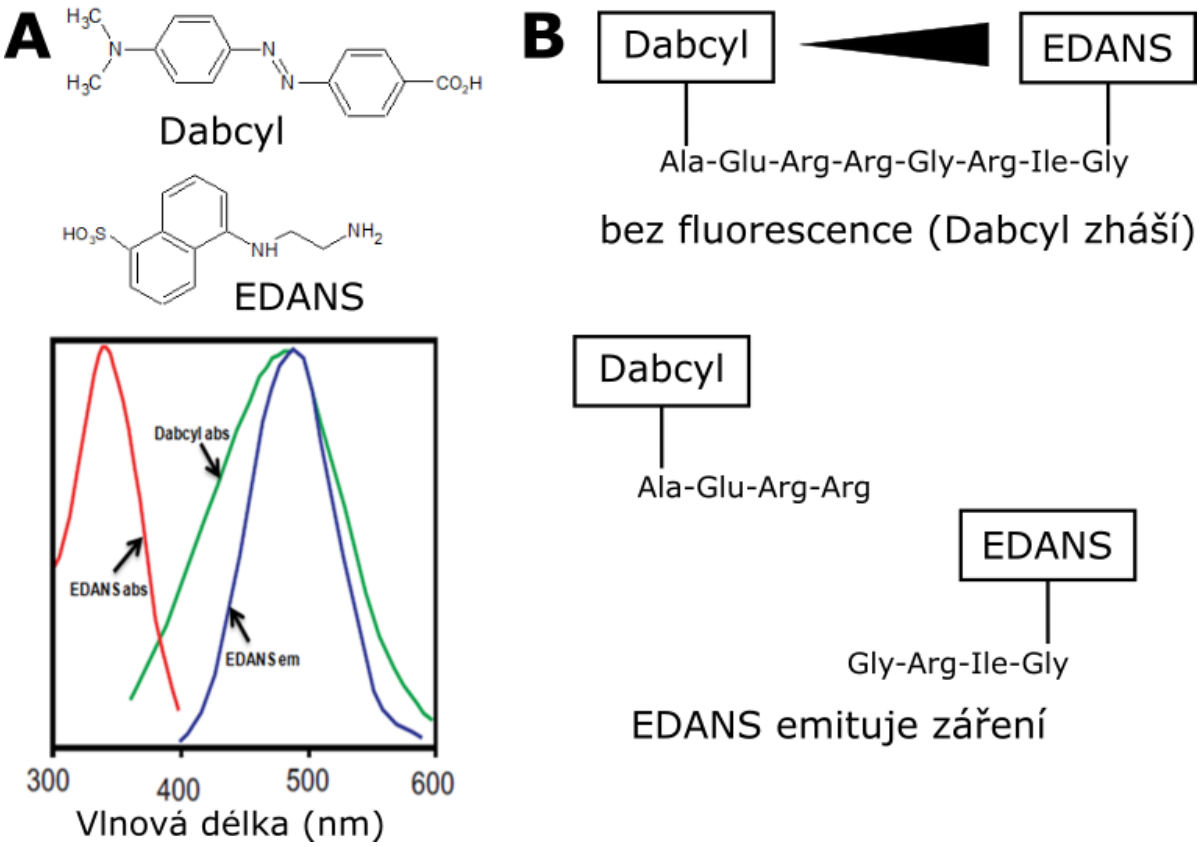
4.2.8 Barvení gelu stříbrem

Gel s rozdělenými proteiny podle jejich elektroforetické pohyblivosti byl vložen do fixačního roztoku – 12 % (v/v) kyselina octová, 50 % (v/v) methanol, 0,05 % formaldehyd). Po minimálně 30 min byl 3x promyt promývacím roztokem (50 % methanol) po 15 min. Po 1 min expozici (0,2 g/l $Na_2S_2O_3.5H_2O$) byl gel promyt destilovanou vodou, 20 min impregnován (2 g/l $AgNO_3$ 0,05 % formaldehyd), znovu promyt destilovanou vodou a vyvoláván (60 g/l Na_2CO_3, 4 mg/l $Na_2S_2O_3.5H_2O$, 0,05 % formaldehydu) do objevení elfogramu (obvykle 2 min). Gel se zobrazenými proteiny byl vyfocen a analyzován.

4.3 Měření enzymové aktivity

4.3.1 Fluorometrické stanovení aktivity flavivirových proteas

Pro stanovení aktivity proteas byl použit peptidový substrát s fluorescenční značku (EDANS, s absorpčním maximem λ_{abs}= 336 nm a emisním maximem λ_{em} = 490 nm) a zhášedlem (Dabcyl, jeho absorpční maximum se rovná emisnímu maximu EDANS, λ_{abs}=490 nm), který vycházel z dříve publikovaného substrátu optimalizovaného pro proteasu viru Dengue [193]. Štěpený peptid o sekvenci AERRGRIG byl označen na N-konci skupinou Dabcyl a na C-konci skupinou EDANS. Pokud byl peptid neporušen, fluorescence EDANS byla zhášena skupinou Dabcyl (efekt se projeví při vzdálenosti obou sloučenin 10-100 Å). Po rozštěpení proteasou a zvětšení vzdálenosti mezi sloučeninami však EDANS začne vykazovat fluorescenci. Toto chování je úměrné koncentraci štěpeného peptidu, potažmo aktivitě proteasy, kterou tak lze sledovat v čase. Měření probíhalo v černé 96jamkové destičce s rovným dnem (Greiner), která byla analyzována fluorimetrem Tecan Infinite M1000. Princip fluorescenčně značeného substrátu je znázorněn na obr. 6. Reakce probíhala v pufru obsahující 50 mM Tris.HCl o pH 9,0, 30 % (v/v) glycerol, 0,1 % Triton X-100 a Milli-Q vodu. Reakční objem byl vždy 100 µl. Reakce byla startována přidáním 3 µg příslušného enzymu. Pro testování inhibitorů byl použit 40 µM substrát. Štěpení substrátu proteasou bylo nezávisle ověřeno pomocí vysokotlakové kapalinové chromatografie na oddělení Medicinální chemie ÚOCHB.



Obr. 6: Princip fluorometrického stanovení aktivity flavivirových proteas, upraveno [194]. (A) Jako fluorescenční sonda slouží EDANS (λ_{abs}=336 nm, λ_{em}=490 nm), jako zhášedlo Dabcyl (λ_{abs}=490 nm). Jejich absorpční a emisní spektra jsou naznačena v grafu. (B) Pokud peptid není štěpen, Dabcyl zháší fluorescenci EDANS. Po rozštěpení peptidu proteasou a oddálení obou sloučenin EDANS vydává fluorescenční záření s maximem intenzity kolem 490 nm.

4.4 Vyhodnocování získaných dat a použití softwaru

4.4.1 Použitý software

K vyhodnocení dat z měření fluorescence pro stanovení Michaelisovy konstanty a titraci aktivních míst sloužil program GraFit 5.0.4 (Erithacus Software) [195]. Tabulky a grafy byly dále vyhodnocovány v programech Microsoft Excel (Microsoft) [196], GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) [197] a OriginPro 8 (OriginLab) [198]. Struktury proteinů byly zpracovány v programu PyMOL Molecular Graphics System 1.3 (Schrödinger LLC) [199].

4.4.2 Měření enzymové kinetiky

Pro charakterizaci dvojice enzym-substrát byl použit kinetický model podle Michaelise a Mentenové. Vychází se z několika předpokladů, které zjednodušují výpočet: koncentrace

substrátu je mnohem větší než koncentrace enzymu, dále se počítá pouze s přímou reakcí, tzn. koncentrace produktu je nulová a měří se počáteční rychlost reakce (systém nedospěl do rovnováhy). Předpokládá se, že koncentrace intermediátu ES se nemění v čase. Potom můžeme při výpočtech vycházet z rovnice

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P, \tag{1}$$

kde *E* je enzym, *S* je substrát, *ES* je komplex enzymu se substrátem a *P* označuje produkt. Pro počáteční rychlost reakce *v* můžeme poté psát závislost

$$v = \frac{V_{max}.[S]}{K_m + [S]}, \tag{2}$$

kde [*S*] označuje koncentraci substrátu, V_{max} maximální rychlost reakce a K_m označuje Michaelisovu konstantu, která je podílem součtu konstant přímých reakcí ($k_1 + k_2$) ku konstantě zpětné reakce k_{-1} a v praxi vyjadřuje koncentraci substrátu při průběhu reakce rychlostí $V_{max}/2$. Pro V_{max} můžeme také psát

$$V_{max} = k_{cat}.[E_t], \tag{3}$$

kde [E_t] je celková koncentrace enzymu a k_{cat} je katalytická konstanta, která se při splnění podmínek pro vztah Michaelis-Mentenové rovná k_2 a vyjadřuje, kolik molekul substrátu je přeměněno jednou molekulou enzymu za sekundu. Konstanty K_m a k_{cat} jsou specifické pro každou dvojici enzym-substrát.

4.4.3 Vyhodnocování inhibice proteolytické reakce

Průběh reakce může být zablokován inhibitory. Z hlediska průběhu můžeme inhibici dělit na kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní či smíšenou. Kompetitivní inhibitor blokuje enzym tak, že není schopen navázat substrát. Reakce tak probíhá podle rovnice

$$E + I \underset{K_i'}{\rightleftharpoons} EI, \tag{4}$$

kde *I* je inhibitor, *EI* komplex enzymu a inhibitoru a K_i' je zdánlivá inhibiční konstanta definovaná jako disociační konstanta rozpadu komplexu *EI*, tzn.

$$K_i' = \frac{[E].[I]}{[EI]}. \tag{5}$$

Zdánlivou inhibiční konstantu K_i' lze použít při výpočtu pravé inhibiční konstanty podle vztahu

$$K_i' = K_i(1 + \frac{[S]}{K_m}). \tag{6}$$

Pro inhibitory s K_i' do 10 nmol/dm^3 (inhibitory vázající se těsně) lze použít Morrisonův výnos relativní rychlosti (v_i/v_0) vůči koncentraci inhibitoru [200]. Tento výnos byl využit pro nelineární regresi programem GraFit 5.0.4 (Erithacus Software), který využívá vztah

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{[E]+[I]+K_i\left(1+\frac{[S]_0}{K_M}\right)-\sqrt{\left([E]+[I]+K_i\left(1+\frac{[S]_0}{K_M}\right)\right)^2-4[E][I]}}{2[E]}, \tag{7}$$

kde v_i je počáteční reakční rychlost pro danou koncentraci inhibitoru, v_0 je počáteční reakční rychlost pro reakci bez inhibitoru a $[S]_0$ je počáteční koncentrace substrátu. Jelikož K_M je konstantní, při neměnném $[E]$ a $[S]_0$ můžeme odečítat K_i.

Pro inhibitory, které vykazovaly K_i' nad 100 nmol/dm^3 byl použit Dixonův výnos, což je závislost reciproké hodnoty reakční rychlosti na koncentraci inhibitoru [201], tzn. vztah

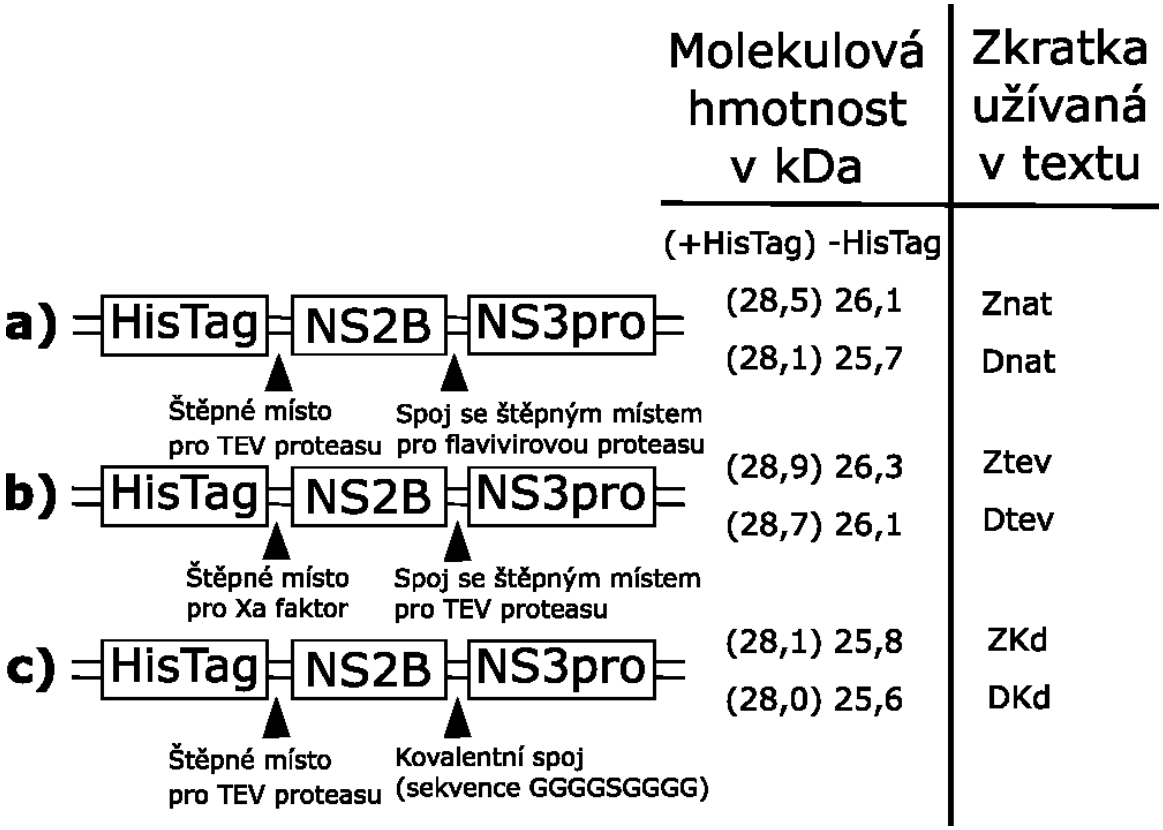
$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}[S]K_i}[I] + \frac{1+\frac{K_M}{[S]}}{V_{max}}. \tag{8}$$

5 Výsledky

5.1 Exprese proteas ve formě fúzních proteinů

Expresní plasmidy byly připraveny v rámci mé bakalářské práce s názvem Příprava expresních vektorů pro produkci fúzního proteinu NS2-NS3 virů Zika a Dengue, která vznikla na Ústavu organické chemie a biochemie pod vedením doc. Jana Konvalinky. Všechny varianty sekvencí pro fúzní protein byly klonovány do expresního vektoru pET-16b. Byly vytvořeny tři varianty virových proteas dvou různých flavivirů, Zika a Dengue typu 2 (viz obr. 7). Celá aminokyselinová sekvence je obsažena v příloze.

Všechny varianty obsahují proteasovou doménu proteinu NS3, která je na N-konci fúzována s aktivačním peptidem proteinu NS2B, tzn. 40 hydrofilních aminokyselin (viz kapitolu 1.4). Aktivační peptid a proteasová doména jsou spojeny buďto kovalentní spojkou (4x glycin, serin, 4x glycin), TEV štěpným místem nebo přirozeným štěpným místem flavivirových proteas. Použité varianty jsou znázorněny na obrázku 7 na následující straně. Všechny varianty mají na svém N-konci histidinovou kotvu (10x histidin) následovanou štěpným místem pro TEV proteasu (proteasa viru leptané tabákové mozaiky, z angl. Tobacco etch virus) nebo štěpným místem pro faktor koagulační kaskády Xa. Tato štěpná místa umožňují řízené odstranění histidinové kotvy ve vhodné fázi purifikačního procesu.

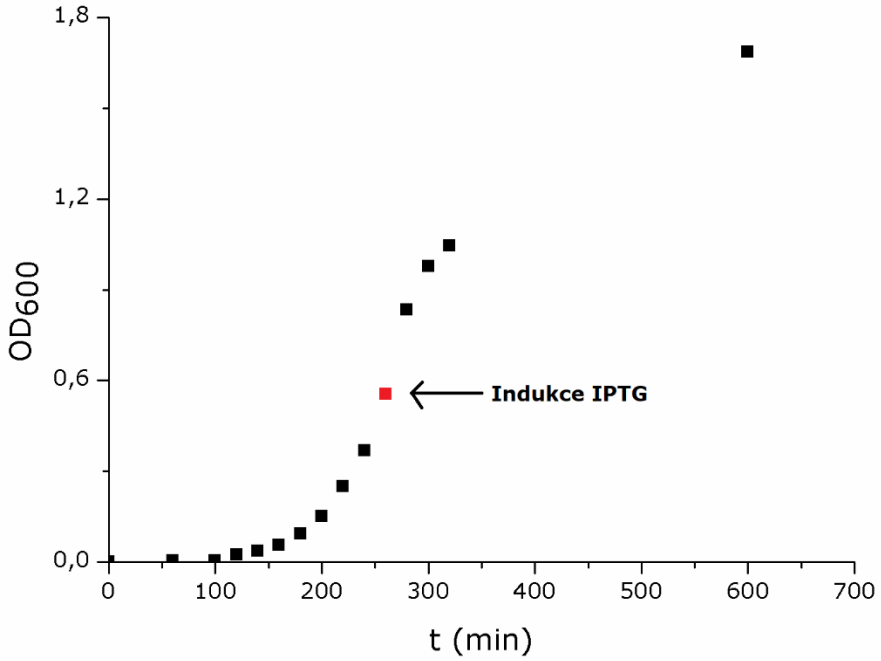


Obr. 7: Varianty fúzního proteinu charakterizované v této práci. Všechny varianty obsahují histidinovou kotvu, NS2B aktivační peptid a NS3 proteasovou doménu. Celé aminokyselinové sekvence jsou obsaženy v příloze. V pravé tabulce jsou uvedeny molekulové hmotnosti v kilodaltonech s histidinovou kotvou (v závorce) a bez ní. V pravém sloupci tabulky jsou uvedeny zkratky použité pro konstrukty v této práci, vyskytují se zejména v obrázcích. a) Varianta obsahující přirozené štěpné místo mezi oběma částmi heterodimeru. Afinitní kotva se odštěpuje TEV proteasou. b) Varianta obsahující štěpné místo pro TEV proteasu mezi funkčními doménami. Afinitní kotva se odštěpuje Xa faktorem. c) Varianta s kovalentně spojenými doménami. Histidinová kotva se odštěpuje TEV proteasou.

Pro expresi těchto proteinů byl použit bakteriální kmen *E. coli* BL21(DE3)RIL obsahující chromozomální kopii T7-RNA polymerasy, která je vysoce efektivní v syntéze RNA a jejíž produkce se spouští přídavkem IPTG. V plasmidu pET16b jsou nukleotidové sekvence pro expresi proteinů vloženy za T7 promotor. Po indukci T7-RNA polymerasy pomocí IPTG nasedá T7 polymearasa na tento promotor a spouští produkci mRNA, kódující daný rekombinantní protein. Bazální produkce T7 RNA polymerasy je před indukcí potlačena represorem LacI, který se exprimuje z plasmidu pET16b. Bakteriální kmen *E. coli* BL21(DE3)RIL dále nese plasmid kódující varianty tRNA pro Arg, Ile, Leu s kodony častěji se vyskytujícími u eukaryot.

Po transformaci požadovaným expresním plasmidem byly bakterie rozetřeny na agarové plotny s LB médiem a ampicilinem a byly ponechány přes noc ve 37 °C. Z této kultury bylo připraveno inokulum pro nárůst v tekutém médiu.

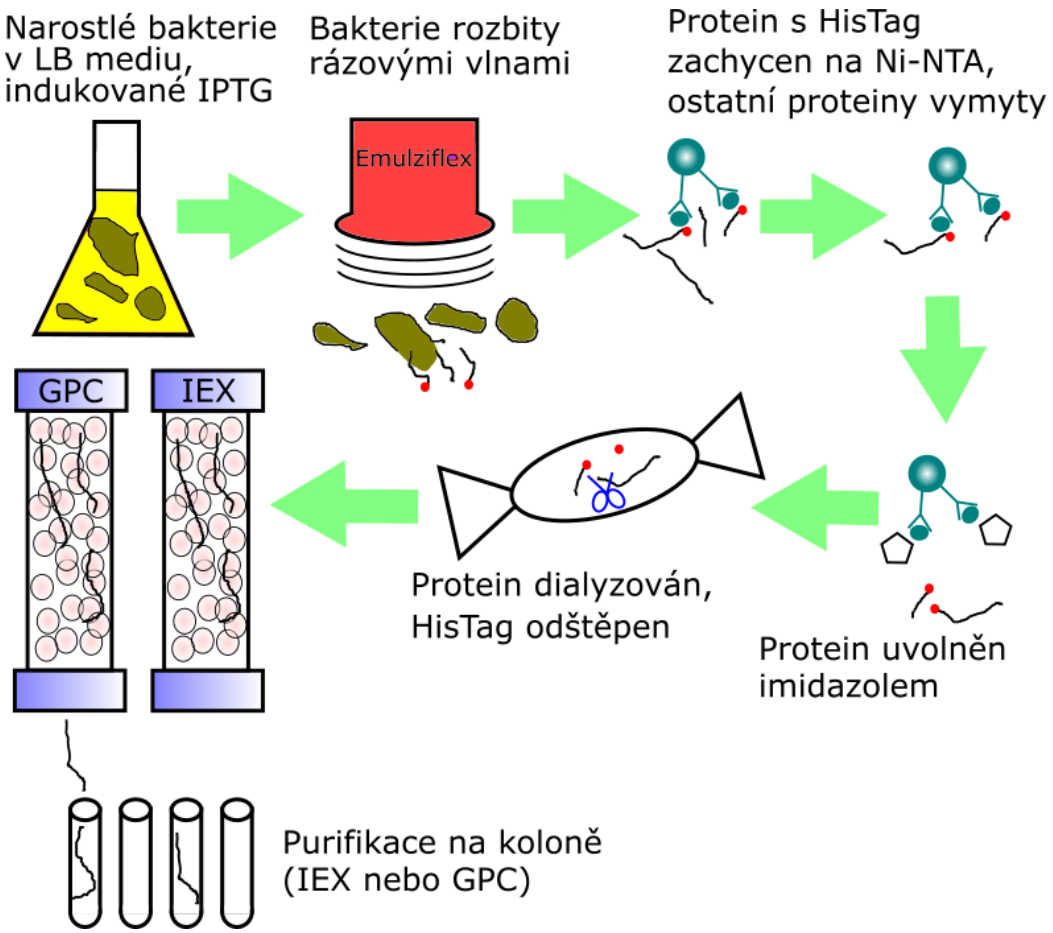
Růst bakterií v tekutém médiu byl sledován pomocí měření optické hustoty. Výsledkem takového měření je růstová křivka (obr. 8 na následující straně). V první fázi růstové křivky, takzvané klidové či lag fázi, se bakterie přizpůsobovaly se novým růstovým podmínkám. Proto je křivka téměř konstantní, s přizpůsobením bakterií růstovým podmínkám dochází k postupnému zvyšování růstové rychlosti (na obr. 8 do přibližně 200 min). Poté, co se bakteriální buňky přizpůsobily, začaly se intenzivně dělit, což se popisuje jako exponenciální či log fáze (na obr. 8 období od cca 200 min). Tento růst by teoreticky mohl pokračovat až do vyčerpání živin, nicméně při OD_{600} = 0,6 byly buňky indukovány IPTG a ochlazeny na 12 °C, čímž se růst zpomalil. V této fázi je indukována produkce T7-RNA polymerasy a exprese fúzního proteinu a buňka využívá většinu energie ke tvorbě konstruktu klonovaného v expresním plasmidu. Po indukci byly buňky kultivovány při 20 °C po 3 h a poté při 12 °C přes noc. Konečná hodnota optické hustoty se nachází v intervalu 1,5 – 2,5, což odpovídá předpokládané hodnotě po indukci syntézy požadovaného proteinu pod silným promotorem. Pokud by indukce neproběhla, optická hustota by neležela v intervalu 1,5 – 2,5 a byla by buď vyšší (buňky ještě nedosáhly stacionární fáze a stále exponenciálně rostou) nebo nižší (buňky přerostly a odumírají vinou akumulace toxických produktů nebo vyčerpáním živin z média).



Obr. 8: Ukázka růstové křivky pro bakterie *E. coli* BL21(DE3)RIL nesoucí expresní plasmid pro produkci Zika proteasy s přirozeným štěpným místem. V tomto případě byly bakterie indukovány při optické hustotě 0,6. Na ose y je vynesena optická hustota při 600 nm, na ose x čas v minutách.

5.2 Purifikace fúzních proteinů

Purifikace fúzních proteinů probíhala podle námi navrženého schématu na obr. 9 na následující straně.

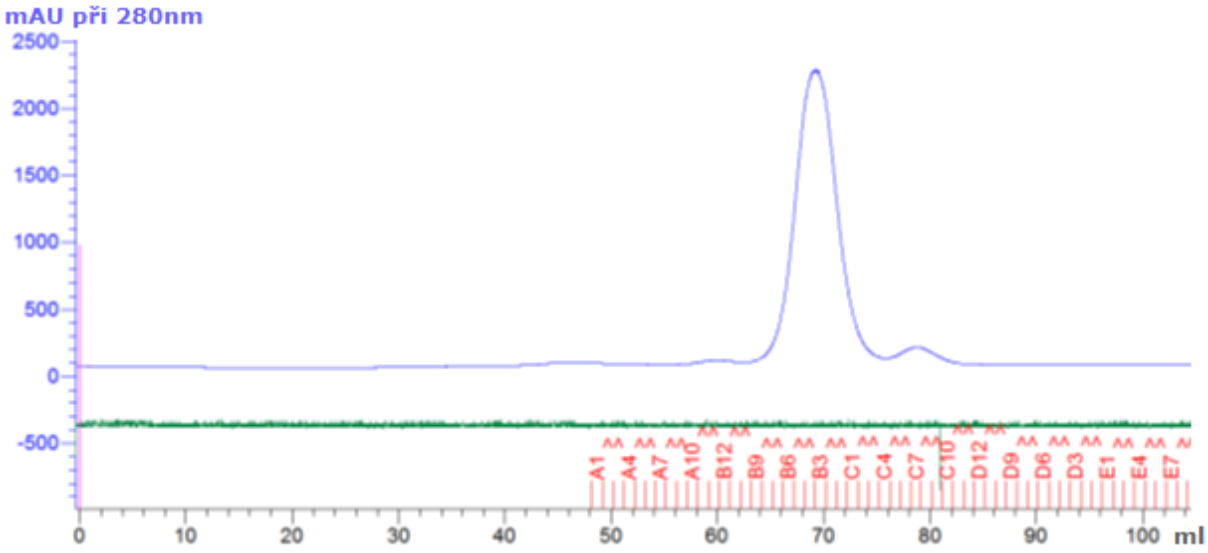


Obr. 9: Schéma purifikačního protokolu. Po rozbití buněk tlakem byly fúzní proteiny v roztoku nabohaceny na nitrilotrisacetátu chelatující nikelnatý kation (Ni-NTA) díky histidinové kotvě na N-konci. Po vymytí z Ni-NTA byly proteiny dialyzovány a zároveň byla štěpena histidinová kotva, která se opětovným využitím Ni-NTA společně s proteasou odstranila. Finálním purifikačním krokem byla iontově výměnná chromatografie (IEX) nebo gelová permeační chromatografie (GPC).

Prvním krokem bylo rozbití bakterií přístrojem Emulziflex C3 (Avestin), následovala vsádková purifikace pomocí afinitní histidinové kotvy přes Ni-NTA. Po 60h štěpení afinitní kotvy TEV proteasou během dialýzy (obr. 10, následující strana) byly neštěpené zbytky odstraněny pomocí Ni-NTA a analyzována byla frakce, která se na kolonu nevázala. Tím byla odstraněna TEV proteasa, histidinové kotvy a nenaštěpený protein.

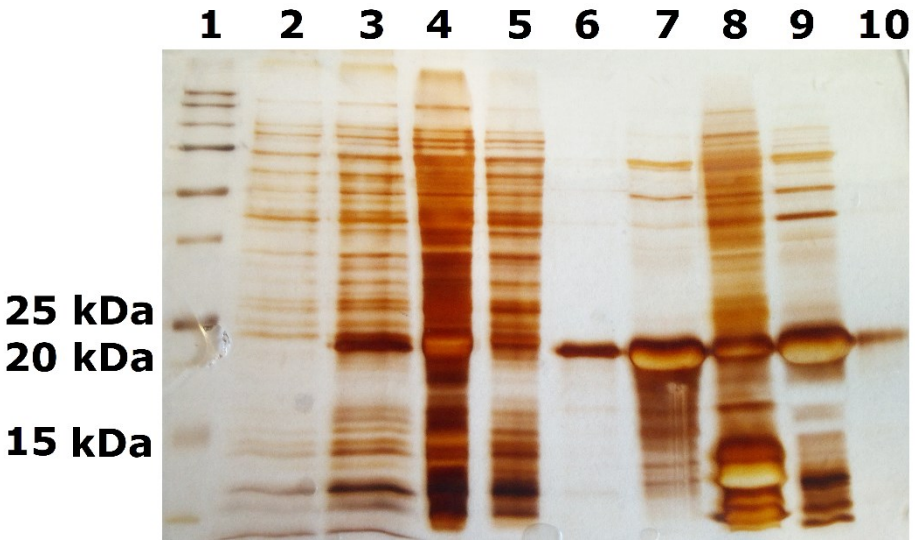
Obr. 10: Ukázka štěpení afinitní histidinové kotvy (HisTag) TEV proteasou – analýza produktů SDS-PAGE. V dráze **1)** putoval marker Precision Plus Protein™ All Blue (Bio-Rad), v dráze **2)** proteasa viru Zika s kovalentně spojenými doménami a s histidinovou kotvou na N-konci a v dráze **3)** se rozdělovala frakce proteinu po 60h štěpení ekvimolárním množstvím TEV proteasy. Štěpení probíhalo během dialýzy v pufru obsahující 50 mM Tris.HCl pH 7,6, 14 mM merkaptoethanol a Milli-Q vodu. V každé dráze putovaly přibližně 4 μg proteinu. Jak lze vidět, kotvu se podařilo plně odštěpit.

Po odstranění afinitní kotvy byla dalším purifikačním krokem iontově výměnná chromatografie nebo gelová chromatografie. Iontově výměnná chromatografie je účinná pro rychlou přípravu proteinu, frakce lze s úspěchem použít například pro enzymologické studie. Pro krystalografické studie však je zapotřebí větší čistoty, proto se využívá gelová permeační chromatografie, která však trvá déle. Jelikož se přípravou krystalů s vázanými inhibitory chceme do budoucna zabývat, byla tato purifikační metoda také testována. Ukázka chromatogramu z gelové permeační chromatografie je na obrázku 11 na následující straně.



Obr. 11: Ukázka chromatogramu získaného při purifikaci varianty fúzního proteinu viru Zika s přirozeným štěpným místem pomocí gelové permeační chromatografie, kolona HiLoad Superdex 75 prepgrade (GE Healthcare Life Sciences) s dextranovým nosičem. Proteasa vytékala z kolony ve frakcích B6 – C2.

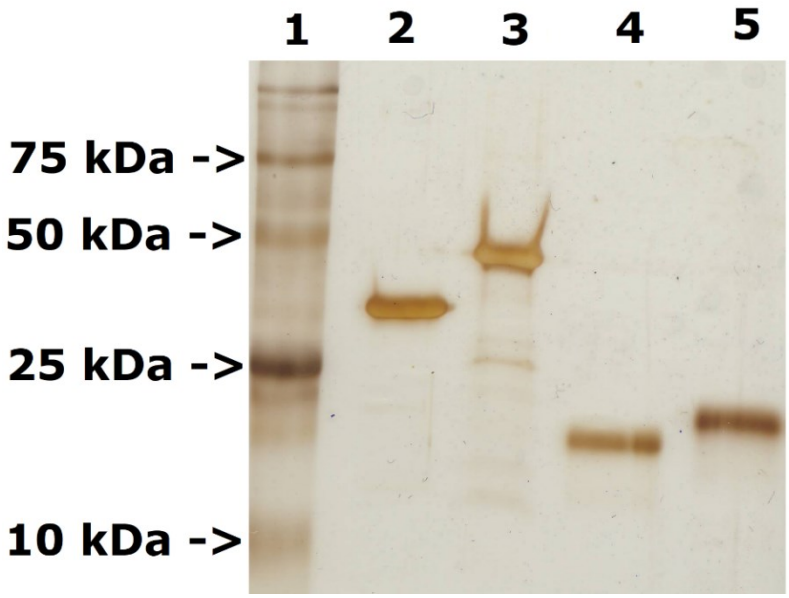
Před a po každém purifikačním kroku byl odebrán vzorek a analyzován pomocí SDS-PAGE. Na obr. 12 je ukázka analýzy pomocí SDS elektroforézy v průběhu purifikace na příkladu varianty Zika proteasy s přirozeným štěpným místem.



Obr. 12: Analýza purifikačních kroků pro variantu fúzního proteinu Dengue proteasy s přirozeným štěpným místem. V **1.** dráze putoval 1 µl markeru Precision Plus Protein All Blue (Bio-Rad), v **2.** dráze bakterie nesoucí expresní plasmid před indukcí, ve **3.** dráze pak tyto bakterie po indukci (nanáška vzorku z 2. a 3. dráhy vždy 20 µl z celkových 0,5 l). Do dráhy **4** byl nasazen vzorek proteinů před purifikací na Ni-NTA, do dráhy **5** frakce proteinů vytékající z Ni-NTA bez adsorpce, do dráhy **6** frakce proteinů vymytých promývacím pufrem (nanáška 4. a 5. dráhy byla 2 µl z 50 ml vzorku, nanáška 6. dráhy byla 10 µl z 50 ml vzorku). Čištěný protein pomocí Ni-NTA je v dráze **7** (5 µl z 6 ml). Štěpený a dialyzovaný protein je separován v dráze **8** (5 µl z 6 ml), frakce před gelovou chromatografií s odstraněnou TEV

proteasou a neštěpenými zbytky putuje v dráze **9** (5 µl z 6 ml), frakce po gelové chromatografii v dráze **10** (25 µl z 2 ml, koncentrace 1,5 mg/ml). Protein má teoretickou molekulovou hmotnost 28,1 kDa, proteasová doména NS3 23,4 kDa, aktivační peptid NS2B 4,7 kDa (není na gelu viditelný, vyputoval s čelem).

Všechny varianty proteas virů Zika a Dengue byly purifikovány a analyzovány pomocí SDS-PAGE (obr. 13). Varianty se štěpným místem pro TEV proteasu na tomto elektroforeogramu nejsou uvedeny, jelikož nebyly předmětem enzymologických studií (viz dále).



Obr. 13: Purifikované varianty fúzních proteinů (používané dále pro charakterizaci) analyzované pomocí SDS-PAGE. V první dráze putoval marker Precision Plus Protein™ All Blue (Bio-Rad). V druhé dráze bylo naneseno 10 µl varianty proteasy viru Zika s kovalentně spojnými doménami, ve třetí dráze 30 µl varianty proteasy viru Dengue s kovalentně spojenými doménami, ve čtvrté dráze bylo naneseno 10 µl varianty proteasy viru Zika s přirozeným štěpným místem a páté dráze gelu bylo naneseno 15 µl varianty proteasy viru Dengue s přirozeným štěpným místem. V každé dráze bylo analyzováno 30 µg proteinu z celkového objemu analyzované frakce vytékající z chromatografické kolony 2 ml.

Výtěžek byl stanoven jako koncentrace celkového proteinu měřením absorbance při 280 nm a je uveden v tabulce 1 na následující straně. Tento výtěžek byl získán vždy z přibližně 16 g bakterií, které narostly ve 4 l LB média.

Tab. 1: Výtěžky purifikací fúzních proteinů používaných pro další charakterizaci. Protein byl získán vždy z přibližně 16 g bakterií, které narostly ve 4 litech LB média.

Varianta fúzního proteinu	Výtěžek (mg)
Zkd	18,0
Znat	12,8
Dkd	14,2
Dnat	10,2

5.2.1 Varianty se štěpným místem pro TEV proteasu mezi doménami NS2B a NS3

Varianty obsahující štěpné místo pro TEV proteasu mezi aktivačním peptidem NS2B a proteasovou doménou NS3 byly purifikovány stejně, jako ostatní varianty fúzních proteinů. Tyto varianty by mohly sloužit ke srovnávacím studiím vlastností proteas před autokatalytickým štěpením a po něm. Po analýze pomocí SDS-PAGE však bylo zjištěno, že i přes eliminaci autokatalytického štěpného místa se tyto proteiny nejspíše štěpí (obr. 14 na následující straně). Toto nové štěpné místo se bude dále zkoumat, například pomocí hmotnostní spektrometrie na specializovaném oddělení na ÚOCHB. Pro účely diplomové práce byly tyto varianty vyřazeny a dále se pracovalo pouze s variantami s přirozeným štěpným místem a s kovalentně spojenými doménami.

Obr. 14: Štěpené varianty se štěpným místem pro TEV proteasu. V první dráze putoval marker Precision Plus Protein™ All Blue (Bio-Rad). V drahách 2-4 byly děleny varianty proteas štěpených TEV (2 – Dengue proteasa, 16 μg; 3 a 4 – Zika

proteasa, 5 μg a 10 μg, vždy 10 μl z 2 ml frakce vytékající z chromatografické kolony) po separaci pomocí gelové chromatografie. Naneseno vždy 10 μl z celkového objemu každé frakce 2 ml.

5.3 Charakterizace dvojice enzym-substrát

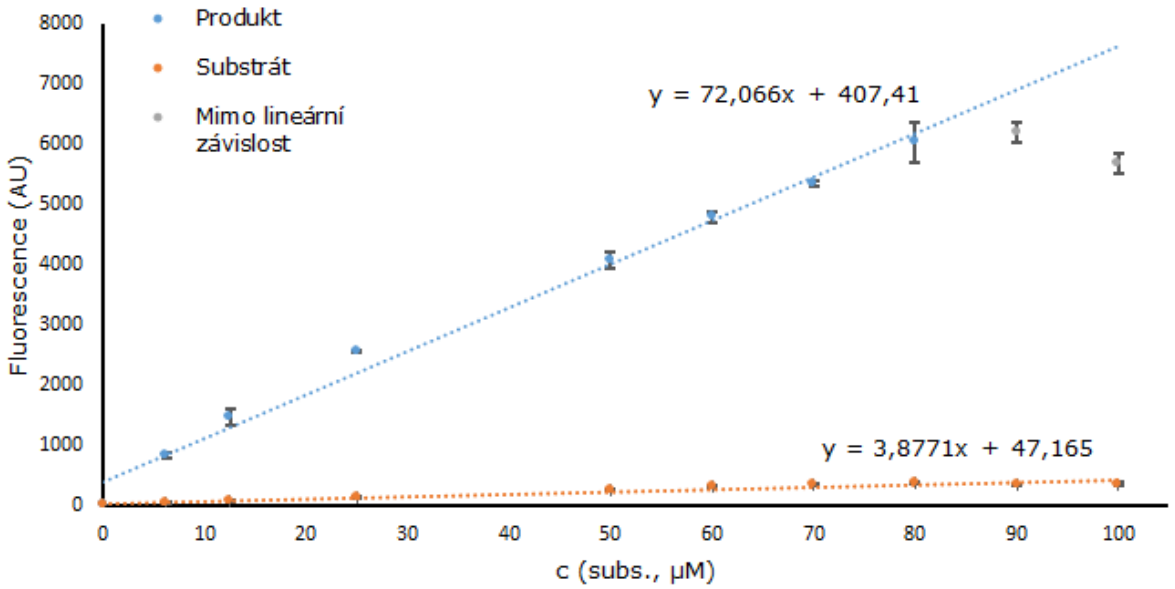
Pro charakterizaci enzymu byl použit fluorescenčně značený substrát o sekvenci Ala-Glu-Arg-Arg-Gly-Arg-Ile-Gly, který byl syntetizován na ÚOCHB a vycházel z publikovaného substrátu pro proteasu viru Dengue [193]. Tento substrát jsme úspěšně použili i pro proteasu viru Zika. Data byla získána měřením fluorescence na přístroji Tecan Infinite M1000 a vyhodnocována pomocí programu GraFit. Oktapeptidový substrát obsahoval na svém N-konci zhášedlo Dabcyl absorbující při 472 nm, na C-konci emitor EDANS absorbující při 336 nm a emitující záření o vlnové délce 490 nm (viz kap. 4.3.1). Pokud jsou molekuly spojeny peptidovým substrátem, probíhá Försterův resonanční energetický přenos (FRET, z angl. Förster resonance energy transfer) a substrát nevykazuje žádnou fluorescenci. Pokud však enzym substrát rozštěpí, molekula zhášedla difunduje od molekuly emitoru a zaznamenáme zvýšenou fluorescenci. Takto lze sledovat míru štěpení substrátu v roztoku.

Měřená fluorescence je přímo závislá na koncentraci produktu v roztoku. Pro fluorescenci v daném čase, *F,* tak můžeme zavést vztah

$$F = F_0 + \Delta\varepsilon'(S_0 - S), \tag{9}$$

kde F_0 je signál substrátu, $\Delta\varepsilon'$ je zdánlivá konstanta úměry závislosti fluorescence na koncentraci (tato hodnota byla zjištěna pro dané uspořádání experimentu, které bylo stejné během všech měření, zahrnuje nastavení přístroje i reakční objem, tj. optickou dráhu), S_0 je koncentrace substrátu v čase 0 a S je koncentrace substrátu v daném čase. Rozdíl $S0 - S$ nám potom dává koncentraci produktu. Tato závislost je lineární, ne však po celý koncentrační rozsah. Při vysokých koncentracích se projeví intermolekulové zhášení fluorescence mezi dvěma vzájemně blízkými molekulami substrátu a dále absorpce rozpouštědla. Proto byla tato závislost proměřena při různých koncentracích produktu (obr. 15 na následující straně). Produkt byl získán úplným štěpením substrátu proteasou viru Zika s kovalentně spojenými doménami přes noc (pro reakci byly použity 3 μg proteinu) v reakčním pufru (viz kapitolu 4.3). Při úplném štěpení se koncentrace

vloženého substrátu přímo rovná koncentraci produktu. Ve vztahu pro fluorescenci tak odpadá koncentrace neštěpeného substrátu a z naměřených hodnot můžeme přímo získat zdánlivou konstantu úměry ⊿ε'.



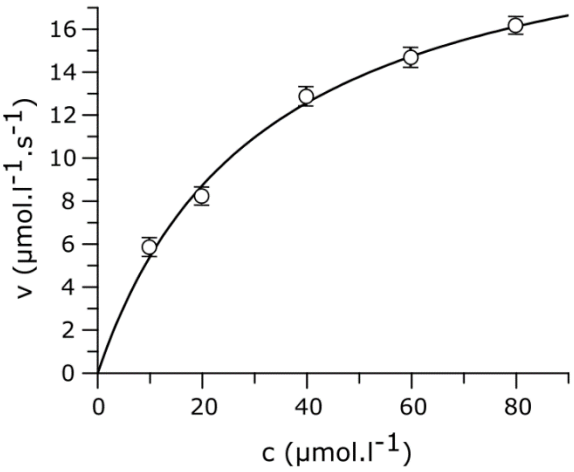
Obr. 15: Stanovení koeficientu pomocí zcela rozštěpeného substrátu (=produktu) proteasou viru Zika s kovalentně spojenými doménami (podmínky v kapitole 4.3). Ze závislosti fluorescence na koncentraci byla stanovena hodnota koeficientu umožňujícího převod změny fluorescence v čase na reakční rychlost.

Úplné štěpení bylo zkontrolováno přidáním enzymu (3 µg) před měřením výsledné fluorescence. Po přidání čerstvého enzymu fluorescence již nerostla. Nelineární oblast se objevuje při koncentraci 90 µM a vyšší, proto můžeme lineární převod fluorescence na koncentraci produktu brát v potaz v koncentračním rozsahu 0–80 µM. Zdánlivá konstanta úměry ⊿ε' se rovná směrnici lineární závislosti pro produkt a rovná přibližně hodnotě 72 AU.µM^{-1}. Stanovení změny koncentrace produktu pomocí změny fluorescence a ⊿ε' potřebujeme ke zjištění reakční rychlosti.

5.3.1 Stanovení Michaelisovy konstanty

Dvojice enzym-substrát se obvykle charakterizuje pomocí konstant K_M a k_{cat}. Tyto konstanty získáme z výnosu Michaleise a Mentenové, což je závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu při konstantní koncentraci enzymu (viz kapitolu 4.4.2). Reakční

rychlost byla měřena pomocí změny fluorescence vzorku v čase po přidání 3 µg příslušného enzymu do roztoku obsahující reakční pufr (viz kapitolu 4.3) a 40µM substrát. Reakce probíhala v celkovém reakčním objemu 100 µl. Ukázka grafického vyhodnocení dat pomocí programu GraFit včetně vypočtených veličin K_M a V_{max} ze závislosti je zobrazena na obrázku 16. Naměřené hodnoty Michaelisových konstant a maximálních rychlostí reakcí jsou pro všechny varianty enzymu uvedeny v tabulce 2 na straně 36.



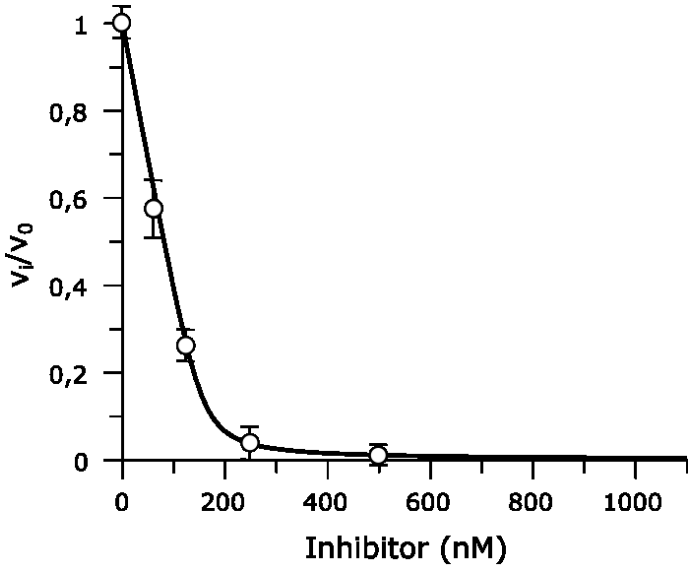
	Hodnota	Směr. odch.
V_{max}	22 µmol.l^{-1}.s^{-1}	1,1
K_m	31 µmol.l^{-1}	3,8

Obr. 16: Stanovení Michaelisovy konstanty pro proteasu viru Zika s kovalentně spojenými doménami programem GraFit. Program určoval Michaelisovu konstantu (K_m) z naměřených křivek štěpení různých koncentrací substrátu v čase. Směrnice těchto závislostí fluorescence na čase určuje rychlost štěpení, která byla pro každou koncentraci jiná. Program z těchto hodnot stanoví Michaelisovu konstantu včetně odchylek. Dále program stanoví hodnotu maximální rychlosti V_{max}. Reakce probíhala v reakčním pufru (viz kapitolu 4.3) se 3 µg proteinu v celkovém reakčním objemu 100 µl.

5.3.2 Stanovení katalytické konstanty k_{cat}

Mimo Michaelisovu konstantu lze dvojici enzym-substrát charakterizovat stanovením katalytické konstanty k_{cat}. Ta je konstantou vyjadřující rychlost rozpadu komplexu enzym-substrát na enzym a produkt (viz kapitolu 4.4.2). Pro určení katalytické konstanty je potřeba znát maximální rychlost reakce (V_{max}) a koncentraci aktivních míst ($[E_T]$). Koncentrace celkového proteinu určená absorbancí při 280 nm však nemusí vždy odpovídat koncentraci enzymu (při této vlnové délce absorbuje i špatně sbalený nebo

štěpený protein, roztok může obsahovat interferující látky atd.). Proto se pro toto stanovení využívá titrace aktivních míst kompetitivním inhibitorem. V této práci byl použit inhibitor serinových proteas aprotinin neboli BPTI (z angl. bovine pancreatic trypsine inhibitor). Tento inhibitor váže serinové proteasy s K_i' přibližně 1 nmol/l, proto lze pro toto stanovení použít Morrisonův výnos (viz kapitolu 4.4.2). Vyhodnocovala se závislost relativní rychlosti katalýzy (podíl rychlosti reakce s inhibitorem vůči rychlosti reakce bez inhibitoru) na koncentraci inhibitoru v reakčním pufru (pro složení viz kapitolu 4.3), koncentrace substrátu byla 40 μM. Reakce ve 100 μL pufru byla startována přidáním 3 μg enzymu. Vyhodnocení probíhalo v programu GraFit, ukázka takovéhoto vyhodnocení je na obrázku 17. Konstrukt Zika s přirozeným štěpným místem se nám titrovat nepodařilo (viz kapitolu 6). Pro všechny enzymy program vyhodnotil i hodnotu K_i' (tab. 3, strana 36). Hodnota zdánlivé inhibiční konstanty proteasy viru Zika s přirozeným štěpným místem byla získána pomocí Dixonova výnosu.



	Hodnota (nM)	Směr. odch.
K_i'	3,90	0,069
Konc. aktivních míst	154,5	0,30

Obr. 17: Titrace aktivních míst proteasy viru Dengue s přirozeným štěpným místem pomocí aprotininu. Vyhodnocuje se pomocí závislosti relativní rychlosti na koncentraci inhibitoru (Morrisonův výnos). Toto vyhodnocení proběhlo v programu GraFit, který vyhodnocuje i zdánlivou inhibiční konstantu. Reakční podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.

Pomocí maximální rychlosti reakce a koncentrace aktivních míst lze stanovit k_{cat} dvojice enzym-substrát (viz kapitolu 4.4.1). Tato hodnota je uvedena v tabulce 2. Program vyhodnotil i K_i' každého enzymu pro BPTI. Tato data jsou v tabulce 3.

Tab. 2: Hodnoty K_m, V_{max}, koncentrace aktivních míst a k_{cat} pro dvojice enzym-substrát. Střední hodnoty i směrodatné odchylky jsou vypočteny pomocí programu GraFit.

* = hodnoty odhadnuté z koncentrace celkového proteinu stanovené pomocí absorbance při 280 nm. Tohoto způsobu bylo využito pro stanovení k_{cat} proteasy viru Zika s přirozeným štěpným místem, jelikož pomocí BPTI nelze aktivní místa tohoto enzymu spolehlivě titrovat.

	K_m (μM)	směr. odch.	V_{max} (nmol/s.l)	směr. odch.	$c_{akt.\ m.}$ (nmol/l)	směr. odch.	**k_{cat} (1/s)**	k_{cat}/K_m (1/s.mM)
Zkd	**31**	3,8	22	1,1	104	5,7	**0,2**	0,007
Znat	**50**	7,3	49	3,5	1149*	-	**0,04***	0,002*
Dkd	**15**	2,6	7,7	0,39	58	4,1	**0,1**	0,009
Dnat	**16**	3,8	4,7	0,3	154,5	0,30	**0,03**	0,002

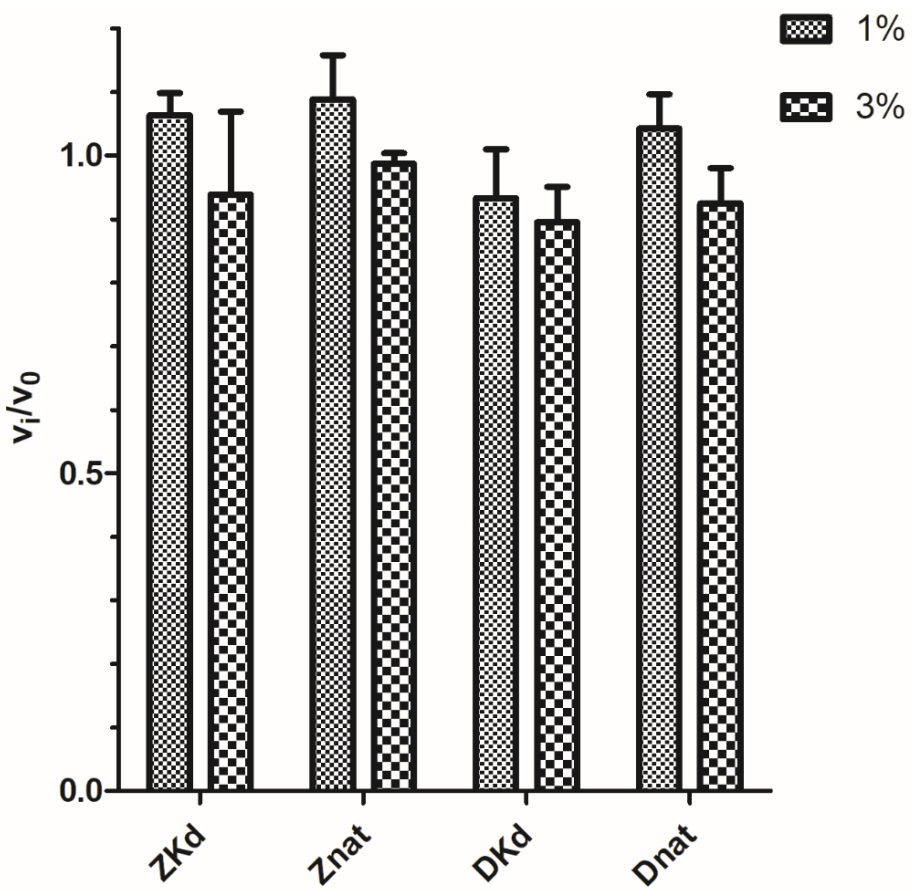
Tab. 3: Hodnoty K_i' a K_i získané během titrace aktivních míst aprotininem. Hodnoty Zkd, Dkd a Dnat byly vypočteny z Morrisonova výnosu programem GraFit při titraci aktivního místa aprotininem. Hodnota pro Znat je získána Dixonovým výnosem.

	K_i' (BPTI) (nmol/l)	směr. odch.	K_i (BPTI) (nmol/l)
Zkd	4	1,3	1,5
Znat	287,1	-	159,50
Dkd	0,3	0,42	0,08
Dnat	3,90	0,069	1,115

5.4 Testování potenciálních inhibitorů proteas

5.4.1 Dimethylsulfoxid

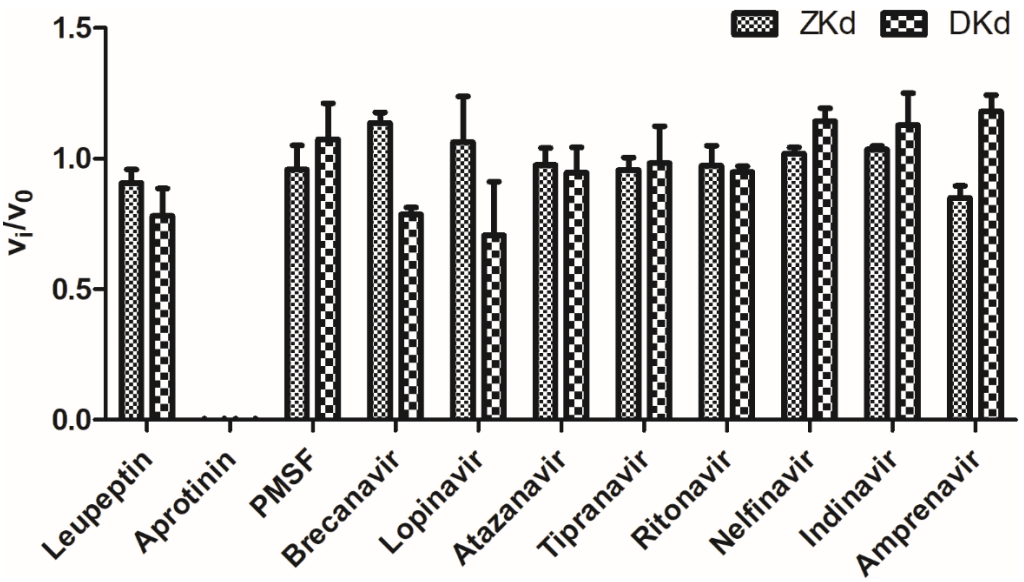
Pro flavivirové proteasy byly vyzkoušeny inhibiční vlastnosti některých pomocných látek. Nejprve byla ozkoušena inhibice DMSO (dimethylsulfoxid), jelikož substrát i ostatní inhibitory byly v tomto rozpouštědle připravovány, a tudíž by se s případnou inhibicí DMSO muselo při charakterizaci substrátu i inhibitorů počítat. Koncentrace této látky v reakčním objemu je menší než 1 %. Na obrázku 18 na následující straně je graf vyjadřující relativní rychlost reakcí probíhající v 1% a 3% DMSO. Jak lze vypozorovat, 1% DMSO neovlivňuje měření, 3% snižuje aktivitu Dengue proteas. Proto koncentrace DMSO v reakčním roztoku nepřesáhla 1 %.



Obr. 18: Aktivita proteas v 1 % a 3 % DMSO. Na ose y je relativní rychlost reakce (podíl rychlosti reakce s inhibitorem a bez inhibitoru). Reakční podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.

5.4.2 Inhibitory serinových a aspartátových proteas

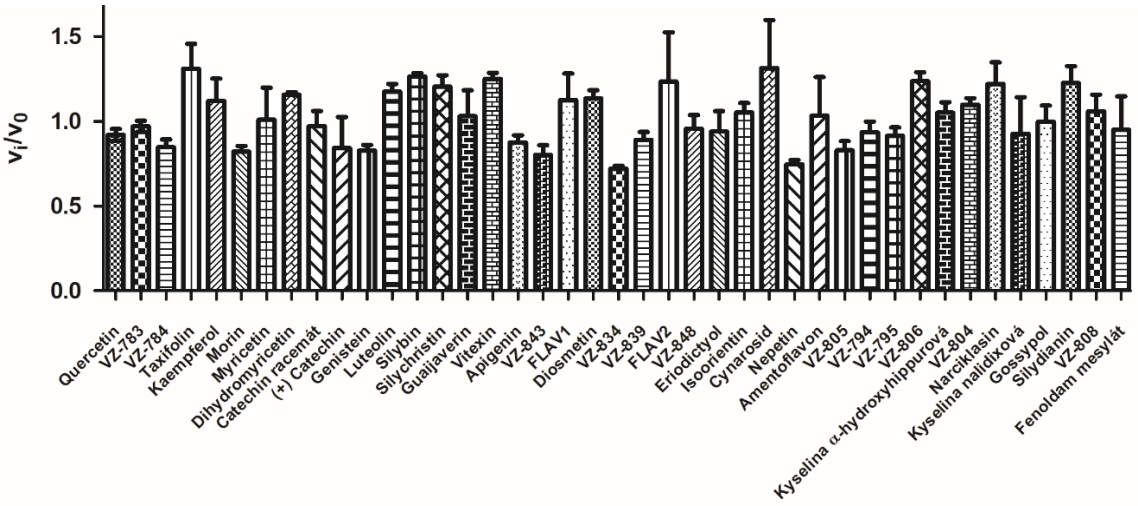
Další inhibitory testované v této diplomové práci byly inhibitory serinových proteas (leupeptin, aprotinin, fenylmethylsulfonyl fluorid) a inhibitory proteasy viru HIV. Z této skupiny byl jediným účinným inhibitorem aprotinin (BPTI), který byl dále použit k titraci aktivních míst. Ostatní inhibitory flavivirové proteasy uspokojivě neinhibují (obr. 19 na následující straně).



Obr. 19: Testování inhibitorů proteas. Byly testovány inhibitory serinových proteas (leupeptin, aprotinin, PMSF = fenylmethylsulfonyl fluorid) a inhibitory HIV proteasy (ostatní) o koncentraci 20 μM. Na ose y je relativní rychlost (rychlost inhibované reakce ku rychlosti reakce bez inhibitoru). Reakční podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3. V grafu je vždy v prvním sloupci relativní aktivita pro kovalentní dimer proteasy viru Zika, v druhém sloupci relativní aktivita stejného konstruktu viru Dengue.

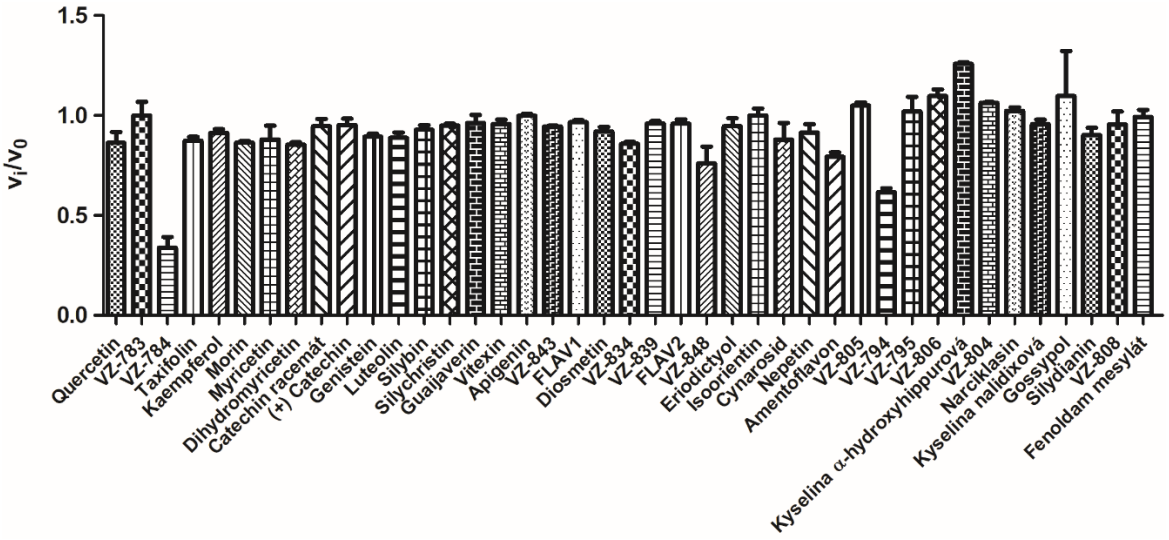
5.4.3 Flavonoidy

Jako inhibitory byly dříve prokázány některé flavonoidy [191]. Proto byla proměřena série flavonoidů a jejich derivátů dostupných na ÚOCHB. Inhibice byla zkoušena na 3 μg kovalentních dimerů obou flavivirových proteas v reakčním pufru (viz kapitolu 4.3.1) za přítomnosti 40μM substrátu a 20μM flavonoidu. Žádný z dostupných flavonoidů však Zika proteasu uspokojivě neinhiboval (obr. 20).



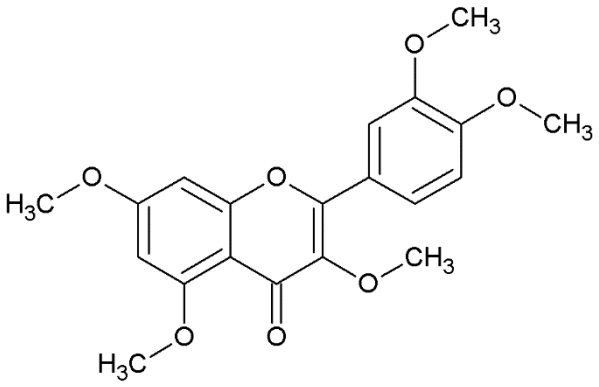
Obr. 20: Inhibice kovalentního dimeru Zika proteasy flavonoidy. Měření probíhala v triplikátech v reakčních podmínkách (kapitola 4.3) s 20 μM flavonoidu.

Inhibiční vlastnosti byly testovány i na protease viru Dengue. Aktivita kovalentně spojené proteasy byla snížena zhruba na polovinu pouze flavonoidem VZ-784 (obr. 21).



Obr. 21: Inhibice kovalentního dimeru Dengue proteasy flavonoidy. Měření probíhala v triplikátech v reakčních podmínkách (viz kapitolu 4.3.1) za přítomnosti 20 μM flavonoidu.

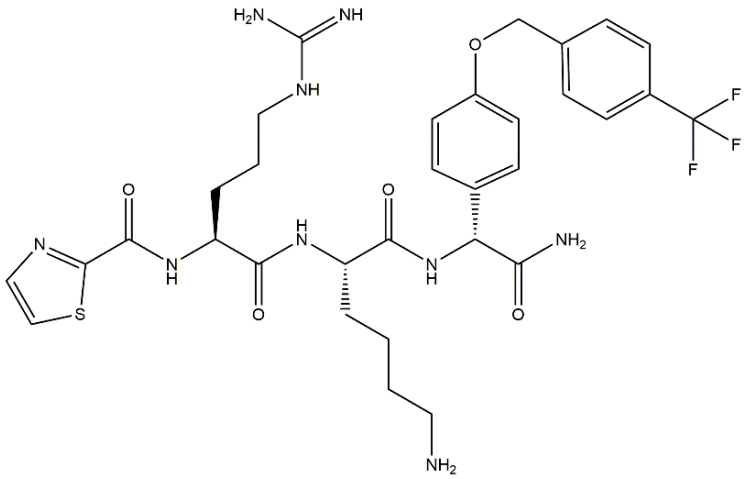
Tento flavonoid je derivátem quercetinu. Na ÚOCHB jej uvařil Václav Zima pod vedením Dr. Aleše Machary z laboratoře Dr. Pavla Majera. Jeho struktura je na obr. 22.



Obr. 22: Flavonoid VZ-784. Nakresleno v programu ChemDraw [202].

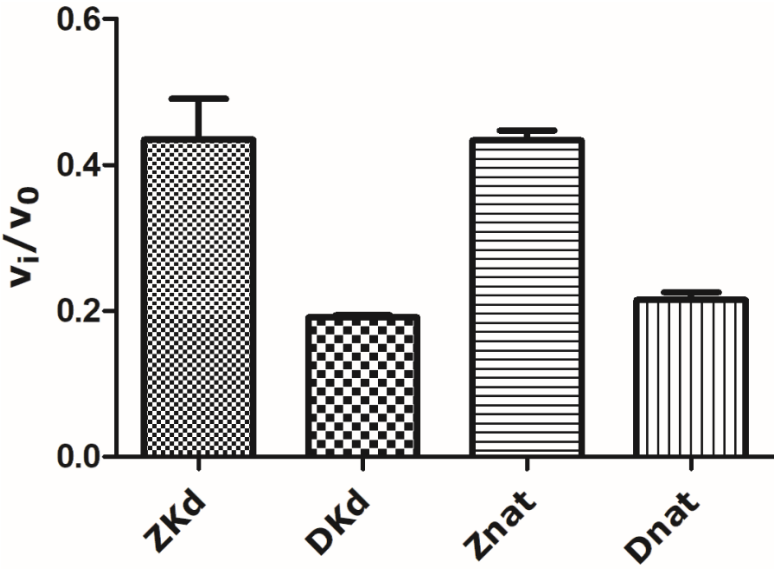
5.4.4 Inhibitor aktivního místa proteasy viru Dengue MH-ZD1

Logickým cílem při inhibici enzymu je aktivní místo. Proto jsme testovali sloučeninu připravenou na ÚOCHB Ing. Martinem Hradilkem, Ph.D., která vycházela z již dříve publikovaného inhibitoru proteasy viru Dengue [203]. Struktura inhibitoru je na obr. 23.



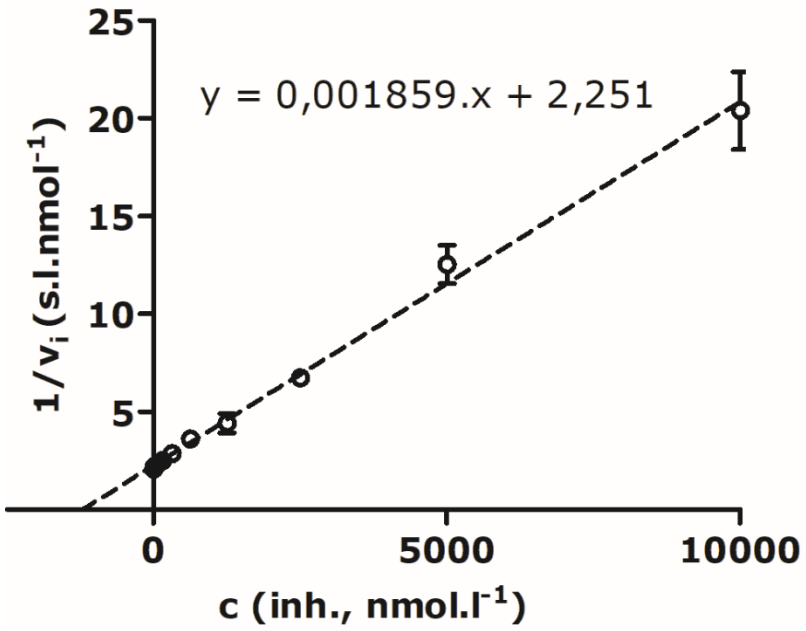
Obr. 23: Struktura inhibitoru MH-ZD1 [203].

Tento inhibitor aktivního místa proteasy viru Dengue, nazván MH-ZD1, jsme testovali se všemi variantami námi připravených flavivirových proteas. Relativní aktivita v reakčním roztoku obsahující 1 μM inhibitor je na obrázku 24.



Obr. 24: Testování inhibitoru aktivního místa proteasy viru Dengue na všech variantách enzymu. Reakční podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3. Na ose y je relativní rychlost reakcí. Měření probíhala v triplikátech s koncentrací inhibitoru MH-ZD1 1 μM.

Pro tento inhibitor byla stanovena inhibiční konstanta proteasy viru Zika s kovalentně spojenými doménami pomocí Dixonova výnosu (obr. 25 na následující straně), ze kterého jsme získali hodnotu zdánlivé inhibiční konstanty. Pomocí vztahu (6) z kapitoly 4.4.3 jsme poté určili pravou inhibiční konstantu. Tato hodnota činila K_i = 330 nM.



Obr. 25: Dixonův výnos pro hodnoty získané při testování účinků inhibitoru MH-ZD1 na proteasu viru Zika s kovalentně spojenými doménami. Na ose y je reciproká hodnota počáteční reakční rychlosti, na ose x je vynesena koncentrace inhibitoru. Reakční podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.

Inhibice ostatních variant enzymů inhibitorem MH-ZD1 v této práci testovány nebyly. Z obr. 24 na předchozí straně však lze předpokládat, že inhibiční konstanty variant proteasy viru Dengue budou nižší než konstanta varianty proteasy viru Zika s kovalentně spojenými doménami.

6 Diskuze

Pro fúzní proteiny proteas flavivirů Zika a Dengue byl navržen purifikační protokol, jehož dodržením jsme získali dostatečné množství proteinu (viz tabulku 1, str. 31). To naznačuje, že konstrukt je navržen (i vzhledem k další charakterizaci) dobře a neobsahuje takové hydrofobní sekvence, které by vedly k precipitaci či vazbu a kumulaci produktu na membránovou frakci v bakteriálním lyzátu (obr. 12, str. 29). Purifikované proteiny budou dále použity pro kinetické studie a pro biofyzikální charakterizaci.

Při purifikaci Zika proteas pomocí gelové permeační chromatografie se ukazuje, že protein tvoří dimery navzdory redukčnímu prostředí (14 mM merkaptoethanol, viz kapitolu 4.2.6 a obr. 11 na str. 29). Toto chování již bylo zjištěno dříve, přičemž kovalentně spojená varianta proteasy vytváří dimery ochotněji, než varianta s přirozeným štěpným místem [159].

Konstrukty, kde je přirozené štěpné místo mezi NS2B a NS3 nahrazeno štěpným místem pro TEV proteasu se v rozporu s naším předpokladem štěpily během purifikace. Buď nastalo autokatalytické štěpení proteasou v alternativním štěpném místě nebo došlo ke štěpení bakteriální proteasou z buněčného lyzátu v důsledku změněných vlastností Zika a Dengue proteas vlivem zavedených mutací, nejpravděpodobněji díky odlišnému sbalení těchto proteinů. Proto se při analýze na SDS-PAGE objevují dva pruhy odpovídající menší molekulové hmotnosti, než by měl protein neštěpený (obr. 14, str. 31). Jelikož ostatní varianty fúzních proteinů se takto neštěpí (obr. 13, str. 30), musí být tato anomálie vinou zavedení štěpného místa. Důvodem může být nechtěné strukturní odhalení nového štěpného místa buď pro virovou proteasu nebo pro bakteriální proteasy. Pro zjištění pozice tohoto nového štěpného místa budou vzorky obsahující dva a více pruhů z SDS elektroforeogramu zaslány na analýzu hmotnostní spektrometrií na příslušné oddělení ÚOCHB. Bylo by možné vytvořit konstrukty s mutovaným alternativním nežádoucím štěpným místem a ověřit, zda-li odpovídá námi odhadované sekvenci.

Inaktivní konstrukty se stejným štěpným místem, ale s mutantním aktivním místem by také mohly sloužit k rozlišení mezi autokatalýzou a štěpení bakteriálními proteasami v průběhu purifikace, která zavedením nové sekvence do proteinu může nově nastávat.

V případě autokatalýzy by konstrukty s mutací v aktivním místě a s TEV štěpným místem mezi NS2B a NS3 zůstaly neštěpené a mohly být ev. využity pro ověření, zda-li zavedení štěpného místa TEV mezi obě domény neovlivňuje sekundární strukturu a nevystavuje tak přirozeně sbalené potenciální štěpné místo pro štěpení jinými proteasami.

I přes to, že jsou tyto varianty štěpeny, vykazují proteolytickou aktivitu vůči substrátu, a to s K_M = 59 μM pro variantu proteasy Zika se štěpným místem pro TEV proteasu (data neuvedena v této práci). Zdá se tedy, že aktivní místo zůstalo funkční, a aktivita této varianty je podobná aktivitě varianty proteasy Ziky s přirozeným štěpným místem (K_M = 50 μM).

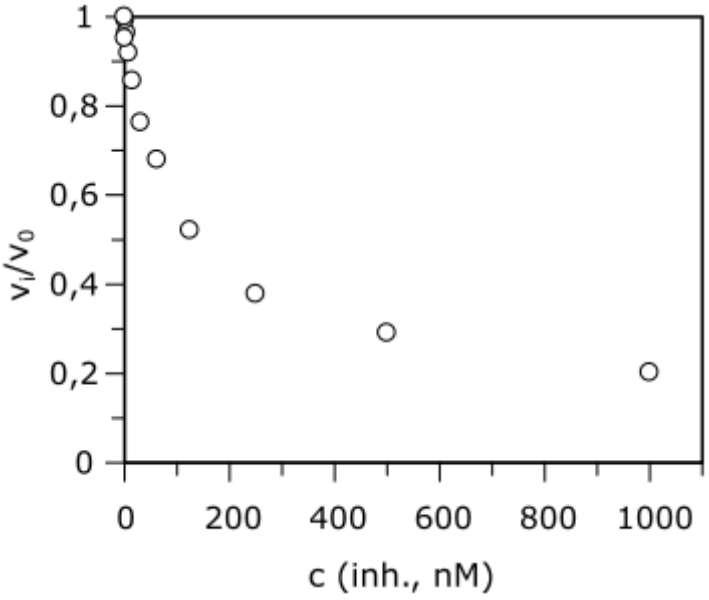
Pro enzymologické charakeristiky byly použity 4 varianty: proteasa viru Zika s přirozeným štěpným místem (=Znat) nebo s kovalentně spojenými doménami (=ZKd), dále proteasa viru Dengue s přirozeným štěpným místem (=Dnat) nebo s kovalentně spojenými doménami (=DKd). Pro všechny tyto varianty byly určeny konstanty K_m a k_{cat} v reakcích s fluorescenčně značeným oktapeptidovým substrátem (viz kap. 4.3.1). Koncentrace aktivních míst byla stanovena titrací aprotininem, vyjma varianty Zika proteasy s přirozeným štěpným místem, pro kterou byla koncentrace aktivních míst ztotožněna s celkovou koncentrací proteinu, získanou absorbancí při 280 nm.

Ze stanovených konstant lze soudit, že ZKd váže fluorescentně značený substrát lépe než Znat, varianta s přirozeným štěpným však substrát přeměňuje rychleji (pro ZKd: K_M = 31 μM, k_{cat} = 0,2 s^{-1}; pro Znat: K_M = 50 μM, k_{cat} = 0,04 s^{-1}). Vyšší K_M varianty Znat může být dáno volným koncem varianty s přirozeným štěpným místem o sekvenci Trp-Gly-Lys-Arg, které proteasa vyhledává jakožto substrát a kompetuje s oktapeptidovým fluorescenčně značeným proteinem. Tato skutečnost byla již publikovaná pro jiný substrát [159]. Důvodem však může být i větší rozvolněnost varianty s přirozeným štěpným místem, a tudíž větší entropická bariéra při vazbě substrátu. Rychlejší štěpení substrátu variantou s přirozeným štěpným místem může být dána lepší orientací substrátu v aktivním místě než u varianty s kovalentně spojenými doménami, kde může glycinový linker stericky bránit vazbě.

Dengue varianty proteasy naproti oběma variantám proteasy viru Zika váží substrát lépe, a to s podobnými Michaelisovými konstantami (DKd: K_M = 15 μM; Dnat = 16 μM). Toto chování se dá očekávat, jelikož substrát byl připraven jakožto substrát pro proteasu viru Dengue. Katalytické konstanty se naproti tomu podobají analogickým variantám proteas viru Zika (DKd: k_{cat} = 0,1 s^{-1}; Dnat: k_{cat} = 0,03 s^{-1}). Důvod rozdílných katalytických konstant mezi kovalentně spojenou proteasou a proteasou s přirozeným štěpným místem může být stejný, jako u proteas viru Zika. Roli může hrát i odlišná dimerizace. Katalytická konstanta ale závisí i na použitém substrátu, pro jiný substrát by mohla být situace odlišná (například vyšší k_{cat} pro Dnat, než pro DKd) [204].

Tři ze čtyř variant se podařilo titrovat aprotininem, stanovily se tak koncentrace aktivních míst a inhibiční konstanty (ZKd: K_i = 1,5 nM, DKd: K_i = 0,08 nM, Dnat: K_i = 1,12 nM). Nejlépe tedy aprotinin inhibuje Dengue proteasu s kovalentně spojenými doménami, inhibiční konstanty ZKd a Dnat jsou si podobné. Rozdíl mezi inhibičními konstantami DKd a Dnat může být opět kompeticí volného konce o aktivní místo tak, jako při vazbě substrátu nebo může jít o vyšší entropickou bariéru. Ve všech těchto případech se však jedná o spolehlivý inhibitor k titraci aktivních míst, jelikož všechny tyto konstanty jsou v nanomolární oblasti. Ostatní testované inhibitory serinových proteas a proteasy viru HIV byly vůči flavivirovým proteasam neúčinné (obr. 19 na str. 38)

Variantu proteasy Zika s přirozeným štěpným místem se nepodařilo titrovat aprotininem. Je to tím, že K_i' je vyšší, než 10 μM, je tedy třeba přidat řádově více inhibitoru, než je enzymu, proto nelze použít vyhodnocení dle Morrisona. I tento rozdíl ve vazbě BPTI byl již dříve pozorován, důvody jsou zřejmě podobné, jako při vazbě substrátu [159]. Analogickou Dengue proteasu s přirozeným štěpným místem se však podařilo spolehlivě titrovat a určit k_{cat} i K_i (obr. 26 na následující straně, srovnej s obr. 17 na straně 35).



Obr. 26: Morrisonův výnos pro variantu proteasy viru Zika s přirozeným štěpným místem. Po srovnání s obr. 17 na straně 36 lze vidět, že tato závislost je odlišná, proto dle ní nelze určit koncentraci aktivních míst. Na ose y je vynesena relativní rychlost reakce (v_i/v_0), na ose x koncentrace inhibitoru. Reakce probíhala v 40 μM substrátu v reakčním pufru (viz kap. 4.3.1) v reakčním objemu 100 μl. Bylo použito 6 μg enzymu s přirozeným štěpným místem.

Ačkoli byla již v minulosti studována schopnost flavonoidů inhibovat flavivirové proteasy [191], v námi testované sadě inhibitorů byl nalezen pouze jeden potenciální inhibitor Dengue proteasy (obr. 20 na straně 38 a obr. 21 na straně 39). Zjevně záleží na konkrétním flavonoidu, ne všechny jsou schopny inhibovat proteasu, i když můžou snižovat množení viru. Při přípravě derivátů s očekávanými lepšími inhibičními vlastnostmi je třeba brát v úvahu, že drobné změny ve struktuře ligandu mohou výrazně ovlivnit jeho afinitu k cílovému enzymu. V našem případě inhibuje flavonoid VZ-784, a to variantu DKd (struktura flavonoidu na obr. 22 na straně 39). 20 μM inhibitor snižuje aktivitu proteasy o polovinu (viz obr. 21 na str. 39). Ačkoliv VZ-784 obsahuje hydrofobní methoxy skupiny, 100μM flavonoid má 99% rozpustnost v daném pufru (stanoveno na ÚOCHB).

Inhibitor připravený na ÚOCHB podle návrhu inhibitoru Dengue proteasy (MH-ZD1) byl úspěšně testován i pro proteasu viru Zika, což před tím nebylo zjištěno. Všechny varianty jsou tímto enzymem inhibovány, i když v různé míře (viz obr. 24 na str. 40). Ze struktury tohoto inhibitoru lze vycházet při návrhu nových inhibitorů proteasy viru Zika, například po vyřešení struktury tohoto proteinu s navázaným inhibitorem a analýze

struktury aktivního místa a jeho interakcí s funkčními skupinami ligandu. Inhibiční konstanta tohoto inhibitoru a varianty proteasy ZKd byla stanovena na K_i = 330 nM.

Čtyři z šesti variant virových proteas se podařilo izolovat a enzymologicky charakterizovat. Z testovaných flavonoidů byl určen pouze jeden, VZ-784, jakožto inhibitor Dengue proteasy s kovalentně spojenými doménami. Pro vývoj nových potenciálních inhibitorů je tedy lepší vycházet ze struktury substrátu. Takto připravený inhibitor optimalizovaný pro proteasu viru Dengue jsme testovali i pro Zika proteasu (MH-ZD1). Pro snížení inhibiční konstanty na jednotky nanomolů je však potřeba strukturu inhibitoru dále optimalizovat.

7 Závěr

Výsledkem této práce je purifikační protokol pro fúzní proteiny proteas flavivirů Zika a Dengue. Tímto postupem se podařilo proteiny uspokojivě vyčistit a získat 18 mg proteasy viru Zika s kovalentně spojenými doménami (=ZKd), 14,2 mg proteasy viru Dengue s kovalentně spojenými doménami (=DKd), 12,8 mg proteasy viru Zika s přirozeným štěpným místem (=Znat) a 10,2 mg proteasy viru Dengue s přirozeným štěpným místem (=Dnat). Tyto proteiny sloužily dále k enzymologickým charakterizacím.

Připravené fúzní proteiny byly dále enzymologicky charakterizovány s použitím syntetického fluorescenčního oktapeptidového substrátu připraveného na ÚOCHB modifikací již publikovaného peptidového substrátu pro proteasu viru Dengue [193]. Byla stanovena Michaelisova konstanta a katalytická konstanta pro každou dvojici enzym-substrát. Pro variantu proteasy viru Zika s kovalentně spojenými doménami byly konstanty K_M = 31 μM a k_{cat} = 0,2 s^{-1}, pro variantu proteasy viru Dengue s kovalentně spojenými doménami pak K_M = 15 μM a k_{cat} = 0,1 s^{-1}, pro variantu proteasy viru Zika s přirozeným štěpným místem je K_M = 50 μM a k_{cat} = 0,04 s^{-1} a pro variantu proteasy viru Dengue s přirozeným štěpným místem bylo stanoveno K_M = 16 μM a k_{cat} =0,03 s^{-1}.

Dále byly testovány různé inhibitory; ze známých inhibitorů serinových proteas byl funkční pouze aprotinin, a to v nM koncentračním rozsahu pro všechny testované varianty mimo proteasu viru Zika s přirozeným štěpným místem, kde byla konstanta vyšší (ZKd K_i = 1,5 nM, DKd K_i = 0,08 nM, Znat K_i = 287,1 nM, Dnat K_i = 1,115 nM). Pro dvojice vykazující nanomolární inhibiční konstanty bylo BPTI využito pro titraci aktivních míst, potažmo pro určení katalytických konstant. Dále byla testována série flavonoidů, ze kterých slabou inhibici vykazoval flavonoid VZ-784, a to pouze pro proteasu viru Dengue. Syntetický dipeptidový inhibitor aktivního místa MH-ZD1, již dříve navržený jako inhibitor Dengue proteasy a syntetizovaný na ÚOCHB, byl úspěšně testován pro všechny varianty fúzních proteinů (včetně variant proteas viru Zika). Pro variantu proteasy viru Zika s kovalentně spojenými doménami byla určena inhibiční konstanta, a to K_i = 330 nM.

Získaná chemická individua a data z enzymových měření budou použita pro racionální návrh nových inhibitorů a pro návrh testovacích metod s vysokou výkonností (z angl. high throughput screening) k testování velkých knihoven nízkomolekulárních látek coby potenciálních inhibitorů. Získané proteiny mohou být použity k dalším strukturním a biofyzikálním studiím.

Použitá literatura:

[1] *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* [Online]. Dostupné na: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus [Navštíveno: 06. 02. 2019]

[2] Knipe, D. M., Howley P.: Fields Virology. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins (2013)

[3] *eENZYME* [Online]. Dostupné na: http://www.eenzyme.com/ [Navštíveno: 07. 02. 2019]

[4] Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., Després, P.: "Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses," *EMBO Rep.*, Vol. 4, no. 7, pp. 723–728, 2003

[5] Chen, Y. C., Wang, S. Y., King, C. C.: "Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism," *J. Virol.*, vol. 73, no. 4, pp. 2650–2657, 1999

[6] Jindadamrongwech, S., Thepparit, C., Smith, D. R.: "Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2," *Arch. Virol.*, vol. 149, no. 5, pp. 915–927, 2004

[7] Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G.: "A structural perspective of the *flavivirus* life cycle," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, no. 1, pp. 13–22, 2005

[8] Lorenz, I. C., Allison, S. L., Heinz, F. X., Helenius, A.: "Folding and Dimerization of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Proteins prM and E in the Endoplasmic Reticulum," *J. Virol.*, vol. 76, no. 11, pp. 5480–5491, 2002

[9] Henchal, E., Putnak, J.: "The Dengue Viruses," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 3, no. 4, pp. 376–396, 1990

[10] Majerová, T., Novotný, P., Krýsová, E., Konvalinka, J. (in press): "Exploiting the unique features of Zika and Dengue proteases for inhibitor design," *Biochimie*, 2019. Dostupné online https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.05.004

[11] Endy, T. P., Chunsuttiwat, S., Nisalak, A., Libraty, D. H., Green, S., Rothman, A. L., Vaughn, D. W., Ennis, F. A.: "Epidemiology of Inapparent and Symptomatic Acute Dengue Virus Infection: A Prospective Study of Primary School Children in Kamphaeng Phet, Thailand," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 156, no. 1, pp. 40–51, 2002

[12] Guzmán, M. G., Kouri, G.: "Dengue: an update," *Lancet Infect. Dis.*, vol. 2, no. 1, pp. 33–42, 2002

[13] Yuliarto, S., Kadafi, K., Anitasari, D.: "Restrictive versus Liberal Fluid Resuscitation in Children with Dengue Shock Syndrome: the differences in Clinical Outcomes and Hemodynamic Parameters," *Int. J. Pediatr.*, vol. 7, no. 4, pp. 9215–9224, 2019

[14] Rush, B.: "An account of the bilious remitting fever: As it appeared in philadelphia, in the summer and autumn of the year 1780," *Am. J. Med.*, vol. 11, no. 5, pp. 546–550, 1951

[15] Rosen, L.: "Dengue in Greece in 1927 and 1928 and the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever: new data and a different conclusion," *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 35, no. 3, pp. 642–653, 1986

[16] Musso, D., Nilles, E. J., Cao-Lormeau, V.-M.: "Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 20, no. 10, pp. O595–O596, 2014

[17] Wang, Z., Wang, P., An, J.: "Zika virus and Zika fever," *Virol. Sin.*, vol. 31, no. 2, pp. 103–109, 2016

[18] Fauci, A. S., Morens, D. M.: "Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat," *N Engl J Med.,* vol. 374, pp. 601-604, 2016

[19] Furuya, A. K. M., Hunt, D., George, K. S., Dupuis, A. P., Kramer, L. D., Shi, P. Y., Wong, S.: "Use of the immunoglobulin G avidity assay to differentiate between recent Zika and past dengue virus infections," *Clin. Sci.*, vol. 133, no. 7, pp. 859–867, 2019

[20] Lindquist, L., Vapalahti, O.: "Tick-borne encephalitis," *The Lancet*, vol. 371, no. 9627, pp. 1861–1871, 2008

[21] Weissenböck, H., Bakonyi, T., Rossi, G., Mani, P., Nowotny, N.: "Usutu Virus, Italy, 1996," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 19, no. 2, pp. 274–277, 2013

[22] Bakonyi, T., Hubálek, Z., Rudolf, I., Nowotny, N.: "Novel Flavivirus or New Lineage of West Nile Virus, Central Europe," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 11, no. 2, pp. 225–231, 2005

[23] Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., Haddow, A. J.: "Zika Virus (I). Isolations and serological specificity," *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 46, no. 5, pp. 509–520, 1952

[24] Gubler, D. J.: "Aedes aegypti and Aedes aegypti-Borne Disease Control in the 1990s: Top Down or Bottom Up," *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 40, no. 6, pp. 571–578, 1989

[25] Bonizzoni, M., Gasperi, G., Chen, X., James, A. A.: "The invasive mosquito species Aedes albopictus: current knowledge and future perspectives," *Trends Parasitol.*, vol. 29, no. 9, pp. 460–468, 2013

[26] "Dengue in Europe: is there an outbreak threat in new areas?" [Online]. Dostupné na: https://www.hospitalmanagement.net/comment/dengue-in-europe/[Navštíveno 13. 12. 2018]

[27] "WHO Warns of Zika Risk in Europe" [Online]. Dostupné na: https://www.scientificamerican.com/article/who-warns-of-zika-risk-in-europe/ [Navštíveno: 06. 03. 2019]

[28] Duffy, M. R., Chen, T.-H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, Ch., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A. J., Lanven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B. J., Fischer, M., Hayes, E. B.: "Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia," *N. Engl. J. Med.*, vol. 360, no. 24, pp. 2536–2543, 2009

[29] Grard, G., Caron, M., Mombo, I. M., Nkoghe, D., Ondo, S. M., Jiolle, D., Fontenille, D., Paupy, Ch., Leroy, E. M.: "Zika Virus in Gabon (Central Africa) – 2007: A New Threat from Aedes albopictus?," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 8, no. 2, e2681, 2014. Online publikace https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002681

[30] Calvet, G., Aguiar, R. S., Melo, A. S. O., Sampaio, S. A., de Filippis, I., Fabri, A., Araujo, E. S. M., de Sequeira, P. C., de Mendonca, M. C. L., de Oliveira, L., Tschoeke, D. A., Schrago, C. G., Thompson, F. L., Brasil, P., dos Santos, F. B., Nogueira, R. M. R., Tanuri, A., de Filippis, A. M. B.: "Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study," *Lancet Infect. Dis.*, vol. 16, no. 6, pp. 653–660, 2016

[31] Sohan, K., Cyrus, C. A.: "Ultrasonographic observations of the fetal brain in the first 100 pregnant women with Zika virus infection in Trinidad and Tobago," *Int. J. Gynecol. Obstet.*, vol. 139, no. 3, pp. 278–283, 2017

[32] Sarno, M., Sacramento, G. A., Khouri, R., do Rosário, M. S., Costa, F., Archanjo, G., Santos, L. A., Nery, N., Vasilakis, N., Ko, A. I., de Almeida, A. R.: "Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 10, no. 2, e0004517, 2016. Online publikace https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004517

[33] Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Di Lullo, E., Sandoval-Espinosa, C., Bershteyn, M., Kriegstein, A. R.: "Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Human Neural Stem Cells," *Cell Stem Cell*, vol. 18, no. 5, pp. 591–596, 2016

[34] Tang, H., Hammack, Ch., Ogden, S. C., Wen, Z., Qian, X., Li, Y., Yao, B., Shin, J., Zhang, F., Lee, E. M., Christian, K. M., Didier, R. A., Jin, P., Song, H., Ming, G.: "Zika Virus Infects Human Cortical Neural Precursors and Attenuates Their Growth," *Cell Stem Cell*, vol. 18, no. 5, pp. 587–590, 2016

[35] Lin, S., Yang, S., He, J., Guest, J. D., Ma, Z., Yang, L., Pierce, B. G., Tang, Q., Zhang, Y. J.: "Zika virus NS5 protein antagonizes type I interferon production via blocking TBK1 activation," *Virology*, vol. 527, pp. 180–187, 2019

[36] Cruz, V. H., Brekken, R. A.: "Assessment of TANK-binding kinase 1 as a therapeutic target in cancer," *J. Cell Commun. Signal.*, vol. 12, no. 1, pp. 83–90, 2018

[37] Delhase, M., Kim, S.-Y., Lee, H., Naiki-Ito, A., Chen, Y., Ahn, E.-R., Murata, K., Kim, S.-J., Lautsch, N., Kobayashi, K. S., Shirai, T., Karin, M., Nakanishi, M.: "TANK-binding kinase 1 (TBK1) controls cell survival through PAI-2/serpinB2 and transglutaminase 2," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 4, pp. E177–E186, 2012

[38] Xia, H., Luo, H., Shan, Ch., Muruato, A. E., Nunes, B. T. D., Medeiros, D. B. A., Zou, J., Xie, X., Giraldo, M. I., Vasconcelos, P. F. C., Weaver, S. C., Wang, T., Rajsbaum, R., Shi, P.-Y.: "An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, 414, 2018. Online publikace https://doi.org/10.1038/s41467-017-02816-2

[39] Liang, Q., Luo, Z., Zeng, J., Chen, W., Foo, S. S., Lee, S. A., Ge, J., Wang, S., Goldman, S. A., Zlokovic, B. V., Zhao, Z., Jung, J. U.: "Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy," *Cell Stem Cell*, vol. 19, no. 5, pp. 663–671, 2016

[40] Ma, J., Ketkar, H., Geng, T., Lo, E., Wang, L., Xi, J., Sun, Q., Zhu, Z., Cui, Y., Yang, L., Wang, P.: "Zika Virus Non-structural Protein 4A Blocks the RLR-MAVS Signaling," *Front. Microbiol.*, vol. 9, 2018

[41] Ding, Q., Gaska, J. M., Douam, F., Wei, L., Kim, D., Balev, M., Heller, B., Ploss, A.: "Species-specific disruption of STING-dependent antiviral cellular defenses by the Zika virus NS2B3 protease," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 115, no. 27, pp. E6310–E6318, 2018

[42] Wu, Y., Liu, Q., Zhou, J., Xie, W., Chen, C., Wang, Z., Yang, H., Cui, J.: "Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins *in vitro*," *Cell Discov.*, vol. 3, 17006, 2017. Online publikace https://doi.org/10.1038/celldisc.2017.6

[43] Siler, J. F., Hall, M. W., Hitchens, A. P.: "Dengue: Its History, Epidemiology, Mechanism of Transmission, Etiology, Clinical Manifestations, Immunity, and Prevention.," *Philipp J Sci*, vol. 29, no. 1–2, pp. 1-304, 1926

[44] Horsfall, F. L., Tamm, I.: Viral and Rickettsial Infections of Man, 4. vydání. Lippincott (1965)

[45] Li, R., Xu, L., Bjørnstad, O. N., Liu, K., Song, T., Chen, A., Xu, B., Liu, Q., Stenseth, N. C.: "Climate-driven variation in mosquito density predicts the spatiotemporal dynamics of dengue," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 116, no. 9, pp. 3624–3629, 2019

[46] "Dengue and severe dengue" [Online]. Dostupné na: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue [Navštíveno: 11. 03. 2019]

[47] Silva, E. M., Conde, J. N., Allonso, D., Ventura, G. T., Coelho, D. R., Carneiro, P. H., Silva, M. L., Paes, M. V., Raelo, K., Weissmuller, G., Bisch, P. M., Mohana-Borges, R.: "Dengue virus nonstructural 3 protein interacts directly with human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and reduces its glycolytic activity," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, 2651, 2019. Online publikace https://doi.org/10.1038/s41598-019-39157-7

[48] Heaton, N. S., Perera, R., Berger, K. L., Khadka, S., Lacount, D. J., Kuhn, R. J., Randall, G.: "Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 40, pp. 17345–17350, 2010

[49] Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Bühler, S., Bartenschlager, R.: "The Non-structural Protein 4A of Dengue Virus Is an Integral Membrane Protein Inducing Membrane Alterations in a 2K-regulated Manner," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 12, pp. 8873–8882, 2007

[50] Solomon, T., Dung, N. M., Vaughn, D. W., Kneen, R., Thao, L. T., Raengsakulrach, B., Loan, H. T., Day, N. P., Farrar, J., Myint, K. S., Warrell, M. J., James, W. S., Nisalak, A., White, N. J.: "Neurological manifestations of dengue infection," *The Lancet*, vol. 355, no. 9209, pp. 1053–1059, 2000

[51] Halstead, S. B.: "Monograph on dengue/dengue haemorrhagic fever," *Pathophysiol. Pathog. Dengue Hemorrhagic Fever*, pp. 80–103, 1993

[52] Petersen, E. E.: "Interim Guidelines for Pregnant Women During a Zika Virus Outbreak — United States, 2016," *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, vol. 65, 2016

[53] Dowd, K. A. *et al.*: "Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus," *Science*, vol. 354, no. 6309, pp. 237–240, 2016

[54] Muthumani, K., Griffin, B. D., Agarwal, S., Kudchodkar, S. B., Reuschel, E. L., Choi, H., Kraynyak, K. A., Duperret, E. K., Keaton, A. A., Chung, Ch., Kim, Y.

K., Booth, S. A., Racine, T., Yan, J., Morrow, M. P, Jiang, J., Lee, B., Ramos, S., Broderick, K. E., Reed, Ch. C., Khan, A. S., Humeau, L., Ugen, K. E., Park, Y. K., Maslow, J. N., Sardesai, N. Y., Kim, J. J., Kobinger, G. P., Weiner, D. B.: "*In vivo* protection against ZIKV infection and pathogenesis through passive antibody transfer and active immunisation with a prMEnv DNA vaccine," *Npj Vaccines*, vol. 1, 16021, 2016. Online publikace https://doi.org/10.1038/npjvaccines.2016.21

[55] Contreras, D., Arumugaswami, V.: "Zika Virus Infectious Cell Culture System and the In Vitro Prophylactic Effect of Interferons," *J. Vis. Exp. JoVE*, no. 114, 54767, 2016. Online publikace https://doi.org/10.3791/54767

[56] Oo, A., Teoh, B. T., Sam, S. S., Bakar, S. A., Zandi, K.: "Baicalein and baicalin as Zika virus inhibitors," *Arch. Virol.*, vol. 164, no. 2, pp. 585–593, 2019

[57] Gaudry, A., Bos, S., Viranaicken, W., Roche, M., Krejbich-Trotot, P., Gadea, G., Desprès, P., El-Kalamouní, C.: "The Flavonoid Isoquercitrin Precludes Initiation of Zika Virus Infection in Human Cells," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 4, E1093, 2018. Online publikace https://doi.org/10.3390/ijms19041093

[58] Francese, R., Civra, A., Rittà, M., Donalisio, M., Argenziano, M., Cavalli, R., Mougharbel, A. S., Kortz, U., Lembo, D.: "Anti-zika virus activity of polyoxometalates," *Antiviral Res.*, vol. 163, pp. 29–33, 2019

[59] Chen, L., Liu, Y., Wang, S., Sun, J., Wang, P., Xin, Q., Zhang, L., Xiao, G., Wang, W.: "Antiviral activity of peptide inhibitors derived from the protein E stem against Japanese encephalitis and Zika viruses," *Antiviral Res.*, vol. 141, pp. 140–149, 2017

[60] Mazzon, M., Ortega-Prieto, A. M., Imrie, D., Luft, C., Hess, L., Czieso, S., Grove, J., Skelton, J. K., Farleigh, L., Bugert, J. J., Wright, E., Temperton, N., Angell, R., Oxenford, S., Jacobs, M., Ketteler, R., Dorner, M., Marsch., M.: "Identification of Broad-Spectrum Antiviral Compounds by Targeting Viral Entry," *Viruses*, vol. 11, no. 2, E176, 2019. Online publikace https://doi.org/10.3390/v11020176

[61] Crance, J. M., Scaramozzino, N., Jouan, A., Garin, D.: "Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses," *Antiviral Res.*, vol. 58, no. 1, pp. 73–79, 2003

[62] Duan, W., Song, H., Wang, H., Chai, Y., Su, C., Qi, J., Shi, Y., Gao, G. F.: "The crystal structure of Zika virus NS5 reveals conserved drug targets," *EMBO J.*, vol. 36, no. 7, pp. 919–933, 2017

[63] Dar, H. A., Zaheer, T., Paracha, R. Z., Ali, A.: "Structural analysis and insight into Zika virus NS5 mediated interferon inhibition," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 51, pp. 143–152, 2017

[64] Cao, X., Li, Y., Jin, X., Li, Y., Guo, F., Jin, T.: "Molecular mechanism of divalent-metal-induced activation of NS3 helicase and insights into Zika virus inhibitor design," *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. 21, pp. 10505–10514, 2016

[65] Tian, H., Ji, X., Yang, X., Xie, W., Yang, K., Chen, C., Wu, C., Chi, H., Mu, Z., Wang, Z., Yang, H.: "The crystal structure of Zika virus helicase: basis for antiviral drug design," *Protein Cell*, vol. 7, no. 6, pp. 450–454, 2016

[66] Bullard-Feibelman, K. M., Govero, J., Zhu, Z., Salazar, V., Veselinovic, M., Diamond, M. S., Geiss, B. J.: "The FDA-approved drug sofosbuvir inhibits Zika virus infection," *Antiviral Res.*, vol. 137, pp. 134–140, 2017

[67] Elfiky, A. A.: "Zika viral polymerase inhibition using anti-HCV drugs both in market and under clinical trials," *J. Med. Virol.*, vol. 88, no. 12, pp. 2044–2051, 2016

[68] Kuivanen, S., Bespalov, M. M., Nandania, J., Ianevski, A., Velagapudi, V., De Brabander, J. K., Kainov, D. E., Vapalhati, O.: "Obatoclax, saliphenylhalamide and gemcitabine inhibit Zika virus infection in vitro and differentially affect cellular signaling, transcription and metabolism," *Antiviral Res.*, vol. 139, pp. 117–128, 2017

[69] Adcock, R. S., Chu, Y.-K., Golden, J. E., Chung, D.-H.: "Evaluation of anti-Zika virus activities of broad-spectrum antivirals and NIH clinical collection compounds using a cell-based, high-throughput screen assay," *Antiviral Res.*, vol. 138, pp. 47–56, 2017

[70] Cao, R.-Y., Xu, Y. F., Zhang, T. H., Yang, J. J., Yuan, Y., Hao, P., Shi, Y., Zhong, J., Zhong, W.: "Pediatric Drug Nitazoxanide: A Potential Choice for Control of Zika," *Open Forum Infect. Dis.*, vol. 4, no. 1, ofx009, 2017. Online publikace https://doi.org/10.1093/ofid/ofx009

[71] Halstead, S. B., Deen, J.: "The future of dengue vaccines," *The Lancet*, vol. 360, no. 9341, pp. 1243–1245, 2002

[72] Kinney, R. M., Huang, C. Y.-H.: "Development of New Vaccines against Dengue Fever and Japanese Encephalitis," *Intervirology*, vol. 44, no. 2–3, pp. 176–197, 2001

[73] Whitehead, S. S., Falgout, B., Hanley, K. A., Joseph, J., Blaney, E., Markoff, L., Murphy, B. R.: "A Live, Attenuated Dengue Virus Type 1 Vaccine Candidate with a 30-Nucleotide Deletion in the 3' Untranslated Region Is Highly Attenuated and Immunogenic in Monkeys," *J. Virol.*, vol. 77, no. 2, pp. 1653–1657, 2003

[74] Guirakhoo, F., Arroyo, J., Pugachev, K. V., Miller, C., Zhang, Z. X., Weltzin, R., Georgakopoulos, K., Catalan, J., Ocran, S., Soike, K., Ratterree, M., Monath, T. P.: "Construction, Safety, and Immunogenicity in Nonhuman Primates of a Chimeric Yellow Fever-Dengue Virus Tetravalent Vaccine," *J. Virol.*, vol. 75, no. 16, pp. 7290–7304, 2001

[75] Konishi, E., Yamaoka, M., Kurane, I., Mason, P. W.: "A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice," *Vaccine*, vol. 18, no. 11, pp. 1133–1139, 2000

[76] Halstead, S. B.: "Licensed Dengue Vaccine: Public Health Conundrum and Scientific Challenge," *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 95, no. 4, pp. 741–745, 2016

[77] Sabchareon, A., Wallace, D., Sirivichayakul, C., Limkittikul, K., Chanthavanich, P., Suvannadabba, S., Jiwariyavej, V., Dulyachai, W., Pengsaa, K., Wartel, T. A., Moureau, A., Saville, M., Bouckenooghe, A., Viviani, S., Tornieporth, N. G., Lang, J.: "Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial," *The Lancet*, vol. 380, no. 9853, pp. 1559–1567, 2012

[78] Clapham, H. E., Wills, B. A.: "Implementing a dengue vaccination programme—who, where and how?," *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 112, no. 8, pp. 367–368, 2018

[79] Kirkpatrick, B. D., Whitehead, S. S., Pierce, K. K., Tibery, C. M., Grier, P. L., Hynes, N. A., Larsson, C. J., Sabundayo, B. P., Talaat, K. R., Janiak, A., Carmolli, M. P., Luke, C. J., Diehl, S. A., Durbin, A. P.: "The live attenuated dengue vaccine

TV003 elicits complete protection against dengue in a human challenge model," *Sci. Transl. Med.*, vol. 8, no. 330, 330ra36, 2016. Online publikace https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf1517

[80] *Takeda's Dengue Vaccine Candidate Associated with Reduced Incidence of Dengue in Children and Adolescents; New 18-Month Interim Phase 2 Data Published in The Lancet Infectious Diseases- Korea Newswire* [Online]. Dostupné na: http://www.newswire.co.kr/newsRead.php?no=859283 [Navštíveno: 25. 03. 2019]

[81] Costa, S. M., Freire, M. S., Alves, A. M. B.: "DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus," *Vaccine*, vol. 24, no. 21, pp. 4562–4564, 2006

[82] Wu, S.-F., Liao, C. L., Lin, Y. L., Yeh, C. T., Chen, L. K., Huang, Y. F., Chou, H. Y., Huang, J. L., Shaio, M. F., Sytwu, H. K.: "Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice," *Vaccine*, vol. 21, no. 25, pp. 3919–3929, 2003

[83] George, J., Valiant, W. G., Mattapallil, M. J., Walker, M., Huang, Y.-J. S., Vanlandingham, D. L., Misamore, J., Greenhouse, J., Weiss, D. E., Verthelyi, D., Higgs, S., Andersen, H., Lewis, M. G., Mattapallil, J. J.: "Prior Exposure to Zika Virus Significantly Enhances Peak Dengue-2 Viremia in Rhesus Macaques," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, 10498, 2017. Online publikace https://doi.org/10.1038/s41598-017-10901-1

[84] Pantoja, P., Pérez-Guzmán E. X., Rodríguez, I. V., White, L. J., González, O., Serrano, C., Giavedoni, L., Hodara, V., Cruz, L., Arana, T., Martínez, M. I., Hassert, M. A., Brien, J. D., Pinto, A. K., de Silva, A., Sariol, C. A.: "Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus," *Nat. Commun.*, vol. 8, 15674, 2017. Online publikace https://doi.org/10.1038/ncomms15674

[85] Mackenzie, J. S., Gubler, D. J., Petersen, L. R.: "Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses," *Nat. Med.*, vol. 10, no. 12s, pp. S98–S109, 2004

[86] Cannalire, R., Tarantino, D., Astolfi, A., Barreca, M. L., Sabatini, S., Massari, S., Tabarrini, O., Milani, M., Querat, G., Mastrangelo, E., Manfroni, G., Cecchetti, V.: "Functionalized 2,1-benzothiazine 2,2-dioxides as new inhibitors of Dengue NS5 RNA-dependent RNA polymerase," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 143, pp. 1667–1676, 2018

[87] Pelliccia, S., Wu, Y. H., Coluccia, A., La Regina, G., Tseng, C. K., Famiglini, V., Masci, D., Hiscott, J., Lee, J. C., Silvestri, R.: "Inhibition of dengue virus replication by novel inhibitors of RNA-dependent RNA polymerase and protease activities," *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 32, no. 1, pp. 1091–1101, 2017

[88] Benmansour, F., Eydoux, C., Querat, G., de Lamballerie, X., Canard, B., Alvarez, K., Guillemot, J.-C., Barral, K.: "Novel 2-phenyl-5-[(E)-2-(thiophen-2-yl)ethenyl]-1,3,4-oxadiazole and 3-phenyl-5-[(E)-2-(thiophen-2-yl)ethenyl]-1,2,4-oxadiazole derivatives as dengue virus inhibitors targeting NS5 polymerase," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 109, pp. 146–156, 2016

[89] Smith, T. M., Lim, S. P., Yue, K., Busby, S. A., Arora, R., Seh, C. C., Wright, S. K., Nutiu, R., Niyomrattanakit, P., Wan, K. F., Beer, D., Shi, P. Y., Benson, T. E.: "Identifying Initiation and Elongation Inhibitors of Dengue Virus RNA Polymerase in a High-Throughput Lead-Finding Campaign," *J. Biomol. Screen.*, vol. 20, no. 1, pp. 153–163, 2015

[90] Niyomrattanakit, P., Chen, Y.-L., Dong, H., Yin, Z., Qing, M., Glickman, J. F., Lin, K., Mueller, D., Voshol, H., Lim, J. Y. H., Nilar, S., Keller, T. H., Shi, P.-Y.: "Inhibition of Dengue Virus Polymerase by Blocking of the RNA Tunnel," *J. Virol.*, vol. 84, no. 11, pp. 5678–5686, 2010

[91] Wagstaff, K. M., Sivakumaran, H., Heaton, S. M., Harrich, D., Jans, D. A.: "Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β-mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus," *Biochem. J.*, vol. 443, no. 3, pp. 851–856, 2012

[92] Ndjomou, J., Kolli, R., Mukherjee, S., Shadrick, W. R., Hanson, A. M., Sweeney, N. L., Bartczak, D., Li, K., Frankowski, K. J., Schoenen, F. J., Frick, D. N.: "Fluorescent primuline derivatives inhibit hepatitis C virus NS3-catalyzed RNA unwinding, peptide hydrolysis and viral replicase formation," *Antiviral Res.*, vol. 96, no. 2, pp. 245–255, 2012

[93] Sweeney, N. L., Hanson, A. M., Mukherjee, S., Ndjomou, J., Geiss, B. J., Steel, J. J., Frankowski, K. J., Li, K., Schoenen, F. J., Frick, D. N.: "Benzothiazole and Pyrrolone Flavivirus Inhibitors Targeting the Viral Helicase," *ACS Infect. Dis.*, vol. 1, no. 3, pp. 140–148, 2015

[94] Basavannacharya, C., Vasudevan, S. G.: "Suramin inhibits helicase activity of NS3 protein of dengue virus in a fluorescence-based high throughput assay format," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 453, no. 3, pp. 539–544, 2014

[95] Lian, W., Jang, J., Potisopon, S., Li, P. C., Rahmeh, A., Wang, J., Kwiatkowski, N. P., Gray, N. S., Yang, P. L.: "Discovery of Immunologically Inspired Small Molecules That Target the Viral Envelope Protein," *ACS Infect. Dis.*, vol. 4, no. 9, pp. 1395–1406, 2018

[96] Schmidt, A. G., Lee, K., Yang, P. L., Harrison, S. C.: "Small-Molecule Inhibitors of Dengue-Virus Entry," *PLOS Pathog.*, vol. 8, no. 4, e1002627, 2012. Online publikace https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002627

[97] Benmansour, F., Trist, I., Coutard, B., Decroly, E., Querat, G., Brancale, A., Barral, K.: "Discovery of novel dengue virus NS5 methyltransferase non-nucleoside inhibitors by fragment-based drug design," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 125, pp. 865–880, 2017

[98] Coutard, B., Decroly, E., Li, Ch., Sharff, A., Lescar, J., Bricogne, G., Barral, K.: "Assessment of Dengue virus helicase and methyltransferase as targets for fragment-based drug discovery," *Antiviral Res.*, vol. 106, pp. 61–70, 2014

[99] Yao, X., Guo, S., Wu, W., Wang, J., Wu, S., He, S., Wan, Y., Nandakumar, K. S., Chen, X., Sun, N., Zhu, Q., Liu, S.: "Q63, a novel DENV2 RdRp non-nucleoside inhibitor, inhibited DENV2 replication and infection," *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 138, no. 4, pp. 247–256, 2018

[100] Stahla-Beek, H. J., April, D. G., Saeedi, B. J., Hannah, A. M., Keenan, S. M., Geiss, B. J.: "Identification of a Novel Antiviral Inhibitor of the Flavivirus Guanylyltransferase Enzyme," *J. Virol.*, vol. 86, no. 16, pp. 8730–8739, 2012

[101] Tay, M. Y. F., Fraser, J. E., Chan, W. K., Moreland, N. J., Rathore, A. P., Wang, C., Vasudevan, S. G., Jans, D. A.: "Nuclear localization of dengue virus (DENV) 1–4 non-structural protein 5; protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin," *Antiviral Res.*, vol. 99, no. 3, pp. 301–306, 2013

[102] Wagstaff, K. M., Rawlinson, S. M., Hearps, A. C., Jans, D. A.: "An AlphaScreen®-Based Assay for High-Throughput Screening for Specific Inhibitors of Nuclear Import," *J. Biomol. Screen.*, vol. 16, no. 2, pp. 192–200, 2011

[103] Noble, C. G., Lim, S. P., Arora, R., Yokokawa, F., Nilar, S., Seh, C. C., Wright, S. K., Benson, T. E., Smith, P. W., Shi, P. Y.: "A Conserved Pocket in the Dengue Virus Polymerase Identified through Fragment-based Screening," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 16, pp. 8541–8548, 2016

[104] Stranix, B., Wu, J. J., Milot, G., Beaulieu, F., Bouchard, J.-E., Gouveia, K., Forte, A., Garde, S., Wang, Z., Mouscadet, J. F., Delelis, O., Xiao, Y.: "Pyridoxine hydroxamic acids as novel HIV-integrase inhibitors," *Bioorg Med Chem Lett.*, vol. 26, no. 4, pp. 1233-1236, 2016

[105] Xu, H.-T., Colby-Germinario, S. P., Hassounah, S., Quashie, P. K., Han, Y., Oliveira, M., Stranix, B. R., Wainberg, M. A.: "Identification of a Pyridoxine-Derived Small-Molecule Inhibitor Targeting Dengue Virus RNA-Dependent RNA Polymerase," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 60, no. 1, pp. 600–608, 2016

[106] Lim, S. P., Sonntag, L. S., Noble, C., Nilar, S. H., Ng, R. H., Zou, G., Monaghan, P., Chung, K. Y., Dong, H., Liu, B., Bodenreider, C., Lee, G., Ding, M., Chan, W. L., Wang, G., Jian, Y. L., Chao, A. T., Lescar, J., Yin, Z., Vedananda, T. R., Keller, T. H., Shi, P. Y.: "Small Molecule Inhibitors That Selectively Block Dengue Virus Methyltransferase," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 8, pp. 6233–6240, 2011

[107] Faustino, A. F., Carvalho, F. A., Martins, I. C., Castanho, M. A., Mohana-Borges, R., Almeida, F. C., Da Poian, A. T., Santos, N. C.: "Dengue virus capsid protein interacts specifically with very low-density lipoproteins," *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, vol. 10, no. 1, pp. 247–255, 2014

[108] Leal, E. S., Aucar, M. G., Gebhard, L. G., Iglesias, N. G., Pascual, M. J., Casal, J. J., Gamarnik, A. V., Cavasotto, C. N., Bollini, M.: "Discovery of novel dengue virus entry inhibitors via a structure-based approach," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 27, no. 16, pp. 3851–3855, 2017

[109] Galiano, V., Garcia-Valtanen, P., Micol, V., Encinar, J. A.: "Looking for inhibitors of the dengue virus NS5 RNA-dependent RNA-polymerase using a molecular docking approach," *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 10, pp. 3163–3181, 2016

[110] Powers, C. N., Setzer, W. N.: "An In-Silico Investigation of Phytochemicals as Antiviral Agents Against Dengue Fever," *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, vol. 19, no. 7, pp. 516-536, 2016

[111] Tarantino, D., Cannalire, R., Mastrangelo, E., Croci, R., Querat, G., Barreca, M. L., Bolognesi, M., Manfroni, G., Cecchetti, V., Milani, M.: "Targeting flavivirus RNA dependent RNA polymerase through a pyridobenzothiazole inhibitor," *Antiviral Res.*, vol. 134, pp. 226–235, 2016

[112] Vincetti, P., Caporuscio, F., Kaptein, S., Gioiello, A., Mancino, V., Suzuki, Y., Yamamoto, N., Crespan, E., Lossani, A., Maga, G., Rastelli, G., Castagnolo, D., Neyts, J., Leyssen, P., Costantino, G., Radi, M.: "Discovery of Multitarget Antivirals Acting on Both the Dengue Virus NS5-NS3 Interaction and the Host Src/Fyn Kinases," *J. Med. Chem.*, vol. 58, no. 12, pp. 4964–4975, 2015

[113] Mastrangelo, E., Pezzullo, M., De Burghgraeve, T., Kaptein, S., Patorino, B., Dallmeier, K., de Lamballerie, X., Neyts, J., Hanson, A. M., Frick, D. N., Bolognesi, M., Milani., M.*:* "Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 67, no. 8, pp. 1884–1894, 2012

[114] De Wispelaere, M., Lian, W., Potisopon, S., Li, P. C., Jang, J., Ficarro, S. B., Clark, M. J., Zhu, X., Kaplan, J. B., Pitts, J. D., Wales, T. E., Wang, J., Engen, J. R., Marto, J. A., Gray, N. S., Yang, P. L.: "Inhibition of Flaviviruses by Targeting a Conserved Pocket on the Viral Envelope Protein," *Cell Chem. Biol.*, vol. 25, no. 8, 1006–1016.e8, 2018. Online publikace https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.05.011

[115] Lu, D., Liu, J., Zhang, Y., Liu, F., Zeng, L., Peng, R., Yang, L., Ying, H., Tang, W., Chen, W., Zuo, J., Tong, X., Liu, T., Hu, Y.: "Discovery and optimization of phthalazinone derivatives as a new class of potent dengue virus inhibitors," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 145, pp. 328–337, 2018

[116] Nobori, H., Toba, S., Yoshida, R., Hall, W. W., Orba, Y., Sawa, H., Sato, A.: "Identification of Compound-B, a novel anti-dengue virus agent targeting the non-structural protein 4A," *Antiviral Res.*, vol. 155, pp. 60–66, 2018

[117] Smith, J. L., Sheridan, K., Parkins, C. J., Frueh, L., Jemison, A. L., Strode, K., Dow, G., Nilsen, A., Hirsh, A. J.: "Characterization and structure-activity relationship analysis of a class of antiviral compounds that directly bind dengue virus capsid protein and are incorporated into virions," *Antiviral Res.*, vol. 155, pp. 12–19, 2018

[118] Pryke, K. M., Abraham, J., Sali, T. M., Gall, B. J., Archer, I., Liu, A., Bambina, S., Baird, J., Gough, M., Chakhtoura, M., Haddad, E. K., Kirby, I. T., Nilsen, A., Streblow, D. N., Hirsch, A. J., Smith, J. L., DeFilippis, V. R.: "A Novel Agonist of the TRIF Pathway Induces a Cellular State Refractory to Replication of Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses," *mBio*, vol. 8, no. 3, e00452-17, 2017. Online publikace https://doi.org/10.1128/mBio.00452-17

[119] Smith, J. L., Stein, D. A., Shum, D., Fischer, M. A., Radu, C., Bhinder, B., Djaballah, H., Nelson, J. A., Früh, K., Hirsch, A. J.: "Inhibition of Dengue Virus Replication by a Class of Small-Molecule Compounds That Antagonize Dopamine Receptor D4 and Downstream Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling," *J. Virol.*, vol. 88, no. 10, pp. 5533–5542, 2014

[120] Fischer, M. A., Smith, J. L., Shum, D., Stein, D. A., Parkins, Ch., Bhinder, B., Radu, Ch., Hirsch, A. J., Djaballah, H., Nelson, J. A., Früh, K.: "Flaviviruses Are Sensitive to Inhibition of Thymidine Synthesis Pathways," *J. Virol.*, vol. 87, no. 17, pp. 9411–9419, 2013

[121] Yang, C.-C., Hu, H. S., Wu, R. H., Wu, S. H., Lee, S. J., Jiaang, W. T., Chern, J. H., Huang, Z. S., Wu, H. N., Chang, C. M., Yueh, A.*:* "A Novel Dengue Virus Inhibitor, BP13944, Discovered by High-Throughput Screening with Dengue

Virus Replicon Cells Selects for Resistance in the Viral NS2B/NS3 Protease," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, no. 1, pp. 110–119, 2014

[122] Hernandez-Morales, I., Geluykens, P., Clynhens, M., Strijbos, R., Goethals, O., Megens, S., Verheyen, N., Last, S., McGowan, D., Coesemans, E., De Boeck, B., Stoops, B., Devogelaere, B., Pauwels, F., Vandyck, K., Berke, J. M., Raboisson, P, Simmen, K., Lory, P., Van Loock, M.: "Characterization of a dengue NS4B inhibitor originating from an HCV small molecule library," *Antiviral Res.*, vol. 147, pp. 149–158, 2017

[123] Van Cleef, K. W. R., Overheul, G. J., Thomassen, M. C., Kaptein, S. J., Davidson, A. D., Jacobs, M., Neyts, J., van Kuppeveld, F. J., van Rij, R. P.: "Identification of a new dengue virus inhibitor that targets the viral NS4B protein and restricts genomic RNA replication," *Antiviral Res.*, vol. 99, no. 2, pp. 165–171, 2013

[124] Venkatesham, A., Saudi, M., Kaptein, S., Neyts, J., Rozenski, J., Froeyen, M., Van Aerschot, A.: "Aminopurine and aminoquinazoline scaffolds for development of potential dengue virus inhibitors," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 126, pp. 101–109, 2017

[125] Saudi, M., Zmurko, J., Kaptein, S., Rozenski, J., Gadakh, B., Chaltin, P., Marchand, A., Neyts, J., Van Aerschot, A.: "Synthetic strategy and antiviral evaluation of diamide containing heterocycles targeting dengue and yellow fever virus," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 121, pp. 158–168, 2016

[126] Saudi, M., Zmurko, J., Kaptein, S., Rozenski, J., Neyts, J., Van Aerschot, A.: "Synthesis and evaluation of imidazole-4,5- and pyrazine-2,3-dicarboxamides targeting dengue and yellow fever virus," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 87, pp. 529–539, 2014

[127] Rausch, K., Hackett, B. A., Weinbren, N. L., Reeder, S. M., Sadovsky, Y., Hunter, C. A., Schultz, D. C., Coyne, C. B., Cherry, S.: "Screening Bioactives Reveals Nanchangmycin as a Broad Spectrum Antiviral Active against Zika Virus," *Cell Rep.*, vol. 18, no. 3, pp. 804–815, 2017

[128] Byrd, C. M., Dai, D., Grosenbach, D. W., Berhanu, A., Jones, K. F., Cardwell, K. B., Schneider, C., Wineinger, K. A., Page, J. M., Harver, C., Stavale, E., Tyavanagimatt, S., Stone, M. A., Bartenschlager, R., Scaturro, P., Hruby, D. E., Jordan, R.: "A Novel Inhibitor of Dengue Virus Replication That Targets the Capsid Protein," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, no. 1, pp. 15–25, 2013

[129] Carocci, M., Hinshaw, S. M., Rodgers, M. A., Villareal, V. A., Burri, D. J., Pilankatta, R., Maharaj, N. P., Gack, M. U., Stavale, E. J., Warfield, K. L., Yang, P. L.: "The Bioactive Lipid 4-Hydroxyphenyl Retinamide Inhibits Flavivirus Replication," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, no. 1, pp. 85–95, 2015

[130] Migliaccio, G., Tomassini, J. E., Carroll, S. S., Tomei, L., Altamura, S., Bhat, B., Bartholomew, L., Bosserman, M. R., Ceccacci, A., Colwell, L. F., Cortese, R., De Francesco, R., Eldrup, A. B., Getty, K. L., Hou, X. S., LaFemina, R. L., Ludmerer, S. W., MacCoss, M., McMasters, D. R., Stahlhut, M. W., Olsen, D. B., Hazuda, D. J., Flores, O. A.: "Characterization of Resistance to Non-obligate Chain-terminating Ribonucleoside Analogs That Inhibit Hepatitis C Virus Replication in Vitro," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 49, pp. 49164–49170, 2003

[131] Zandi, K., Bassit, L., Amblard, F., Cox, B. D., Hassandarvish, P., Moghaddam, E., Yueh, A., Rodrigues, G. O. L., Passos, I., Costa, V. V., AbuBakar, S., Zhou, L.,

Kohler, J., Teixeira, M. M., Schinazi, R. F.: "Nucleoside Analogs with Selective Antiviral Activity against Dengue Fever and Japanese Encephalitis Viruses," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 63, no. 7, e00397, 2019. Online publikace https://doi.org/10.1128/AAC.00397-19

[132] Wang, G., Lim, S. P., Chen, Y. L., Hunziker, J., Rao, R., Gu, F., Seh, C. C., Ghafar, N. A., Xu, H., Chan, K., Lin, X., Saunders, O. L., Fenaux, M., Zhong, W., Shi, P. Y., Yokokawa, F.: "Structure-activity relationship of uridine-based nucleoside phosphoramidate prodrugs for inhibition of dengue virus RNA-dependent RNA polymerase," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 28, no. 13, pp. 2324–2327, 2018

[133] Lin, C., Yu, J., Hussain, M., Zhou, Y., Duan, A., Pan, W., Yuan, J., Zhang, J.: "Design, synthesis, and biological evaluation of novel 7-deazapurine nucleoside derivatives as potential anti-dengue virus agents," *Antiviral Res.*, vol. 149, pp. 95–105, 2018

[134] Kurt Yilmaz, N., Swanstrom, R., Schiffer, C. A.: "Improving Viral Protease Inhibitors to Counter Drug Resistance," *Trends Microbiol.*, vol. 24, no. 7, pp. 547–557, 2016

[135] Crouchet, E., Wrensch, F., Schuster, C., Zeisel, M. B., Baumert, T. F.: "Host-targeting therapies for hepatitis C virus infection: current developments and future applications," *Ther. Adv. Gastroenterol.*, vol. 11, 2018. Online publikace https://doi.org/10.1177/1756284818759483

[136] Falgout, B., Miller, R. H., Lai, C. J.: "Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity.," *J. Virol.*, vol. 67, no. 4, pp. 2034–2042, 1993

[137] Gupta, G., Lim, L., Song, J.: "NMR and MD Studies Reveal That the Isolated Dengue NS3 Protease Is an Intrinsically Disordered Chymotrypsin Fold Which Absolutely Requests NS2B for Correct Folding and Functional Dynamics," *PLOS ONE*, vol. 10, no. 8, e0134823, 2015. Online publikace https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134823

[138] Luo, D., Xu, T., Hunke, C., Gruber, G., Vasudevan, S. G., Lescar, J.: "Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus," *J. Virol.*, vol. 82, no. 1, pp. 173–183, 2008

[139] Clum, S., Ebner, K. E., Padmanabhan, R.: "Cotranslational Membrane Insertion of the Serine Proteinase Precursor NS2B-NS3(Pro) of Dengue Virus Type 2 Is Required for Efficient in Vitro Processing and Is Mediated through the Hydrophobic Regions of NS2B," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 49, pp. 30715–30723, 1997

[140] Brinkworth, R. I., Fairlie, D. P., Leung, D., Young, P. R.: "Homology model of the dengue 2 virus NS3 protease: putative interactions with both substrate and NS2B cofactor.," *J. Gen. Virol.*, vol. 80, no. 5, pp. 1167–1177, 1999

[141] Erbel, P., Schiering, N., D'Arcy, A., Renatus, M., Kroemer, M., Lim, S. P., Yin, Z., Keller, T. H., Vasudevan, S. G., Hommel, U.: "Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 13, no. 4, pp. 372–373, 2006

[142] Chen, X., Yang, K., Wu, C., Chen, C., Hu, C., Buzovetsky, O., Wang, Z., Ji, X., Xiong, Y, Yang, H.: "Mechanisms of activation and inhibition of Zika virus NS2B-NS3 protease," *Cell Res.*, vol. 26, no. 11, pp. 1260–1263, 2016

[143] De la Cruz, L., Nguyen, T. H., Ozawa, K., Shin, J., Graham, B., Huber, T., Otting, G.:"Binding of Low Molecular Weight Inhibitors Promotes Large Conformational Changes in the Dengue Virus NS2B-NS3 Protease: Fold Analysis by Pseudocontact Shifts," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 47, pp. 19205–19215, 2011

[144] Falgout, B., Pethel, M., Zhang, Y. M., Lai, C. J.: "Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins," *J. Virol.*, vol. 65, no. 5, pp. 2467-2475, 1991

[145] Chotiwan, N., Andre, B. G., Sanchez-Vargas, I., Islam, M. N., Grabowski, J. M., Hopf-Jannasch, A., Gough, E., Nakayasu, E., Blair, C. D., Belisle, J. T., Hill, C. A., Kuhn, R. J., Perera, R.: "Dynamic remodeling of lipids coincides with dengue virus replication in the midgut of Aedes aegypti mosquitoes," *PLOS Pathog.*, vol. 14, no. 2, e1006853, 2018. Online publikace https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006853

[146] Añez, G., Heisey, D. A., Volkova, E., Rios, M.: "Complete Genome Sequences of Dengue Virus Type 1 to 4 Strains Used for the Development of CBER/FDA RNA Reference Reagents and WHO International Standard Candidates for Nucleic Acid Testing," *Genome Announc*, vol. 4, no. 1, e01583-15, 2016. Online publikace https://doi.org/10.1128/genomeA.01583-15

[147] Nitsche, C., Holloway, S., Schirmeister, T., Klein, C. D.: "Biochemistry and Medicinal Chemistry of the Dengue Virus Protease," *Chem. Rev.*, vol. 114, no. 22, pp. 11348–11381, 2014

[148] Li, J., Lim, S. P., Beer, D., Patel, V., Wen, D., Tumanut, C., Tully, D. C., Williams, J. A., Jiricek, J., Priestle, J. P., Harris, J. L., Vasudevan, S. G.: "Functional Profiling of Recombinant NS3 Proteases from All Four Serotypes of Dengue Virus Using Tetrapeptide and Octapeptide Substrate Libraries," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 31, pp. 28766–28774, 2005

[149] Sun, G., Larsen, C. N., Baumgarth, N., Klem, E. B., Scheuermann, R. H.: "Comprehensive Annotation of Mature Peptides and Genotypes for Zika Virus," *PLOS ONE*, vol. 12, no. 1, e0170462, 2017. Online publikace https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170462

[150] Saw, W. G., Pan, A., Subramanian Manimekalai, M. S., Grüber, A., Grüber, G.: "Structure and flexibility of non-structural proteins 3 and -5 of Dengue- and Zika viruses in solution," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 143, pp. 67-77, 2019

[151] Klema, V. J., Padmanabhan, R., Choi, K. H.: "Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping," *Viruses*, vol. 7, no. 8, pp. 4640–4656, 2015

[152] Singleton, M. R., Wigley, D. B.: "Modularity and Specialization in Superfamily 1 and 2 Helicases," *J. Bacteriol.*, vol. 184, no. 7, pp. 1819-26, 2002

[153] Selisko, B., Wang, C., Harris, E., Canard, B.: "Regulation of Flavivirus RNA synthesis and replication," *Curr. Opin. Virol.*, vol. 9, pp. 74–83, 2014

[154] Wang, C.-C., Huang, Z.-S., Chiang, P.-L., Chen, C.-T., Wu, H.-N.: "Analysis of the nucleoside triphosphatase, RNA triphosphatase, and unwinding activities of the

helicase domain of dengue virus NS3 protein," *FEBS Lett.*, vol. 583, no. 4, pp. 691–696, 2009

[155] Saisawang, C., Kuadkitkan, A., Auewarakul, P., Smith, D. R., Ketterman, A. J.: "Glutathionylation of dengue and Zika NS5 proteins affects guanylyltransferase and RNA dependent RNA polymerase activities," *Plos One*, vol. 13, no. 2, e0193133, 2018. Online publikace https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193133

[156] Rusanov, T., Kent, T., Saeed, M., Hoang, T. M., Thomas, C., Rice, Ch. M., Pomerantz, R. T.: "Identification of a Small Interface between the Methyltransferase and RNA Polymerase of NS5 that is Essential for Zika Virus Replication," *Sci. Rep.*, vol. 8, 17384, 2018. Online publikace https://doi.org/10.1038/s41598-018-35511-3

[157] Chandramouli, S., Joseph, J. S., Daudenarde, S., Gatchalian, J., Cornillez-Ty, C., Kuhn, P.: "Serotype-specific structural differences in the protease-cofactor complexes of the dengue virus family," *J. Virol.*, vol. 84, no. 6, pp. 3059–3067, 2010

[158] Lei, J., Hansen, G., Nitsche, C., Klein, C. D., Zhang, L., Hilgenfeld, R.: "Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor," *Science*, vol. 353, no. 6298, pp. 503–505, 2016

[159] Phoo, W. W., Li, Y., Zhang, Z., Lee, M. Y., Loh, Y. R., Tan, Y. B., Ng, E. Y., Lescar, J., Kang, C., Luo, D.: "Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage," *Nat. Commun.*, vol. 7, 13410, 2016. Online publikace https://doi.org/10.1038/ncomms13410

[160] Zhang, Z., Li, Y., Loh, Y. R., Phoo, W. W., Hung, A. W., Kang, C., Luo, D.: "Crystal structure of unlinked NS2B-NS3 protease from Zika virus," *Science*, vol. 354, no. 6319, pp. 1597–1600, 2016

[161] Li, Y., Zhang, Z., Phoo, W. W., Loh, Y. R., Wang, W., Liu, S., Chen, M. W., Hung, A. W., Keller, T. H., Luo, D., Kang, C.: "Structural Dynamics of Zika Virus NS2B-NS3 Protease Binding to Dipeptide Inhibitors," *Struct. Lond. Engl. 1993*, vol. 25, no. 8, 1242–1250.e3, 2017. Online publikace https://doi.org/10.1016/j.str.2017.06.006

[162] Lin, K.-H., Ali, A., Rusere, L., Soumana, D. I., Yilmaz, N. K., Schiffer, C. A.: "Dengue Virus NS2B/NS3 Protease Inhibitors Exploiting the Prime Side," *J. Virol.*, vol. 91, no. 10, e00045-17, 2017. Online publikace https://doi.org/10.1128/JVI.00045-17

[163] Nitsche, C., Zhang, L., Weigel, L. F., Schilz, J., Graf, D., Bartenschlager, R., Hilgenfeld, R., Klein, C. D.: "Peptide–Boronic Acid Inhibitors of Flaviviral Proteases: Medicinal Chemistry and Structural Biology," *J. Med. Chem.*, vol. 60, no. 1, pp. 511–516, 2017

[164] Takagi, Y., Matsui, K., Nobori, H., Maeda, H., Sato, A., Kurosu, T., Orba, Y., Sawa, H., Hattori, K., Higashino, K., Numata, Y., Yoshida, Y.: "Discovery of novel cyclic peptide inhibitors of dengue virus NS2B-NS3 protease with antiviral activity," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 27, no. 15, pp. 3586–3590, 2017

[165] Weng, Z., Shao, X., Graf, D., Wang, C., Klein, C. D., Wang, J., Zhou, G. C.: "Identification of fused bicyclic derivatives of pyrrolidine and imidazolidinone as dengue virus-2 NS2B-NS3 protease inhibitors," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 125, pp. 751–759, 2017

[166] Weigel, L. F., Nitsche, C., Graf, D., Bartenschlager, R., Klein, C. D.: "Phenylalanine and Phenylglycine Analogues as Arginine Mimetics in Dengue Protease Inhibitors," *J. Med. Chem.*, vol. 58, no. 19, pp. 7719–7733, 2015

[167] Yin, Z., Patel, S. J., Wang, W.-L., Chan, W.-L., Rao, K. R. R., Wang, G., Ngew, X, Patel, V., Beer, D., Knox, J. E., Ma, N. L., Ehrhardt, C., Lim, S. P., Vasudevan, S. G., Keller, T. H.: "Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 2: SAR study of tetrapeptide aldehyde inhibitors," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 16, no. 1, pp. 40–43, 2006

[168] Brecher, M., Li, Z., Liu, B., Zhang, J., Koetzner, Ch. A., Alifarag, A., Jones, S. A., Lin, Q., Kramer, L. D., Li, H.: "A conformational switch high-throughput screening assay and allosteric inhibition of the flavivirus NS2B-NS3 protease," *PLOS Pathog.*, vol. 13, no. 5, e1006411, 2017. Online publikace https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006411

[169] Cabarcas-Montalvo, M., Maldonado-Rojas, W., Montes-Grajales, D., Bertel-Sevilla, A., Wagner, Döbler, I., Sztajer, H., Reck, M., Flechas-Alarcon, M., Ocazionez, R., Olivero-Verbel, J.: "Discovery of antiviral molecules for dengue: In silico search and biological evaluation," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 110, pp. 87–97, 2016

[170] Li, L., Basavannacharya, C., Chan, K. W. K., Shang, L., Vasudevan, S. G., Yin, Z.: "Structure-guided Discovery of a Novel Non-peptide Inhibitor of Dengue Virus NS2B–NS3 Protease," *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 86, no. 3, pp. 255–264, 2015

[171] Viswanathan, U., Tomlinson, S. M., Fonner, J. M., Mock, S. A., Watowich, S. J.: "Identification of a Novel Inhibitor of Dengue Virus Protease through Use of a Virtual Screening Drug Discovery Web Portal," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 54, no. 10, pp. 2816–2825, 2014

[172] Pambudi, S., Kawashita, N., Phanthanawiboon, S., Omokoko, M. D., Masrinoul, P., Yamashita, A., Limkittikul, K., Yasunaga, T., Takagi, T., Ikuta, K., Kurosu, T.: "A small compound targeting the interaction between nonstructural proteins 2B and 3 inhibits dengue virus replication," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 440, no. 3, pp. 393–398, 2013

[173] Constant, D. A., Mateo, R., Nagamine, C. M., Kirkegaard, K.: "Targeting intramolecular proteinase NS2B/3 cleavages for trans-dominant inhibition of dengue virus," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 115, no. 40, pp. 10136–10141, 2018

[174] Fukuda, K., Vishnuvardhan, D., Sekiya, S., Hwang, J., Kakiuchi, N., Taira, K., Shimotohno, K., Kumar, P. K., Nishikawa, S.: "Isolation and characterization of RNA aptamers specific for the hepatitis C virus nonstructural protein 3 protease," *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, no. 12, pp. 3685–3694, 2000

[175] Beesetti, H., Tyagi, P., Medapi, B., Krishna, V. S., Sriram, D., Khanna, N., Swaminathan, S.: "A quinoline compound inhibits the replication of dengue virus serotypes 1-4 in Vero cells," *Antivir. Ther.*, vol. 23, no. 5, pp. 385–394, 2018

[176] Zhou, G.-C., Weng, Z., Shao, X., Liu, F., Nie, X., Liu, J., Wang, D., Wang, C., Guo, K.: "Discovery and SAR studies of methionine–proline anilides as dengue virus NS2B-NS3 protease inhibitors," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 23, no. 24, pp. 6549–6554, 2013

[177] Balasubramanian, A., Manzano, M., Teramoto, T., Pilankatta, R., Padmanabhan, R.: "High-throughput screening for the identification of small-molecule inhibitors of the flaviviral protease," *Antiviral Res.*, vol. 134, pp. 6–16, 2016

[178] Koh-Stenta, X., Joy, J., Wang, S. F., Kwek, P. Z., Wee, J. L., Wan, K. F., Gayen, S., Chen, A. S., Kang, C., Lee, M. A., Poulsen, A., Vasudevan, S. G., Hill, J., Nacro, K.: "Identification of covalent active site inhibitors of dengue virus protease," *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 9, pp. 6389–6399, 2015

[179] Johnston, P. A., Philips, J., Shun, T. Y., Shinde, S., Lazo, J. S., Huryn, D. M., Myers, M. C., Ratnikov, B. I., Smith, J. W., Su, Y., Dahl, R., Cosford, N. D., Shiryaev, S. A., Strongin, A. Y.: "HTS Identifies Novel and Specific Uncompetitive Inhibitors of the Two-Component NS2B-NS3 Proteinase of West Nile Virus," *ASSAY Drug Dev. Technol.*, vol. 5, no. 6, pp. 737–750, 2007

[180] Wu, H., Bock, S., Snitko, M., Berger, T., Weidner, T., Holloway, S., Kanitz, M., Diederich, W. E., Steuber, H., Walter, C., Hofmann, D., Weißbrich, B., Spannaus, R., Acosta, E. G., Bartenschlager, R., Engels, B., Schirmeister, T., Bodem, J.: "Novel Dengue Virus NS2B/NS3 Protease Inhibitors," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, no. 2, pp. 1100–1109, 2015

[181] Liu, H., Wu, R., Sun, Y., Ye, Y., Chen, J., Luo, X., Shen, X., Liu, H.: "Identification of novel thiadiazoloacrylamide analogues as inhibitors of dengue-2 virus NS2B/NS3 protease," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 22, no. 22, pp. 6344–6352, 2014

[182] Tomlinson, S. M., Watowich, S. J.: "Use of parallel validation high-throughput screens to reduce false positives and identify novel dengue NS2B-NS3 protease inhibitors," *Antiviral Res.*, vol. 93, no. 2, pp. 245–252, 2012

[183] Xu, H.-T., Colby-Germinario, S. P., Hassounah, S. A., Fogarty, C., Osman, N., Palanisamy, N., Han, Y., Oliveira, M., Quan, Y., Wainberg, M. A.: "Evaluation of Sofosbuvir (β-D-2'-deoxy-2'-α-fluoro-2'-β-C-methyluridine) as an inhibitor of Dengue virus replication," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, 6345, 2017. Online publikace https://doi.org/10.1038/s41598-017-06612-2

[184] Yang, C.-C., Hsieh, Y. C., Lee, S. J., Wu, S. H., Liao, C. L., Tsao, C. H., Chao, Y. S., Chern, J. H., Wu, C. P., Yueh, A.: "Novel Dengue Virus-Specific NS2B/NS3 Protease Inhibitor, BP2109, Discovered by a High-Throughput Screening Assay," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 55, no. 1, pp. 229–238, 2011

[185] Leung, D., Schroder, K., White, H., Fang, N.-X., Stoermer, M. J., Abbenante, G., Martin, J. L., Young, P. R., Fairlie, D. P.: "Activity of Recombinant Dengue 2 Virus NS3 Protease in the Presence of a Truncated NS2B Co-factor, Small Peptide Substrates, and Inhibitors," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 49, pp. 45762–45771, 2001

[186] Yildiz, M., Ghosh, S., Bell, J. A., Sherman, W., Hardy, J. A.: "Allosteric Inhibition of the NS2B-NS3 Protease from Dengue Virus," *ACS Chem. Biol.*, vol. 8, no. 12, pp. 2744–2752, 2013

[187] De Sousa, L. R. F., Wu, H., Nebo, L., Fernandes, J. B., da Silva, M. F., Kiefer, W., Kanitz, M., Bodem, J., Diederich, W. E., Schirmeister, T., Vieira, P. C.: "Flavonoids as noncompetitive inhibitors of Dengue virus NS2B-NS3 protease: Inhibition kinetics and docking studies," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 23, no. 3, pp. 466–470, 2015

[188] Rut, W., Zhang, L., Kasperkiewicz, P., Poreba, M., Hilgenfeld, R., Drąg, M.: "Extended substrate specificity and first potent irreversible inhibitor/activity-

based probe design for Zika virus NS2B-NS3 protease," *Antiviral Res.*, vol. 139, pp. 88–94, 2017

[189] Pinkham, A. M., Yu, Z., Cowan, J. A.: "Broad-spectrum catalytic metallopeptide inactivators of Zika and West Nile virus NS2B/NS3 proteases," *Chem. Commun.*, vol. 54, no. 87, pp. 12357–12360, 2018

[190] Nitsche, C., Passioura, T., Varava, P., Mahawaththa, M. C., Leuthold, M. M., Klein, Ch. D., Suga, H., Otting, G.: "De Novo Discovery of Nonstandard Macrocyclic Peptides as Noncompetitive Inhibitors of the Zika Virus NS2B-NS3 Protease," *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 10, no. 2, pp. 168–174, 2019

[191] Lim, H., Nguyen, T. T. H., Kim, N. M., Park, J.-S., Jang, T.-S., Kim, D.: "Inhibitory effect of flavonoids against NS2B-NS3 protease of ZIKA virus and their structure activity relationship," *Biotechnol. Lett.*, vol. 39, no. 3, pp. 415–421, 2017

[192] Sahoo, M., Jena, L., Daf, S., Kumar, S.: "Virtual Screening for Potential Inhibitors of NS3 Protein of Zika Virus," *Genomics Inform.*, vol. 14, no. 3, pp. 104–111, 2016

[193] Zuo, Z., Liew, O. W., Chen, G., Chong, P. C. J., Lee, S. H., Chen, K., Jiang, H., Puah, C. M., Zhu, W.: "Mechanism of NS2B-mediated activation of NS3pro in dengue virus: molecular dynamics simulations and bioassays," *J. Virol.*, vol. 83, no. 2, pp. 1060–1070, 2009

[194] Guo, J., Xu, C., Li, X., Chen, S.: "A Simple, Rapid and Sensitive FRET Assay for Botulinum Neurotoxin Serotype B Detection," *PLOS ONE,* vol. 9, no. 12, e114124, 2014. Online publikace https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114124

[195] Leatherbarrow, R.J. (2009) GraFit Version 7, Erithacus Software Ltd., Horley, U.K.

[196] Microsoft Office 16 (2016), Microsoft Corp., Redmond, WA, USA

[197] GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California, USA, www.graphpad.com

[198] OriginPro version 8. OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA

[199] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3. Schrödinger, LLC

[200] Morrison, J. F.: "Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol.*, vol. 185, no. 2, pp. 269–286, 1969

[201] Dixon, M.: "The determination of enzyme inhibitor constants," *Biochem. J.*, vol. 55, no. 1, pp. 170–171, 1953

[202] ACD/ChemSketch, Freeware, version 12.01, Advanced Chemistry Development, Bracknell, UK

[203] Behnam, M. A. M., Graf, D., Bartenschlager, R., Zlotos, D. P., Klein, Ch. D.: "Discovery of Nanomolar Dengue and West Nile Virus Protease Inhibitors Containing a 4-Benzyloxyphenylglycine Residue," *J. Med. Chem.*, vol. 58, no. 23, pp. 9354-9370, 2015

[204] Shannon, A. E., Chappell, K. J., Stoermer, M. J., Chow, S. Y., Kok, W. M., Fairlie, D. P., Young, P. R.: "Simultaneous uncoupled expression and purification of the Dengue virus NS3 protease and NS2B co-factor domain," *Protein Expr. Purif.*, vol. 119, pp. 124–129, 2016

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka