

36. OTDK Biológia szekció

*In vitro* antivirális hatékonyság vizsgálat optimalizálása  
Zika vírus esetében

Készítette:

Kopasz Zoltán László

Biológia MSc II. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Kuczmog Anett

Papp Henrietta

Pécsi Tudományegyetem

2023

Pécs

# Tartalomjegyzék

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| Bevezetés.....                                               | 3  |
| I. Irodalmi áttekintés .....                                 | 4  |
| I. 1. Zika vírus epidemiológiája, patogenezise .....         | 4  |
| I. 2. Zika vírus felépítése .....                            | 5  |
| I. 3. Belépési útvonala és replikációja .....                | 7  |
| I. 3. Antivirális vegyületek .....                           | 10 |
| I. 4. A ZIKV bejutásának gátlása .....                       | 12 |
| I. 5. A ZIKV replikációjának gátlása .....                   | 12 |
| II. Célkitűzés .....                                         | 14 |
| III. Anyag és módszer .....                                  | 15 |
| III. 1. Alkalmazott sejtvonal.....                           | 15 |
| III. 2. Vírus törzsoldat készítése.....                      | 15 |
| III. 3. Vírus titer meghatározás - TCID <sub>50</sub> .....  | 15 |
| III. 4. Vírus titer meghatározás – Plaque assay .....        | 16 |
| III. 5. Antivirális hatékonyság vizsgálata - MTT assay ..... | 17 |
| III. 7. Real time-PCR.....                                   | 18 |
| III. 8. Vegyületek .....                                     | 18 |
| III. 9. Statisztikai analízis.....                           | 19 |
| IV. Eredmények .....                                         | 21 |
| IV. 1. Vírus titer meghatározás .....                        | 21 |
| IV. 3. Antivirális hatás vizsgálata .....                    | 23 |
| V. Összegzés .....                                           | 26 |
| VI. Köszönetnyilvánítás .....                                | 28 |
| VII. Irodalomjegyzék .....                                   | 29 |

## Bevezetés

A Zika vírus a *Flaviviridae* családba tartozik, mint például a Sarga-láz vírus, Nyugat-nílusi láz vírus, Dengue vírus. A vírust 1947-ben először rézuszmajmokban izolálták, az első humán megbetegedést 1954-ben Nigériában írták le. Az ezt követő fél évszázadban csak néhány Zika vírus általi humán fertőzésről számoltak be. Első járványos megbetegedést 2007-ben Mikronézia területén okozott, amit később több járvány kitörése is követte a csendes-óceáni területeken. 2015-ben jelent meg az amerikai kontinensen és 2016-ra Dél-, Közép- és Észak-Amerika területén több mint 20 országban találtak fertőzött személyt. Az emberek, a többi flavivirushoz hasonlóan, legtöbbször szúnyogok által fertőződnek meg (*Aedes* spp.), ritkább esetben képes szexuális úton terjedni, illetve transzplacentáris fertőzési útját is megfigyelték. A fertőzés lappangási ideje 3-12 nap. A legtöbb esetben tünetmentesen folyik le a betegség, ritkább esetben főbb tünetei a kiütés, láz, ízületi-, izomfájdalom, fáradtság, fejfájás. Nagyon alacsony esetszámban az idegrendszert is megtámadja, agyhártyagyulladást, agyvelőgyulladást, illetve feltételezések szerint a Guillain-Barre szindróma kialakulásáért is felelhet. A magzatokra jelenti a legnagyobb veszélyt a fertőzés, ugyanis terhesség alatti fertőződés a csecsemőknél mikrokefáliát, vagy más agyi rendellenességet okozhat.

Annak ellenére, hogy már régóta ismerjük a vírust még se védőoltás, se antivirális terápia sincsen ellene, csak tüneteket enyhítő kezelést alkalmaznak a betegeknek. A klímaváltozás és antropogén hatások következtében az idegenhonos (*Aedes* spp.) szúnyogok terjedésével a különböző vírusok megjelenésének, mint a Zika vírus, és járványok kitörésének az esélye egyre növekvő. Ezért elengedhetetlen, hogy ellene hatásosnak bizonyuló gyógyszerek fejlesztését szorgalmazzuk. A glikopeptid antibiotikumok közé tartozó teikoplanin alapú gyógyszerek ígéretesnek tűnnek, hiszen Ebola-, SARS-, MERS és különböző Influenza törzsek ellen is már hatásosnak bizonyultak.

# I. Irodalmi áttekintés

## I. 1. Zika vírus epidemiológiája, patogenezise

A Zika vírus (ZIKV) a *Flaviviridae* családba tartozó arbovírus (arthropod-borne virus, ízeltlábúak által terjesztett fertőző vírus). A család tagjai egyetlen nemzetséghez, *Flavivirus*, tartoznak, és világszerte széles körű megbetegedést és halálozást okoznak. Az ízeltlábúak, elsősorban szúnyogok és kullancsok, által terjesztett vírusok közé tartoznak többek között még a Sárga-láz vírusa, Dengue vírus, Japán agyvelőgyulladás és a Nyugat-nílusi láz vírusok.

A ZIKV vírust először 1947-ben rézuszmajmokból (*Macaca mulatta*) izolálták Uganda Zika nevű erdejében (Dick és mtsai., 1952). Az első humán megbetegedést 1954-ben Nigériában írták le (Macnamara, 1954). Az ezt követő fél évszázadban a vírus csak néhány alkalommal bukkant fel. Az első nagyobb tömeges megbetegedést 2007-ben Mikronéziai Szövetségi Államokhoz tartozó Yap szigeten okozta (Duffy és mtsai., 2009). 2013-2014-ben Francia Polinézia területén jelent meg, a fertőzöttek számát 30000-re becsülték (Cao-Lormeau és mtsai., 2014). 2015-ben a csendes-óceáni szigetvilágról az amerikai kontinensre is átjutott, ahol több mint 20 országban okozott megbetegedést, a fertőzöttek számát 440000-1300000 közé becsülték csak Brazíliában (Musso & Gubler, 2016; Hennessey és mtsai., 2016). 2016-ra 60 országban regisztrálták a vírust és a World Health Organization (WHO) ennek következtében „globálisan aggasztó közegészségügyi vészhelyzetet” hirdetett (Oladapo és mtsai., 2016). Jelenleg 87 országban található meg a vírus, a WHO által kijelölt négy - afrikai, dél-kelet ázsiai, amerikai, nyugati csendes-óceáni régióban (WHO, 2019.). Annak köszönhetően, hogy 1983-ban a vírus eljutott Ázsiába, két fő filogenetikailag elkülönülő vonal alakult ki, az afrikai és az ázsiai (Pielnaa és mtsai., 2020).

A többi flavivírushoz hasonlóan a fő terjesztői a szúnyogok, azok közül is az *Aedes* nemzetségbe tartozó fajok, mint az *Aedes aegypti* és *Aedes albopictus* (Marchette és mtsai., 1969). A kórokozó potenciális társadalmi kockázatát a vektor szúnyogfajok elterjedése alapján lehet behatárolni. A ZIKV előbb említett hordozóinak globális elterjedése a kereskedelem és az utazások miatt egyre bővül (Kraemer és mtsai., 2015). Az ökológiai kutatások azt sugallják, hogy a ZIKV-t a csapadék és a hőmérséklet változásai nagyobb mértékben befolyásolhatják, így nagyobb valószínűséggel korlátozódik a trópusi területekre. Viszont a klímaváltozás és az antropogén hatások következtében a vírust terjeszteni képes vektor szúnyog fajok Európában és Magyarországon is terjednek, melynek köszönhetően több, az országban eddig ismeretlen

kórokozó, köztük a ZIKV is, egyre nagyobb fenyegetettséget jelenthetnek (Carlson és mtsai., 2016; Kurucz és mtsai., 2016).

A vírus rézuszmajmok és szúnyogok között cirkulál a természetben, amit enzootikus körnek hívunk. A ZIKV a szúnyog közép bélhámsejtjeiben, majd a nyálmirigy sejtjeiben sokszorozódik, 5-10 nap elteltével már kimutatható a szúnyog nyálában. A fertőzött majom vérét szívott szúnyog nyálával képes bejutni az emberi bőrbe, ahol a vírus megfertőzheti a bőr epidermális keratinocitáit, a bőrben lévő bőrfibroblasztokat és a Langerhans-sejteket. A vírus patogenezise majd a nyirokcsomókban és a véráramban való terjedéssel folytatódik (Chan és mtsai., 2016), és a ZIKV már képes is emberek között cirkulálni (Basu & Tumban, 2016).

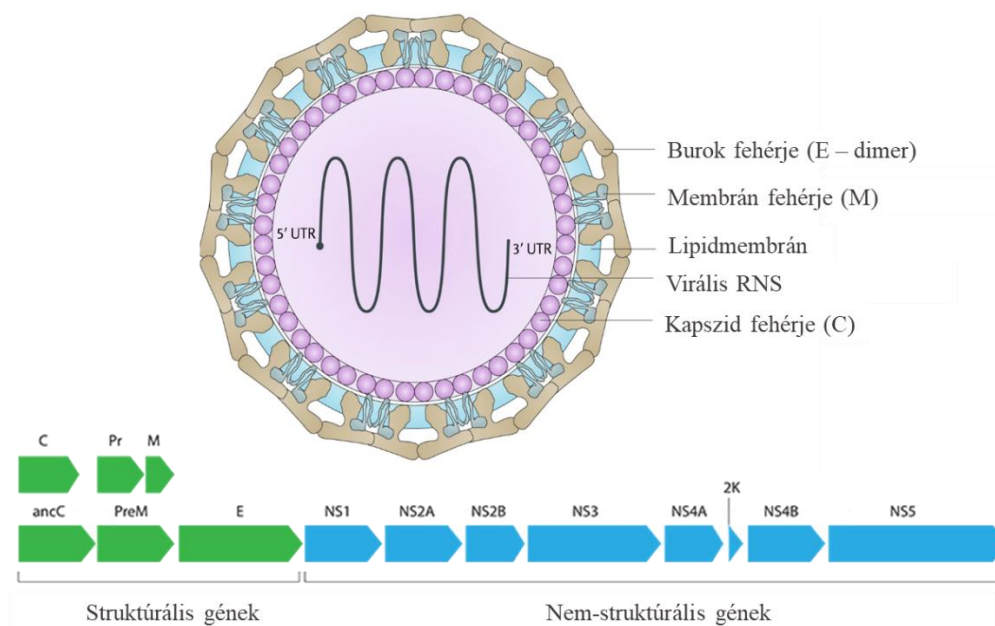
A vírus más módon is képes terjedni, úgy mint szexuális transzmisszióval (Deckard és mtsai., 2016), vertikálisan az anya képes a magzatot megfertőzni (Besnard és mtsai., 2014), valamint vér transfúzióval, mely esetekben a donor legtöbbször tünetmentes (Magnus és mtsai., 2018). Mindezek mellett a vizeletben is megtalálható a vírus, amellyel ha lárvállapotban érintkezik a szúnyog, képes fertőződni és tovább is adni (Du és mtsai., 2019).

A humán fertőzések nagy része tünetmentesen vagy enyhe tünetekkel játszódik le. Az esetek 20-25%-ban influenzaszerű tünetek jelennek meg, mint fejfájás, láz, gyengeség, kiütés, izom- és végtagfájdalom, melyek hét napnál rövidebb ideig tartanak. Súlyosabb esetekben, ez a fertőzöttek 1%-a, az idegrendszeret támadja agyhártyagyulladást, agyvelőgyulladást okozva. A 2013-as járvány során sikerült kapcsolatba hozni a fertőzést a Guillen-Barre szindrómával. A vírus képes megtámadni a Shwann-sejteket és felnőttek esetében a szindróma kialakulásához vezet. A terhes nők magzatjai külön veszélynek vannak kitéve, ugyanis a terhesség alatti fertőződés a csecsemőknél mikrokefáliát, vagy más agyi rendellenességet okozhat. Brazíliában 2015-2017 között 2639 csecsemő született ezzel a rendellenességgel a vírusnak köszönhetően (Peiter és mtsai., 2020; Pielnaa és mtsai., 2020).

## **I. 2. Zika vírus felépítése**

A Zika vírus jellemzően 18-45 nanométer átmérőjű, ikozaéderes alakú, burkos vírus. A genomja pozitív, egyszálú RNS, amelyet kapszid és lipidmembrán vesz körül (Pielnaa és mtsai., 2020; Sirohi és mtsai., 2016). Mérete megközelítőleg 10,8 kilobázis (kb), amely 3419 aminosavból álló poliprotein prekursorba transzlálódik, amelyet mind a gazdaszervezet, mind a vírus proteázai ko- és poszt-transzlációsan dolgoznak majd fel. A genom 3' és 5' végén rövid nem transzlálódó régiók (untranslated region, UTR) találhatóak. Három fontos struktúrális fehérjét (kapszid - C, pre/membrán (prM/M), és a burok - E fehérje) és 7 nem struktúrális

fehérjét (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B és NS5, Pielnaa és mtsai., 2020) kódol (1. ábra).



**1. ábra:** Az összeszerelődött érett virion szerkezete és genomja (Abbink és mtsai., 2018) A Zika vírus pozitív, egyszálú RNS-sel rendelkezik, amely 7 nem-strukturális génből (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B és NS5) és három strukturális génből (C, M, E) áll, melyek a velük azonos nevű fehérjékké transzlálódnak. Az M gén által kódolt PreM fehérje inaktív, a furin enzim segítségével hasad majd Pr és M fehérjére és válik funkcionáló fehérjékké. A C fehérjén egy transzmembrán domain található, kapszid horgonyzónak is neveznek (ancC), NS2B/NS3 proteáz általi hasítás előtt az ER-membránhoz rögzíti a fehérjét, ami transzlokációs jel lesz a PrM számára az ER-lumenbe (Rana és mtsai., 2018).

Az M és az E fehérjék a vírus membránjába ágyazódnak bele. Az utóbbiról elmondható, hogy 4 domainből áll, egy transzmembrán és három (DI, DII, DIII) membránon kívüli domainből. A burok szerkezetének kialakításában van fontos szerepük, ami úgynevezett raftokból áll, számszerint 30-ból és ezeknek az aszimmetrikus elrendeződése adja ki az ikozaéderes alakját a virionnak. Egy raft három E fehérje dimerből és az alatta található M fehérjéből áll (Sirohi & Kuhn, 2017). A membrán (M) fehérje a PreM fehérje egy része, amelyet a vírus érése során a gazdaszervezet furin proteáza dolgoz fel és a vírus lipidmembránjához tapad. Belsejébe a strukturális C fehérjéből felépített ikozaéderes nukleokapszid van beágyazva (Prasad és mtsai., 2017). A vírus C fehérje homodimer formájában képződik, hidrofób oldal a vírus membránfehérjéhez kötődik, másik oldala a vírus RNS genommal érintkezik.

A ZIKV nem strukturális fehérjei a vírus genom replikációjában vesznek részt, a részecskék összeszerelésében és a gazdaszervezet immunrendszerének kijátszásában. Az NS1 fehérje, egy membrán-asszociált homodimer forma, fontos szerepet játszik a vírusreplikáció

során a replikációs komplex kialakításáért, valamint a fertőzött sejtől hexamer fehérjeliposzómák formájában szekretálódik, amelyek a komplementrendszer megváltoztatásával (Avirutnan és mtsai., 2010, 2011; Xu és mtsai., 2016) és a TANK-kötő kináz 1 (tank-binding kinase 1, TBK1) foszforilációs lépésénél az I. típusú interferon (IFN) termelésének csökkentésével segítik az immunrendszer kikerülését (Xia és mtsai., 2018).

Az NS2A, NS2B, NS4A és NS4B membrán-asszociált hidrofób fehérjék, amelyek az ER-membránokban helyezkednek el, és a vírus replikációs komplexének kialakításában játszanak szerepet. Az NS2A fehérje ezenkívül kölcsönhatásba lép a vírus RNS-ével és fehérjéivel, hogy elősegítse a virionok összeszerelődését (Zhang és mtsai., 2019; Zhang és mtsai., 2019). A TBK1 foszforilációjának gátlásával és az I. típusú IFN szuppressziójával ez a fehérje is a veleszületett immunválasz antagonistájaként működik (Xia és mtsai., 2018). Az NS2B egy kofaktor, az NS3 fehérjével dolgozik együtt, aminek két funkcionális doménje van - proteáz és helikáz -, amelyek többféle enzimatis aktivitást mutatnak, mint például szerin proteáz, RNS-helikáz és NTPáz. Ebből adódóan több szerepet játszik a vírus replikációs ciklusában, mint a kettős szálú RNS feltekercselésében a vírus replikációja vagy a poliprotein feldolgozás során (Giri és mtsai., 2016; Phoo és mtsai., 2016; S. Xu és mtsai., 2019). Az NS4B a replikációs komplexhez való társulás mellett immunválasz antagonistájaként is működik az előbb említettek szerint. A ZIKV NS5 fehérje két doménnel rendelkezik, az N-terminális metil-transzferáz (MTáz) és a C-terminális RNS-függő RNS-polimeráz (RdRp) doménnel, amelyek nélkülözhetetlenek a vírusgenom szintéziséhez, a genom stabilizálásához és, ahogy korábban említettem, a gazdaszervezet immunválaszának megkerüléséhez (Ferrero és mtsai., 2019; Zhao és mtsai., 2017).

### **I. 3. Belépési útvonala és replikációja**

Jelenlegi tudásunk szerint a virionok dinamikus változásai teszik lehetővé a különböző szövetekben lévő sejtek fertőzését (Agrelli és mtsai., 2019). Számos különböző humán sejtet képes fertőzni, többek között a fibroblasztokat (Hamel és mtsai., 2015), méhlepény trophoblasztokat és Hofbauer-sejteket (Aagaard és mtsai., 2017), neuronális progenitor sejtet (Dang és mtsai., 2016). Ezt a széleskörű sejt-specifitást az teszi lehetővé, hogy több különböző receptorhoz, különböző faktorok segítségével képes kötni (Agrelli és mtsai., 2019).

A ZIKV replikációs ciklusa a vírus E fehérjének N-glikolizációjával, a gazdasejt felszínén lévő receptorokhoz és specifikus kötődési faktorokhoz való kapcsolódásával kezdődik. Az E fehérje glikolizációja a 154-es pozícióban levő aszparaginon történik (Hasan

és mtsai., 2017). A folyamathoz elengedhetetlenek a konzervált aminosavak, N-X-T (N-aszparagin, X-bármely aminosav, ami nem prolin, T-treonin), amelyek lehetővé teszik a vírus sejthez való kötődését (Fontes-Garfias és mtsai., 2017). A glikolizációnak a helye kijelöl egy úgynevezett 150-es hurok régiót, ami befolyásolja a fertőzőképességet ZIKV törzsek és flavivírusok között is (Sirohi & Kuhn, 2017). Az E fehérje 4 doménje közül a DII végén fúziós hurok található, amely kölcsönhatásba fog lépni a sejt membránjával, a flavivírusok között ez a szakasz a legkonzerváltabb (Heinz & Stiasny, 2012). A DIII domén fontos szerepet vállal a sejthez való kötődésben, itt található a receptorkötő szakasz (Agreli és mtsai., 2019).

A flavivírusok egyik legáltalánosabb receptorai a C-típusú lektin receptorok (CLR). Fontos szerepük van a patogénhez kötött molekuláris mintázatok (PAMP-ok) felismerésében. A legnagyobb számban a makrofágokon, monocitákon és dentritikus sejteken találhatóak meg, amelyek az immunrendszer fontos sejt részei (Kim és mtsai., 2017). A flavivírusok glikoproteinjét PAMP-ként érzékelik és bekebelezik a vírust, majd endoszómát alakítanak ki (Agreli és mtsai., 2019).

Újabb tanulmányok kimutatták, hogy a flavivírusoknak lehet egy, az E fehérjétől független belépési útvonala is, ahol a vírus negatív töltésű lipidje, a foszfatidil-szerin (PS) játszik fontos szerepet (Agreli és mtsai., 2019). A sejteknek az anion-lipid receptorait két családba soroljuk, TIM (TIM-1 és TIM-4) és TAM (AXL és Tyro3) (Kay és mtsai., 2012). Ezeknek a receptoroknak alapvetően az a feladata, hogy felismerjék a PS molekulákat az apoptózis után megmaradó sejtörmeléken és bekebelezzék. A flavivírusok ezt használják ki a saját PS molekulájukkal, a folyamatot „apoptotikus mimikrinek” is hívják (Amara & Mercer, 2015). Először Dengue-vírusnál fedezték fel és csak később sikerült ZIKV-nál is leírni több szövet esetében is (Agreli és mtsai., 2019).

A leggyakoribb kötődési faktorok a negatív töltésű glikoaminoglikánok (GAG) (Kim és mtsai., 2017), amelyeket leírtak már több flavivírusnál is, mint például a Dengue vírusnál (Thepparit és mtsai., 2004) és Nyugat-nílusi vírusnál is (Lee és mtsai., 2004). A közelmúltban két kötődési faktorról számoltak még be, amelyek a ZIKV-fertőzést közvetítik. Az egyik az integrin- $\alpha V/\beta 5$ , amely elősegíti a neuronális őssejtek vírusfertőzését (Vazquez & Jurado, 2020), és a neural sejtadhéziós molekula (NCAM1), amely elősegíti a humán asztrocitóma sejtek fertőzését (Srivastava és mtsai., 2020).

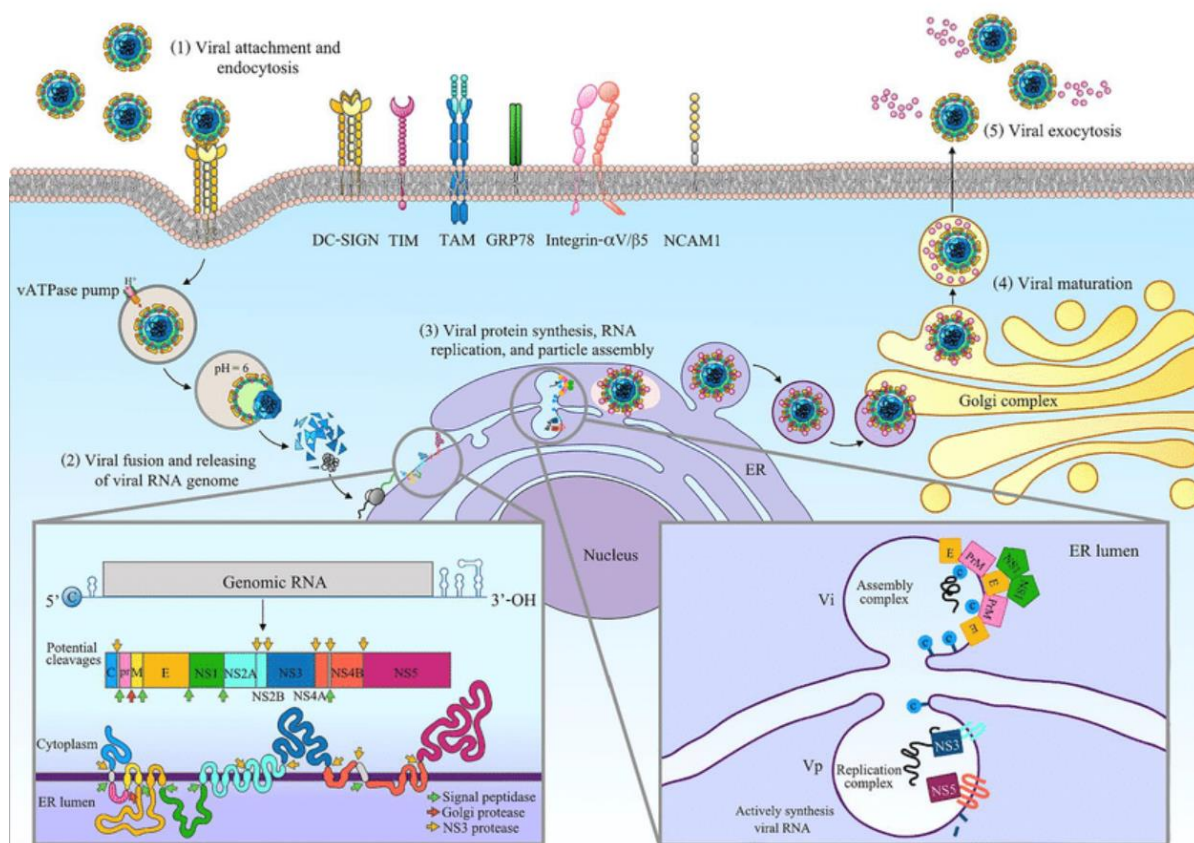
Ezen kölcsönhatások után a vírus klatrin-függő vagy klatrin-független endocitózison keresztül jut be a gazdasejtbe. A sejten belül egy korai endoszóma fog lefűződni a membránból és ez szállítja az endoplazmatikus retikulum felé (2. ábra). Egy vakuoláris ATP-áz protonokat pumpál az endoszómába, ezáltal savas környezet jön létre, amely kiváltja a vírusburkoló

fehérjék és az endoszómális membránok fúzióját. Ezt követi a vírus nukleokapszid C-protein degradációja, ami a vírus RNS-ének a sejt citoplazmába történő felszabadulásához vezet (Li és mtsai., 2020).

A vírus RNS transzlációja közvetlenül a felszabadulás után történik és egy N-terminális ER lokalizációs jellel rendelkező poliprotein keletkezését eredményezi. Ez a poliprotein az ER membránon helyezkedik el, a PrM, E, NS1 és az NS2A, NS4A és NS4B részei az ER lumenében helyezkednek el, míg a C, NS3 és NS5 részek a citoplazma felé néznek. A poliproteinből a gazdaszervezet proteázai (az ER lumen felé néző részeket hasítják) és egy vírus proteáz (a citoplazma felé néző részeket hasítja) hozzák létre a vírus szerkezeti és nem szerkezeti fehérjeit (Assenberg és mtsai., 2009).

Ezután kialakul a replikációs komplex és megtörténik a vírus genomjának szintézise. Az NS1, NS2A, NS2B, NS4A és NS4B transzmembrán-fehérjék módosított lipidekkel asszociálódnak, amelyek molekuláris „állványzatot” biztosítanak a replikációs komplexnek. A komplex ezután olyan ER-membrán átrendeződéseket indukál, amelyek megkönnyítik a vezikuláris zsebek (VP-k) létrehozását, melyek a replikáció színterei lesznek (2. ábra; Aktepe és mtsai., 2017; Ci és mtsai., 2020; Cortese és mtsai., 2017). A pozitív egyszálú RNS az NS5 fehérje (RdRp) segítségével íródik át, pozitív és negatív szálakból álló dsRNS-é, melyet az NS3 helikáz választ szét, hogy pozitív és negatív ssRNS-t hozzon létre. A negatív ssRNS-ek a további transzkripció mintájaként szolgálnak, míg a pozitív ssRNS-ek az ER-ben lévő PreM, C és E proteinekkal egyesülnek az éretlen virionok összeállításához. Az éretlen részecskék ezt követően az ER-ből a Golgi-komplexumba és a transz-Golgi-hálózatba jutnak, ahol a savas környezet feltárja a PreM hasítási helyet. Végül a PreM-et a gazdaszervezet furin proteáza hasítja, kialakítva az M fehérjét, lehetővé téve a részecskék érését (2. ábra). Végül az érett virionok exocitózissal szabadulnak ki a fertőzött sejtekből (Caldas és mtsai., 2020; Owczarek és mtsai., 2019; Rossignol és mtsai., 2017).

Az éretlen „tüskés” virionokról elmondható, hogy alapvetően nem fertőzőképesek, de struktúrális vizsgálatok során megállapították, hogy az ER membránjából származó foszfatidil-szerin csak ebben az állapotában látható jól a receptorok számára (Li és mtsai., 2008; Sirohi & Kuhn, 2017). Ezek a foszfatidil-szerin molekulák a korábban leírt apoptotikus mimikri belépési útvonalhoz szükségesek, így elmondható hogy az éretlen virion is képes lehet a fertőzésre (Wichit és mtsai., 2021).



**2. ábra:** A ZIKV replikációja. (1) A vírus kötődése és endocitózisa. A sejthez való kötődéshez elsősorban az C-típusú lektin receptorokat és különböző kötődési faktorokat használja. (2) Virális fúzió és virális RNS genom felszabadulása. (3) Virális fehérjék szintézise, RNS replikációja és a részek összeszerelődése az ER-ben zajlik, elkülönül az összeszerelődési komplex (Vi) és replikációs komplex (Vp). (4) Vírus érése. (5) Vírus exocitózisa (Wichit és mtsai., 2021).

### I. 3. Antivirális vegyületek

A virális fertőzések száma az emberiség növekedésével emelkedik. A védőoltások mellett a leghatékonyabb védekezési módszerünk az antivirális gyógyszerek alkalmazása. Idoxuridine volt az első ilyen gyógyszer, amit 1963-ban sikeresen alkalmaztak, herpes vírus ellen. Az azóta eltelt közel 60 év során több, mint 100 antivirális gyógyszert fogadtak el és alkalmaznak is különböző vírusok ellen (De Clercq & Li, 2016; G. Li és mtsai., 2021).

A modern vírusellenes gyógyszerek tervezése mögött álló általános elképzelés az, hogy olyan vírusfehérjéket vagy fehérjék részeit kell azonosítani, amelyeket a vírus fertőzése során használ és hatástalaníthatók. Ezeknek a "célpontoknak" egyrészt a lehető legkevésbé kell hasonlítaniuk az emberben található fehérjékre vagy fehérjeelemekre, hogy csökkentsék a mellékhatások valószínűségét. Másrészt a célpontoknak közösnek kell lenniük a vírus számos törzsében, vagy akár ugyanazon család különböző vírusfajtái között is, annak érdekében, hogy

egyetlen gyógyszer legyen széleskörűen hatékony. Így például a fejlesztési vizsgálatok középpontjában állhat egy olyan kritikus enzim, amelyet a vírus kódol, de a gazdaszervezet nem, és amely közös a törzsekben, és megvizsgálható, hogy mivel/hogyan lehet beavatkozni a működésébe (Zhang és mtsai., 2011).

A célpontok azonosítása után a gyógyszerjelöltek, vagy a már ismert, megfelelő hatású gyógyszerek választhatóak ki. Az ígéretesnek tűnő jelöltek ezután *in silico*, *in vitro*, *in vivo* eszközökkel tesztelhetők, hogy beavatkoznak-e a célpont működésébe (Bowman, 2019). A vírusellenes szerek kifejlesztésére irányuló ilyen "racionális gyógyszertervezési" munkák a vírusok életciklusának minden szakaszát próbálják támadni. A vírusok életciklusa azok típusától függően igen változatos, viszont egy általános mintázat mindegyikre egységesen jellemző (Rampersad & Tennant, 2018):

- Gazdasejthez kapcsolódás.
- A vírus örökítőanyaga és esetleg enzimek felszabadulása a gazdasejtbe.
- A víruskomponensek replikációja a gazdasejt gépezetének segítségével.
- A víruskomponensek teljes vírusrészecskékké való összeépülése.
- A vírusrészecskék felszabadulása és új gazdasejtek megfertőzésére.

Két fő csoportba sorolhatjuk az antivirális vegyületek hatását, az egyik a vírus fehérjéit célozza (direkt ható) míg a másik a gazdasejt fehérjéit célozza (közvetve ható). Az eltérő megközelítésnek különböző előnyei és hátrányai lehetnek. A direkt hatókra elmondható, hogy kevesebb negatív hatást fejtenek ki a gazdaszervezetre, de a vírus könnyebben is tud hozzá alkalmazkodni. Míg a közvetve ható esetén ez pont fordítva jelenik meg (Chaudhuri és mtsai., 2018). A jelenleg forgalomban lévő gyógyszereket funkcionalitás szerint is lehet csoportosítani, mint például belépést, kötődést, DNS vagy RNS polimeráz működést gátlók, valamint egy vegyületnek lehet egy vagy több célpontja is.

Az RNS vírusok esetén nagyobb kihívást jelent a gyógyszerek fejlesztése, mivel a genomjuk gyorsabban változik meg, mint a DNS vírusoknak. Ez köszönhető az RNS függő RNS polimeráz hiba halmozó átírásának. A nagyfokú változékonyság miatt gyorsan alakul ki a gyógyszer rezisztencia. Ennek elkerülése érdekében érdemes különböző kezeléseket váltogatni, hogy elkerüljék a rezisztencia kialakulását és folyamatosan monitorozni, vizsgálni a rezisztencia kialakulásokat (Adamson és mtsai., 2021; Richman, 2006).

#### I. 4. A ZIKV bejutásának gátlása

Mivel a ZIKV fertőzés komoly közegészségügyi problémává vált, számos erőfeszítést tettek egy ZIKV ellenes gyógyszer kifejlesztésére. E tekintetben számos molekula bírt gátló hatással a ZIKV életciklusának különböző szakaszaiban, mint például a vírus belépése, replikációja, érése és a fertőző részecskék felszabadulása. Sajnos azonban mind a mai napig nincs specifikus gyógyszer vagy vakcina ellene (Munjál és mtsai., 2017).

Ami a ZIKV belépését illeti, ismert, hogy egyes molekulák blokkolják a korai vírusmechanizmusokat: a receptorkötődés zavarásával vagy az endocitózis gátlásával. Különböző sejtvonalakon végzett *in vitro* vizsgálatok azt mutatták, hogy a curcumin (Mounce és mtsai., 2017), a nanchangmicin (Rausch és mtsai., 2017), a ZINC33683341 és a ZINC49605556 (Fernando és mtsai., 2016) molekulák gátolják a vírus bejutását a receptorkötődés blokkolásával, míg az olyan vegyületek, mint a klorokin (Li és mtsai., 2017; Shiryayev és mtsai., 2017), a suramin (Albulescu és mtsai., 2017) a 25-hidroxikoleszterol (C. Li és mtsai., 2017) bizonyítottan gátolják a ZIKV internalizációját *in vitro* és *in vivo*.

A klorokin hatásmechanizmusa ellentmondásos a tekintetben, hogy a vírus bejutásában vagy az autofágikus fluxusban játszik-e szerepet. Számos *in vitro* és *in vivo* vizsgálatot végeztek a hatásmechanizmus felderítésének érdekében. Az eddigi eredmények kettős mechanizmust mutatnak a gyógyszer esetében (Li és mtsai., 2017; Liang és mtsai., 2016; Shiryayev és mtsai., 2017; Zhang, Yi, Li, és mtsai., 2019).

Úgy tűnik, hogy a nanchangmicin az AXL célzottan történő receptorkötődés blokkolása mellett kettős szerepet játszik a klatrin-mediált endocitózis gátlásával is (Rausch és mtsai., 2017). Továbbá az arbidolról, ami egy jól ismert, széles spektrumú antivirális hatóanyag, kimutatták hogy *in vitro* megakadályozza a ZIKV életciklusának egy korai lépését, bár pontos hatásmechanizmusa még nem ismert (Fink és mtsai., 2018). Az epigallokatekin-gallát (EGCG), zöld teában jelen lévő vegyület, bizonyítottan jelentősen csökkenti a ZIKV fertőzőképességét Vero sejtekben, és úgy tűnik, hogy hatása a ZIKV burkával való közvetlen kölcsönhatás révén vírusölő (Carneiro és mtsai., 2016).

#### I. 5. A ZIKV replikációjának gátlása

Számos más hatékony vegyület bizonyult ígéretes gátlónak ZIKV ellen, amelyek az RNS függő RNS polimeráz enzimet veszik célba. Ezek lehetnek nukleozid analógok vagy magát az enzimet közvetlenül célzóak. A nukleozid analógok előnye, hogy a virális RNS

polimerizációját tudják megakadályozni, de a humán RNS szintézisre nincsenek hatással. A sofosbuvir egy nukleozid analóg, ami Hepatitis C elleni gyógyszerként kereskedelmi forgalomban már kapható (Sovaldi) és *in vitro* kísérleteknél igazolták, hogy hatásosan gátolja a ZIKV fertőzést is. A sofosbuvir foszforamidát egy prodrug, ami a sejt környezetben alakul át trifoszfát analógjává (aktív forma). Az aktív metabolit, a 2'-fluoro-2-C-metil-UTP az NS5 aktív helyéhez kötődik. Ugyan a különböző sejttípusok között eltérően hat, például Vero sejteken nem tapasztaltak sejtet védő hatást ZIKV fertőzés esetén, de hepatocelluláris karcinóma (Huh-7) és emberi placenta-koriokarcinóma (Jar) sejtek esetében igen (Reznik & Ashby, 2017; Sacramento és mtsai., 2017).

Széles skálán gátló hatást mutató adenzin analóg, a BCX4430, a ZIKV RdRp enzimét szelektíven gátolja. Fő célpontja az NS5 fehérje, RNS polimerizáció láncterminációs hatásával. A BCX4430 hatóanyagú gyógyszer fejlesztése már klinikai fázisban van (Baz & Boivin, 2019).

Számos vegyület esetén az NS2B-NS3 fehérje gátlását figyelték meg. A NS2B-NS3 tripszinszerű szerin-proteáz, amelynek kulcsszerepe van a vírus replikációjában, mivel a poliprotein feldolgozásban vesz részt. Ilyen típusú gátló mechanizmussal rendelkezik a Novobiocin és Temoporfin is, amelyek *in vitro* és *in vivo* kísérletek során is hatásosnak bizonyultak (Li és mtsai., 2017; Yuan és mtsai., 2017).

A ZIKV fertőzés általi megbetegedések esetében jelenleg tüneti kezelések vannak, mint például a paracetamol, mint lázcsillapító vagy a kiütések ellen különböző antihisztaminok. Az előbb összefoglaltak alapján elmondható, hogy az elmúlt években nagy erőfeszítéseket tettek a speciális antivirális szerek kutatására. Számos hatóanyag alkalmas ZIKV fertőzés gátlására és néhány vegyület már a klinikai vizsgálatok első fázisáig is eljutott.

A dolgozatomban bemutatott munkánk során teikoplaninból és vankomicinből szintetizált új vegyületeknek vizsgáltuk meg a ZIKV fertőzés elleni hatásosságát. A teikoplanin a glikopeptid antibiotikumok közé tartozik úgy, mint a vankomycin vagy az eremomycin. Ezek az antibiotikumok Gramm-pozitív baktériumoknak sejtfal szintézisét gátolják és antivirális hatásukról közel 30 éve tudunk. Vírus gátló folyamatokat először egy influenza törzs esetén írták le, később más RNS vírusnál is írtak le hasonló, úgy mint a HIV-1 vagy a SARS-CoV1 (Vimberg, 2021).

A Virológiai Nemzeti Laboratóriumban több kutatás zajlott és zajlik is a glikopeptid antibiotikumok és származékok antivirális hatásának vizsgálatára különböző vírusok fertőzése ellen (Bereczki és mtsai., 2021). Több vegyület esetén is sikerült gátló hatást kimutatni, ami jól igazolja a bennük rejlő potenciált.

## II. Célkitűzés

Jelenleg a regisztrált ZIKV fertőzöttek száma alacsony a világon, de bármikor kialakulhat a 2015-ös járványhoz hasonló fertőzési hullám. Több vakcina fejlesztése is folyamatban van, különböző generációs technológiák alapján, de még egyik sincs közel a forgalomba bocsátáshoz (Poland és mtsai., 2019). Emellett a mai napig nincs speciális gyógykezelés. Hiába sok esetben nem okoz komoly megbetegedést a vírus, szükséges a megfelelő gyógymód, főképp a magzatok egészségének megőrzése szempontjából.

Ezért a következőket tűztük ki célunknak:

- a Debreceni Egyetem Gyógyszerészi Kémia Tanszék által szintetizált glikopeptid antibiotikum származékoknak a vírus gátló hatását vizsgálni, amelyek akár később antivirális gyógyszerek hatóanyagává válhatnak.
- a nagyszámú vegyület miatt egy olcsó, megbízható és nagy áteresztőképességű módszert szerettünk volna beállítani, amelyet később kisebb módosításokkal más vírusokra is tudunk alkalmazni.

### III. Anyag és módszer

#### III. 1. Alkalmazott sejtvonal

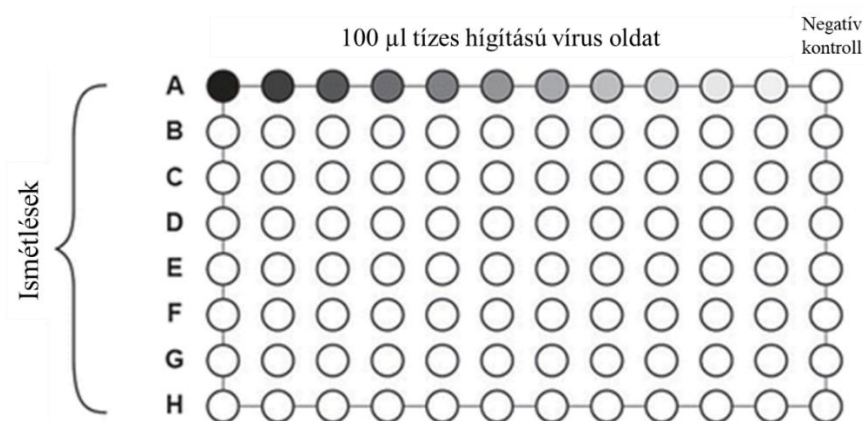
A vizsgálataink során Vero E6 sejtvonalat (Afrikai zöld majom (*Cercopithecus aethiops*) vese epithél sejtéből származik) használtunk, amelyet Dulbecco's modification of Eagle mediumban (DMEM, Lonza, Svájc) tartottunk fent, 2% szarvasmarha magzati szérummal (fetal bovin serum, FBS, Biosera, Franciaország) és 1% penicillin/sztreptomycin antibiotikummal (PS, Lonza, Svájc) kiegészítve. A sejtkultúrákat a munkákhoz megfelelő flaskákban vagy 6, 24, 96 lyukú lemezen (későbbiekben well és plate), 37 °C-os párasított inkubátorban, 5% CO<sub>2</sub> betáplálás mellett neveltük (naponta vagy minden második napon monitoroztuk) a 70-80 %-os konfluens monoréteg eléréséig.

#### III. 2. Vírus törzsoldat készítése

Munkánkhoz a Nemzeti Virologiai Laboratórium törzsgyűjteményében rendelkezésre álló két ZIKV törzset (MR 766 (Uganda), KX673530 (Guadeloupe)) tudtuk használni és a dolgozatomban bemutatott munkákat a két törzsre külön-külön végeztük el. A Vero E6 sejteket 1 ml vírus oldattal 1 óráig fertőztük, majd a felülúszó eltávolítása után 10 ml tápoldatot (DMEM+2%FBS, 1%PS) adtunk a sejtekhez és további 6 napig (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) tartottuk fent őket. Az inkubáció után a felülúszót 1 ml-es adagokra osztottuk szét és az így elkészített vírus törzsoldatokat (stock) -80°C-on tároltuk.

#### III. 3. Vírus titer meghatározás - TCID<sub>50</sub>

Az elkészített vírus stockoknak a fertőző vírus-partikulák számának meghatározásához a sejtek 50%-os fertőződési dózisának (50% tissue culture infection dose, TCID<sub>50</sub>) meghatározást végeztük el mindkettő vírus vonalunkkal. 96 well-es platen 3x10<sup>4</sup> számú sejtet növesztettünk 1 napig (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). A vírus stock oldatokból tízes hígítási sort készítettünk, a fertőzéshez használt platen oszloponként balról jobbra csökkenő koncentrációban ráértünk a hígított vírus-szuszpenziót a sejtekre. A well-ekbe azonos mennyiségű (100 µl) vírus oldat került (3. ábra). 1 óra inkubáció után (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), a felülúszó leszívásával eltávolítottuk a meg nem tapadt vírus-partikulákat és 200 µl tápoldatot (DMEM+2% FBS, 1% PS) adtunk a sejtekhez.



**3. ábra:** TCID<sub>50</sub> vizsgálat vizualizálása 96 well-es platen.

5 nap inkubálást (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) követően inverz fénymikroszkóp (Primo Vert, Zeiss, Németország) segítségével megszámoltuk a vírus által okozott sejtelhalást (cythopathic effect, CPE, pozitív) mutató wellék és a negatív wellék számát (nem látható CPE). Majd a Heidelbergi Egyetemen munkatársa, Marco Binder, által készített, Spearman- Kärber algoritmust alkalmazó TCID<sub>50</sub> kalkulátor segítségével kiszámoltuk a fertőző vírus-partikula számot (Kangro & Mahy, 1996).

### III. 4. Vírus titer meghatározás – Plaque assay

A fertőző vírus szám meghatározásra a plaque assay módszerét is alkalmaztuk, szintén mindkettő vírus vonalunkkal párhuzamosan végeztük el a vizsgálatot. A módszer lényege, hogy a fertőzött sejteket a vírus lizálja, plakkokat vagy más néven tisztuló területeket formálva a sejtek monorétegében.

24 well-es platen  $3 \times 10^5$  számú sejtet növesztettünk 1 napig (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). A vírus stock oldatokból szintén tízes hígítási sort készítettünk. A 70-80 %-os konfluens sejt-monorétegre az adott hígítású, azonos mennyiségű (200 µl) vírus oldat került. 1 óra inkubáció után (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), a felülúszót eltávolítottuk és 2%-os carboxy-metil-cellulóz (CMC) és tápoldat (DMEM+2%FBS, 1%PS) 1:1 arányával fedtük le. 5 nap inkubáció (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) után a fedő médiumot eltávolítottuk és 4%-os paraformaldehiddel (PFA) fixáltuk a sejteket. 30 perc után a PFA-t eltávolítottuk és 0,25%-os kristályibolya festékoldatot adtuk hozzá. 15 perc után a festéket eltávolítottuk és vízzel mostuk a welléket. Száradást követően leolvastuk a vírus fertőzését mutató plakkok számát.

A plakk formáló egységet (plaque forming unit, PFU) vagyis a vírusaink titerét a szakirodalomban található módon számoltuk ki. PFU/ml-ként a welllemben látható plakkok számát osztottuk a hígítási és fertőzésre használt vírus mennyiségével (Baer & Kehn-Hall, 2014).

A titerek meghatározásával a továbbiakban ki tudtuk számolni a fertőzés multiplicitását vagy MOI-t, ami a kórokozók (fágok, vírusok, baktériumok) és a fertőzési célpontok (sejtek) aránya (Abedon & Bartom, 2013). Például amikor vírusrészecskékkal beoltott sejtek csoportjára utalunk, a MOI a vírusrészecskék számának és a meghatározott térben jelen lévő célsejtek számának aránya lesz.

### **III. 5. Antivirális hatékonyság vizsgálata - MTT assay**

A glikopeptid származékok *in vitro* vírus gátló hatásának mérésére az MTT (3-[4-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromid) kolorimetriás sejteletképességi módszert használtuk (MTT Cell Proliferation Assay, Roche, Németország), mely az élő sejtekben történő formazán kristályokká történő átalakulásán alapul és a mitokondriális aktivitást határozza meg. Mivel a legtöbb sejtpopuláció esetében a teljes mitokondriális aktivitás az életképes sejtek számával függ össze, ezt a vizsgálatot széles körben használják a gyógyszerek sejtvonalakon vagy primer beteg sejteken kifejtett *in vitro* citotoxikus hatásainak mérésére is.

A módszer előnye, hogy nagy áteresztőképességű és képes inaktiválni a vírust. 96 well-es platere  $1 \times 10^4$  sejtet raktunk ki wellenként és egy napig neveltük őket ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). A glikopeptid származékok törzsoldatából 100  $\mu\text{M}$  koncentrációjú oldatokat készítettünk, majd abból felező hígítási sort és a fertőzéssel egy időben kezeltük velük a sejteket. A fenntartó tápoldat eltávolítása után kezeltük és fertőztük a sejteket. A vírus mennyisége MOI 1 (multiplicity of infection) volt, a glikopeptid származékok pedig változó koncentrációban (60  $\mu\text{M}$ - 2,5  $\mu\text{M}$ ) voltak jelen a kísérletben. Pozitív kontrollként csak vírussal fertőzött sejteket, negatív kontrollként csak a vegyületekkel kezelt sejteket használtunk. 2 óra inkubáció ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) után a felülúszót eltávolítottuk és fenntartó oldatot (DMEM+2% FBS, 1% PS) tettünk rá, ami csak tápoldatot és a vegyületet tartalmazta a megadott koncentrációban. 5 nap inkubáció után ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) a felülúszót eltávolítottuk, mostuk kétszer Eagle's Minimal Essential médiummal (EMEM) és hozzáadtuk az 50  $\mu\text{l}$  MTT reagenst (10x hígítva DMEM+2%FBS, 1%PS; protokolltól eltérve csak fele mennyiséget használtunk). 4 órás inkubálást követően hozzáadtuk a reagenssel megegyező mennyiségű oldószert (megvásárolt

reagens csomag része) és végül az abszorbanciát (OD) 570 nm-en Crocodile 5-in-one ELISA miniWorkstation (Berthold Technologies, Németország) készülék segítségével mértük.

### III. 6. Citotoxicitás vizsgálat – MTT assay

A glikopeptid származékok sejtekre kifejtett citotoxikus hatásainak vizsgálatára is a sejtelétképességet vizsgáltuk, az előbb leírt MTT (3-[4-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromid) kolorimetriás módszer segítségével. Az antivirális hatóanyagok tesztelésével párhuzamosan végeztük, a III. 5. fejezetben leírtak szerint.

### III. 7. Real time-PCR

Azoknál a vegyületeknél, melyeknél gátló hatást figyeltünk meg az 5 napos kezelt sejtek felülszójából RNS-t izoláltunk a Viral RNA kit (Zymo Research, Amerikai Egyesült Államok) segítségével a gyártó utasításait követve. A valós idejű RT-PCR reakciókat a ZIKV genom NS1 régiójára tervezett (1. táblázat) primerek segítségével végeztük, OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Németország) használatával a gyártó utasításait követve. A ciklikus körülmények a következők voltak: reverz transzkripció 50 °C 30 percig és 15 percig 95 °C, majd 40 ciklus denaturálás 95 °C-on 20 másodpercig, annealing 51 °C-on 20 másodpercig, és elongáció 72 °C-on 20 másodpercig.

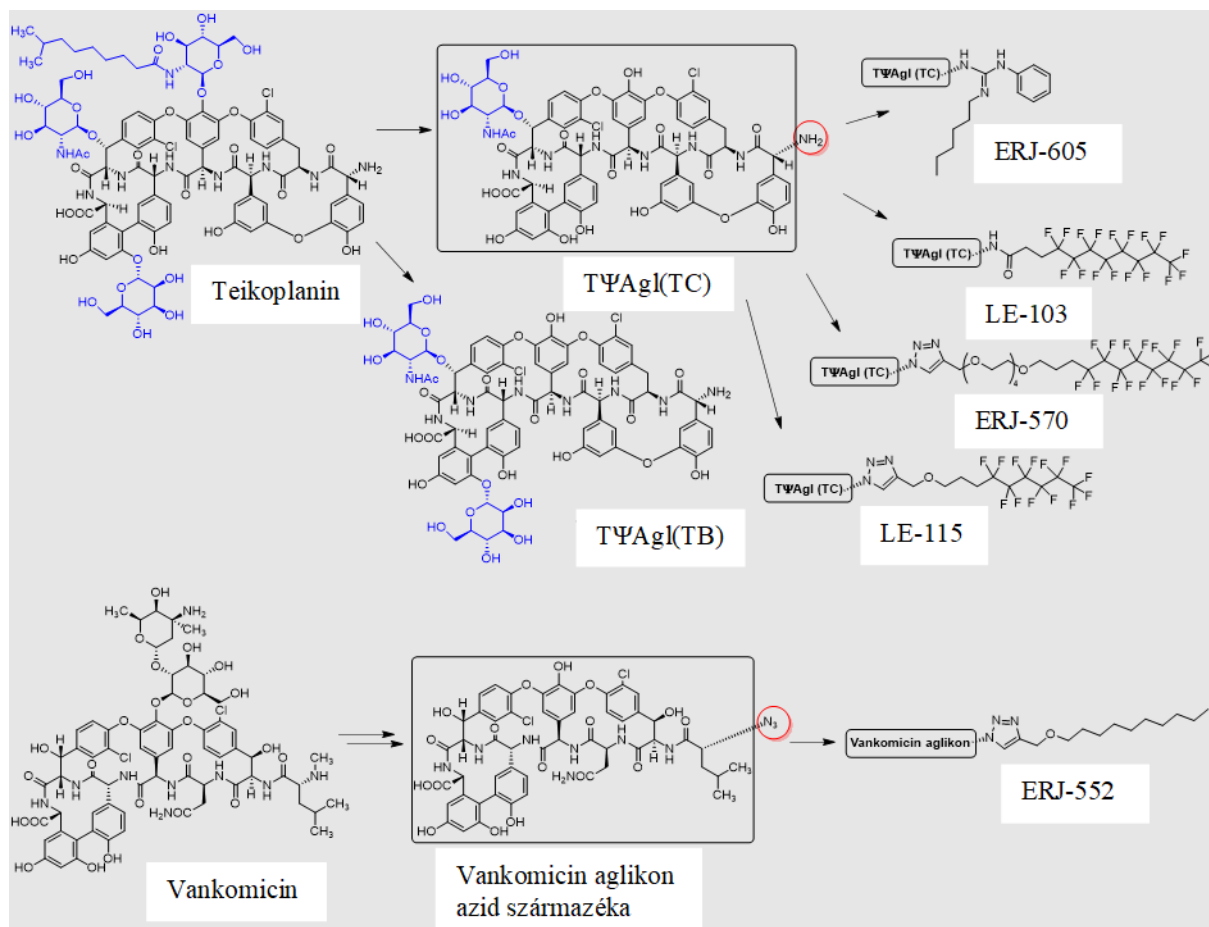
**1. táblázat:** Alkalmazott PCR primerek

| Primer          | Szekvencia                                         |
|-----------------|----------------------------------------------------|
| Ugandai_FW      | AAA AGG AAA CGA GAT GTG GCA                        |
| Ugandai_REV     | CAT TCT CCT CTA GGA TAG CAT                        |
| Ugandai_Pb      | FAM/ 5'-CCC GCA GAT-3' /ZEN/ 5'-TGG CAG CAG-3'BHQ1 |
| Guadeloupei_FW  | CTTGAGGTGCTTGATGATT                                |
| Guadeloupei_REV | CTCCTCCAGTGTTTCATTT                                |
| Guadeloupei_Pb  | 5'FAM- AGAAGAGAATGACCACAAAGATCA-3'TAMRA            |

### III. 8. Vegyületek

A glikopeptid antibiotikum származékokat a Debreceni Egyetem Gyógyszerészi Kémia Tanszék munkatársai szintetizálták glikopeptid antibiotikumokból. A vegyületekből 10 mM-os dimetil-szulfidos (DMSO) törzsoldatokat készítettünk, és azokat -20°C-on tároltuk a

további felhasználásig. A munkánk során eddig vizsgált vegyületek szerkezeti képletei a 4. ábrán láthatók.



4. ábra: A vizsgált glikopeptid antibiotikum származékok szerkezeti képletei.

### III. 9. Statisztikai analízis

A MTT sejtéletképességi módszer megbízhatóságának vizsgálatára a Z-faktort alkalmaztuk. A nagy áteresztőképességű szűrések során számos minta nagyszámú egyedi méréseit hasonlítják össze pozitív és negatív kontrollmintákkal. A nagyméretű szűrések idő- és erőforrás igényesek. Ezért egy nagy szűrés megkezdése előtt kisebb teszt- (vagy kísérleti) szűréseket használnak a vizsgálat minőségének értékelésére, hogy megállapítsák, hasznos lesz-e az a nagy áteresztőképességű környezetben. A Z-faktor mutat arra, hogy számszerűsítsük az adott beállítások mellett, az adott teszt alkalmas-e egy teljes körű, nagy áteresztőképességű szűrővizsgálatban való felhasználásra. Szóval a Z-faktor egy olyan statisztikai paraméter, ami a módszer hatékonyságát mutatja meg (J.-H. Zhang és mtsai., 1999).

A vegyületek 50%-os gátló koncentrációjának (half maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ ) meghatározáshoz nem-lineáris regresszió analízist alkalmaztunk, amihez a GraphPad Prism v.9 programot használtuk.

## IV. Eredmények

### IV. 1. Vírus titer meghatározás

A dolgozatomban bemutatott munkákat a két ZIKV törzsre (MR 766 (Uganda), KX673530 (Guadeloupe)) külön-külön végeztük el. A Vero E6 sejteket 1 óráig fertőztük a vírusokkal és további 6 napig (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) tartottuk fent őket. Utána inverz fénymikroszkóp (Prima Vert, Zeiss, Németország) segítségével megnéztük, hogy látható-e vírus általi CPE a Vero E6 sejtes monorétegen (5. ábra).



**5. ábra:** A ZIKV (MR 766 (Uganda), KX673530 (Guadeloupe)) törzsek Vero E6 sejtek fertőzésének mikroszkópos felvétele. A ZIKV fertőzés sötétebb gyöngyszerű képletekként jelenik meg, melyek az elhalt sejtek maradványai. A negatív kontroll a kezeletlen sejtek voltak.

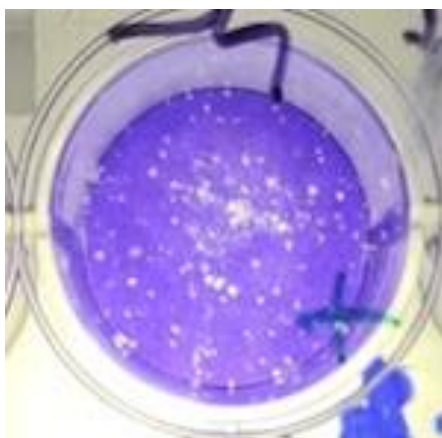
Az elkészített vírus törzsoldatoknál első lépésként meg kellett határoznunk a pontos fertőző vírus partikula számot. Erre azért volt szükség, hogy a kísérletek megismételhetőek legyenek, ugyanis a vírus száma nagymértékben befolyásolhatja az adott vizsgálati módszer működését, kimenetelét. A két ZIKV vonalnál párhuzamosan végeztük a vizsgálatainkat.

Először a TCID<sub>50</sub> módszert alkalmaztuk fertőzőképes vírusszám meghatározására. A pozitív (citopátiás hatást mutató, CPE, fertőzött) és negatív (nem fertőzött) welleket mikroszkópos vizsgálat segítségével különítettük el. Az egyre hígabb vírusszuspenzióval fertőzött wellek esetében nem volt egyértelműen eldönthető, hogy mely wellek CPE pozitívak vagy negatívak. Ugyanis a sejtek öregedési folyamatai során is keletkeznek denz szerű, sötétebb gyöngyszerű elváltozások és szakadások a sejtek monorétegében. Ez pedig mikroszkópikusan összetéveszthető a hígítás következtében kevés számú vírus által okozott CPE-vel.

A TCID<sub>50</sub> módszerrel párhuzamosan a másik gyakran alkalmazott módszert, a plaque assay-t is bevettettük a fertőző vírus partikulaszám meghatározásához. Mivel korábban a vírussal még nem végeztek a Nemzeti Virologiai Laboratórium munkacsoport tagjai ilyen

jellegű meghatározást, így a kezdeti lépések optimalizációs lépések voltak. Először fedő médiumnak az avicelt használtuk az assay során, amivel nem kaptuk szép, látható tarfoltokat, csak egy összefüggő szemcsés felület volt látható. Ezt követően a karboxi-metil-cellulózt (CMC) alkalmaztunk fedő médiumként, aminek segítségével már sikerült jól elkülöníthető plakkokat látni.

Az optimalizálás során a plate típusát is változtatnunk kellett. Először 12 és 24 well-es platet használtunk, melyek alkalmazásakor a Vero E6 sejtes monorétegek kiszáradtak és leváltak a plate aljáról a mosási lépések során. Végül a 48 well-es plate vált ideálissá számunkra. Az inkubációs időt is kellett optimalizálnunk, ha túl kevés volt az inkubációs idő (3 nap) nem alakultak ki a plakkok, míg ha túl hosszú (7 nap) akkor nem tudtuk elkülöníteni őket. Így végül az 5 nap volt a legmegfelelőbb (6. ábra).



**6. ábra:** Plaque assay eredménye. A fertőzött sejteket a vírus lizálja, ami plakkok formájában jelenik meg a sejtek monorétegében.

A megfelelő beállítások mellett sikeresen meghatároztuk mindkét vírus vonal plakk formáló egység (PFU/ml) mennyiségét, a vírus törzsoldataink titerét. Az ugandai (MR 766) vonal esetében a 7150000 PFU/ml, míg a guadeloupei (KX673530) vonal esetében a 1015000 PFU/ml értéket kaptuk. A vírus törzsek titerének pontos meghatározásával a későbbi fertőzések során meg tudtuk adni a fertőzés során használt multiplicitását vagy MOI-t (multiplicity of infection), ami a kórokozó és a fertőzési célpontok, azaz sejtek aránya.

#### **IV. 2. MTT assay optimalizálás**

Az MTT assay egy nagy áteresztőképességű, kolorimetriás sejt életképességet mérni képes módszer. A dolgozatomban már említésre került, hogy a módszer az élő sejtekben történő

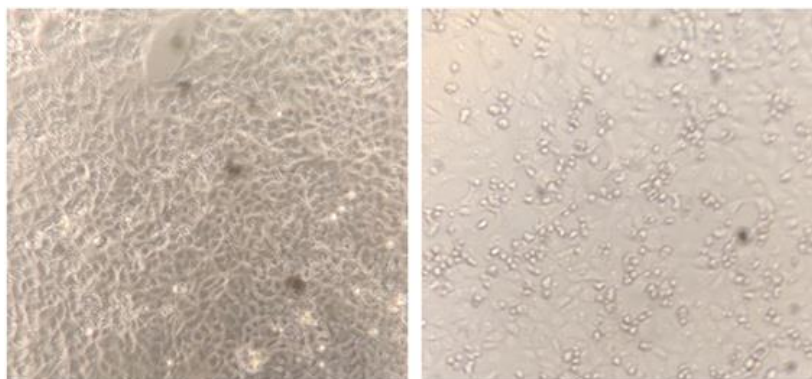
MTT reagens formazán kristályokká történő átalakulásán alapul, ahol a mitokondriális aktivitásra kaphatunk eredményt. Mivel a legtöbb sejtpopuláció esetében a teljes mitokondriális aktivitás az életképes sejtek számával összefügg, ezt a vizsgálatot alkalmazni tudtuk a vegyületeink Vero E6 sejtvonalon kifejtett *in vitro* citotoxikus hatásainak mérésére.

Előnyei közé tartozik, hogy megfizethető és a többi hasonló típusú eljárással ellentétben itt inaktiválódik a vírus a formazán kristályok oldódása során, mivel az kit oldószere sósavat (HCl) tartalmaz. Hátrányként viszont elmondható, hogy a mért érték, nem közvetlen a vírus számot határozza meg, más életképességet mérő módszerek mellett, és a kémia interferencia is történhet az abszorbancia méréskor. Vizsgálataink során a módszer segítségével közvetetten tudtuk vizsgálni a vegyületek vírus gátlását, pontosabban a sejtvédő hatását.

Az MTT assay optimalizációja során végig a Z-faktor statisztikai paramétert vettük figyelembe. Ha ez az érték 0,5 feletti, akkor elmondható, hogy az adott módszer megbízható. Az optimalizálást csak az ugandai ZIKV vonal esetén végeztük el. Számos tényezőt vizsgáltunk, hogy a lehető legmegfelelőbb legyen a kapott Z-faktor. Elsőnek a kiindulási sejtszámot állítottuk be, itt 10000, 20000 vagy 30000 Vero E6 sejt/well kiindulási számokat néztük meg. A fertőzés során a vírus számot is több, különböző mennyiségben próbáltuk ki (0,5 MOI, 0,8 MOI, 1 MOI, 2 MOI) és a fertőzés idejét is változtattuk (1 vagy 2 óra). Végül a fertőzést követő inkubációs időt is be kellett állítani (4-7-nap). A legjobb, 0,63-as Z-értéket 10000 kiindulási sejtszám, 1 MOI vírusrészecske, 2 óra fertőzés és 5 nap inkubációs beállítások mellett kaptuk. Az 5 napnál tovább tartó inkubációk esetében nagyobb eltérést kaptunk a fertőzött és nem fertőzött welllek között, viszont ilyen hosszú idő után a vegyületek fertőzés gátló hatásának csökkenése volt tapasztalható, valószínűsíthetően addigra számottevően lebomlottak.

#### **IV. 3. Antivirális hatás vizsgálata**

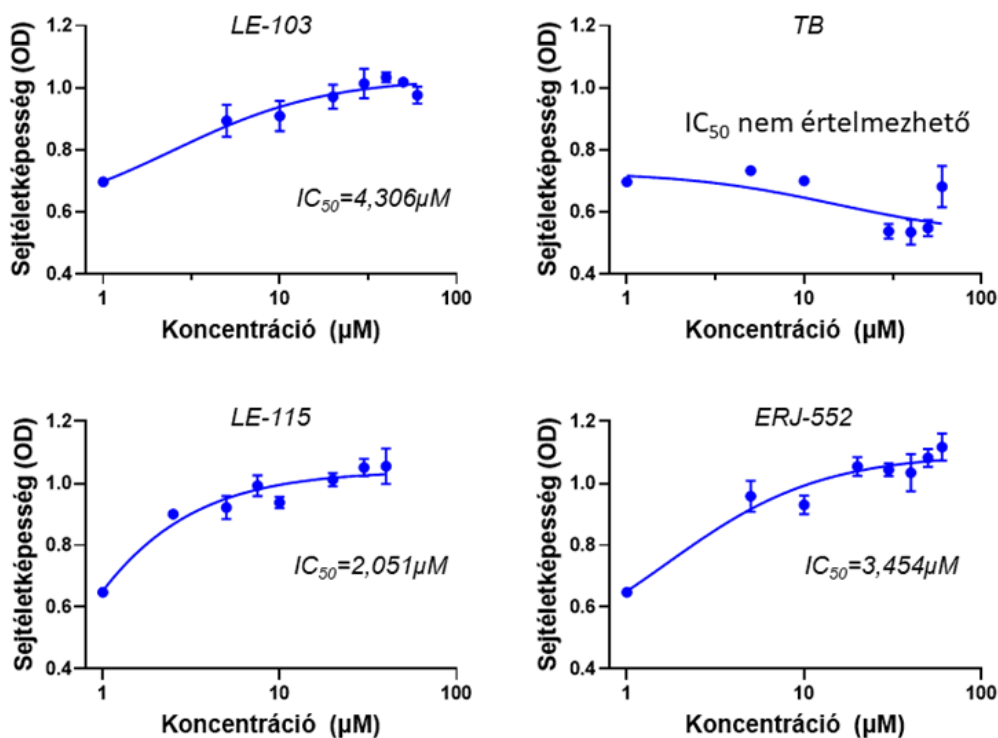
A kutatócsoport számára több, mint 50 glikopeptid antibiotikum származék érhető el, amiknek az antivirális hatását ZIKV ellen még senki se vizsgálta. A hatóanyagok vírus fertőzését gátló vizsgálatát első körben mikroszkópos megfigyeléssel végeztük, a CPE gátlást néztünk a sejtek monorétegén (7. ábra). Előzetes vizsgálataink során több, mint 20 vegyületet vizsgáltunk meg, így kaptunk egy előzetes képet a hatásosságukról.



**7. ábra:** Jobb oldali képen vegyülettel nem kezelt ZIKV fertőzött Vero E6 sejtek, bal oldali képen a LE-103 vegyülettel kezelt és ZIKV fertőzött Vero E6 sejtek mikroszkópos felvétele látható. Jól látszik, hogy a kezelt sejtek fertőződése csekély mértékű a kezeletlen sejtekhez képest.

A pontosabb gátló hatás meghatározásához az MTT assay-t használtuk. Tulajdonképpen a sejtek életképességét vizsgáltuk és minél magasabb abszorbancia (OD) értéket kaptunk, annál jobb volt a sejtek működése. A méréseinket a III. 5. fejezetben leírt módon végeztük.

Eddig nyolc vegyületet vizsgáltunk meg MTT assay-t alkalmazva, melyek közül három, LE-103, LE-115, ERJ-552 hatásosnak bizonyult (8. ábra).



**8. ábra:** Az ábrán egy nem ható (Teikoplanin  $\psi$ - aglikon TB) és három (LE-103, LE-115 és ERJ-552) antivirális hatást kifejtő vegyület MTT mérésének adataiból generált (n=3) grafikonja látható. A vegyületek 50% hatékonyságú gátló koncentrációjának (IC<sub>50</sub>) meghatározáshoz nem-lineáris regresszió analízist alkalmaztunk, amihez a GraphPad Prism v.9 programot használtuk.

A vírust gátló hatások hatékonyságának meghatározást célzó munkák során a vegyületeket nem citotoxikus koncentráció alatt alkalmaztuk, amelyekről a párhuzamosan végzett nem fertőzött, csak vegyületekkel kezelt mintáinkkal bizonyosodtunk meg. Bizonyos antibiotikum származékoknál azt tapasztaltuk, hogy képesek befolyásolni a fényelnyelést. Annak érdekében, hogy az értékek a lehető legpontosabbak legyenek, olyan normalizálást végeztünk, mely során a DMSO-val kezelt kontroll minták értékeit kivontuk a csak vegyületekkel kezelt minták értékeiből és az így kapott értéket vontuk végül ki a fertőzött-kezelt minták esetében mért értékekből.

Az MTT assay módszer segítségével közvetetten tudtuk vizsgálni a vegyületek vírus fertőzésének gátlását, pontosabban a sejtvédő hatását. A vírus partikulák számának változását RT-qPCR-val is megnéztük, és így a virális RNS mennyiségnek mérésével összetettebb képet kaptunk a hatóanyagok működéséről. Az ugandai ZIKV törzs esetén az LE-103 vegyülettel kezelt mintákból (5 napos fertőzés és kezelés utáni felülűszó) és a DMSO kontroll fertőzött mintákból sikeresen készítettünk RNS extrakciót. Összevetettük a legmagasabb koncentrációval kezelt és a kontroll mintákat, és azt kaptuk, hogy a LE-103-al kezelt sejteknél kevesebb virális RNS volt detektálható a felülűszóban.

## V. Összegzés

Az elmúlt évtized ZIKV járványai rávilágítottak arra, hogy a vírus jól képes terjedni ott, ahol a vektorai, az *Aedes* fajok megtalálhatóak, és komolyabb megbetegedéseket tudnak okozni, mint a Guillen-Barre szindróma és a mikrokefália. Jelenleg nagy esetszámmal járó járvány nincsen. 2022-ben közel 36000 esetről számoltak be világszerte, de bármikor kialakulhat egy nagyobb fertőzési hullám (PAHO/WHO, 2022) és a klímaváltozás, emberi beavatkozások hatásai miatt akár Európában is megjelenhet a vírus.

Mivel korábban komoly közegészségügyi problémát okozott, számos erőfeszítést tettek már ZIKV ellenes gyógyszerek és vakcina kifejlesztésére. Számos molekula rendelkezett gátló hatással a ZIKV életciklusának különböző szakaszaiban, úgy mint a ribavirin vagy a sofosbuvir, de klinikai fázisban lévő a gyógyszerfejlesztés még csak a BCX4430 esetén van (Baz & Boivin, 2019). Fontosnak láttuk, hogy a birtokunkban levő glikopeptid antibiotikum származékoknak megvizsgáljuk a ZIKV gátló hatását.

A vizsgálatainkhoz sikeresen hoztunk létre törzsoldatot mindkettő vírus vonalból (MR 766 (Uganda), KX673530 (Guadeloupe)). A plaque assay segítségével elvégeztük a vírus törzsoldat pontos fertőző partikula szám meghatározást, amivel később a fertőzések során már meg tudtuk adni a fertőzés multiplicitását. Az MTT assay több lépéses optimalizálása után, sikeresen beállítottuk, és ezt követően megbízhatóan tudtuk méréseinket végezni. Vizsgálataink során a módszer segítségével közvetetten tudtuk vizsgálni a vegyületek vírus gátlását, pontosabban a sejtvédő hatását.

Kezdeti mikroszkópos vizsgálataink során ígéretesnek tűnő vegyületek közül nyolc vegyület esetében már sikerült elvégeznünk az MTT assay módszerrel történő hatékonyságmérést is. Három hatóanyag (LE-103, LE-115 és ERJ-552) esetében sikerült is azok ZIKV-ra jellemző  $IC_{50}$  értékeit meghatározni.

További terveink között szerepel, hogy folytatjuk a vegyületek antivirális hatásának vizsgálatát a guadeloupei vonal tekintetében is. Kíváncsiak vagyunk, hogy a vegyületek ugyanúgy vagy eltérően fejtenek ki gátló hatást a variánsokra. Ezen felül a többi, eddig még nem mért glikopeptid antibiotikum származékainkat is megvizsgálánk, mind az afrikai, és mind az ázsiai vonalat képviselő vírustörzsünkkel.

Továbbá szeretnénk azon vegyületek esetén megerősíteni a vírus partikula szám változását RT-qPCR-al is, amelyek hatásosan védtek meg a sejteket a vírusfertőzéstől. Ezeknek az értékeknek és az MTT assay értékeknek az összevetésével összetettebb képet kaphatunk a hatóanyagok működéséről.

Az antivirális gyógyszerek fejlesztésének első lépése a megfelelő hatóanyag megtalálása. Bízunk abban, hogy eredményeink hozzájárulnak majd ahhoz, hogy az általunk vizsgált glikopeptid származékokból egyszer majd hatékony ZIKV elleni gyógyszer lesz.

## **VI. Köszönetnyilvánítás**

Köszönetem szeretném a témavezetőim, Dr. Kuczmog Anett és Papp Henrietta, felé nyilvánítani, akik a munkámat irányították és szaktudásukkal, tapasztalatukkal segítettek.

Köszönettel tartozok még a Virologiai Nemzeti Laboratórium vezetőjének, Prof. Dr. Jakab Ferencnek, hogy kitűnő laboratóriumi körülményeket biztosított számomra és a kutatócsoport minden tagjának, akik mindig segítségemre voltak, ha szükség volt rá.

Külön köszönettel tartozok még Debreceni Egyetem Gyógyszerészi Kémia Tanszék munkatársainak, Prof. Dr. Borbás Anikó, Dr. Bakai-Bereczki Ilona, Lőrincz Eszter és csapatuknak, akik biztosították számunkra a vegyületeket és szakmai kérdések megválaszolásában mindig segítettek.

## VII. Irodalomjegyzék

- Aagaard, K. M., Lahon, A., Suter, M. A., Arya, R. P., Seferovic, M. D., Vogt, M. B., Hu, M., Stossi, F., Mancini, M. A., Harris, R. A., Kahr, M., Eppes, C., Rac, M., Belfort, M. A., Park, C. S., Lacorazza, D., & Rico-Hesse, R. (2017). Primary Human Placental Trophoblasts are Permissive for Zika Virus (ZIKV) Replication. *Scientific Reports*, 7(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/srep41389>
- Abbink, P., Stephenson, K. E., & Barouch, D. H. (2018). Zika virus vaccines. *Nature Reviews Microbiology*, 16(10), Art. 10. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0039-7>
- Abedon, S. T., & Bartom, E. (2013). Multiplicity of Infection. In S. Maloy & K. Hughes (Szerk.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* (o. 509–510). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00989-X>
- Adamson, C. S., Chibale, K., Goss, R. J. M., Jaspars, M., Newman, D. J., & Dorrington, R. A. (2021). Antiviral drug discovery: Preparing for the next pandemic. *Chemical Society Reviews*, 50(6), 3647–3655. <https://doi.org/10.1039/D0CS01118E>
- Agrelli, A., de Moura, R. R., Crovella, S., & Brandão, L. A. C. (2019). ZIKA virus entry mechanisms in human cells. *Infection, Genetics and Evolution*, 69, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.018>
- Aktepe, T. E., Liebscher, S., Prier, J. E., Simmons, C. P., & Mackenzie, J. M. (2017). The Host Protein Reticulon 3.1A Is Utilized by Flaviviruses to Facilitate Membrane Remodelling. *Cell Reports*, 21(6), 1639–1654. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.055>
- Albulescu, I. C., Kovacikova, K., Tas, A., Snijder, E. J., & van Hemert, M. J. (2017). Suramin inhibits Zika virus replication by interfering with virus attachment and release of infectious particles. *Antiviral Research*, 143, 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.04.016>
- Amara, A., & Mercer, J. (2015). Viral apoptotic mimicry. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), Art. 8. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3469>
- Assenberg, R., Mastrangelo, E., Walter, T. S., Verma, A., Milani, M., Owens, R. J., Stuart, D. I., Grimes, J. M., & Mancini, E. J. (2009). Crystal Structure of a Novel Conformational State of the Flavivirus NS3 Protein: Implications for Polyprotein Processing and Viral Replication. *Journal of Virology*, 83(24), 12895–12906. <https://doi.org/10.1128/JVI.00942-09>

- Avirutnan, P., Fuchs, A., Hauhart, R. E., Somnuk, P., Youn, S., Diamond, M. S., & Atkinson, J. P. (2010). Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(4), 793–806. <https://doi.org/10.1084/jem.20092545>
- Avirutnan, P., Hauhart, R. E., Somnuk, P., Blom, A. M., Diamond, M. S., & Atkinson, J. P. (2011). Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 187(1), 424–433. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100750>
- Baer, A., & Kehn-Hall, K. (2014). Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 93, 52065. <https://doi.org/10.3791/52065>
- Basu, R., & Tumban, E. (2016). Zika Virus on a Spreading Spree: What we now know that was unknown in the 1950's. *Virology Journal*, 13(1), 165. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0623-2>
- Baz, M., & Boivin, G. (2019). Antiviral Agents in Development for Zika Virus Infections. *Pharmaceuticals*, 12(3), Art. 3. <https://doi.org/10.3390/ph12030101>
- Berezki, I., Papp, H., Kuczmog, A., Madai, M., Nagy, V., Agócs, A., Batta, G., Milánkovits, M., Ostorházi, E., Mitrović, A., Kos, J., Zsigmond, Á., Hajdú, I., Lőrincz, Z., Bajusz, D., Keserű, G. M., Hodek, J., Weber, J., Jakab, F., ... Borbás, A. (2021). Natural Apocarotenoids and Their Synthetic Glycopeptide Conjugates Inhibit SARS-CoV-2 Replication. *Pharmaceuticals*, 14(11), Art. 11. <https://doi.org/10.3390/ph14111111>
- Besnard, M., Lastère, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V. M., & Musso, D. (2014). Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance*, 19(13), 20751. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20751>
- Bowman, C. (2019). *Plant Virology*. Scientific e-Resources.
- Caldas, L. A., Azevedo, R. C., da Silva, J. L., & de Souza, W. (2020). Microscopy analysis of Zika virus morphogenesis in mammalian cells. *Scientific Reports*, 10(1), 8370. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65409-y>
- Carlson, C. J., Dougherty, E. R., & Getz, W. (2016). An Ecological Assessment of the Pandemic Threat of Zika Virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(8), e0004968. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004968>

- Carneiro, B. M., Batista, M. N., Braga, A. C. S., Nogueira, M. L., & Rahal, P. (2016). The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry. *Virology*, 496, 215–218. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.06.012>
- Chan, J. F. W., Choi, G. K. Y., Yip, C. C. Y., Cheng, V. C. C., & Yuen, K.-Y. (2016). Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *The Journal of Infection*, 72(5), 507–524. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.02.011>
- Chaudhuri, S., Symons, J. A., & Deval, J. (2018). Innovation and trends in the development and approval of antiviral medicines: 1987-2017 and beyond. *Antiviral Research*, 155, 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.05.005>
- Ci, Y., Liu, Z.-Y., Zhang, N.-N., Niu, Y., Yang, Y., Xu, C., Yang, W., Qin, C.-F., & Shi, L. (2020). Zika NS1-induced ER remodeling is essential for viral replication. *The Journal of Cell Biology*, 219(2), e201903062. <https://doi.org/10.1083/jcb.201903062>
- Cortese, M., Goellner, S., Acosta, E. G., Neufeldt, C. J., Oleksiuk, O., Lampe, M., Haselmann, U., Funaya, C., Schieber, N., Ronchi, P., Schorb, M., Pruunsild, P., Schwab, Y., Chatel-Chaix, L., Ruggieri, A., & Bartenschlager, R. (2017). Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Reports*, 18(9), 2113–2123. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.014>
- Dang, J., Tiwari, S. K., Lichinchi, G., Qin, Y., Patil, V. S., Eroshkin, A. M., & Rana, T. M. (2016). Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell*, 19(2), 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.014>
- De Clercq, E., & Li, G. (2016). Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 695–747. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15>
- Deckard, D. T., Chung, W. M., Brooks, J. T., Smith, J. C., Woldai, S., Hennessey, M., Kwit, N., & Mead, P. (2016). Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus—Texas, January 2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(14), 372–374.
- Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., & Haddow, A. J. (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(5), 509–520. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)
- Du, S., Liu, Y., Liu, J., Zhao, J., Champagne, C., Tong, L., Zhang, R., Zhang, F., Qin, C.-F., Ma, P., Chen, C.-H., Liang, G., Liu, Q., Shi, P.-Y., Cazelles, B., Wang, P., Tian, H., & Cheng, G. (2019). Aedes mosquitoes acquire and transmit Zika virus by breeding in contaminated aquatic environments. *Nature Communications*, 10(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09256-0>

- 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, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A. J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B. J., Fischer, M., & Hayes, E. B. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England Journal of Medicine*, 360(24), 2536–2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>
- Fernando, S., Fernando, T., Stefanik, M., Eyer, L., & Ruzek, D. (2016). An Approach for Zika Virus Inhibition Using Homology Structure of the Envelope Protein. *Molecular Biotechnology*, 58(12), 801–806. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9979-1>
- Ferrero, D. S., Ruiz-Arroyo, V. M., Soler, N., Usón, I., Guarné, A., & Verdaguer, N. (2019). Supramolecular arrangement of the full-length Zika virus NS5. *PLOS Pathogens*, 15(4), e1007656. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007656>
- Fink, S. L., Vojtech, L., Wagoner, J., Slivinski, N. S. J., Jackson, K. J., Wang, R., Khadka, S., Luthra, P., Basler, C. F., & Polyak, S. J. (2018). The Antiviral Drug Arbidol Inhibits Zika Virus. *Scientific Reports*, 8(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27224-4>
- Fontes-Garfias, C. R., Shan, C., Luo, H., Muruato, A. E., Medeiros, D. B. A., Mays, E., Xie, X., Zou, J., Roundy, C. M., Wakamiya, M., Rossi, S. L., Wang, T., Weaver, S. C., & Shi, P.-Y. (2017). Functional Analysis of Glycosylation of Zika Virus Envelope Protein. *Cell Reports*, 21(5), 1180–1190. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.016>
- Giri, R., Kumar, D., Sharma, N., & Uversky, V. N. (2016). Intrinsically Disordered Side of the Zika Virus Proteome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2016.00144>
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Perera-Lecoin, M., Surasombatpattana, P., Talignani, L., Thomas, F., Cao-Lormeau, V.-M., Choumet, V., Briant, L., Desprès, P., Amara, A., Yssel, H., & Missé, D. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of Virology*, 89(17), 8880–8896. <https://doi.org/10.1128/JVI.00354-15>
- Hasan, S. S., Miller, A., Sapparapu, G., Fernandez, E., Klose, T., Long, F., Fokine, A., Porta, J. C., Jiang, W., Diamond, M. S., Crowe Jr., J. E., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2017). A human antibody against Zika virus crosslinks the E protein to prevent infection. *Nature Communications*, 8(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms14722>
- Heinz, F. X., & Stiasny, K. (2012). Flaviviruses and their antigenic structure. *Journal of Clinical Virology*, 55(4), 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.08.024>

- Hennessey, M., Fischer, M., & Staples, J. E. (2016). Zika Virus Spreads to New Areas—Region of the Americas, May 2015-January 2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(3), 55–58. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e1>
- Kangro, H. O., & Mahy, B. W. J. (1996). *Virology Methods Manual*. Elsevier.
- Kay, J. G., Koivusalo, M., Ma, X., Wohland, T., & Grinstein, S. (2012). Phosphatidylserine dynamics in cellular membranes. *Molecular Biology of the Cell*, 23(11), 2198–2212. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-11-0936>
- Kim, S. Y., Li, B., & Linhardt, R. J. (2017). Pathogenesis and Inhibition of Flaviviruses from a Carbohydrate Perspective. *Pharmaceuticals*, 10(2), Art. 2. <https://doi.org/10.3390/ph10020044>
- Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q., Shearer, F. M., Barker, C. M., Moore, C. G., Carvalho, R. G., Coelho, G. E., Van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I. R., Teng, H.-J., Brady, O. J., Messina, J. P., Pigott, D. M., Scott, T. W., Smith, D. L., ... Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *eLife*, 4, e08347. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
- Kurucz, K., Kiss, V., Zana, B., Schmieder, V., Kepner, A., Jakab, F., & Kemenesi, G. (2016). Emergence of *Aedes koreicus* (Diptera: Culicidae) in an urban area, Hungary, 2016. *Parasitology Research*, 115(12), 4687–4689. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5229-5>
- Lee, E., Hall, R. A., & Lobigs, M. (2004). Common E Protein Determinants for Attenuation of Glycosaminoglycan-Binding Variants of Japanese Encephalitis and West Nile Viruses. *Journal of Virology*, 78(15), 8271–8280. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.15.8271-8280.2004>
- Li, C., Deng, Y.-Q., Wang, S., Ma, F., Aliyari, R., Huang, X.-Y., Zhang, N.-N., Watanabe, M., Dong, H.-L., Liu, P., Li, X.-F., Ye, Q., Tian, M., Hong, S., Fan, J., Zhao, H., Li, L., Vishlaghi, N., Buth, J. E., ... Cheng, G. (2017). 25-Hydroxycholesterol Protects Host against Zika Virus Infection and Its Associated Microcephaly in a Mouse Model. *Immunity*, 46(3), 446–456. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.012>
- Li, G., Xu, M., Yue, T., Gu, W., & Tan, L. (2021). Life-long passion for antiviral research and drug development: 80th birthday of Prof. Dr. Erik De Clercq. *Biochemical Pharmacology*, 185, 114485. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114485>
- Li, L., Lok, S.-M., Yu, I.-M., Zhang, Y., Kuhn, R. J., Chen, J., & Rossmann, M. G. (2008). The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: Structure and

- maturation. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5871), 1830–1834.  
<https://doi.org/10.1126/science.1153263>
- Li, M., Zhang, D., Li, C., Zheng, Z., Fu, M., Ni, F., Liu, Y., Du, T., Wang, H., Griffin, G. E., Zhang, M., & Hu, Q. (2020). Characterization of Zika Virus Endocytic Pathways in Human Glioblastoma Cells. *Frontiers in Microbiology*, 11.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00242>
- Li, Z., Brecher, M., Deng, Y.-Q., Zhang, J., Sakamuru, S., Liu, B., Huang, R., Koetzner, C. A., Allen, C. A., Jones, S. A., Chen, H., Zhang, N.-N., Tian, M., Gao, F., Lin, Q., Banavali, N., Zhou, J., Boles, N., Xia, M., ... Li, H. (2017). Existing drugs as broad-spectrum and potent inhibitors for Zika virus by targeting NS2B-NS3 interaction. *Cell Research*, 27(8), Art. 8. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.88>
- 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. (2016). 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*, 19(5), 663–671.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.019>
- Macnamara, F. N. (1954). Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(2), 139–145. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(54\)90006-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(54)90006-1)
- Magnus, M. M., Espósito, D. L. A., Costa, V. A. da, Melo, P. S. de, Costa-Lima, C., Fonseca, B. A. L. da, & Addas-Carvalho, M. (2018). Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, 40(3), 250–254.  
<https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.01.011>
- Marchette, N. J., Garcia, R., & Rudnick, A. (1969). Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 18(3). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19701001467>
- Mounce, B. C., Cesaro, T., Carrau, L., Vallet, T., & Vignuzzi, M. (2017). Curcumin inhibits Zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding. *Antiviral Research*, 142, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.03.014>
- Munjal, A., Khandia, R., Dhama, K., Sachan, S., Karthik, K., Tiwari, R., Malik, Y. S., Kumar, D., Singh, R. K., Iqbal, H. M. N., & Joshi, S. K. (2017). Advances in Developing Therapies to Combat Zika Virus: Current Knowledge and Future Perspectives.

- Frontiers in Microbiology*, 8.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01469>
- Oladapo, O. T., Souza, J. P., De Mucio, B., de León, R. G. P., Perea, W., & Gülmezoglu, A. M. (2016). WHO interim guidance on pregnancy management in the context of Zika virus infection. *The Lancet Global Health*, 4(8), e510–e511.  
[https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30098-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30098-5)
- Owczarek, K., Chykunova, Y., Jassoy, C., Maksym, B., Rajfur, Z., & Pyrc, K. (2019). Zika virus: Mapping and reprogramming the entry. *Cell Communication and Signaling*, 17(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0349-z>
- Peiter, P. C., Pereira, R. dos S., Nunes Moreira, M. C., Nascimento, M., Tavares, M. de F. L., Franco, V. da C., Carvajal Cortês, J. J., Campos, D. de S., & Barcellos, C. (2020). Zika epidemic and microcephaly in Brazil: Challenges for access to health care and promotion in three epidemic areas. *PLoS ONE*, 15(7), e0235010.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235010>
- 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. (2016). Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. *Nature Communications*, 7, 13410.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms13410>
- Pielnaa, P., Al-Saadawe, M., Saro, A., Dama, M. F., Zhou, M., Huang, Y., Huang, J., & Xia, Z. (2020). Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. *Virology*, 543, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.01.015>
- Poland, G. A., Ovsyannikova, I. G., & Kennedy, R. B. (2019). Zika Vaccine Development: Current Status. *Mayo Clinic Proceedings*, 94(12), 2572–2586.  
<https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.05.016>
- Prasad, V. M., Miller, A. S., Klose, T., Sirohi, D., Buda, G., Jiang, W., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2017). Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(2), 184–186.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb.3352>
- Rampersad, S., & Tennant, P. (2018). Replication and Expression Strategies of Viruses. *Viruses*, 55–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811257-1.00003-6>
- Rana, J., Slon Campos, J. L., Leccese, G., Francolini, M., Bestagno, M., Poggianella, M., & Burrone, O. R. (2018). Role of Capsid Anchor in the Morphogenesis of Zika Virus. *Journal of Virology*, 92(22), e01174-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01174-18>

- Rausch, K., Hackett, B. A., Weinbren, N. L., Reeder, S. M., Sadovsky, Y., Hunter, C. A., Schultz, D. C., Coyne, C. B., & Cherry, S. (2017). Screening Bioactives Reveals Nanchangmycin as a Broad Spectrum Antiviral Active against Zika Virus. *Cell Reports*, 18(3), 804–815. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.068>
- Reznik, S. E., & Ashby, C. R. (2017). Sofosbuvir: An antiviral drug with potential efficacy against Zika infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 55, 29–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.12.011>
- Richman, D. D. (2006). Antiviral drug resistance. *Antiviral Research*, 71(2–3), 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.03.004>
- Rossignol, E. D., Peters, K. N., Connor, J. H., & Bullitt, E. (2017). Zika virus induced cellular remodelling. *Cellular Microbiology*, 19(8). <https://www.cabdirect.org/globalhealth/abstract/20173298179>
- Sacramento, C. Q., de Melo, G. R., de Freitas, C. S., Rocha, N., Hoelz, L. V. B., Miranda, M., Fintelman-Rodrigues, N., Martorelli, A., Ferreira, A. C., Barbosa-Lima, G., Abrantes, J. L., Vieira, Y. R., Bastos, M. M., de Mello Volotão, E., Nunes, E. P., Tschoeke, D. A., Leomil, L., Loiola, E. C., Trindade, P., ... Souza, T. M. L. (2017). The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. *Scientific Reports*, 7(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/srep40920>
- Shiryaev, S. A., Mesci, P., Pinto, A., Fernandes, I., Sheets, N., Shresta, S., Farhy, C., Huang, C.-T., Strongin, A. Y., Muotri, A. R., & Tersikh, A. V. (2017). Repurposing of the anti-malaria drug chloroquine for Zika Virus treatment and prophylaxis. *Scientific Reports*, 7(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15467-6>
- Sirohi, D., & Kuhn, R. J. (2017). Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(suppl\_10), S935–S944. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix515>
- Srivastava, M., Zhang, Y., Chen, J., Sirohi, D., Miller, A., Zhang, Y., Chen, Z., Lu, H., Xu, J., Kuhn, R. J., & Andy Tao, W. (2020). Chemical proteomics tracks virus entry and uncovers NCAM1 as Zika virus receptor. *Nature Communications*, 11(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17638-y>
- Thepparit, C., Phoolcharoen, W., Suksanpaisan, L., & Smith, D. R. (2004). Internalization and Propagation of the Dengue Virus in Human Hepatoma (HepG2) Cells. *Intervirology*, 47(2), 78–86. <https://doi.org/10.1159/000077830>

- Vazquez, C., & Jurado, K. A. (2020). Playing Favorites: Integrin  $\alpha\beta 5$  Mediates Preferential Zika Infection of Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 26(2), 133–135.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.01.007>
- Vimberg, V. (2021). Teicoplanin—A New Use for an Old Drug in the COVID-19 Era? *Pharmaceuticals*, 14(12), Art. 12. <https://doi.org/10.3390/ph14121227>
- Weekly Epidemiological Update for Dengue and other Arboviruses*. (é. n.). Elérés 2023. január 13., forrás [https://ais.paho.org/ha\\_viz/Arbo/Arbo\\_Bulletin\\_2022.asp?env=pri](https://ais.paho.org/ha_viz/Arbo/Arbo_Bulletin_2022.asp?env=pri)
- Wichit, S., Gumpangseth, N., Hamel, R., Yainoy, S., Arikkit, S., Punsawad, C., & Missé, D. (2021). Chikungunya and Zika Viruses: Co-Circulation and the Interplay between Viral Proteins and Host Factors. *Pathogens*, 10(4), Art. 4.  
<https://doi.org/10.3390/pathogens10040448>
- Xia, H., Luo, H., Shan, C., 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. (2018). An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nature Communications*, 9(1), Art. 1.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02816-2>
- Xu, S., Ci, Y., Wang, L., Yang, Y., Zhang, L., Xu, C., Qin, C., & Shi, L. (2019). Zika virus NS3 is a canonical RNA helicase stimulated by NS5 RNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, 47(16), 8693–8707. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz650>
- Xu, X., Song, H., Qi, J., Liu, Y., Wang, H., Su, C., Shi, Y., & Gao, G. F. (2016). Contribution of intertwined loop to membrane association revealed by Zika virus full-length NS1 structure. *The EMBO Journal*, 35(20), 2170–2178.  
<https://doi.org/10.15252/embj.201695290>
- Yuan, S., Chan, J. F.-W., den-Haan, H., Chik, K. K.-H., Zhang, A. J., Chan, C. C.-S., Poon, V. K.-M., Yip, C. C.-Y., Mak, W. W.-N., Zhu, Z., Zou, Z., Tee, K.-M., Cai, J.-P., Chan, K.-H., de la Peña, J., Pérez-Sánchez, H., Cerón-Carrasco, J. P., & Yuen, K.-Y. (2017). Structure-based discovery of clinically approved drugs as Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitors that potently inhibit Zika virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Research*, 145, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.07.007>
- Zhang, J.-H., Chung, T. D. Y., & Oldenburg, K. R. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *SLAS Discovery*, 4(2), 67–73. <https://doi.org/10.1177/108705719900400206>
- Zhang, L., Xi, Z., & Chattopadhyaya, J. (2011). *Medicinal Chemistry of Nucleic Acids*. John Wiley & Sons.

- Zhang, S., Yi, C., Li, C., Zhang, F., Peng, J., Wang, Q., Liu, X., Ye, X., Li, P., Wu, M., Yan, Q., Guo, W., Niu, X., Feng, L., Pan, W., Chen, L., & Qu, L. (2019). Chloroquine inhibits endosomal viral RNA release and autophagy-dependent viral replication and effectively prevents maternal to fetal transmission of Zika virus. *Antiviral Research*, 169, 104547. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104547>
- Zhang, X., Xie, X., Xia, H., Zou, J., Huang, L., Popov, V. L., Chen, X., & Shi, P.-Y. (2019). Zika Virus NS2A-Mediated Virion Assembly. *mBio*, 10(5), e02375-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02375-19>
- Zhang, X., Xie, X., Zou, J., Xia, H., Shan, C., Chen, X., & Shi, P.-Y. (2019). Genetic and biochemical characterizations of Zika virus NS2A protein. *Emerging Microbes & Infections*, 8(1), 585–602. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1598291>
- Zhao, B., Yi, G., Du, F., Chuang, Y.-C., Vaughan, R. C., Sankaran, B., Kao, C. C., & Li, P. (2017). Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. *Nature Communications*, 8(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms14762>
- Zika epidemiology update—July 2019*. (é. n.). Elérés 2023. január 22., forrás <https://www.who.int/publications/m/item/zika-epidemiology-update>