

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

SARS-COV-2 METILTRANSFERĀZES NSP14 INHIBITORU IZPĒTE

BAKALaura DARBS

Autore: Anna Līna Bula

Stud. apl. Nr. ab19189

Darba vadītāja: *Mg. sc. ing.* Diāna Zeļencova-Gopejenko

Recenzents: *Dr. chem.* Alons Lends

RĪGA 2022

KOPSAVILKUMS

SARS-CoV-2 parādījās 2019. gada nogalē un ātri vien kļuva par nopietnu draudu sabiedrības veselībai, radot vajadzību pēc terapeitiskiem līdzekļiem tā izraisītās slimības Covid-19 ārstēšanai. Viens variants ir radīt potentu inhibitoru pret kādu no proteīniem, kas nepieciešams vīrusa dzīves cikla īstenošanai. Potenciāls mērķis ir nestrukturālais proteīns 14 (nsp14), kura metiltransferāzes aktivitāte svarīga vīrusa mRNS stabilitātei un translācijai.

Darba mērķis bija iegūt aktīvu SARS-CoV-2 nsp14/nsp10 kompleksu un, veicot KMR fragmentu skrīningu, meklēt savienojumus, kas saistās tā metiltransferāzes aktīvajā centrā (S-adenozil-*L*-metionīna (SAM) saistīšanas kabatā). Pētījuma ietvaros *E. coli* ekspresijas sistēmā tika producēti nsp14 un nsp10 proteīni un tika veikts nsp14/nsp10 kompleksa KMR skrīnings 695 fragmentu bibliotēkai. No 47 savienojumiem, kas KMR eksperimentos uzrādīja saistību, divi konkurēja ar SAM analogu sinefungīnu, norādot uz to, ka ir spējīgi saistīties metiltransferāzes aktīvajā centrā.

Bakalaura darbs tika izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā, Valsts pētījumu programmas (VPP) "Covid-19 seku mazināšanai" projekta "Jaunu terapeitisko un profilaktisko līdzekļu izstrāde pret Covid-19 un koronavīrusiem" ietvaros.

Atslēgvārdi: SARS-CoV-2, metiltransferāze, proteīnu producēšana, KMR skrīnings, fragmenti

SUMMARY

SARS-CoV-2 first appeared at the end of 2019 and quickly became a serious public health threat, creating a need for therapeutic agents that could treat the disease. One option is to develop a potent inhibitor against a protein that is crucial for the viral life cycle. One such potential target is the non-structural protein 14 (nsp14) that acts as a methyltransferase and is important for viral mRNA stability and translation.

The main objective of this work was to produce an active SARS-CoV-2 nsp14 and using NMR fragment screening look for compounds that bind to the S-adenosyl-L-methionine (SAM) binding pocket. In this study, nsp14 and nsp10 were produced in the *E. coli* expression system and a library of 695 fragments was screened on the nsp14/nsp10 complex using NMR spectroscopy. Out of the 47 compounds that showed binding in the NMR experiments, two showed competitive binding with the SAM analog sinefungin, indicating that they bind at the methyltransferase active site.

The work was carried out at the Latvian Institute of Organic Synthesis as a part of the State Research Program project “Towards new therapeutic and prophylactic treatments against Covid-19 and coronaviruses”.

Keywords: SARS-CoV-2, methyltransferase, protein production, NMR screening, fragments

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

CPMG – Carr-Purcell-Meiboom-Gill

DMSO – dimetilsulfoksīds

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

DTT – ditiotreitols

EDTA – etilēndiamīntetraetiķskābe

HSQC – heterokodola viena kvanta koherence

ITK – izotermālās titrēšanas kalorimetrija

IPTG – izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozīds

KMR – kodolu magnētiskā rezonanse

KOE – kodolu Overhauzera efekts

LB – lizogēnā barotne

MES – 2-(N-morfolino)-etānsulfonskābe

OD600 – optiskais blīvums pie 600 nm

RNS – ribonukleīnskābe

SAH – S-adenozil-L-homocisteīns

SAM – S-adenozil-L-metionīns

SARS – Severe acute respiratory syndrome

MERS – Middle eastern respiratory syndrome

SDS – nātrijs dodecilsulfāts

SDS-PAGE – nātrijs dodecilsulfāta poliakrilamīda gēla elektroforēze

SOC – superoptimālā barotne ar katabolītu supresiju

STD – saturation transfer difference

Tris – 2-amino-2-(hidroksimetil)-propān-1,3-diols

UV – ultravioletais starojums

waterLOGSY – Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy

SATURS

IEVADS	7
1. LITERATŪRAS APSKATS	8
1.1. SARS-CoV-2 vīruss	8
1.2. Vīrusa mRNS <i>cap</i> struktūra.	9
1.2.1. <i>Cap</i> veidošanās	9
1.2.2. <i>Cap</i> funkcijas.....	10
1.2.3. Nsp14 – bifunkcionāls enzīms.....	10
1.3. Uz fragmentiem balstīta zāļu izveide	12
1.3.1. Zāļu veidošanas process.	12
1.3.2. Proteīna-liganda mijiedarbības pētījumi ar KMR.	13
1.4. Saistības konkurences pētīšana.....	14
2. MATERIĀLI UN METODEDES	16
2.1. Materiāli	16
2.1.1. Reaģenti un vielas.....	16
2.1.2. Barotnes un šķīdumi	17
2.1.3. Buferšķīdumi proteīna attīrīšanai	17
2.1.4. Komplekti	18
2.2. Aparatūra	18
2.3. Laboratorijas inventārs un materiāli.....	19
2.4. Baktēriju celmi un plazmīdas	20
2.5. Lietojumprogrammas	20
2.6. Metodes	20
2.6.1. Transformācija <i>E. coli</i> šūnās	20
2.6.2. Plazmīdu izdalīšana no <i>E. coli</i> šūnām pēc GeneJET™ Gel Extraction Kit protokola	20
2.6.3. Proteīna gēna ekspresija <i>E. coli</i> šūnās.....	21
2.6.4. <i>E. coli</i> šūnu sagraušana ar ultraskaņu.....	21

2.6.5. Proteīna attīrīšana ar niķeļa afinitātes hromatogrāfiju.....	22
2.6.6. Proteīna attīrīšana ar gēlfiltrācijas hromatogrāfiju	22
2.6.7. Proteīna buferšķīduma apmaiņas hromatogrāfija.....	22
2.6.8. SDS-PAGE proteīnu analīze/Elektroforēze poliakrilamīda gēlā	23
2.6.9. Izotermālās titrēšanas kalorimetrija (ITK)	23
2.6.10. KMR fragmentu skrīninga paraugu sagatavošana un spektru uzņemšanas parametri	23
2.6.11. KMR datu analīzes metodes.....	24
2.6.12. Darba drošība.....	24
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA	25
3.1. Nsp14 un nsp10 ekspresija un attīrīšana.	25
3.1.1. Nsp14 ekspresija un attīrīšana.....	25
3.1.2. Nsp10 ekspresija un attīrīšana.....	26
3.1.3. Nsp14/10 kompleksa aktivitātes novērtēšana.....	27
3.2. KMR skrīnings fragmentu bibliotēkai.....	30
3.2.1. Saistību uzrādošu savienojumu identificēšana.....	30
3.2.2. Ar sinefungīnu konkurējošie savienojumi.....	35
3.3. Metiltransferāzes domēna ^1H - ^{15}N -HSQC spektrs.....	37
SECINĀJUMI	39
PATEICĪBAS.....	40
LITERATŪRAS SARAKSTS	41

IEVADS

SARS-CoV-2 ir vīruss, kura izraisītā slimība Covid-19 var atstāt smagas sekas uz cilvēku veselību. Pašlaik pieejamas vairākas vakcīnas pret šo vīrusu, taču to efektivitāte ar laiku mazinās, kā arī ir atšķirīga pret dažādiem vīrusa celmiem. Efektīvas zāles pret Covid-19 vēl nav izstrādātas. Vīrusa nsp14 ar N7-guanilmetiltransferāzes aktivitāti ir viens no enzīmiem, kas piedalās virālā mRNS *cap* struktūras radīšanā. Šī struktūra nodrošina mRNS stabilitāti, translāciju un izvairīšanos no imūnsistēmas detekcijas un ir nepieciešama vīrusa dzīves ciklam. Tas padara nsp14 par potenciālu zāļu mērķi.

Uz fragmentiem balstīta zāļu atklāšana ir plaši izmantota pieeja, lai radītu jaunus terapeitiskos līdzekļus. Pirmais solis ir fragmentu skrīnings, kura mērķis ir identificēt savienojumus, kas saistās pie konkrēta mērķproteīna. Tālākie zāļu attīstīšanas soļi balstās uz šo savienojumu modificēšanu, lai iegūtu inhibitorus ar augstu saistīšanās stiprumu un selektivitāti.

Darba mērķis ir identificēt savienojumus, kas saistās metiltransferāzes nsp14 aktīvajā centrā

Darba uzdevumi:

- veikt proteīnu nsp14 un nsp10 attīrīšanu
- pārbaudīt nsp14/nsp10 kompleksa aktivitāti
- veikt KMR skrīningu 695 fragmentu bibliotēkai
- analizēt skrīninga datus

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. SARS-CoV-2 vīruss

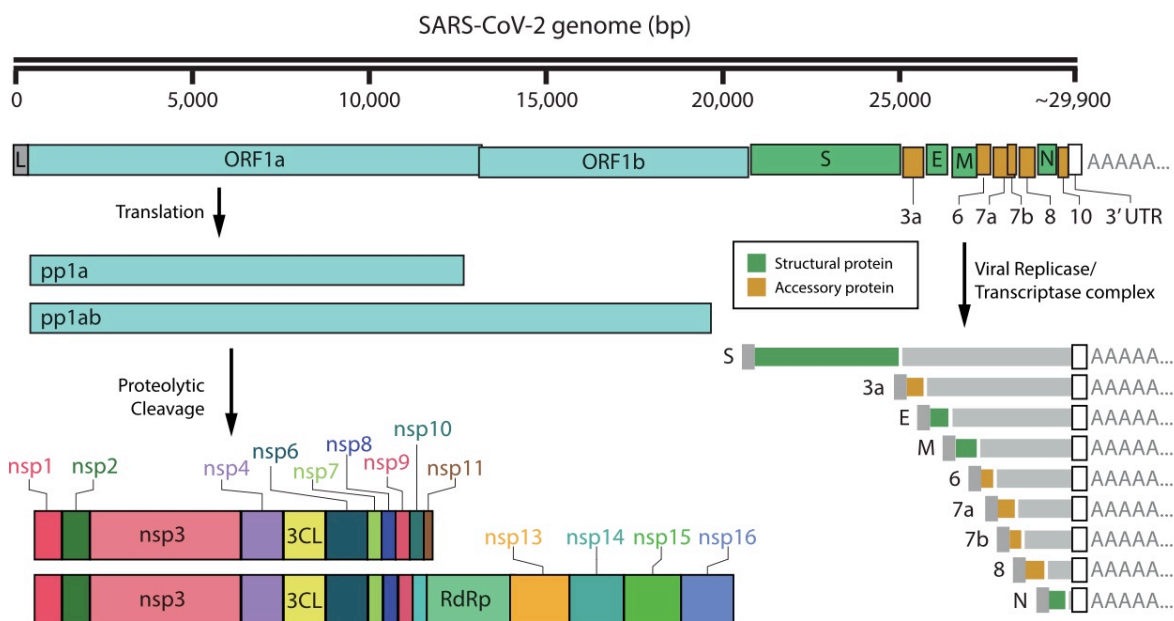
SARS-CoV-2 tika atklāts 2019. gada decembrī Ķīnā, un saistībā ar tā straujo izplatību 2020. gada 11. martā Pasaules Veselības organizācija pasludināja pandēmiju¹. Tas ir trešais zoonotiskais beta koronavīruss, kas parādījies kopš 21. gs. sākuma – pirmais bija SARS-CoV-1 2003. gadā, kas parādījās Ķīnā un izplatījās pa 30 valstīm, un tam sekoja MERS-CoV 2012. gadā, kurš skāra 26 valstis, pie tam mirstība no šī vīrusa tika novērtēta pie 30%².

Pēc 2022. gada maija datiem, ar SARS-CoV-2 izraisīto slimību Covid-19 slimojuši 525 miljoni cilvēku, no kuriem 6,3 miljoni ir miruši, taču pētījumi liecina, ka patiesais nāvju skaits ir pat daudz augstāks³. Galvenie Covid-19 simptomi ir drudzis, klepus, nogurums un grūtības elpot⁴. Slimība var radīt nopietnus bojājumus galvenokārt plaušām, var skart arī nieru, smadzeņu un sirds darbību⁵. Tostarp aptuveni 10% Covid-19 slimnieku tādi simptomi kā nogurums, krūškurvja sāpes, locītavu sāpes un kognitīvie traucējumi var saglabāties ilgstoši no vairākām nedēļām līdz pat mēnešiem, ko dēvē par *long covid* jeb garo covid⁶.

Ārkārtas apstākļos rekordlielā ātrumā – nepilna gada laikā kopš pandēmijas sākuma – parādījās pirmie vakcīnu kandidāti pret SARS-CoV-2, no kurām trīs galvenie ir uz mRNS tehnoloģiju balstītās Pfizer&BioNTech un Moderna vakcīnas, kuras sākotnējos klīniskajos pētījumos uzrādīja 95% efektivitāti, un uz adenovīrusa bāzes izstrādātā AstraZeneca vakcīna ar novērtēto efektivitāti 67%⁷. Taču šo vakcīnu efektivitāte laika gaitā ievērojami samazinās, jo ar laiku asinīs mazinās pret pīķa proteīnu izstrādāto antivielu koncentrācija⁸. Aktuāla ir arī vīrusa mainība un jaunu tā variantu rašanās, pret kuriem vakcīnas ir vēl jo mazāk efektīvas. Vakcīnas izraisa antivielu veidošanos pret vīrusa pīķa (*spike*) proteīnu, taču no vakcīnām gūtā imūnā atbilde ir vājāka pret tiem SARS-CoV-2 variantiem, kuros šis proteīns ir akumulējis daudzas mutācijas^{9,10}. Joprojām aktuāli radīt efektīvus terapeitiskos līdzekļus pret SARS-CoV-2 un potenciāliem jauniem koronavīrusiem nākotnē. Viena iespēja ir jau eksistējošu zāļu vielu pārprofilēšana, piemēram, zāļu *remdesivir* pārprofilēšana, taču šī pieeja nav bijusi īpaši efektīva¹¹. Vēl viena iespēja ir radīt jaunas zāles konkrēti pret kādu no šī vīrusa proteīniem, kas nepieciešami vīrusa dzīves cikla realizācijai.

SARS-CoV-2 pieder pie *positive-sense* ssRNS (+RNS) vīrusiem, pie valsts *Riboviria*, kārtas *Nidovirales*, dzimtas *Coroniridae*, apakšdzimtas *Corovirinae*. Tā genoms ir 29,9 kb liels – divas trešdaļas vīrusa genoma aizņem divi atvērtie lasīšanas rāmji: Orf1a un Orf1ab. To kodētie poliproteīni (attiecīgi pp1a un pp1ab) tiek autoproteolītiski sašķelti par 16 nestrukturālajiem proteīniem (*non-structural proteins* jeb nsp), starp kuriem ir gan enzīmi,

gan to palīgproteīni, kuru funkcija ir nodrošināt veiksmīgu vīrusa genoma replikāciju, transkripciju un translāciju inficētajā eikariotu šūnā. Trešdaļu genoma veido gēni, kas kodē vīrusa strukturālos proteīnus – pīķa (S), apvalka (E), membrānas (M) un nukleokapsīda (N) proteīnus¹² (1. attēls).



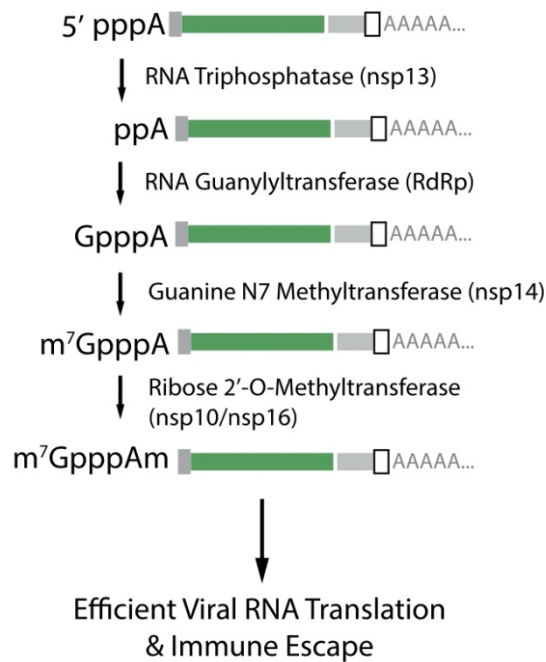
1. attēls. SARS-CoV-2 genoma struktūra un kodētie proteīni.¹²

Figure 1. SARS-CoV-2 genome structure and encoded proteins.¹²

1.2. Vīrusa mRNS *cap* struktūra.

1.2.1. *Cap* veidošanās.

Vīrusa RNS transkripcija notiek inficētās šūnas citoplazmā. Tai seko jaunsintezētās mRNS *capping* process, kurā iesaistīti pieci no vīrusa nestrukturālajiem proteīniem. Vispirms pēc RNS sintēzes nsp13, kuram piemīt RNS trifosfatāzes aktivitāte, nošķel terminālo γ -fosfātgrupu no adenoziņa trifosfāta ($5'$ pppA – ppA). Tad nsp12, kas funkcionē kā RNS-guaniltransferāze, adenoziņa difosfātam pievieno guanīnu, ģenerējot GpppA *cap* struktūru. Pēc tam nsp14, kam piemīt N7-metiltransferāzes aktivitāte, metilē guanīna N7 pozīciju, radot m7G jeb *cap-0* struktūru. Visbeidzot nsp16/nsp10 komplekss ar $2'$ -O-metiltransferāzes aktivitāti veic *cap-0* struktūras ribozes $2'$ -O metilēšanu, pabeidzot virālās mRNS *cap* struktūras formēšanu – šādā stadijā to sauc par *cap-1* struktūru¹³ (2. attēls).



2. attēls. SARS-CoV-2 mRNS *capping* mehānisms.

Figure 2. SARS-CoV-2 mRNA capping mechanism.

1.2.2. *Cap* funkcijas.

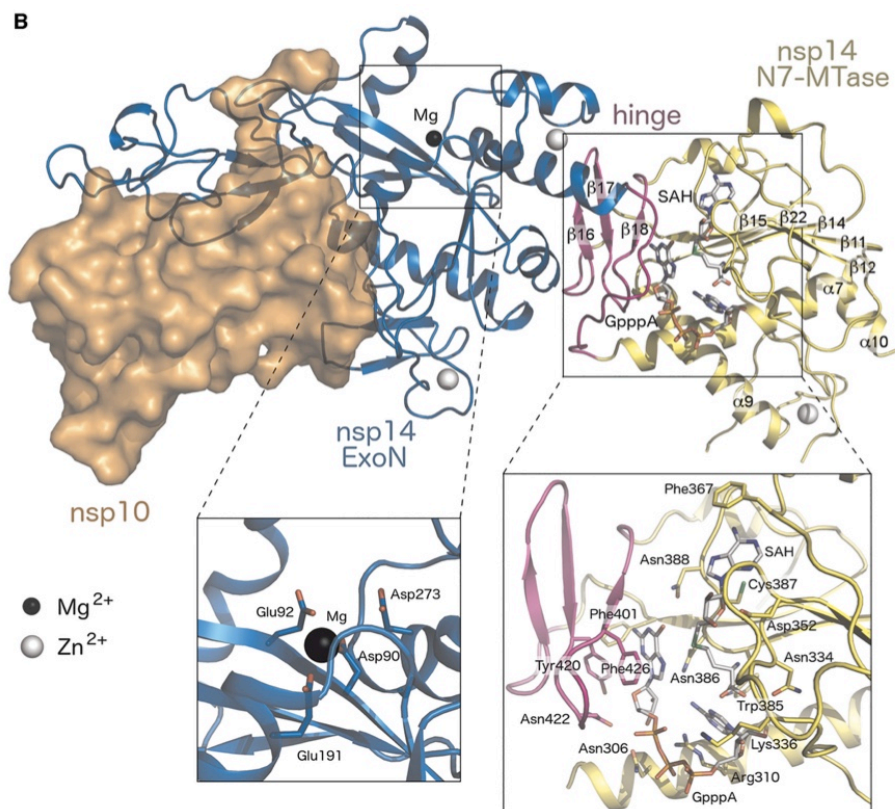
Šī modificēšana padara vīrusa mRNS līdzīgāku eikariota mRNS, kam arī ir *cap* struktūra, ko transkripcijas procesa laikā šūnas kodolā pievieno RNS polimerāze II. *Cap* struktūra nodrošina mRNS translāciju, ļaujot saistīties eikariotu translācijas iniciācijas faktoram 4E (precīzāk, tā subvienībai eIF4AE)^{14,15}. *Cap* struktūra arī ir svarīga ribosomu saistīšanai un lai izvairītos no 5' – 3' eksoribonukleāžu degradācijas¹⁶. Pie tam mRNS bez *cap* struktūras, specifiski bez 2'-O metilēšanas, ko veic nsp16/nsp10 komplekss, izsauc imūnsistēmas atbildi – pastiprinātu antivirālo citokīnu ekspresiju^{17,18}.

1.2.3. Nsp14 – bifunkcionāls enzīms

Viens no nestrukturālajiem proteīniem, kas nepieciešams vīrusa genoma replikācijai inficētajās šūnās, ir nsp14. Tas ir 60 kDa liels enzīms, kurš sastāv no diviem galvenajiem domēniem – *N*-terminālās daļas eksoribonukleāzes (ExoN) domēna un *C*-terminālā metiltransferāzes (MTāzes) domēna. Abus domēnus savieno *hinge* jeb eņģes domēns (3.attēls). *N*-terminālās daļas 3' – 5' *proofreading* eksoribonukleāzes aktivitāti atklāja Minskaia et al 2006. gadā¹⁹. ExoN aktivitātei nepieciešams aktivējošais kofaktors nsp10 – tas ir 16 kDa liels proteīns, kas satur divus cinka pirkstu motīvus, funkcionē kā vairāku vīrusa

replikatīvo enzīmu aktivācijas kofaktors²⁰. Nsp10, saistoties pie ExoN domēna, izmaina tā aktīvā centra konformāciju, palielinot aktivitāti 35 reizes²¹.

Savukārt nsp14 C-terminālajai daļai piemīt N7-guanīna metiltransferāzes aktivitāte, ko atklāja Chen et al 2009. gadā²². Nsp14 kā metilgrupas donoru izmanto S-adenozil-L-metionīnu (SAM). Metilēšanas rezultātā rodas m7G cap-0 struktūra un S-adenozil-L-homocisteīns (SAH).



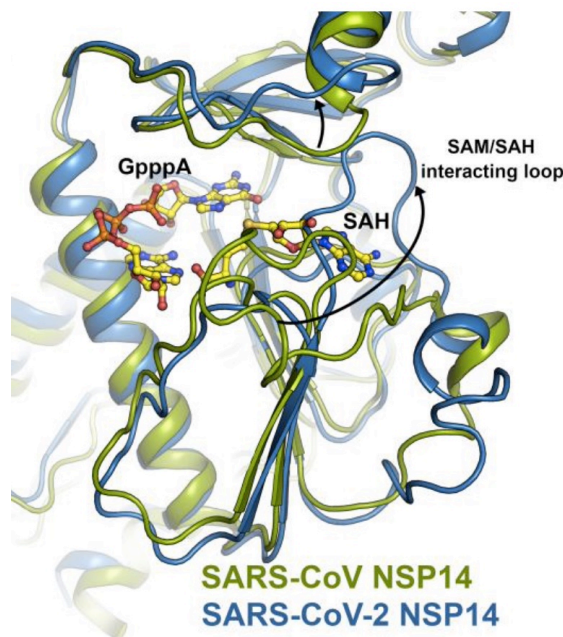
3. attēls. Nsp14/nsp10 kompleksa struktūra. Zilā krāsā – 3'- 5' eksoribonukleāzes domēns, dzeltenā – N7-guanilmetiltransferāzes domēns, rozā – eņģes domēns, oranžā – nsp10.²⁶

Figure 3. Nsp14/nsp10 complex structure. Shown in blue – the 3'– 5' exoribonuclease domain, in yellow – the N7-guanyl methyltransferase domain, in pink – the hinge domain, in orange – nsp10.

MTāzes domēna aktivitātei nav nepieciešams kofaktors nsp10. Domēnu veido 12 beta ķēdes un piecas alfa spirāles, centrālā beta plāksne sastāv no piecām beta ķēdēm (beta 11, 12, 14, 15, 22).²³

SARS-CoV-1 nsp14/10 kompleksa kristāla struktūra tika publicēta 2015. gadā,²⁴ krio-EM struktūra publicēta 2021. gadā.²⁵ Tikai pavisam nesen – 2022. gada martā tika publicēta SARS-CoV-2 nsp14 kristāla struktūra bez nsp10, kas ļauj salīdzināt kofaktora ietekmi uz nsp14 ExoN un MTāzes domēnu konformācijām. Visizteiktākā izmaiņa ir ExoN

konformācijā, pirmajām 60 aminoskābēm ir kompaktāka konformācija un augstāks alfa spirāļu skaits, kā arī netiek formēta pirmā beta plāksne, kas asociējas ar nsp10 cinka pirksta motīvu. MTāzes domēnā izteiktākās atšķirības ir SAM/SAH mijiedarbības cilpā (4. attēls) 356 – 378 atlikumos, kas dažās vietās veido polāras mijiedarbības ar ExoN domēnu (S357 ar V287, D358 ar H283) un eņģes domēnu (S577 ar H427, K359 ar D415). Pie tam MTāzes domēnā, līdzīgi kā ExoN domēnā, novērojama sekundārās struktūras elementu nomaina (*interchange*), kur vienu no centrālo beta plāksni veidojošajām beta ķēdēm nomaina alfa spirāle (363-366 atlikumos).²⁶



4. attēls. SAM/SAH mijiedarbības cilpu salīdzinājums: Zaļā krāsā SARS-CoV nsp14/nsp10 kompleksa SAM/SAH mijiedarbības cilpa. Zilā krāsā SARS-CoV-2 nsp14 SAM/SAH mijiedarbības cilpa.²⁶

Figure 4. Comparison of SAM/SAH interacting loops: SARS-CoV nsp14/nsp10 complex shown in green, SARS-CoV-2 nsp14 shown in blue.²⁶

1.3. Uz fragmentiem balstīta zāļu izveide

1.3.1. Zāļu veidošanas process.

Uz fragmentiem balstīta zāļu izveide (FBDD – *Fragment Based Drug Design*) ir pieeja jaunu terapeitisku līdzekļu izstrādei. Procesa pamatā ir jaunu vielu dizainēšana, sākot ar fragmentiem. Vispirms tiek dizainēta fragmentu bibliotēka, kas parasti satur vairākus simtus līdz pat tūkstošus mazmolekulāru (< 300 Da) savienojumu²⁷. Tad veic šo bibliotēku skrīningu pret izvēlēto terapeitisko mērķi, piemēram, vīrusa proteīnu. Skrīninga mērķis ir identificēt, kuri no bibliotēkas fragmentiem saistās pie mērķa. Fragmentu mazo izmēru un vienkāršās

var pielietot arī ^1H - ^{15}N -HSQC eksperimentu, kurā salīdzina proteīna aminoskābju signālu nobīdes liganda klātbūtnē. Tādējādi var noteikt vietu, kur ligands piesaistījies pie mērķproteīna, iespējams arī noteikt saistības stiprumu²⁹. Taču šādiem eksperimentiem jāproducē proteīns ar ^{15}N izotopa iezīmēm, kas ir dārgs process.

1.3.2.1. WaterLOGSY eksperiments.

WaterLOGSY ir viens no plašāk izmantotajiem KMR eksperimentiem ligandu signālu novērošanas fragmentu skrīningam. Tā darbības princips ir saistīts ar magnetizācijas pārnesei caur ūdens molekulām uz ligandiem, izmantojot kodolu Overhauzera efektu (KOE). Ligandi, kas nesaistās ar proteīnu, magnetizāciju saņem no brīvām ūdens molekulām šķīdumā, turpretī ligandi, kas saistās ar proteīnu, magnetizāciju saņem pastarpināti, pārnesot to no ar proteīnu saistītām ūdens molekulām vai arī labiliem protoniem. KOE šajos gadījumos ir pretēja zīme – ar proteīnu saistīta liganda KOE būs negatīvs (waterLOGSY eksperimentā pozitīvs signāls) un brīva liganda KOE ar ūdens molekulām būs pozitīvs (waterLOGSY eksperimentā negatīvs signāls).³⁰

1.3.2.2. $T_{1\rho}$ eksperiments.

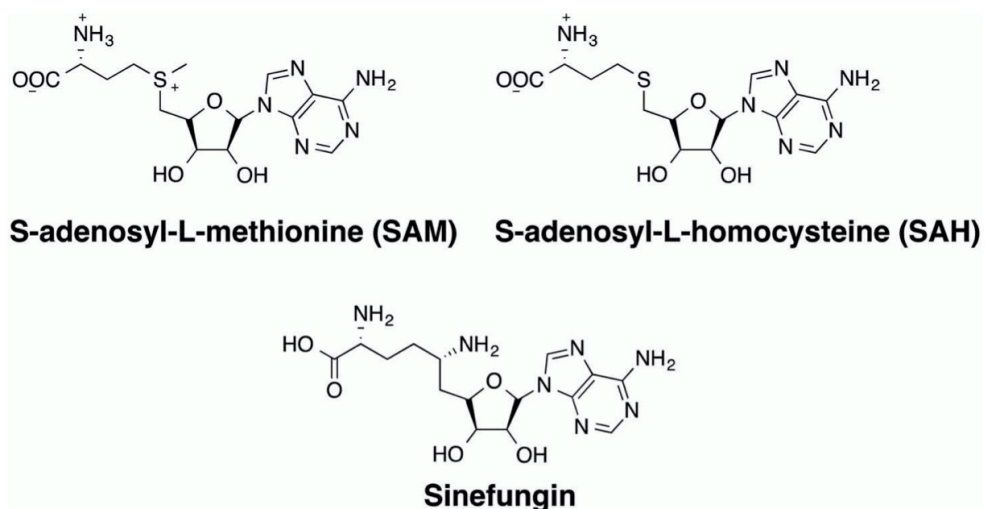
Šis ligandu novērošanas KMR eksperiments balstās uz relaksācijas ātrumu atšķirību mazām un lielām molekulām.³¹ Mazām molekulām relaksācija notiek lēnāk, bet lielām molekulām – ātrāk. Šajā eksperimentā tiek iegūts no transversās (*transverse*) relaksācijas atkarīgs signāls. Ligandam saistoties pie proteīna, tas iegūst makromolekulai līdzīgu relaksācijas ātrumu. Izmantojot 400 ms *spin-lock*, tiek panākta proteīnu un ar tiem saistošos ligandu signālu izfiltrēšana – salīdzinot liganda $T_{1\rho}$ spektru bez proteīna un proteīna klātbūtnē, saistības gadījumā novēro liganda signālu intensitātes samazināšanos.

1.4. Saistības konkurences pētīšana

Šajā pētījumā tika izmantoti waterLOGSY un $T_{1\rho}$ eksperimenti fragmentiem bez un nsp14/nsp10 kompleksa klātbūtnē. Papildu tam tika veikta arī fragmentu saistības konkurences pētīšana ar dabīgā metiltransferāzes liganda – metilgrupas donora S-adenozil-L-metionīna (SAM) analogu sinefungīnu (6. attēls). Sinefungīns (adenozil-ornitīns) ir antibiotika, kas pirmoreiz tika izdalīta no *Streptomyces griseolus*.³² Tas spēcīgi konkurē ar SAM un ir plaši pielietots kā SAM atkarīgu DNS metiltransferāžu inhibitors.³³

Pēc proteīna pievienošanas fragmentu maisījumam saistības gadījumā attiecīgo fragmentu signāli izmainīsies, salīdzinot ar atskaites spektriem – waterLOGSY gadījumā

signāli kļūs mazāk negatīvi un T₁ρ gadījumā signāli zaudēs intensitāti. Gadījumā, ja fragmenti saistās nsp14 SAM-saistīšanas kabatā, pēc sinefungīna pievienošanas notiktu fragmenta un sinefungīna konkurence par saistību pie proteīna. Rezultātā sinefungīna klātbūtnē fragments tiktu “izspiests” no saistības vietas un fragmenta signāli atgūtu sākotnējo intensitāti.



6. attēls. SAM, SAH un sinefungīna struktūras.³⁴

Figure 6. Structures of SAM, SAH and sinefungin.³⁴

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Materiāli

2.1.1. Reāģenti un vielas

- Agars (Fisher Scientific, Meksika);
- Amonija hlorīds (Sigma Aldrich, Spānija);
- Ampicilīns (Thermo Fisher, Beļģija);
- BME Vitamins 100x solution (Sigma Aldrich, Anglija);
- Bromfenolzilais (Fisher Scientific, Indija);
- D2O (Euroisotop, Vācija);
- DMSO (Sigma Aldrich, Vācija);
- DTT (Sigma Aldrich, Kanāda);
- EDTA (Acros Organics, Beļģija);
- Etanols, 96% (Latvijas Balzāms, Latvija);
- EZ-Run proteīnu marķieris (Fisher Scientific);
- Glicerīns (Fisher Scientific, ASV);
- IPTG (Fisher Scientific, Itālija);
- Kalcija hlorīds (Acros Organics, Čehija);
- Kālija dihidrogēnfosfāts (Fisher Scientific, ASV);
- Kālija hlorīds (Fisher Scientific, ASV);
- Kanamicīns (Thermo Fisher, Beļģija);
- Magnija sulfāts (AppliChem, Vācija);
- MES monohidrāts (Fisher Scientific, ASV);
- Nātrija azīds (Acros Organics, Indija);
- Nātrija dodecilsulfāts (SDS) (Fisher Scientific, Japāna);
- Nātrija hidroksīds (Acros Organics, Polija);
- Nātrija hipohlorīts (Fisher Scientific, Anglija)
- Nātrija hlorīds (Fisher Scientific, ASV);
- Rauga ekstrakts (Acros Organics, Ķīna);
- Sālsskābe (Sigma Aldrich, Vācija);
- PageBlue Protein Staining Solution (Thermo Scientific, Lietuva);
- Tryptons (Fisher Scientific, ASV);
- Tris (Fisher Scientific, ASV);

2.1.2. Barotnes un šķīdumi

- 1 M IPTG šķīdums ūdenī;
- 100 mg/mL ampicilīna šķīdums ūdenī;
- 50 mg/mL kanamicīna šķīdums ūdenī;
- 5 M NaCl šķīdums ūdenī;
- 1 M DTT šķīdums ūdenī;
- 70%, 20% etanols;
- Agarizētā LB barotne: 10 g/L triptons, 5 g/L rauga ekstrakts, 10 g/L NaCl, 20 g/L agars
- 2TY šķidrā barotne: 16 g/L triptons, 10 g/L rauga ekstrakts, 5 g/L NaCl, 100 mg/L ampicilīns;

2.1.3. Bufēršķīdumi proteīna attīrīšanai

Lizēšanas buferšķīdums:

50 mM Tris, pH 8,3, 500 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 0,1 % Triton X-100 (v/v), 5% glicerīns (v/v).

Līdzsvarošanas buferšķīdums niķeļa afinitātes hromatogrāfijai (turpmāk "bufēršķīdums A"):

20 mM Tris, pH 8,3, 500 mM NaCl, 40 mM imidazols, 2 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 5% glicerīns (v/v).

Eluēšanas buferšķīdums niķeļa afinitātes hromatogrāfijai (turpmāk "bufēršķīdums B"):

20 mM Tris, pH 8,3, 500 mM NaCl, 500 mM imidazols, 2 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 5% glicerīns (v/v).

Buferšķīdums gēlfiltrācijas hromatogrāfijai:

20 mM Tris, pH 8,3, 500 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 5% glicerīns (v/v).

KMR skrīninga paraugu buferšķīdums:

20 mM kālija fosfāts, pH 8,0, 500 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,5 mM MgCl₂, (10% D₂O).

SDS gēla elektroforēzes buferšķīdums (*Running Buffer*) (20x):

1 M MES, 1 M Tris, 2% SDS, 20 mM EDTA, pH 7,3.

Laemmlī paraugu uznešanas buferšķīdums (2x):

120 mM Tris, 20% glicerīns, 4% SDS, 200 mM DTT, 0,02% bromfenolzilais, pH 6,8

2.1.4. Komplekti

- GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Lietuva)

2.2. Aparatūra

- -20°C saldētavas KW Apparocchi Scientificic;
- -80°C saldētava Witeg WUF-400;
- 600 MHz kodolmagnētiskās rezonanses spektrometrs Bruker Avance Neo ar QCI-F kriozondi;
- Analītiskie sviri KERN ABT 120-5DM;
- Autoklāvs Systex DX-65;
- Barošanas bloks vertikālās elektroforēzes sistēmai Cleaver Scientific Ltd CS-300V Omni-PAC;
- Bioloģiskās drošības skapis (lamināra skapis) ESCO Streamline SC2-4AI1;
- Centrifūgas: Beckman Coulter Avanti J-E (ar nomaināmiem rotoriem: JLA-10.500 un
- Frakcionētājs GE Healthcare Frac-920;
- Gēlfiltrācijas kolonna GE Healthcare HiLoad 16/600 Superdex 200 pg;
- Gēlfiltrācijas kolonna Superdex 75 16/600;
- Inkubators-kratītājs Biosan ES-20;
- Inkubators-kratītājs Infors HT Multitron Standard;
- Laboratorijas sviri KERN PLJ 750-3N;
- Magnētiskie maisītāji Biosan MS-3000;
- Mikrotilpumu spektrofotometrs NanoDrop 2000c;
- Mikroviļņu krāsns SAMSUNG MG23F301TAK;
- Multifunkcionālais orbitālais kratītājs Biosan PSU-20i;
- Katjonapmaiņas hromatogrāfijas kolonnas GE Healthcare HTSPHP (5 mL);
- pH-metrs Oakton pH-1100;
- Preperatīvās proteīnu šķidrumu hromatogrāfijas sistēma ÄKTA Purifier 10;
- Termobloks Biosan TS-100C;
- Ūdens vanna Biosan Grant WB-2S;
- Ultraskaņas homogenizators Hielscher UP200Ht;
- Ultraskaņas vanna Bandeln Sonorex Super;
- Vertikālā elektroforēzes sistēma XCell SureLock Mini-Cell;
- Vorteksa iekārta Biosan V-1 plus.

2.3. Laboratorijas inventārs un materiāli

- 1,5 mL, 2 mL mikromēģenes (Sarstedt);
- 10 mm plastmasas kivetes (Sarstedt);
- 50 mL centrifūgas stobriņi (Beckman Coulter);
- 500 mL centrifūgas pudeles (Beckman Coulter);
- Alumīnija folija (Thomas Scientific);
- Autoklavēšanas lenta (Thomas Scientific);
- Automātiskās pipetes: 0,1-3,0 µL, 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL (Biohit);
- Steritop 0,22 µm pudeļu filtri buferšķīdumu filtrēšanai (Merck Millipore);
- Centrifugācijas filtri Amicon-ultra ar membrānas caurlaidību 3 kDa: 0,5 mL, 15 mL (Merck Millipore);
- Cilpas koloniju izolēšanai (Sarstedt);
- Koniskās kolbas: 250 mL un 2 L (Schott);
- Lateksa cimdi (Klinion);
- Līdzinātāji Petri platēm (Sarstedt);
- Parafīna plēve (Parafilm);
- Petri plates (Sarstedt);
- Pipešu uzgaļi: 20 µL, 200 µL, 1000 µL (Sarstedt);
- Plastmasas cilindri: 100 mL, 500 mL, 1000 mL (VWR);
- Plastmasas vārglāzes: 1 L, 2 L, 3 L, 5 L (VWR);
- Seroloģiskā pipete PipetBoy (Integra);
- Seroloģiskās pipetes uzgaļi: 5 mL, 10 mL, 25 mL (Sarstedt);
- Spectra Por dialīzes membrānas ar caurlaidību 3,5 kDa (Spectrum Laboratories);
- Sterili polipropilēna stobriņi: 15 mL, 50 mL (Sarstedt);
- Stikla cilindri: 250 mL, 500 mL (Marienfield);
- Stikla pudeles: 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1 L, 2 L (Schott);
- Stikla vārglāzes: 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL (Rasotherm);
- Šļircēs: 500 µL, 3 mL, 5 mL, 20 mL, 50 mL (Omnifix);
- Šļirču filtri: 0,22 µm, 0,45 µm (Sarstedt)

2.4. Baktēriju celmi un plazmīdas

- BL21(DE3) *E. Coli* baktēriju celms
- XL-1 Blue *E. Coli* baktēriju celms
- NR-52425 (GenScript) nsp10
- pRSF-Duet1 (Novagen) pilna garuma nsp14
- pET28a (Novagen) nsp14 MTāzes domēns

2.5. Lietojumprogrammas

MestReNova v.12.0.0. ¹H 1D KMR spektru analizēšanai

ExPASy ProtParam proteīnu parametru aprēķināšanai

TopSpin v. 4.1.1. – KMR spektru uzņemšanai un analīzei

MarvinView – v. 22.9.0 fragmentu struktūru analīzei

MicroCal Origin 7 SR4 software (OriginLab) – ITK datu analīzei

2.6. Metodes

2.6.1. Transformācija *E. coli* šūnās

Uz ledus atkausē 50 µL *E. coli* kompetentās šūnas (glabātas -80°C) un plazmīdu (glabāta -20°C). Pēc 20 min šūnām pievieno 1 µL plazmīdas (DNS koncentrācija 50 ng/µL), inkubē uz ledus 30 min. Tad 1,5 mL mikromēģeni ar šūnām ievieto ūdens vannā 42 °C uz 45 s (siltumšoks), pēc tam 2 min inkubē uz ledus. Šūnām pievieno 1 mL SOC barotnes un uz 1 h atstāj inkubēties 37°C ar 400 apgr./min kratīšanu. Maisījumu centrifugē 3 min 4500 g un pēc tam nosūc 950 µL barotnes supernatanta. Atlikušajā tilpumā resuspendē šūnas un izklāj uz LB agara plates, kas satur atbilstošo antibiotiku 50 µg/mL koncentrācijā pozitīvo koloniju selekcijai. Plati atstāj inkubēties 37°C pa nakti (12-16 h).

2.6.2. Plazmīdu izdališana no *E. coli* šūnām pēc GeneJET™ Gel Extraction Kit protokola

Lamināra skapī ar sterilu cilpu paņem vienu transformēto koloniju un ievieto 250 mL kolbā, kura satur 20 mL LB barotnes ar atbilstošo antibiotiku. Kolbu ievieto inkubatorā un šūnas audzē 37 °C 16 h ar kratīšanu 200 apgr./min.

15 mL sterilā stobriņā ievieto 10 mL izaudzēto šūnu kultūras un centrifugē 2 min 6800 g istabas temperatūrā. Nolej supernatantu, nosēdušās šūnas resuspendē 250 µL

resuspendēšanas šķīduma (*Resuspension Solution*) un pārlej 2 mL mikromēģenē. Tad pievieno 250 µL lizēšanas šķīduma (*Lysis Solution*), apvēršot mikromēģeni 2 – 4 reizes. Pievieno 350 µL neitralizācijas šķīduma (*Neutralization Solution*), apvēršot mikromēģeni 2 – 4 reizes. Centrifugē 5 min 14000 apgr./min, uzmanīgi nosūc supernatantu un pārnes uz GeneJET™ kolonnu, centrifugē 1 min 14000 apgr./min. Nolej caurplūdi, pievieno 500 µL mazgāšanas šķīduma (*Wash Solution*) un centrifugē 1 min apgr./min, atkārti mazgāšanu vēl vienu reizi. Centrifugē tukšo kolonnu ar saistīto DNS 1 min apgr./min, lai atbrīvotos no palikušā mazgāšanas šķīduma. Kolonnu pārvieto uz jaunu 1,5 mL mikromēģeni, pievieno 25 eluēšanas buferšķīduma (*Elution Buffer*), kas iepriekš tika uzkarsēts līdz 65°C. Inkubē 2 min istabas temperatūrā, tad centrifugē 2 min 14000 apgr./min. Savāc mikromēģeni ar izdalīto plazmīdas šķīdumu. DNS koncentrāciju mēra ar spektrofotometru.

2.6.3. Proteīna gēna ekspresija *E. coli* šūnās

Lamināra skapī 250 mL kolbā ievieto 30 mL LB barotnes un pievieno antibiotiku: nsp14 producēšanai pievieno kanamicīnu līdz beigu koncentrācijai 50 µg/mL, nsp10 producēšanai – ampicilīnu līdz beigu koncentrācijai 100 µg/mL. Barotnē ar sterilu cilpu no transformētās plates inokulē vienu koloniju. Atstāj pa nakti augt inkubātorā 30 °C ar kratīšanu 200 apgr./min. No rīta ar spektrofotometru nomēra šūnu kultūras optisko blīvumu OD₆₀₀. Vēlamā nakts kultūras OD₆₀₀ vērtība ir 1,5 – 3,0. Pie 6000 g nocentrifugē tādu kultūras tilpumu, lai, resuspendējot 2 L LB barotnes, sākotnējais OD₆₀₀ būtu 0,05. Veic nocentrifugēto šūnu resuspensiju sagatavotajā barotnē, resuspensiju sadala pa 500 mL četrās 2 L kolbās un atstāj augt inkubatorā 37 °C 180 apgr./min. Pēc 1 h pārbauda šūnu kultūras OD₆₀₀ vērtību – kad tā sasniedz 0,3, kolbas pārliet inkubatorā, kas atdzesēts līdz 20 °C. Pēc 40 min nomēra OD₆₀₀ vērtību – kad tā sasniegusi 0,8, veic proteīna producēšanas indukciju, šūnu kultūrām pievienojot IPTG līdz 0,1 mM beigu koncentrācijai. Šūnas atstāj inkubētās pa nakti (12 – 14 h) 20 °C ar kratīšanu 200 apgr./min. Nākamajā dienā šūnu kultūru nocentrifugē 15 min 7000 g 4 °C. Šūnas pārliet 50 mL plastmasas stobriņā, nosver un ievieto uzglabāšanā saldētavā -20 °C.

2.6.4. *E. coli* šūnu sagraušana ar ultraskaņu

Uz ledu atsaldē 50 mL stobriņu ar sasaldētajām šūnām. Veic šūnu resuspendēšanu līzes buferšķīdumā (10 mL uz 1 g šūnu), pārnes uz atbilstoša tilpuma vārglāzi, kas ievietota ledu vanniņā. To sonicē 10 min ar ultraskaņas impulsiem režīmā 1 s impulss, 1 s pauze, 100 W, amplitūda atkarībā no tilpuma (50 – 100 mL 70%, >100 mL 90%). Lizātu centrifugē

27000 ×g 45 min 4 °C. Savāc supernatantu, kas satur šķīstošo producēto proteīnu un filtrē caur 0,22 µm filtru. Ja nepieciešams, šūnu paliekas var resuspendēt 8M urīnvielas šķīdumā līdz sākotnējam lizāta tilpumam, lai ar SDS gēla elektroforēzi kvantitatīvi analizētu šķīstošā un nešķīstošā proteīna relatīvo daudzumu.

2.6.5. Proteīna attīrīšana ar niķeļa afinitātes hromatogrāfiju

Hromatogrāfijā izmanto HisTrap kolonnu – tā satur niķeļa sefarozi. Veic HisTrap kolonnas (tilpums 5 mL) mazgāšanu – vispirms 5 kolonnas tilpumi jeb 25 mL ūdens, tad 25 mL buferšķīduma B, lai ar augstu imidazola koncentrāciju (500 mM) aizvietotu un no kolonnas niķeļa matricas liktu atsaistīties jebkādiem savienojumiem. Kolonnu stabilizē ar 5 kolonnas tilpumiem buferšķīduma A. Uz kolonnas uznes filtrēto lizātu, vārglāzē savācot caurplūdes frakciju. Uz kolonnas saistīto proteīnu mazgā ar 10% koncentrāciju buferšķīduma B (50 mM imidazols), savācot atsaistītos proteīnus 15 mL stobriņā, un visbeidzot proteīnu eluē ar 100% koncentrāciju buferšķīduma B, fracionējot pa 2 mL mikromēģenēs. Savāktās frakcijas analizē ar SDS gēla elektroforēzi. Salej kopā proteīnu saturošās frakcijas.

2.6.6. Proteīna attīrīšana ar gēlfiltrācijas hromatogrāfiju

Mazgā gēlfiltrācijas kolonnu – nsp14 attīrīšanai izmanto Superdex 200pg 16/600 kolonnu, nsp10 attīrīšanai izmanto Superdex 75pg 16/600 kolonnu – vispirms ar 1,25 kolonnas tilpumiem (150 mL) ūdens, tad ar 1,25 kolonnas tilpumiem gēlfiltrācijas buferšķīduma. Proteīnu iekoncentrē līdz aptuveni 3 mL tilpumam, inžektē uz kolonnas un veic hromatogrāfiju ar plūsmas ātrumu 1 mL/min. Proteīnu savāc 2 mL frakcijās, analizē ar SDS gēla elektroforēzi. Tīru proteīnu saturošās frakcijas salej kopā.

2.6.7. Proteīna buferšķīduma apmaiņas hromatogrāfija

Mazgā HiTrap (*Desalting*) kolonnu ar 5 kolonnas tilpumiem (25 mL) ūdens, tad stabilizē ar 5 kolonnas tilpumiem KMR skrīninga buferšķīduma. Proteīnu iekoncentrē vismaz līdz 1,5 mL tilpumam un inžektē uz kolonnas, uzreiz sākot fracionēt pa 0,5 mL. Proteīna koncentrāciju dažādās frakcijās nomēra ar spektrofotometru. Tam nepieciešams zināt proteīna molmasu un ekstinkcijas koeficientu. Darbā izmantoto proteīnu teorētiskie parametri ir šādi:

- Nsp10 139 aa, 16.24 kDa, 12,950 M⁻¹ cm⁻¹;
- Pilna garuma nsp14 aa 1 – 527 60.01 kDa, 91,660 M⁻¹ cm⁻¹;
- Nsp14 Mtāzes domēnam aa 288-527 27.82 kDa, 48,970 M⁻¹ cm⁻¹.

2.6.8. SDS-PAGE proteīnu analīze/Elektroforēze poliakrilamīda gēlā

Analizējamās paraugus sajauc ar 2x Laemmli buferšķīdumu tilpumu attiecībā 1:1, vorteksē un centrifugē 10 s 6000 ×g. Paraugus denaturē, karsējot 98°C 10 min ar kratīšanu 400 apgr./min. Pēc karsēšanas paraugus centrifugē 10 s min 6000 ×g un katrā SDS elektroforēzes gēla kasetes celiņā iepilda pa 5 μL parauga, vienu celiņu atstājot arī proteīnu marķierim (arī 5 μL). Elektroforēzes vannu pieslēdz pie barošanas bloka, 35 min laiž ar 125 mA strāvu pie 200 V sprieguma. Pēc tam gēlu izņem no kasetes, mazgā ar ūdeni (3 reizes ar 100 mL), karsējot to mikroviļņu krāsnī (45 s, 800 W). Pēc tam gēlu 1 min atstāj kratīties uz orbitālā kratītāja. Tad gēlam pievieno 20 mL krāsvielas, karsē mikroviļņu krāsnī (30 s, 800 W) un atstāj iekrāsoties 10 min uz orbitālā kratītāja. Visbeidzot krāsvielu nolej un gēlu skalo ar ūdeni, lai nomazgātu lieko krāsu un atgūtu gēla caurspīdīgo fonu, uz kura būs redzami zilās proteīna joslas.

2.6.9. Izotermālās titrēšanas kalorimetrija (ITK)

Titrēšanas eksperimentus veica 25 °C ar 15 μM nsp14/nsp10 kompleksu KMR skrīninga buferšķīdumā (bez D₂O). Tika veiktas 20 sinefungīna (200 μM izejas šķīdums) injekcijas. Katra titrēšana sākās ar mazu 0,3 μL injekciju, lai kompensētu difūzijas efektus, un turpinājās ar 2 μLx20 injekcijām ar 120 s pauzēm starp katru injekciju. Titrēšanas datus pielāgoja teorētiskai titrēšanas līknei, izmantojot MicroCal Origin 7 SR4 lietojumprogrammu.

2.6.10. KMR fragmentu skrīninga paraugu sagatavošana un spektru uzņemšanas parametri

Skrīningu veica ar *Diamond-SGC-iNEXT (DSI) Poised Library*.

Fragmentu skrīninga parauga beigu tilpums ir 180 μL, to iepilda 3 mm KMR ampulā. Atskaites spektra uzņemšanai sagatavo paraugu ar 8 fragmentiem, kas katrs izšķīdināts KMR skrīninga buferšķīdumā līdz 250 μM beigu koncentrācijai. Tālāk atskaites paraugam pievieno nsp14 un nsp10 kompleksu līdz 12,5 μM beigu koncentrācijai. Lai pārbaudītu saistības konkurenci ar zināmo nsp14 inhibitoru sinefungīnu, paraugam to pievieno līdz 250 μM beigu koncentrācijai. Molārā attiecība starp proteīnu un ligandiem ir 1:20.

Katram paraugam uzņem 1D protonu, WaterLOGSY un T_{1ρ} spektrus trīs variantiem: atskaites paraugam tikai ar fragmentiem, paraugam ar fragmentiem un pievienotu nsp14/nsp10 kompleksu un paraugam ar pievienotu zināmo inhibitoru sinefungīnu.

KMR eksperimentus veic 298 K temperatūrā uz 600 MHz Bruker Advance Neo spektrometra, aprīkotam ar QCI-F kriozondi.

WaterLOGSY spektrus uzņem ar 128 uzkrājumiem) un samaisīšanas laiku) 1,7 s. Ūdens nospiešanu panāk ar *excitation sculpting with gradients* un proteīnu signālus filtrē ar 30 ms *trim* pulsu.

CPMG (*Carr-Purcell-Meiboom-Gill*) $T_{1\rho}$ spektrus uzņem ar 128 uzkrājumiem, ūdens signāla pirms-piesātināšanu starpskenēšanas aizkaves laikā un *spin-lock* laiku 400 ms.

2.6.11. KMR datu analīzes metodes

KMR spektru analīzi veic, izmantojot TopSpin un MestReNova lietojumprogrammas. Kritēriji fragmenta saistības noteikšanai WaterLOGSY un $T_{1\rho}$ eksperimentos ir >20% signāla intensitātes izmaiņas. Kritēriji saistības konkurences identificēšanai abos eksperimentos ir signāla intensitātes atgūšana.

Lai noteiktu konkrēto fragmentu no 8 savienojumu maisījuma, kura signāli mainījušies un uzrāda fragmenta saistību, lietojumprogrammā MestReNova veic individuālo fragmentu un fragmentu maisījuma 1D protonu spektru salīdzinājumu, tos pārklājot.

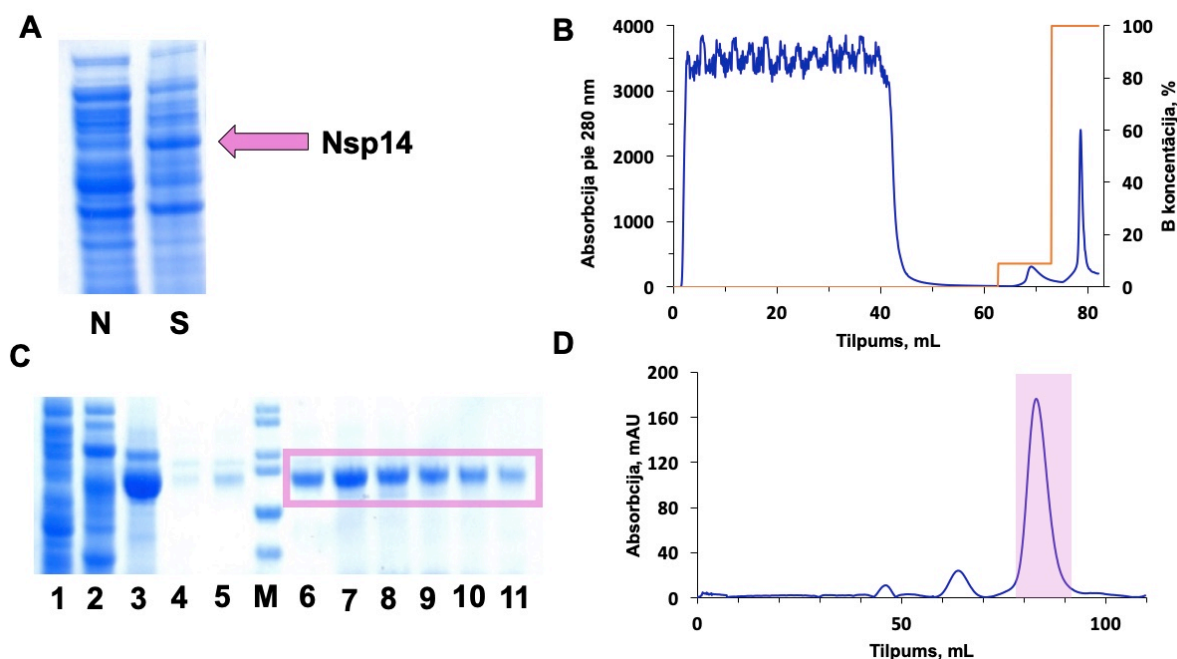
2.6.12. Darba drošība

Pēc darba ar ģenētiski modificētām šūnu kultūrām izmantotajām barotnēm pievieno VirkonTM S līdz beigu koncentrācijai 1% un laboratorijas inventāru dezinficē ar 1% VirkonTM S šķīdumu.

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

3.1. Nsp14 un nsp10 ekspresija un attīrīšana.

3.1.1. Nsp14 ekspresija un attīrīšana.



7. attēls. Nsp14 attīrīšana. A – SDS-PAGE gēls pēc šūnu lizēšanas, kur N – nogulšņu frakcija, S – supernatanta frakcija. B – niķeļa afinitātes hromatogramma. Tumši zilā krāsā absorbēcija pie 280 nm. Oranžā krāsā – buferšķīduma B koncentrācija. C – SDS-PAGE gēls pēc niķeļa afinitātes hromatogrāfijas (ceļiņi 1 – 3) un gēlfiltrācijas (ceļiņi 4 – 11), kur 1 – caurplūde, 2 – mazgāšana, 3 – eluāts, 4, 5 – agregāti, M – marķieris, 6 -11 – frakcijas ar tīru nsp14. D – gēlfiltrācijas hromatogramma.

Figure 7. Nsp14 purification. Absorption at 280 nm is shown in dark blue. Buffer B concentration shown in orange. A – SDS-PAGE gel after cell lysis, where N shows the cell pellet fraction, S – supernatant fraction. B– nickel affinity chromatogram. Absorption at 280 nm is shown in dark blue. Buffer B concentration shown in pink. C – SDS-PAGE gel after nickel affinity chromatography (wells 1 – 3) and gel filtration (wells 4 – 11), where 1 – flowthrough, 2 – washing, 3 – eluate, 4, 5 – aggregates, M – marker, 6 – 11 – fractions containing pure nsp14. D – gel filtration chromatogram.

Pēc šūnu sagraušanas ar ultraskaņu, lielākā daļa producētā nsp14 proteīna atradās supernatantā jeb iegūtais proteīns bija šķīstošs (7. attēls A, ceļinš S), nogulsnēs novēroja minimālu nsp14 daudzumu (7. attēls A, ceļinš N). Nsp14 attīrīšanai vispirms veica niķeļa

afinitātes hromatogrāfiju (7. attēls B). Pēc proteīna uznešanas uz kolonnas piesaistījās viss nsp14, par ko var spriest pēc caurplūdes frakcijas, kas nesatur nsp14 (7. attēls C, celiņš 1). veica mazgāšanu ar 10% B buferšķīduma, kas ļāva atsaistīties vairākiem nespecifiski saistītiem piemaisījumiem, kurus var redzēt SDS-PAGE gēlā (7. attēlā C celiņā 2). Eluējot nsp14 ar 100% B buferšķīduma, panāca tā atsaistīšanos, taču līdz ar to atsaistījās arī lielāks nespecifiski saistījies piemaisījums, kas redzams celiņā 3. Eluējot ar zemāku B koncentrāciju, notika daļēja nsp14 atsaistīšanās lielā tilpumā (> 4 mL), ko pēc tam nāktos iekonzentrēt pirms gēlfiltrācijas. Tas varētu izraisīt proteīna nogulšņu veidošanos, tādēļ eluēšanu veica ar 100% B, iegūstot eluātu aptuveni 3 mL tilpumā. Tālākai attīrīšanai veica gēlfiltrācijas hromatogrāfiju (7. attēls D), kurā izdevās atdalīt nsp14 no piemaisījumiem un iegūt pietiekami tīru proteīnu tālākiem aktivitātes testiem un eksperimentiem. Iegūtais nsp14 daudzums bija 6 mg no 1 L 2TY barotnes.

3.1.2. Nsp10 ekspresija un attīrīšana.

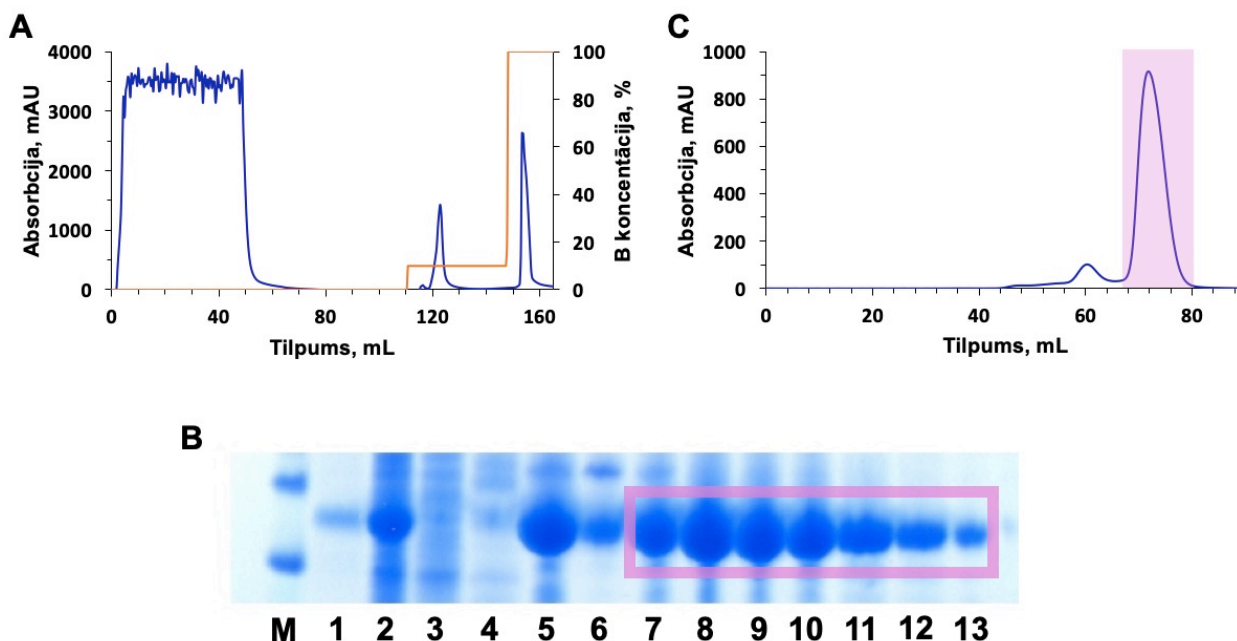
Līdzīgi kā nsp14 gadījumā šūnu lizātam veica niķeļa afinitātes hromatogrāfiju (8. attēls A). Pie kolonnas matricas piesaistījās viss uz kolonnas uznestais nsp10 proteīns – caurplūdes frakcijā nebija novērojama proteīna josla pie 16 kDa (8. attēls B 3. celiņš). Mazgājot piesaistīto proteīnu ar 10% B, tika atsaistīti daudzi nespecifiski saistītie proteīni. Eluējot ar 100% B buferšķīduma, no kolonnas atsaistījās nsp10 un vēl daži piemaisījumi. (8. attēls B). Līdzīgi kā nsp14, arī nsp10 sāka atsaistīties no kolonnas, mazgājot ar 20-40 % B koncentrāciju, tādēļ izmantoja 100% B eluācijai, lai iegūtu mazāku eluāta tilpumu.

Tad veica gēlfiltrācijas hromatogrāfiju (8. attēls C), kurā izdevās atdalīt nsp10 no lielākiem piemaisījumiem, kas eluējās pīķī ar virsotni pie 60 mL, turpretī pats nsp10 eluējās ar virsotni pie 72 mL. Nsp10 iznākums bija 35 mg/L 2TY barotnes.

Pēc gēlfiltrācijas hromatogrāfijām gan nsp14, gan nsp10 veica buferšķīdumu apmaiņas hromatogrāfijas uz KMR skrīninga buferšķīdumu, lai atbrīvotos no buferšķīdumu komponentēm, galvenokārt glicerīna, kuru signāli būtu redzami ¹H spektrā un tādējādi pazeminātu spektru kvalitāti un apgrūtinātu datu analīzi.

Kopumā var secināt, ka nsp14 iznākumi (6 mg/L 2TY barotnes) bija gandrīz sešas reizes mazāki nekā nsp10 iznākumi (35 mg/L 2TY barotnes), kas bija sagaidāms, jo nsp14 ir lielāks proteīns (60 kDa) nekā nsp10 (16 kDa) un tas ietekmē ekspresijas efektivitāti. Nsp10 nenovēroja stabilitātes problēmas ne attīrīšanas procesā, ne ilgstoši uzglabājot 4 °C. Turpretī nsp14 bija daudz nestabilāks – augstās koncentrācijās (> 3 mg/mL) un temperatūrā virs 4 °C tam bija izteikta tendence veidot nogulsnes. Tā stabilitātei bija nepieciešama augsta sāls

koncentrācija (virs 400 mM), kā arī reducējoša aģenta klātbūtne. Stabilitāti uzlaboja kompleksa veidošana ar nsp10 – novēroja mazāk intensīvu nogulšņu veidošanos, taču pat kompleksu ilgstoši nevarēja uzglabāt 4 °C. Proteīna nestabilitāte palēlināja KMR skrīninga procesu – limitējošais faktors bija svaiga, aktīva proteīna pieejamība.



8. attēls. Nsp10 attīrīšana. A – niķeļa afinitātes hromatogrāfijas hromatogramma. Tumši zilā krāsā absorbcija pie 280 nm. Oranžā krāsā – bufera B koncentrācija. B – SDS-PAGE gēls pēc niķeļa afinitātes hromatogrāfijas (celiņi 2 – 5) un gēlfiltrācijas hromatogrāfijas (celiņi 6 – 13), kur 2 – lizāta supernatants, 3 – caurplūde, 4 – mazgāšana, 5 – eluāts, 6 – agregāti, 7 – 13 – tīrs nsp10. C – gēlfiltrācijas hromatogrāfijas hromatogramma.

Figure 8. Nsp10 purification. A – nickel affinity chromatogram. Absorption at 280 nm is shown in dark blue. Buffer B concentration is shown in orange. B – SDS-PAGE gel after nickel affinity chromatography (wells 2 – 5) and gelfiltration chromatography (wells 6 – 13), where 2 – lysate supernatant, 3 – flowthrough, 4 – washing, 5 – eluate, 6 – aggregates, 7 – 13 – pure nsp10. C – gelfiltration chromatogram.

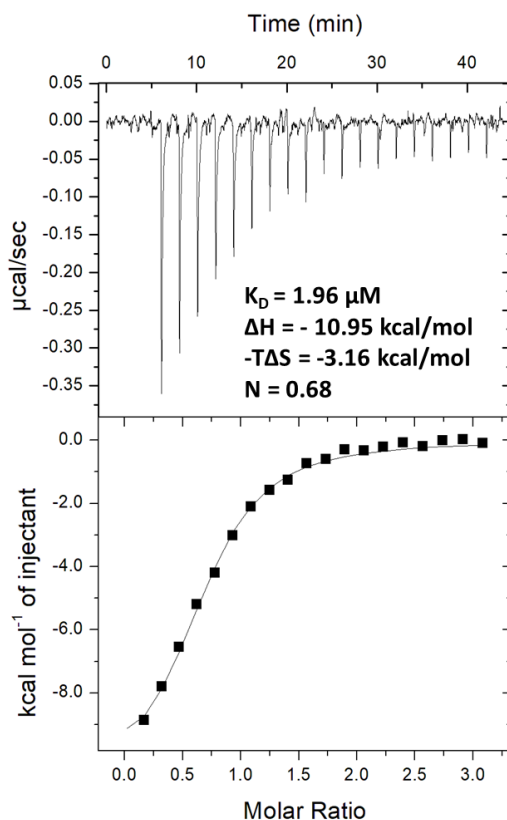
3.1.3. Nsp14/10 kompleksa aktivitātes novērtēšana.

Lai izveidotu nsp14/nsp10 kompleksu, pēc buferšķīduma apmaiņas savienoja nsp10 un nsp14 proteīnus 1:1 molārā attiecībā. Kompleksa aktivitāti noteica, veicot HTRF (*homogeneous time-resolved fluorescent energy transfer*) enzimatiskās aktivitātes testu

(sadarbībā ar LOSI Farmakoloģijas laboratoriju), kurā tiek kvantificēts reakcijas laikā atbrīvotais SAH. Enzimātiskajos testos komplekss uzrādīja 70% aktivitāti.

Attīrītā nsp14 aktivitātes novērtēšanai papildus veica izotermālās titrēšanas kalorimetrijas (ITK) eksperimentu ar SAM analogu sinefungīnu, kuru tālāk KMR skrīninga eksperimentos izmantoja kā zināmo inhibitoru konkurējošās saistības pētīšanai metiltransferāzes SAM saistīšanas kabatā. Eksperiments pie reizes kalpo arī kā pozitīvā kontrole.

9. attēlā redzams ITK titrēšanas piemērs. Šajā gadījumā proteīna aktivitāte ir 68%, ko nosaka pēc stehiometrijas, pieņemot, ka proteīns ar ligandu saistās attiecībā 1:1. Sinefungīna saistības stiprums ir $K_D = 1,96 \mu\text{M}$. Ņemot vērā, ka fragmentu saistības stiprumi ir mazi (augsti μM līdz mM reģionā) to mazo izmēru dēļ, sinefungīna saistības stiprums ir pietiekami augsts, lai spētu “izspiest” konkurējošos fragmentus no tā saistības vietas nsp14 SAM saistības kabatā. Var secināt, ka nsp14 ir pietiekami aktīvs un spējīgs saistīt inhibitoru.

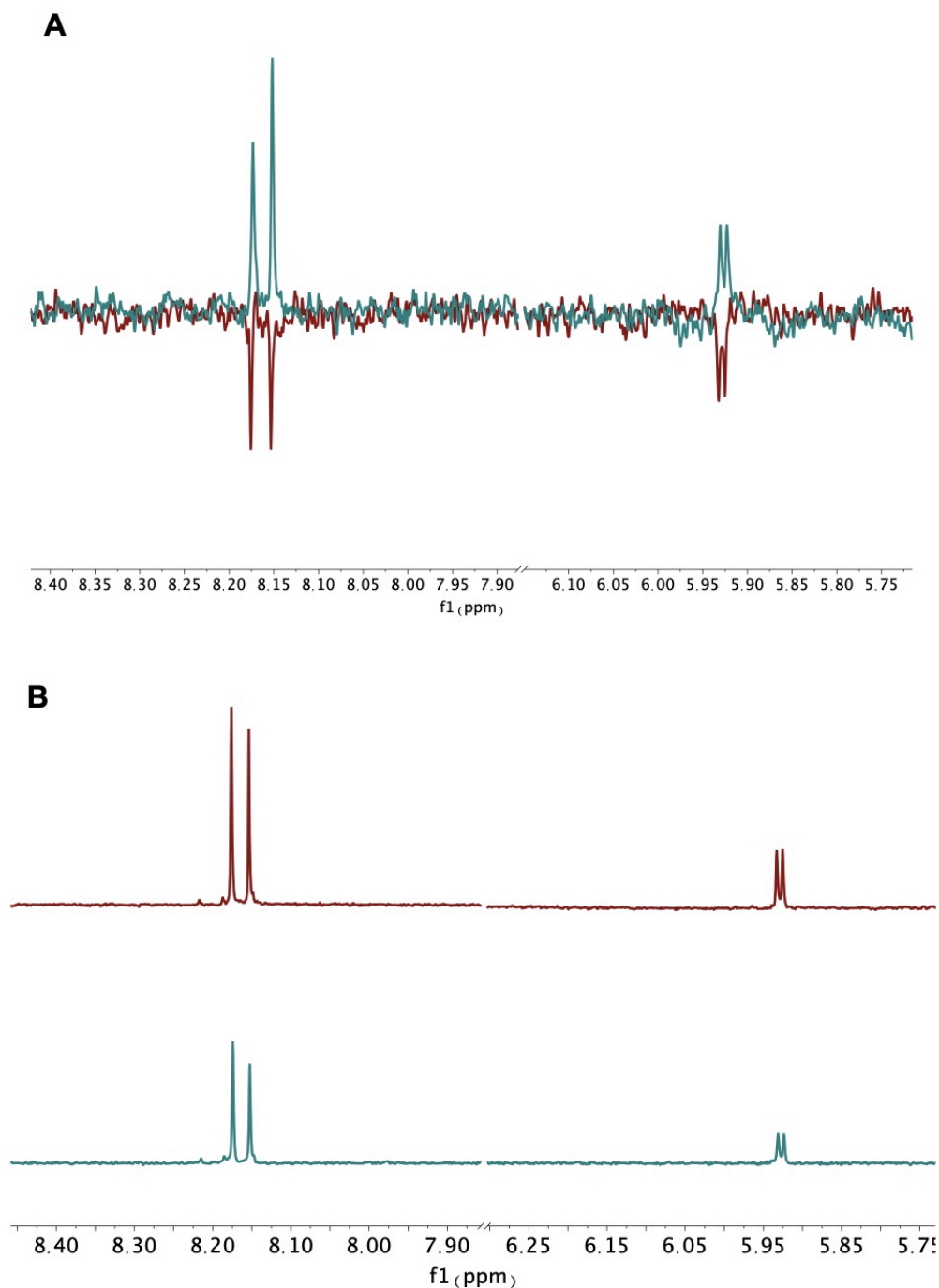


9. attēls. ITK nsp14 un sinefungīna titrēšanas līkne.

Figure 9. ITC titration curve of nsp14 and sinefungin.

Kompleksam nsp14/nsp10 veica KMR kontroles eksperimentus - waterLOGSY un $T_{1\rho}$ - ar sinefungīnu. 10. attēlā redzams, ka abos eksperimentos novērojami pozitīvi rezultāti – signāla fāzes maiņa waterLOGSY eksperimentā un signāla intensitātes samazināšanās

par >20 % $T_{1\rho}$ eksperimentā, kas apstiprina proteīna aktivitāti un eksperimentu jutības piemērotību tālākiem skrīninga eksperimentiem.



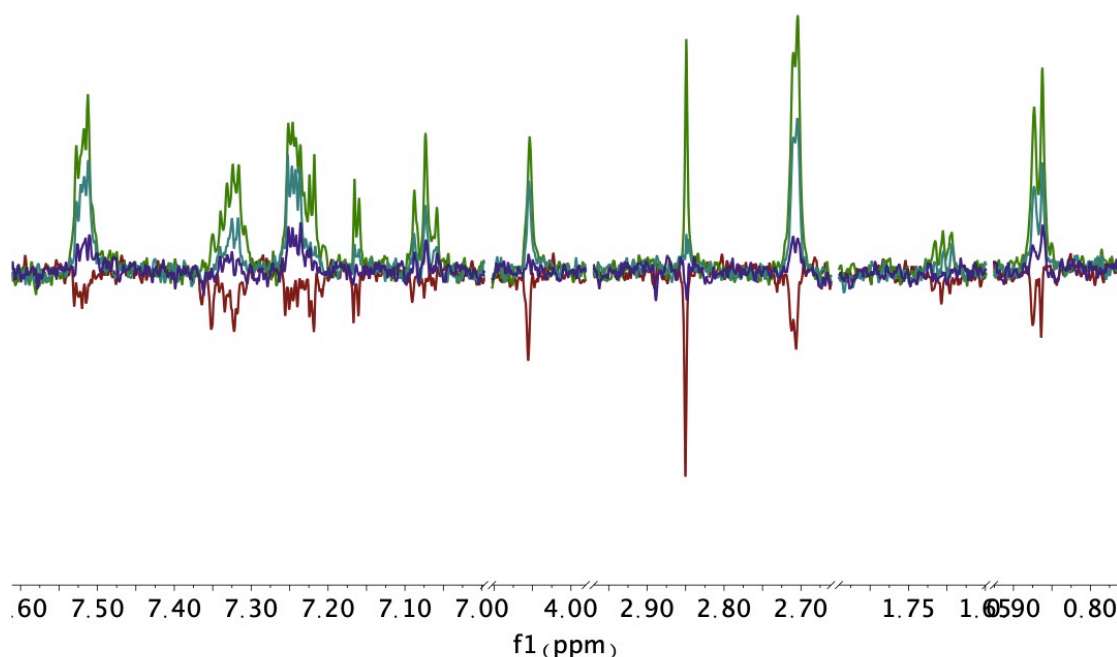
10. attēls. Nsp14/nsp10 saistības ar sinefungīnu detektēšana ar KMR eksperimentiem. Sarkanā krāsā sinefungīna atskaites spektri, zilā krāsā spektri sinefungīnam un nsp14/nsp10 A – waterLOGSY eksperiments. B – $T_{1\rho}$ eksperiments.

Figure 10. Detection of nsp14/nsp10 binding with sinefungin using NMR experiments. Shown in red – sinefungin reference spectra, shown in blue – spectra for sinefungin with nsp14/nsp10. A – waterLOGSY experiment. B – $T_{1\rho}$ experiment.

3.2. KMR skrīnings fragmentu bibliotēkai.

3.2.1. Saistību uzrādošu savienojumu identificēšana.

Tika veikts KMR skrīnings 695 fragmentu bibliotēkai. Pētījuma laikā kopā tika pagatavoti 174 paraugi (katrā paraugā pa 8 fragmentiem). Katram paraugam uzņēma ^1H spektrus, kā arī veica waterLOGSY un $T_{1\rho}$ eksperimentus: vispirms bez proteīna, tad ar pievienotu nsp14/nsp10 kompleksu, tad ar pievienotu sinefungīnu. Kopā tika uzņemti 783 spektri. Skrīninga eksperimentu veikšana ilga aptuveni mēnesi.



11. attēls. Četru waterLOGSY spektru pārklājums. Sarkanā krāsā – atskaites spektrs, zaļā krāsā spektrs uzreiz pēc nsp14/nsp10 pievienošanas, zilā krāsā – spektrs pēc sinefungīna pievienošanas, violetā krāsā – spektrs tam pašam paraugam 24 h pēc sinefungīna pievienošanas.

Figure 11. Superimposition of four waterLOGSY spectra. Shown in red – reference spectrum, in green – spectrum after the addition of nsp14/nsp10, in blue – spectrum after the addition of sinefungin, in purple – spectrum for the same sample 24 hours after the addition of sinefungin.

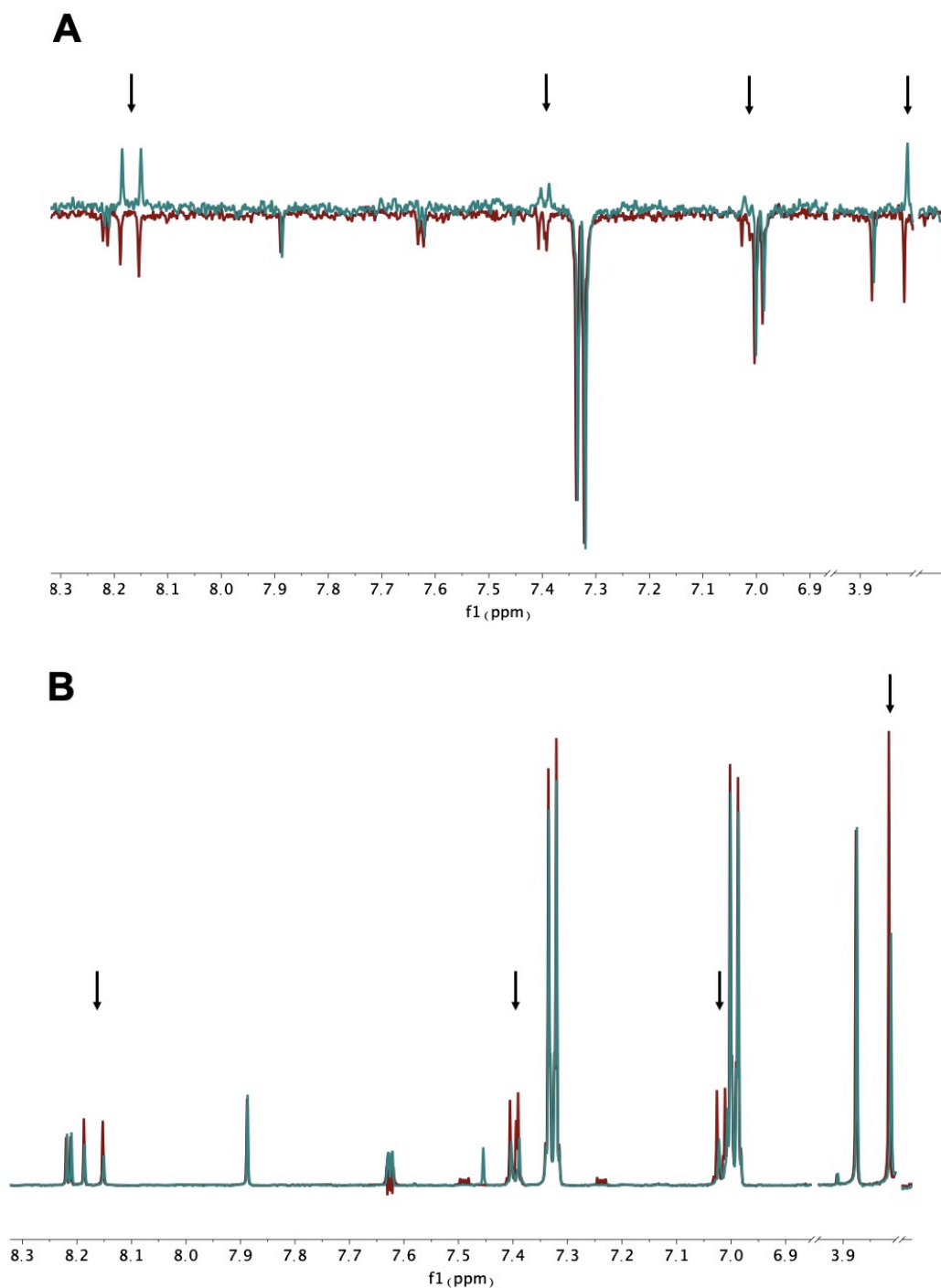
Kopumā vienā attīrīšanas reizē (no 1 L 2TY barotnes gan nsp14, gan nsp10) iegūtais nsp14/nsp10 kompleksa daudzums teorētiski pietika, lai izveidotu 40 KMR skrīninga paraugus, taču jau iepriekš minēto nsp14 stabilitātes problēmu dēļ paraugu skaits bija mazāks – aptuveni 30. Nsp14 nestabilitāte augstās koncentrācijās arī bija iemesls, kāpēc nācās mainīt paraugu gatavošanas procesu – tika gatavoti atsevišķi paraugi atskaites spektru uzņemšanai un

atsevišķi paraugi proteīnu saturošu paraugu spektru uzņemšanai, jo, lai pievienotu nsp14/nsp10 kompleksu jau gatavam atskaites paraugam, proteīna kompleksam jābūt iekonzentrētam līdz augstai koncentrācijai (>10 mg/mL). Citādi nākas pievienot pārāk lielu tilpumu, kas ievērojami pazemina paraugā esošo fragmentu koncentrācijas, padarot eksperimentu rezultātu analīzi neiespējamu, kā arī traucējot ūdens signāla nospiešanu. Kad sākumā tika mēģināts iekonzentrēt nsp14/nsp10 kompleksu >10 mg/mL koncentrācijā un pievienot to atskaites paraugam, waterLOGSY un T₁ρ eksperimentos novēroja, ka lielākā daļa fragmentu signālu uzrāda saistību, bet pēc sinefungīna pievienošanas lielākā daļa signālu intensitāšu samazinājās, kas liecināja nevis par specifisku saistību, bet gan par proteīna degradāciju, ko varēja arī novērot KMR parauga ampulā. Lai pārlicinātos, ka pie vainas proteīna degradācija, paraugam uzņēma tos pašus spektrus 24 h pēc sinefungīna pievienošanas un, patiešām, novēroja signālu intensitātes mazināšanos ar laiku (11. attēls.).

Veicot datu analīzi, kā saistību pieņēma signāla intensitātes izmaiņu par >20% gan waterLOGSY, gan T₁ρ eksperimentā. Ja paraugā novēroja saistības pazīmi kādā no eksperimentiem, veica konkrētā savienojuma identitātes noteikšanu. Piemērs saistības novērošanai fragmentu maisījumā gan waterLOGSY, gan T₁ρ eksperimentos attēlots 12. attēlā.

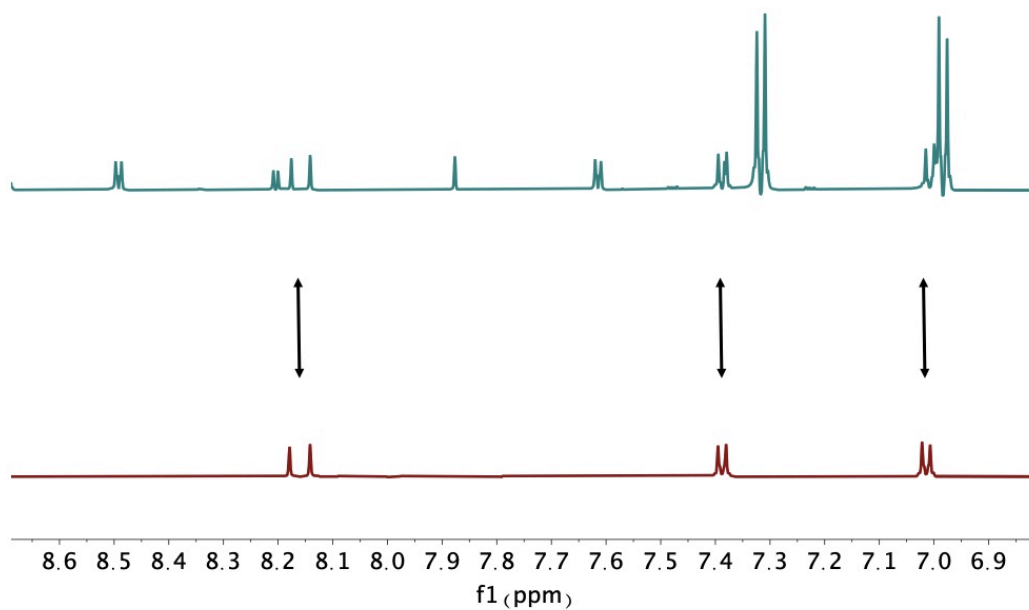
Lai identificētu savienojumu, veica fragmentu maisījuma un to veidojošo individuālo fragmentu atskaites ¹H spektru savietojumu. 12. attēlā redzams piemērs fragmenta, kurš abos eksperimentos uzrādīja saistību, identificēšanai. Konkrētajā gadījumā visi saistību uzrādošie signāli atbilda vienam fragmentam ar kodu Z276545932. Savienojumu identifikāciju apgrūtināja pH atšķirības fragmentu maisījumu un individuālo savienojumu atskaites spektriem.

Kopumā saistību ar nsp14/nsp10 kompleksu vismaz vienā no eksperimentiem uzrādīja 46 savienojumi (1. tabula). No tiem pozitīvi rezultāti abos eksperimentos bija 26 savienojumiem, tikai waterLOGSY eksperimentā – 17 savienojumiem, bet tikai T₁ρ eksperimentā – 3 savienojumiem.



12. attēls. Nespecifiskas saistības identificēšana fragmentu maisījumam. Sarkanā krāsā – atskaites spektri, zaļā krāsā – spektri paraugam ar pievienotu nsp14/nsp10. Melnās bultiņas izceļ signālus, kas norāda uz saistību. A – waterLOGSY eksperiments. B – $T_{1\rho}$ eksperiments.

Figure 12. Identification of nonspecific binding for a fragment mixture. Shown in red – reference spectra, in green – spectra of samples with added nsp14/nsp10. Black arrows show signals which indicate binding, A – waterLOGSY experiment. B – $T_{1\rho}$ experiment.



12. attēls. Fragmenta identitātes noteikšana. Zilā krāsā – ^1H spektrs fragmentu mikstūrai, sarkanā krāsā – ^1H atskaites spektrs identificētajam savienojumam.

Figure 12. Determination of the fragment identity. Shown in blue – ^1H spectrum for the fragment mixture, shown in red – ^1H reference spectrum of the individual identified compound.

Saistību uzrādošie savienojumi WaterLOGSY un CPMG eksperimentos.

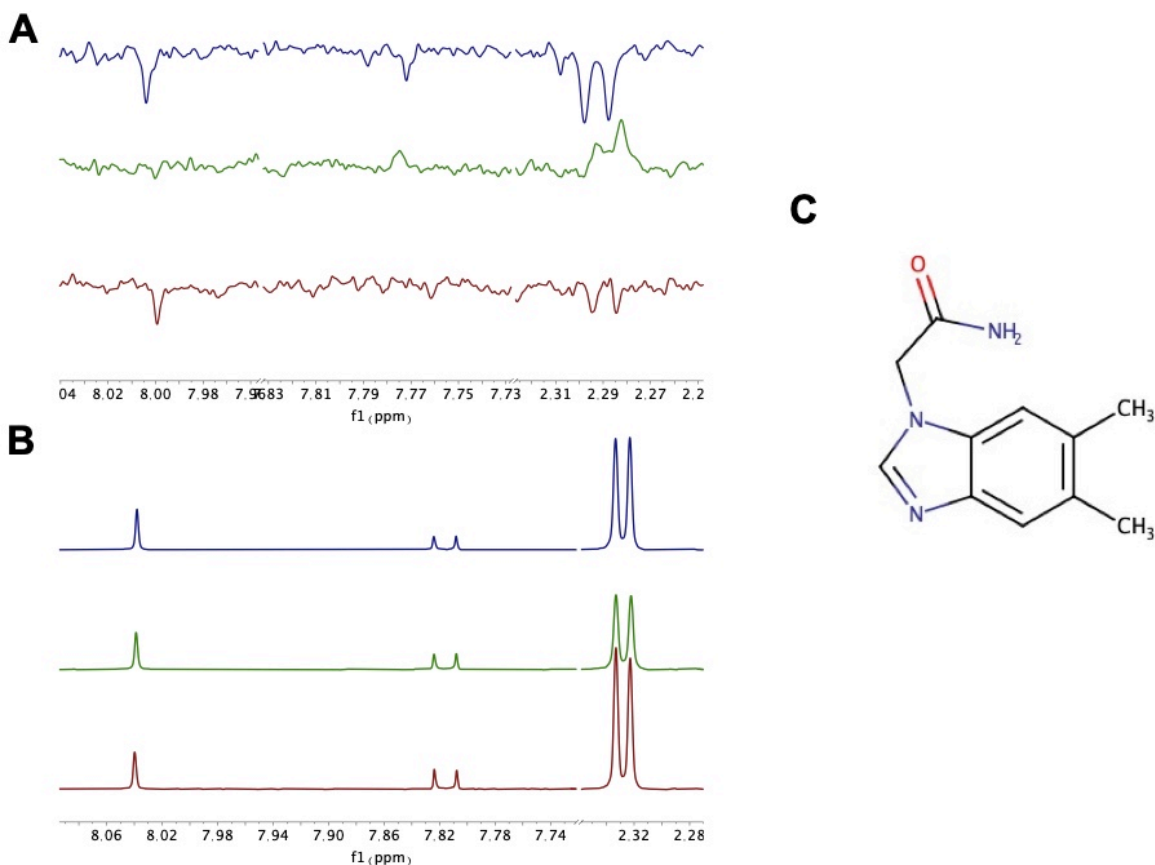
Table 1.

Compounds that showed binding in WaterLOGSY and CPMG experiments.

ID	WaterLOGSY	T _{1ρ}
Z27797417		
Z55671900		
Z31432226		
Z2856434871		
Z2856434816		
Z31697001		
Z1275599911		
Z321318226		
Z57515803		
Z1741973467		
Z19739650		
Z30612387		
Z1217741507		
Z285675722		
Z1623890017		
Z281077318		
Z57792053		
Z1273312153		
Z102895082		
Z219104216		
Z1354416068		
Z56347187		
Z30620520		
Z1086293874		
Z44592329		
Z86416929		
Z136583524		
Z53860899		
Z58982727		
Z57101343		
Z19733482		
Z1741960769		
Z208334100		
Z2301438417		
Z123970702		
Z2856434779		
Z363993198		
Z53834613		
Z31792168		
Z296054478		
Z32386228		
Z2856434805		
Z276545932		
Z57292378		
ZN26251905		
ZN30820160		

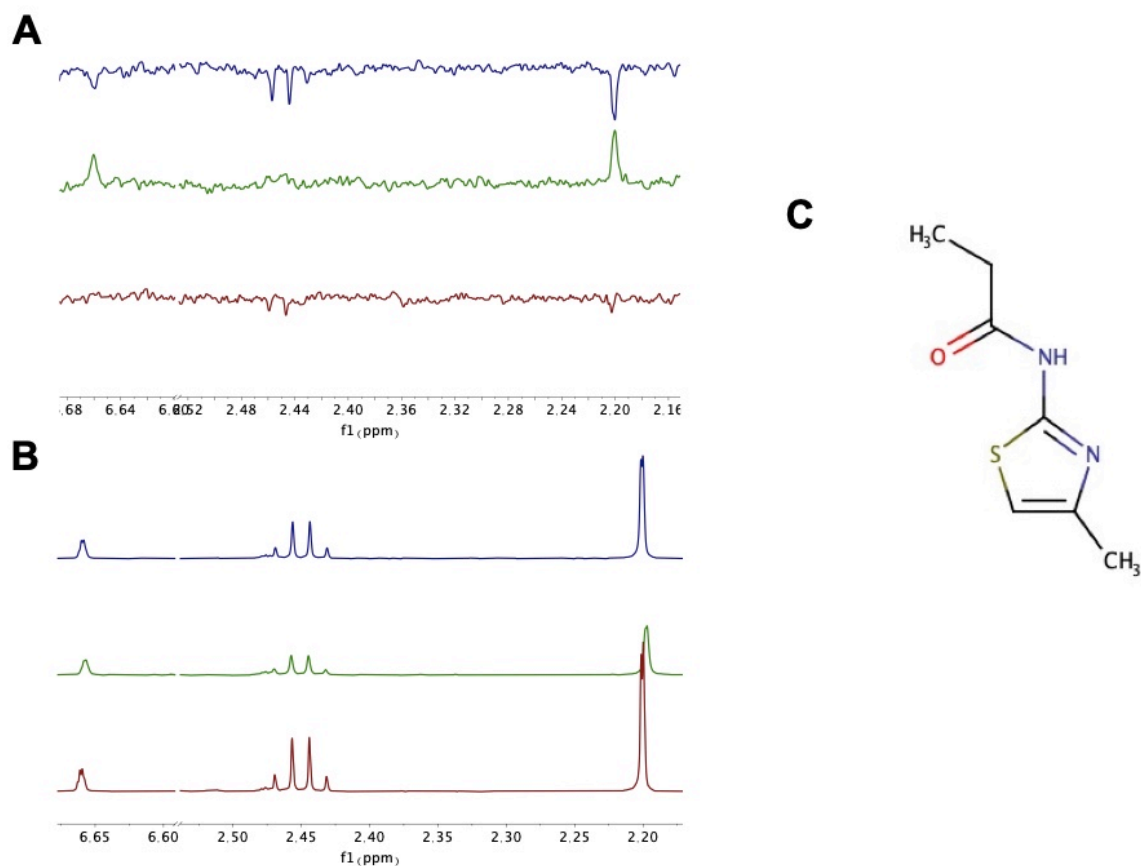
3.2.2. Ar sinefungīnu konkurējošie savienojumi.

No identificētajiem 46 savienojumiem, kas uzrādīja saistību, ar sinefungīnu saistības konkurenci uzrādīja tikai divi (skat. 13. un 14. attēlus). Tiem bija pozitīvi gan waterLOGSY, gan $T_{1\rho}$ testi, tas ir, novēroja signāla intensitātes izmaiņu par >20% pēc nsp14/nsp10 kompleksa pievienošanas. Savukārt pēc sinefungīna pievienošanas signālu intensitāte tika pilnīgi vai daļēji atgūta.



13. attēls. Specifiskas saistības identificēšana. Zilā krāsā – atskaites spektri, zaļā krāsā – spektri ar pievienotu nsp14/10 kompleksu, sarkanā – spektri ar pievienotu sinefungīnu. A – waterLOGSY eksperimenti. B – $T_{1\rho}$ eksperimenti. C – identificētā savienojuma struktūra.

Figure 13. Identification of specific binding. Shown in blue – reference spectra, in green – spectra with added nsp14/nsp10 complex, in red – spectra with added sinefungin. A – waterLOGSY experiments. B – $T_{1\rho}$ experiments. C – structure of the identified compound.



14. attēls. Specifiskas saistības identificēšana. Zilā krāsā – atskaites spektri, zaļā krāsā – spektri ar pievienotu nsp14/nsp10 kompleksu, sarkanā – spektri ar pievienotu sinefungīnu. A – waterLOGSY eksperimenti. B – T_{1ρ} eksperimenti. C – identificētā savienojuma struktūra.

Figure 14. Identification of specific binding. Shown in blue – reference spectra, in green – spectra with added nsp14/nsp10 complex, in red – spectra with added sinefungin. A – waterLOGSY experiments. B – T_{1ρ} experiments. C – structure of the identified compound.

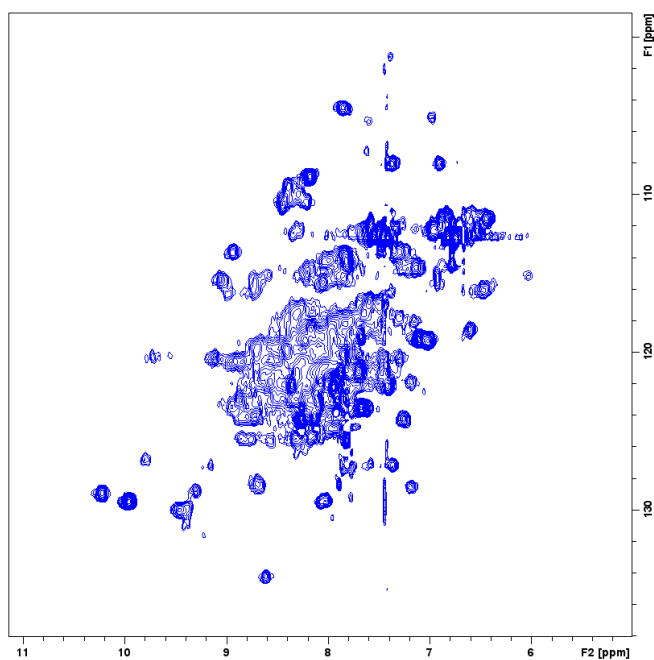
Kaut gan tikai diviem savienojumiem novēroja konkurenci ar sinefungīnu, nevar apgalvot, ka tie ir vienīgie fragmenti, kas saistās metiltransferāzes aktīvajā centrā. Iespējams, savienojumi ar nespecifisku saistību arī saistās konkrētajā kabatā tikai citā vietā nekā sinefungīns. Daļa savienojumu, iespējams, saistās pie nsp14 citās vietās, piemēram RNS saistīšanas kabatā vai eksoribonukleāzes domēna aktīvajā centrā. Savukārt ļoti iespējams, ka daļa no saistību uzrādošajiem savienojumiem tiešām veido nespecifiskas saistības. Gadījumos, kad tikai viens no eksperimentiem uzrādīja saistību, pastāv lielāka iespēja, ka tika iegūts šķietami pozitīvs rezultāts (*false positive*) nekā gadījumos, kad abi eksperimenti uzrādīja pozitīvu rezultātu.

No savienojumiem, kas uzrādīja saistību tikai vienā eksperimentā, lielākā daļa bija waterLOGSY eksperimentos, kas liecina par šī eksperimenta augstāku jutību salīdzinājumā ar

T₁ρ eksperimentu pētāmās sistēmas ietvaros, kas norāda uz efektīvu magnetizācijas pārnese spinu difūzijas dēļ.

3.3. Metiltransferāzes domēna ¹H-¹⁵N-HSQC spektrs.

Kā jau minēts nodaļā “1. Literatūras apskats”, ar KMR iespējams arī noteikt liganda saistīšanās vietu proteīnā. Tam nepieciešams producēt ar ¹⁵N izotopiem iezīmētu proteīnu, kuram var uzņemt ¹H-¹⁵N-HSQC spektru. Tajā katrs signāls atbilst konkrētas proteīna aminoskābes pamatvirknes NH signālam, kā arī dažām aminoskābēm spektrā parādās arī sānu ķēdes NH signāli (piem., asparagīnam, glutamīnam, triptofānam un arginīnam). Rezultātā iegūts proteīna strukturālais “pirkstu nospiedums”. Ja veikta spektra asignēšana, kurā identificēts, kāda aminoskābe atbilst katram signālam, tad šī metode ir noderīgs rīks, lai pētītu savienojumu saistību pie proteīna. Uzņemot spektrus proteīnam pirms un pēc savienojuma pievienošanas, novēro atšķirības aminoskābju signālu ķīmiskajās nobīdēs, lai noteiktu, kur savienojums saistās.



15. attēls. 2D ¹H-¹⁵N-HSQC spektrs ¹⁵N iezīmētām nsp14 MTāzes domēnam.

Figure 15. 2D ¹H-¹⁵N-HSQC spectrum for ¹⁵N labeled nsp14 MTase domain.

Šim nolūkam tika ekspresēts un attīrīts ¹⁵N iezīmēts nsp14 metiltransferāzes domēns (288.-527. aminoskābes, 28 kDa), kuram uzņēma ¹H-¹⁵N-HSQC spektru (15. attēls). Diemžēl, iegūtais spektrs nav augstas kvalitātes. Tajā redzami daži atsevišķi, intensīvi signāli, taču

spektra centrā gandrīz nav iespējams atšķirt individuālus signālus. Šis norāda uz nsp14 MTāzes domēna relatīvi augsto nestabilitāti. Rezultātā, no iegūtajiem datiem nevarētu asignēt pamatvirknes aminoskābju signālus, kā arī nebūtu iespējams noteikt liganda saistības vietu pie proteīna.

SECINĀJUMI

1. Bakalaura darbā apgūta un efektīvi pielietota nsp14 un nsp10 proteīnu ekspresija *Escherichia coli* šūnās šķīstošā un aktīvā formā.
2. Izstrādāts protokols fragmentu bibliotēkas skrīningam ar KMR metodi.
3. Optimizējot eksperimentu apstākļus, tika atklāts, ka nsp14 aktivitāti veicina augsta sāls koncentrācija, reducējoša aģenta klātbūtne, uzglabāšana zemā temperatūrā bez sasalšanas zemās koncentrācijās.
4. Nsp10 pievienošana stehiometriskā daudzumā būtiski uzlabo nsp14 stabilitāti.
5. Pētāmās sistēmas ietvaros waterLOGSY eksperiments uzrādīja lielāku jūtīgumu salīdzinājumā ar T₁ρ eksperimentu.
6. Izmantojot waterLOGSY un T₁ρ eksperimentus atklāti 44 fragmenti, kas uzrādīja neselektīvu un divi – selektīvu saistību attiecībā pret SAM-saistīšanas kabatu.

PATEICĪBAS

Autore izsaka pateicību Latvijas Organiskās sintēzes institūta Fizikāli organiskās ķīmijas laboratorijas vadītājam Kristapam Jaudzemam par iespēju šo darbu izstrādāt viņa vadītajā laboratorijā. Pateicība arī laboratorijas kolēģiem par atbalstu darba izstrādes procesā.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) Cucinotta, D.; Vanelli, M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Biomed.* **2020**, *91* (1), 157–160. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i1.9397>.
- (2) Cui, J.; Li, F.; Shi, Z. L. Origin and Evolution of Pathogenic Coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17* (3), 181–192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>.
- (3) Taylor, L. Covid-19 : True Global Death Toll from Pandemic Is Almost 15 Million , Says WHO. **2022**, No. May, 1–2. <https://doi.org/10.1136/bmj.o1144>.
- (4) Alimohamadi, Y.; Sepandi, M.; Taghdir, M.; Hosamirudsari, H. Determine the Most Common Clinical Symptoms in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Prev. Med. Hyg.* **2020**, *61* (3), E304–E312. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2020.61.3.1530>.
- (5) Raman, B.; Cassar, M. P.; Tunnicliffe, E. M.; Filippini, N.; Griffanti, L.; Alfaro-Almagro, F.; Okell, T.; Sheerin, F.; Xie, C.; Mahmod, M.; et al. Medium-Term Effects of SARS-CoV-2 Infection on Multiple Vital Organs, Exercise Capacity, Cognition, Quality of Life and Mental Health, Post-Hospital Discharge. *EClinicalMedicine* **2021**, *31*. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100683>.
- (6) Augustin, M.; Schommers, P.; Stecher, M.; Dewald, F.; Gieselmann, L.; Gruell, H.; Horn, C.; Vanshylla, K.; Cristanziano, V. Di; Osebold, L.; et al. Post-COVID Syndrome in Non-Hospitalised Patients with COVID-19: A Longitudinal Prospective Cohort Study. *Lancet Reg. Heal. - Eur.* **2021**, *6*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2021.100122>.
- (7) Olliaro, P.; Torreele, E.; Vaillant, M. COVID-19 Vaccine Efficacy and Effectiveness—the Elephant (Not) in the Room. *The Lancet Microbe* **2021**, *2* (7), e279–e280. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00069-0](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00069-0).
- (8) Pérez-Alós, L.; Armenteros, J. J. A.; Madsen, J. R.; Hansen, C. B.; Jarlhelt, I.; Hamm, S. R.; Heftdal, L. D.; Pries-Heje, M. M.; Møller, D. L.; Fogh, K.; et al. Modeling of Waning Immunity after SARS-CoV-2 Vaccination and Influencing Factors. *Nat. Commun.* **2022**, *13* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29225-4>.
- (9) Ahmad, L. Implication of SARS-CoV-2 Immune Escape Spike Variants on Secondary and Vaccine Breakthrough Infections. *Front. Immunol.* **2021**, *12* (November), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.742167>.
- (10) Feikin, D. R.; Higdon, M. M.; Abu-Raddad, L. J.; Andrews, N.; Araos, R.; Goldberg, Y.; Groome, M. J.; Huppert, A.; O'Brien, K. L.; Smith, P. G.; et al. Duration of Effectiveness of Vaccines against SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 Disease:

- Results of a Systematic Review and Meta-Regression. *Lancet* **2022**, 399 (10328), 924–944. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00152-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00152-0).
- (11) WHO Solidarity Trial Consortium. Remdesivir and Three Other Drugs for Hospitalised Patients with COVID-19: Final Results of the WHO Solidarity Randomised Trial and Updated Meta-Analyses. *Lancet (London, England)* **2022**, 399 (10339), 1941–1953. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00519-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00519-0).
- (12) Khailany, R. A.; Safdar, M.; Ozaslan, M. Genomic Characterization of a Novel SARS-CoV-2. *Gene Reports* **2020**, 19 (March), 100682. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100682>.
- (13) Chen, Y.; Guo, D. Molecular Mechanisms of Coronavirus RNA Capping and Methylation. *Viol. Sin.* **2016**, 31 (1), 3–11. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3726-4>.
- (14) Dowling, R. J. O.; Sonenberg, N. *Signaling Pathways That Mediate Translational Control of Ribosome Recruitment to mRNA*, Second Edi.; Elsevier Inc., 2010; Vol. 3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00281-3>.
- (15) Sonenberg, N.; Morgan, M. A.; Merrick, W. C.; Shatkin, A. J. A Polypeptide in Eukaryotic Initiation Factors That Crosslinks Specifically to the 5'-Terminal Cap in MRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, 75 (10), 4843–4847. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.10.4843>.
- (16) Gu, M.; Lima, C. D. Processing the Message: Structural Insights into Capping and Decapping MRNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, 15 (1 SPEC. ISS.), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.01.009>.
- (17) Abbas, Y. M.; Pichlmair, A.; Gónna, M. W.; Superti-Furga, G.; Nagar, B. Structural Basis for Viral 5'-PPP-RNA Recognition by Human IFIT Proteins. *Nature* **2013**, 494 (7435), 60–64. <https://doi.org/10.1038/nature11783>.
- (18) Kawai, T.; Akira, S. Innate Immune Recognition of Viral Infection. *Nat. Immunol.* **2006**, 7 (2), 131–137. <https://doi.org/10.1038/ni1303>.
- (19) Minskaia, E.; Hertzog, T.; Gorbalenya, A. E.; Campanacci, V.; Cambillau, C.; Canard, B.; Ziebuhr, J. Discovery of an RNA Virus 3'→5' Exoribonuclease That Is Critically Involved in Coronavirus RNA Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103 (13), 5108–5113. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508200103>.
- (20) Bouvet, M.; Lugari, A.; Posthuma, C. C.; Zevenhoven, J. C.; Bernard, S.; Betzi, S.; Imbert, I.; Canard, B.; Guillemot, J. C.; Lécine, P.; et al. Coronavirus Nsp10, a Critical Co-Factor for Activation of Multiple Replicative Enzymes. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289 (37), 25783–25796. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.577353>.

- (21) Bouvet, M.; Imbert, I.; Subissi, L.; Gluais, L.; Canard, B.; Decroly, E. RNA 3'-End Mismatch Excision by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nonstructural Protein Nsp10/Nsp14 Exoribonuclease Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (24), 9372–9377. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201130109>.
- (22) Chen, Y.; Cai, H.; Pan, J.; Xiang, N.; Tien, P.; Ahola, T.; Guo, D. Functional Screen Reveals SARS Coronavirus Nonstructural Protein Nsp14 as a Novel Cap N7 Methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (9), 3484–3489. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808790106>.
- (23) Ferron, F.; Subissi, L.; De Morais, A. T. S.; Le, N. T. T.; Sevajol, M.; Gluais, L.; Decroly, E.; Vonrhein, C.; Bricogne, G.; Canard, B.; et al. Structural and Molecular Basis of Mismatch Correction and Ribavirin Excision from Coronavirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *115* (2), E162–E171. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718806115>.
- (24) Ma, Y.; Wu, L.; Shaw, N.; Gao, Y.; Wang, J.; Sun, Y.; Lou, Z.; Yan, L.; Zhang, R.; Rao, Z. Structural Basis and Functional Analysis of the SARS Coronavirus Nsp14-Nsp10 Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (30), 9436–9441. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508686112>.
- (25) Liu, C.; Shi, W.; Becker, S. T.; Schatz, D. G.; Liu, B.; Yang, Y. Structural Basis of Mismatch Recognition by a SARS-CoV-2 Proofreading Enzyme. *Science (80-.)*. **2021**, *373* (6559), 1142–1146. <https://doi.org/10.1126/science.abi9310>.
- (26) Newman, J. Crystal Structures and Fragment Screening of SARS-CoV-2 NSP14 Reveal Details of Exoribonuclease Activation and mRNA Capping and Provide Starting Points for Antiviral Drug Development. **2022**.
- (27) Doak, B. C.; Norton, R. S.; Scanlon, M. J. The Ways and Means of Fragment-Based Drug Design. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *167*, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.07.003>.
- (28) Murray, C. W.; Rees, D. C. The Rise of Fragment-Based Drug Discovery. *Nat. Chem.* **2009**, *1* (3), 187–192. <https://doi.org/10.1038/nchem.217>.
- (29) Shuker, S. B.; Hajduk, P. J.; Meadows, R. P.; Fesik, S. W. Discovering High-Affinity Ligands for Proteins_SAR by NMR (First Paper about FBS NMR). *Science (80-.)*. **1996**, *274*, 1531–1534.
- (30) Dalvit, C.; Fogliatto, G.; Stewart, A.; Veronesi, M.; Stockman, B. WaterLOGSY as a Method for Primary NMR Screening: Practical Aspects and Range of Applicability. *J. Biomol. NMR* **2001**, *21*, 349–359. <https://doi.org/10.1023/A:1013302231549>.
- (31) Hajduk, P. J.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. One-Dimensional Relaxation- and

- Diffusion-Edited NMR Methods for Screening Compounds That Bind to Macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (9), 12257–12261. <https://doi.org/10.1021/ja9715962>.
- (32) Hoehn, M.; Butler, T. F. New Adenine-Containing Antifungal Antibiotic : Fermentation Meantde-. **1973**, *3* (1), 49–56.
- (33) Copeland, R. A.; Solomon, M. E.; Richon, V. M. Protein Methyltransferases as a Target Class for Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8* (9), 724–732. <https://doi.org/10.1038/nrd2974>.
- (34) Kok, W. M. New Developments in Flavivirus Drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2016**, *11* (5), 433–445. <https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1160887>.

Bakalaura darbs „SARS-CoV-2 metiltransferāzes nsp14 inhibitoru izpēte”
izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā
norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autore: Anna Līna Bula 24.05.2022.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: *Mg. sc. ing.* Diāna Zeļencova-Gopejenko 24.05.2022.

Recenzents: *Dr. chem.* Alons Lends

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 24.05.2022.

Lietvede: Liliāna Teļeševa

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: