

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії

проф. Сергій Вікторович Рябухін

Протокол №\_\_\_\_ засідання кафедри

від “\_\_\_” \_\_\_\_\_ 20\_\_р.

## **ЯМР-СПЕКТРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕЛЕМЕНТА ЗСУВУ**

### **РАМКИ ЗЧИТУВАННЯ SARS-COV-1**

Випускна кваліфікаційна робота магістра

студентки спеціальності 102 Хімія

ОП «Хемоінформатика»

**Ващенко Ольги Олександрівни**

Науковий керівник від кафедри

доцент кафедри супрамолекулярної хімії

**к.х.н. Гринь Світлана Валеріївна**

Робота виконана в Інституті органічної хімії

та хімічної біології

Франкфуртського університету ім. Гете

під керівництвом Prof. Dr. **Harald Schwalbe**

Оцінка захисту роботи

---

Київ – 2024 р.

## **Анотація**

Ващенко О.О. ЯМР-спектроскопічне дослідження елемента зсуву рамки зчитування SARS-CoV-1. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 102 Хімія ОП «Хемоінформатика».

У роботі було досліджено елемент зсуву рамки зчитування SARS-CoV-1. Область була представлена двома конструктами РНК: РК69 довжиною 69 nt, що відповідає центральній псевдовузловій ділянці елемента, і РК84 довжиною 84 nt, що додатково включає слизьку послідовність. Вперше було зафіксовано наявність альтернативної вторинної структури в ЯМР спектрах довшого конструкта, а також показано перерозподіл співвідношення структур при зміні температури. Елемент зсуву рамки зчитування може формувати різні структури в зараженій клітині на різних етапах трансляції, і дослідження цих структур відкриває потенційні шляхи до лікування коронавірусних захворювань. Було досліджено здатність РК69 до зв'язування з лігандами, які попередньо показали сильне зв'язування з елементом зсуву рамки зчитування SARS-CoV-2. Зв'язування одного з таких лігандів, HSJA1012, відбувається в однаковому сайті зв'язування у випадку обох вірусних РНК з однаковою константою дисоціації.

**Ключові слова:** Елемент зсуву рамки зчитування; Зсув рамки зчитування; РНК псевдовузол; SARS-CoV-1; Спектроскопія ЯМР.

**Abstract**

In this study, the frameshifting element (FSE) of SARS-CoV-1 was investigated. The region was represented by two RNA constructs: 69 nt-long PK69, corresponding to the core pseudoknot region of the FSE, and 84 nt-long PK84, which additionally includes a slippery sequence. For the first time, the presence of an alternative secondary structure was detected in the NMR spectra of the longer construct, and the temperature-driven redistribution of the structure ratio was shown. The FSE can form different structures in an infected cell at different stages of translation, and the study of these structures opens up potential avenues for the treatment of coronavirus diseases. We investigated the ability of PK69 to bind to ligands that have previously shown strong binding to the SARS-CoV-2 FSE. The binding of one of these ligands, HSJA1012, occurs at the same binding site in the case of both viral RNAs with the same dissociation constant.

**Keywords:** Frameshifting element; Frameshift; RNA pseudoknot; SARS-CoV-1; NMR spectroscopy.

## Зміст

Список умовних позначень .....	6
Вступ.....	8
1. Огляд літератури .....	11
1.1. Рибонуклеїнова кислота (РНК).....	11
1.2. SARS-CoV-1 .....	12
1.2.1. Структура FSE .....	14
1.2.2. Механізм -1 PRF.....	18
1.2.3. Ефективність зсуву рамки зчитування.....	19
1.3. Таргетинг FSE.....	22
1.3.1. ЯМР-скринінг .....	22
2. Матеріали і методи.....	24
2.1. Матеріали .....	24
2.2. Методи.....	30
2.2.1. Підготовка РНК.....	30
2.2.2. Гель-електрофорез .....	35
2.2.3. Визначення концентрації нуклеїнових кислот .....	37
2.2.4. ЯМР-спектроскопія.....	37
2.2.5. Флуоресценція .....	38
3. Результати та обговорення .....	40
3.1. Підготовка РНК .....	40
3.1.1. Підготовка ДНК-шаблону .....	40
3.1.2. IVT .....	42
3.1.3. Нативний поліакриламідний гель-електрофорез.....	50
3.2. ЯМР.....	51

3.2.1.	Скринінг .....	52
3.2.2.	Дослідження вторинної структури.....	55
3.2.3.	Титрування РК69.....	71
3.3.	Флуоресцентне титрування .....	76
Висновки .....		79
Бібліографія .....		80
Додатки.....		88

**Список умовних позначень**

A	Аденін
att HP	Шпилька-атенюатор (англ. Attenuator hairpin)
C	Цитозин
CoV	Коронавірус (англ. Coronavirus)
CPMG	Carr–Purcell–Meiboom–Gill
CSP	Збурення хімічного зсуву (англ. Chemical shift perturbation)
DMS	Диметилсульфат
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FSE	Елемент зсуву рамки зчитування (англ. Frameshifting element)
G	Гуанін
HDV	Вірус гепатиту дельта (англ. Hepatitis delta virus)
HH	Рибозим Hammerhead
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	High-performance liquid chromatography
IVT	<i>In vitro</i> транскрипція
JR	Стрибок-повернення (англ. Jump-return)
LB	Розширення ліній (англ. Line broadening)
Loop	Петля
MWCO	Переріз мембрани (англ. Molecular weight cut-off)
n.a.	Природний вміст (англ. Natural abundance)
NOE	Ядерний ефект Оверхаузера (англ. Nuclear Overhauser effect)
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
nt	Нуклеотид (англ. Nucleotide)
NTP	Нуклеозидтрифосфат (англ. Nucleoside triphosphate)

ORF	Відкрита рамка зчитування (англ. Open reading frame)
Pi	Неорганічний фосфат
PK	Псевдовузел (англ. Pseudoknot)
PRF	Запрограмований рибосомальний зсув рамки зчитування (англ. Programmed ribosomal frameshift)
SARS	Тяжкий гострий респіраторний синдром (англ. Severe acute respiratory syndrome)
SHAPE	Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension
SOFAST	Band-selective optimized flip-angle short-transient
SOGGY	Solvent-optimized double gradient spectroscopy
SS	Слизька послідовність (англ. Slippery sequence)
Stem	Стовбур
TROSY	Transverse relaxation-optimized spectroscopy
U	Урідин
waterLOGSY	Water-ligand observed via gradient spectroscopy
ДНК	Дезоксирибонуклеїнова кислота
Кріо-ЕМ	Кріогенна електронна мікроскопія
мРНК	Матрична РНК
MPP	Малокутове рентгенівське розсіювання
ПЛР	Полімеразна ланцюгова реакція
пп	Поліпротеїн
РНК	Рибонуклеїнова кислота
рРНК	Рибосомальна РНК
тРНК	Транспортна РНК
ТТ	Тестова транскрипція

## Вступ

**Актуальність теми.** Епідемія важкого гострого респіраторного синдрому у 2002-2004 роках, спричинена членом сімейства коронавірусів (CoV, англ. coronavirus) SARS-CoV-1 (Severe Acute Respiratory Syndrome), призвела до близько 8000 випадків захворювання та щонайменше 774 смертей у всьому світі [1]. Близькосхідний респіраторний синдром, вірусний агент MERS-CoV, з 2610 підтвердженими випадками з квітня 2012 року та 940 смертями є ще одним прикладом епідемії, пов'язаної з CoV [2]. Нещодавній пандемічний спалах коронавірусної хвороби 2019, викликаної новим представником сімейства коронавірусів, SARS-CoV-2, у 2019 році призвів до близько 800 мільйонів підтверджених випадків, а також близько 7 мільйонів летальних випадків у всьому світі [3]. Вплив захворювань, пов'язаних з CoV, на людство важко переоцінити.

Геном SARS-CoV-1 містить дві відкриті рамки зчитування (ORF, англ. Open reading frame) 1a і 1b, що перекриваються, які кодують два поліпротеїни (пп) 1a і 1ab. Для регуляції співвідношення трансльованих пп коронавіруси використовують регуляторний механізм -1 запрограмованого рибосомального зсуву рамки зчитування (-1 PRF, англ. -1 Programmed Ribosomal Frameshift). Під час події -1 PRF рибосома «прослизає» на 1 нуклеотид (nt, англ. Nucleotide) у 5'-напрямку, і трансляція продовжується в новій -1 рамці. Даний механізм дозволяє вірусам контролювати співвідношення синтезованих білків і таким чином підтримувати вірусну реплікацію [4]. -1 PRF регулюється двома цис-діючими елементами РНК: слизькою послідовністю (SS, англ. Slippery sequence), гептамером, на якому відбувається зсув рамки, і тристовбуровим псевдовузлом (ПК, англ. Pseudoknot), об'ємною РНК структурою, яка викликає рибосомальну паузу, що призводить до зсуву рамки. Через свою значимість елемент зсуву рамки зчитування (FSE, англ. Frameshifting Element) зберігається серед коронавірусів: лише одна мутація відбулася в ключовій області FSE між SARS-CoV-1 та SARS-CoV-2. Дослідження подібностей і

відмінностей між цими двома вірусами може допомогти в боротьбі з майбутніми захворюваннями, пов'язаними з CoV.

Важливість -1 PRF для реплікації вірусу робить його потенційною терапевтичною мішенню. Дослідження виявили зниження ефективності -1 PRF як в SARS-CoV-1, так і в SARS-CoV-2 малими молекулами – інгібіторами фреймшифту [5], [6], [7], що призводить до значного зниження реплікації вірусу [7], [8]. Один з методів пошуку таких молекул – ЯМР-скринінг, що базується на фрагментах. Скринінг FSE SARS-CoV-2 визначив одинадцять хітів [9].

Структура центрального РК як SARS-CoV-1, так і SARS-CoV-2 вивчена та добре встановлена [10], [11]. Дослідження подовжених конструктів FSE має сенс у клітинному контексті під час процесу трансляції. Постулюється, що SS недоступна, поки FSE знаходиться в безпосередній взаємодії з рибосомою, але вільна в інших випадках, що відкриває можливість утворення різних вторинних структур [12].

**Мета дослідження.** Визначити залежність вторинної структури елемента зсуву рамки зчитування SARS-CoV-1 від його довжини та порівняти спорідненість до лігандів елементів зсуву рамки зчитування SARS-CoV-1 і SARS-CoV-2.

*Об'єкт дослідження:* елемент зсуву рамки зчитування SARS-CoV-1 довжиною 69 nt та 84 nt (PK69 та PK84).

*Предмет дослідження:* вторинна структура елемента зсуву рамки зчитування SARS-CoV-1 довжиною 69 nt та 84 nt; спорідненість до лігандів елемента зсуву рамки зчитування SARS-CoV-1 довжиною 69 nt.

*Методи дослідження:* гель-електрофорез; одно- ( $^1\text{H}$ , waterLOGSY (Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy), CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill)  $T_2$ -релаксація) та двовимірні ( $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy),  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -TROSY (Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy),  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -SOFAS-T-HMQC (Band-Selective Optimized Flip-Angle Short-Transient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), HNN-COSY (Correlated

Spectroscopy)) спектроскопія ЯМР; ЯМР-скринінг, що базується на фрагментах (1D;  $^1\text{H}$  waterLOGSY (Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy), CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill)  $T_2$ -релаксація); флуоресцентне титрування.

**Особистий внесок здобувача.** Систематизацію літературних даних, підготовку зразків РНК для дослідження, обробку та аналіз експериментальних даних, узагальнення та оформлення отриманих результатів було проведено здобувачем особисто. Оптимізація параметрів ЯМР-експериментів була виконана у співпраці з Dr. Christian Richter. Постановка завдання дослідження та обговорення результатів проводились з науковим керівником, Prof. Dr. Harald Schwalbe, та PhD-кандидаткою Jennifer Adam.

## 1. Огляд літератури

### 1.1. Рибонуклеїнова кислота (РНК)

РНК – це біополімер з різноманітними функціями, який бере участь у біосинтезі білка. Різні РНК поділяються на класи залежно від їхніх функцій. Рибосомні РНК (рРНК) є компонентами рибосом у живих клітинах, транспортні РНК (тРНК) доставляють амінокислоти до рибосом під час трансляції білка, а матричні РНК (мРНК) кодуєть послідовність білка. мРНК транскрибується з дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) у клітинних організмах, або несе генетичну інформацію безпосередньо, як у випадку вірусів з позитивним ланцюгом РНК. Молекула РНК побудована з нуклеотидів, з'єднаних фосфодіетерними зв'язками. Кожен нуклеотид містить фосфатну групу, залишок рибози і пуринову або піримідинову основу. Пуриновими основами є аденін (А) і гуанін (G), а двома піримідиновими основами є цитозин (С) і урацил (U). Здатність основ до утворення пар зумовлює різноманіття можливих вторинних структур молекули. Рисунок 1.1, (А) ілюструє водневий зв'язок між основами в канонічних (А-U і G-C) та неканонічних (G-U) парах основ. Внутрішньомолекулярне спарювання основ призводить до утворення шпильок, що складаються зі спарованих стовбурів та неспарованих ділянок – петель. У разі невідповідності основ утворюються внутрішні петлі і опуклості [13]. Псевдовузли являють собою більш складний приклад вторинної структури РНК. У структурі РК основи в петлі шпильки спаровуються з основами зовні стовбура, утворюючи таким чином другий стовбур [14]. Основні елементи вторинної структури РНК показані на Рисунку 1.1, (В).

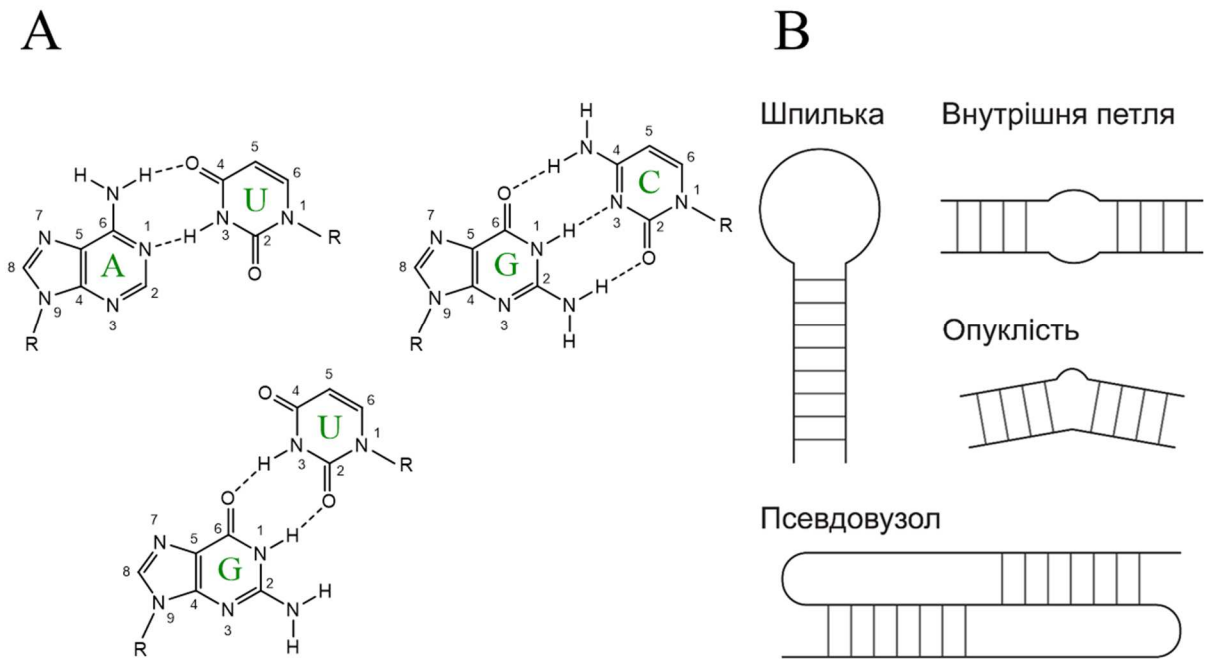


Рисунок 1.1 – А. Канонічні (A-U і G-C) і неканонічні (G-U) пари основ.

### В. Елементи вторинної структури РНК.

#### 1.2. SARS-CoV-1

SARS-CoV-1, відповідальний за спалах SARS у 2003 році, належить до бетакоронавірусів, підроду Sarbecovirus. Це вірус з оболонкою з позитивним ланцюгом РНК з геномом близько 30 kb. Як показано на Рисунку 1.2, приблизно дві третини його представлено двома ORF, що перетинаються, 1a і 1b, які кодують два пп 1a і 1ab, що охоплюють неструктурні білки 1-11 і 1-16 відповідно [15], [16]. Для регуляції співвідношення білків використовується механізм -1 PRF. Показано, що зміна ефективності зсуву рамки зчитування змінює співвідношення синтезованих білків, а, отже, впливає на реплікацію вірусу [4], [17], [18]. Під час процесу рибосома «прослизає» на один нуклеотид в 5'-напрямку, уникає стоп-кодон, і трансляція продовжується в новій -1 рамці [19].

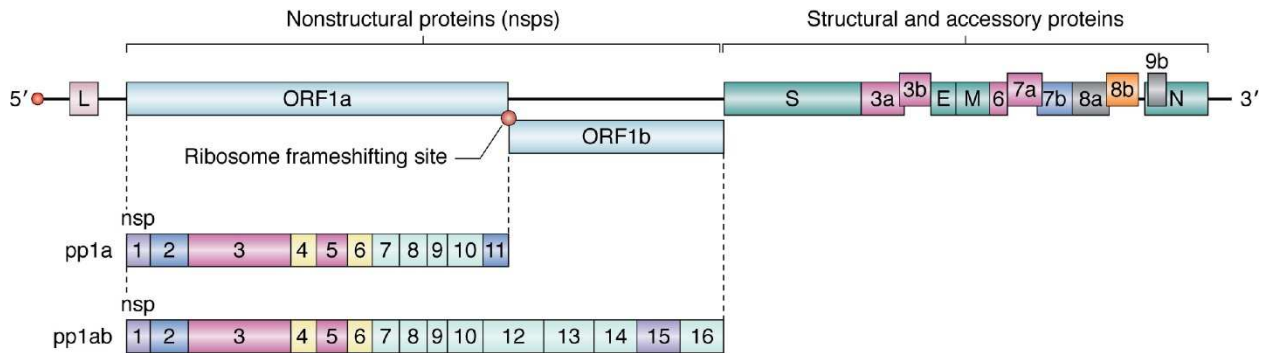


Рисунок 1.2 – Організація геному SARS-CoV-1. Передруковано з [16].

Сигнал -1 PRF, також відомий як елемент зсуву рамки зчитування (FSE), складається з двох цис-регуляторів: SS і PK з 5-нуклеотидним спейсером між ними [19]. Слизька послідовність, як правило, є гептамером, NNNWWWH, де N = будь-яка основа, W = A або U, і H ≠ G. У разі SARS-CoV-1 послідовність UUAAAAC. Структура PK буде детально розглянута в наступному розділі (1.2.1). Ще одним структурним елементом, який регулює -1 PRF, але зазвичай не відноситься до FSE, є шпилька, розташована вище у послідовності від слизької ділянки. Ця шпилька відома як шпилька-атенюатор (att HP) і, як повідомляється, знижує ефективність -1 PRF [20].

FSE є дуже консервативним серед коронавірусів: у той час як загальна ідентичність послідовності між SARS-CoV-1 та SARS-CoV-2 становить 79 %, регіон FSE довжиною 222 nt зберігається на 93 % [12]. Рисунок 1.3 показує вирівнювання розширених регіонів FSE SARS-CoV-1 та SARS-CoV-2, включаючи att HP, SS та PK. Єдиною мутацією, що відбувається в регіоні SS+PK, є мутація C13.533A. Структурно-функціональне збереження двох FSE була показана Kelly *et al* [6]. Разом з тим, att HP зберігається набагато менше, оскільки між вірусами спостерігається вісім мутацій. Запропоновано кілька вторинних структур SARS-CoV-2 att HP [8], [11], які відрізняються від структури SARS-CoV-1 att HP [20].

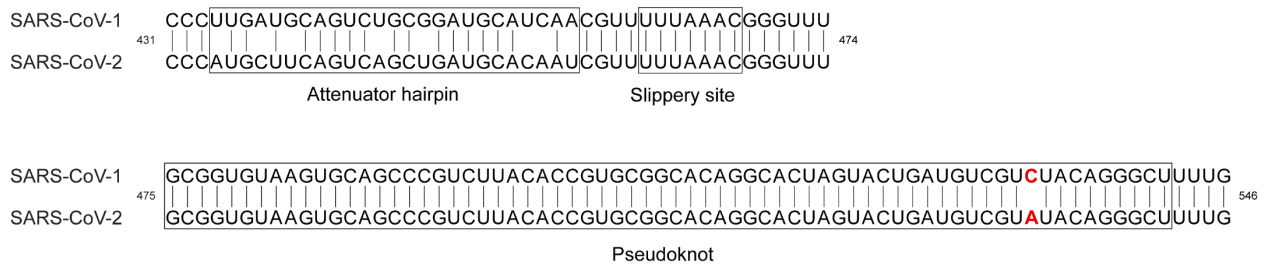


Рисунок 1.3 – Вирівнювання послідовностей розширеного регіону FSE SARS-CoV-1 (вгорі) та SARS-CoV-2 (знизу). Регулятори -1 PRF помічені прямокутниками. Мутація C533A позначена червоним кольором. Нумерація нуклеотидів у цій роботі відповідає дослідженню ЯМР, проведеному Wacker *et al* [11] Адаптовано з [6].

### 1.2.1. Структура FSE

Структура ядра SARS-CoV-1 FSE (68 nt) була вивчена за допомогою ЯМР і являє собою тристовбуровий РК [10]. РК складається зі стовбура Stem 1, за яким слідує Stem 3, а також Stem 2, утворений петлею Loop 1 і 3' кінцевими нуклеотидами (Рисунок 1.4, (1)). РК SARS-CoV-2 демонструє лише одну точкову мутацію, і було показано за допомогою МРР (малокутове рентгенівське розсіювання) та ЯМР, що вони мають однакову структуру [6], [11]. Цей факт дозволяє наглядно інтерпретувати висновки про SARS-CoV-2 FSE по відношенню до SARS-CoV-1 і навпаки. Кілька експериментальних досліджень FSE різної довжини продемонстрували наявність канонічного тристовбурового РК в SARS-CoV-2 за допомогою різних методів, включаючи ЯМР [11], РСА (рентгеноструктурний аналіз) [21], МРР [6], крио-ЕМ [8], [22], SHAPE (Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension) та DMS (диметилсульфат) мепінг [12], [22], [23]. Варто зазначити, що, хоча різні дослідження показують один і той самий структурний мотив, точне сполучення основ може відрізнятися довгими або коротшими стовбурами або додатковими шпильками, які не порушують саму структуру РК.

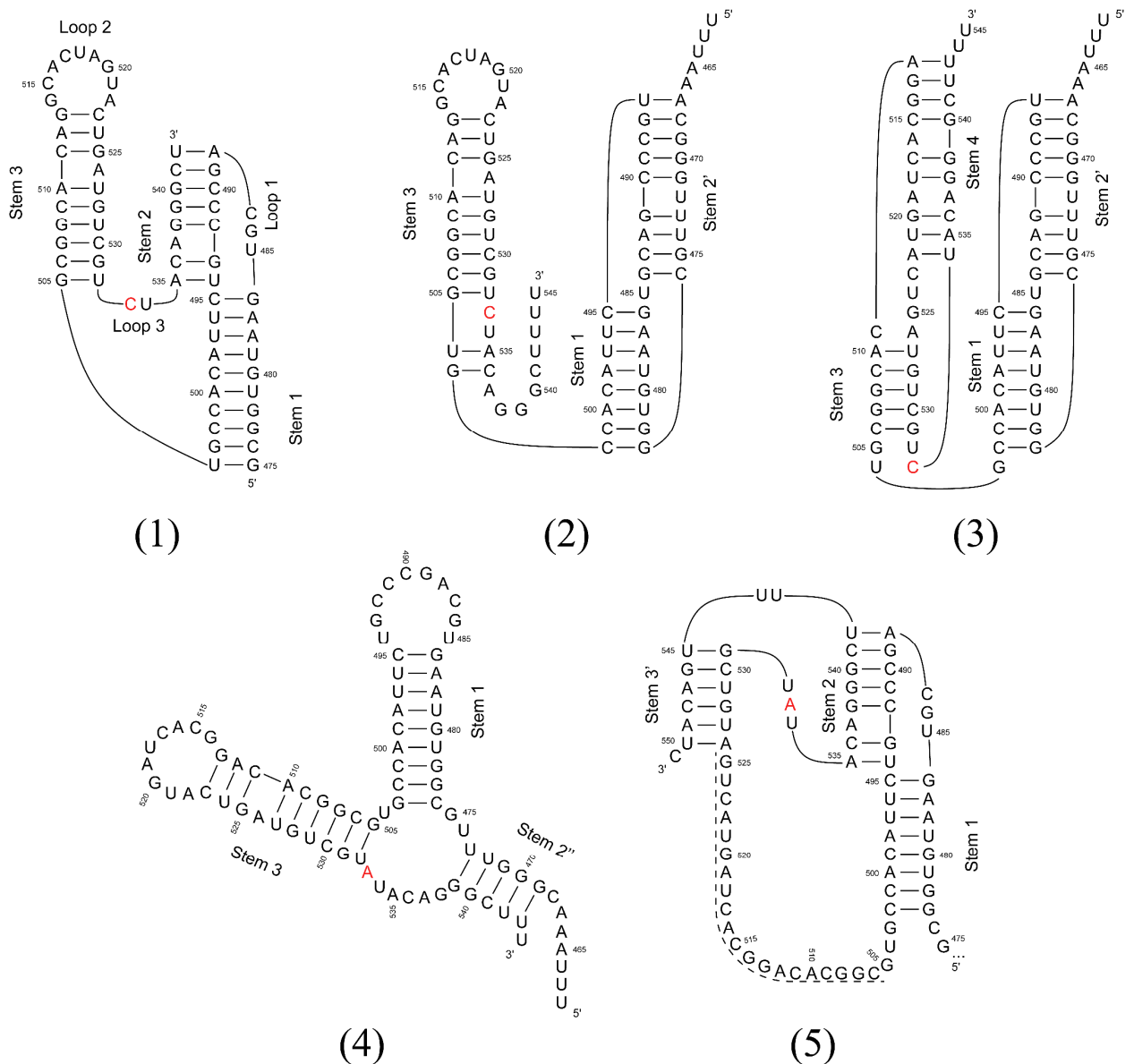


Рисунок 1.4 – Деякі із запропонованих структур для FSE SARS-CoV-1 та SARS-CoV-2. (1) Структура центрального РК SARS-CoV-1, визначена Plant *et al* [10] Цей РК вважається канонічним. (2) і (3) Альтернативні РК структури для SARS-CoV-1 FSE довжиною 84 nt. [24] (4) Непсевдовузлова тристовбура структура для SARS-CoV-2 FSE [12]. (5) Структура SARS-CoV-2 FSE, визначена Huston *et al*, що містить новий Stem 3' та альтернативний Stem 1' перед Stem 1 (тут не показаний). Область, позначена пунктирною лінією, бере участь у далеких взаємодіях [25]. Мутація C533A позначено червоним кольором у всіх заданих структурах.

Однак останні дослідження виявляють дані, що суперечать канонічній структурі РК. У роботі Schlick *et al* [12] було досліджено FSE SARS-CoV-2

різної довжини з використанням обчислювальних методів з подальшим використанням SHAPE. Передбачення, узгоджені з SHAPE для центрального РК довжиною 77 nt, показали домінування канонічної структури РК з мінорною часткою тристовбурової структури зі збереженими Stems 1 і 3 і новим Stem 2'', що формується між 3' і 5' кінцевими нуклеотидами (Рисунок 1.4, (4)). Для РК довжиною 84 nt різні алгоритми призводять до трьох можливих вторинних структур. Перша – канонічний РК (1) з подовженими 3' і 5' кінцями, дві інші – альтернативні структури: РК зі збереженими Stems 1 і 3 і альтернативним Stem 2', утвореним між Loop 1 і 5'-кінцем (Рисунок 1.4, (2)) і двопсевдовузлова структура з тими ж Stems 1, 2' і 3, а також новим Stem 4, утвореним між Loop 2 і 3'-кінцем (Рисунок 1.4, (3)). Альтернативні структури містять нуклеотиди зі спейсера і SS, що беруть участь в утворенні Stem 2', що пояснює його утворення тільки у випадку довших конструктів, але не для центрального РК. У той час як конструкт довжиною 84 nt не вивчався за допомогою SHAPE, зондування (близької до неї за довжиною) РНК довжиною 87 nt показало, що (2) – основна структура з мінорним канонічним РК (1). Передбачення для конструкту довжиною 144 nt, що містить att HP, не узгоджуються між різними інструментами прогнозування. Спільними для цих різних структур є лише Stem 1 і att HP. Два з чотирьох інструментів передбачення показують канонічний мотив РК для центральної області конструкту. Реакційна здатність SHAPE для довжини 144 nt, як і для 87 nt, показує, що основною структурою є альтернативний мотив РК (2) з менш ніж 5% канонічного мотиву РК (1). Для конструкту довжиною 156 nt, продовженого у 5' напрямку від слизької послідовності, спостерігається канонічний РК з утворенням альтернативного Stem 1', сформованого між нуклеотидами 5' від Stem 1 і нуклеотидами 5' від SS. Дані SHAPE показали домінуючу невузлову структуру з альтернативним Stem 1' замість Stem 1 зі Stems 2 і 3 з канонічного РК.

Подальша робота тієї ж групи показала прогнози, виконані для різних коронавірусів, SARS-CoV-1 та SARS-CoV-2 серед інших. Передбачення були

виконані в області широкої довжини від 77 nt центрального РК (зі спейсером) до 144 nt структур, що містять att HP. Результати для обох вірусів схожі для коротшого фрагмента FSE (менше 100 nt). Деякі результати даного дослідження та попередньої роботи не повністю збігаються через використання різних інструментів передбачення структури. До таких відмінностей, наприклад, можна віднести структуру 77 nt FSE. У той час як попереднє дослідження пропонувало структуру (1) як головну конформацію з малою часткою тристовбурової структури (4), у другій роботі дві головні структури на цій довжині – рівномірно розподілені (1) і (3), (2) в якості другорядної структури. Для всіх структур від 79 nt (перші два nt SS включно) до 88 nt (SS повністю і два додаткових nt як вгору, так і вниз у послідовності) канонічний РК повністю зникає з конформаційного простору, а структура (3) стає переважаючою з мінорною частиною (2). В подальшому подовжений з обох сторін конструкт довжиною 92 nt знову показує канонічний РК як домінуючу структуру. Наступне розширення FSE створює можливість утворення нових конкуруючих стебел з нуклеотидами, що знаходяться вище по послідовності [24].

Експериментальні роботи також показали наявність альтернативних структур. Наприклад, в той час як крио-ЕМ-дослідження 88 nt FSE SARS-CoV-2 підтвердило, що тристовбуровий канонічний РК є основною структурою, наявність структури (2) було виявлено за допомогою DMS-відображення [22]. Низка досліджень «довгого варіанту FSE» показала альтернативні структури. Дослідження цілого генома *in vivo* і *in vitro*, виконане Manfredonia *et al*, показало високу реакційну здатність SHAPE частини канонічного Stem 1, що свідчить про часткове розгортання РК *in vivo* при збереженні Stems 2 і 3 [26]. Інше *in vivo* дослідження повного геному, проведене Huston *et al*, виявило РК з повністю збереженим Stem 2 і частково збереженим Stem 1, і з новим Stem 3', утвореним нижче частиною колишнього Stem 3 з 3'-кінцем, і альтернативним Stem 1', утвореним спейсером та нуклеотидами вище від att HP (Рисунок 1.4, (5)). Область колишнього Stem 3 бере участь у взаємодії на далеких відстанях

(віддалених на 470 nt). Канонічний РК був виявлений другорядною структурою (0,8 %) [25]. Формування канонічного РК було поставлено під сумнів і в іншій загальногеномній роботі [23]. Автори дослідження також виявили альтернативний Stem 1', але в порівнянні зі Stem 1' з [25], він довший і, таким чином, взагалі не дозволяє Stem 1 утворюватися. Відповідно до множинного вирівнювання, послідовність Stem 1' зберігається серед усіх CoV, пов'язаних із SARS, зокрема в SARS-CoV-1.

В цілому, вищезгадані дослідження вказують на те, що структура FSE сильно залежить від його довжини і може приймати різні конформації, які можуть мати функціональну роль під час -1 PRF [27].

### 1.2.2. Механізм -1 PRF

-1 PRF – це регуляторний механізм синтезу білка у вірусів, який відбувається на SS, змінюючи рамку зчитування з U-UUA-AAC на UUU-AAA-C. Кріо-ЕМ-дослідження виявило структурні деталі взаємодії РК з рибосомою під час фреймшифту [8]. Рибосома в процесі трансляції призупиняється об'ємною структурою РК, розташованою на вході в канал мРНК. Р-сайтова тРНК зв'язується з кодоном UUU, що передує першому кодону слизької послідовності, UUA. Пауза рибосоми характеризується більш ніж в 10 разів тривалішим перебуванням в порівнянні з іншими кодонами [28]. РК є громіздким, стабільним, високоструктурованим елементом, який специфічно взаємодіє з білками рибосом і рРНК. Він чинить опір розкручуванню і створює зворотне притягання РНК, що призводить до збільшення ймовірності -1 зсуву рамки під час транслокації тРНК. Коли рибосома переміщається на один кодон далі, кодон UUA, відповідальний за зсув рамки, розташовується в Р-сайті. Це призводить до збільшення напруги мРНК і розкручування багатої на GC основи Stem 1, коли вона потрапляє у вхідний канал мРНК. тРНК в А- і Р-сайтах роз'єднуються з кодонами і повторно спарюються в -1 рамці, що допускається послідовністю SS. Схематично процес показаний на Рисунку 1.5.

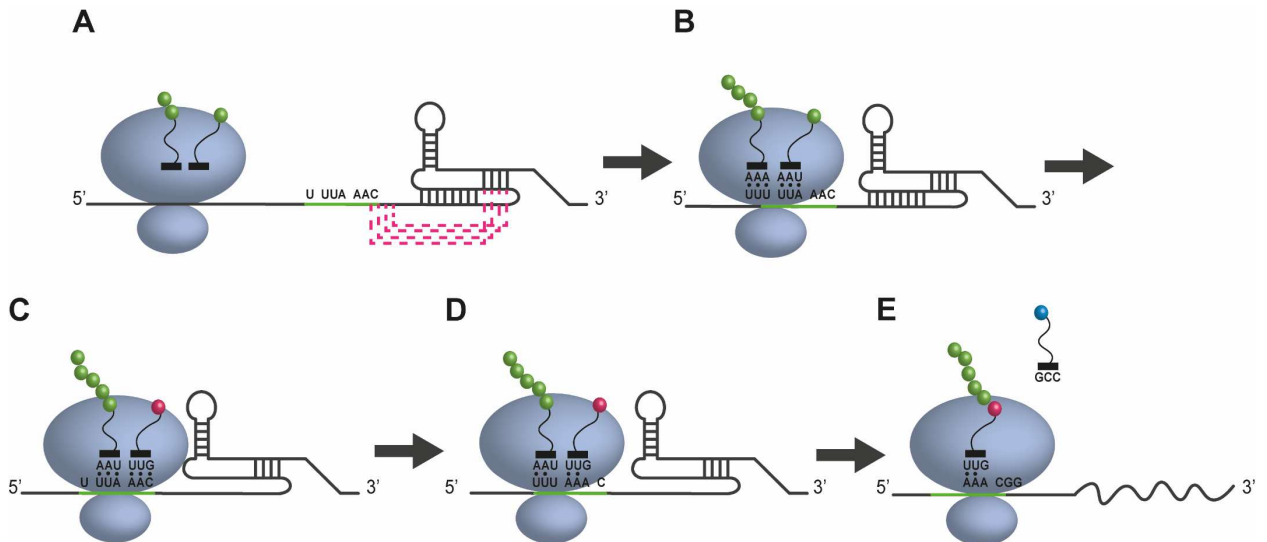


Рисунок 1.5 – Схематичне зображення -1 PRF в SARS-CoV-1. А. Трансляція, що передує -1 PRF. Показано можливе формування альтернативних структур у межах SS та спейсеру рожевими пунктирними лініями. В. Рибосома призупиняється структурою ПК. С. Транслокація рибосоми на один кодон далі і розкручування Stem 1. D. Прослизання рибосоми в 5'-напрямку, що викликано підвищеною напругою з боку ПК. Стадії С і D відбуваються одночасно. Е. Трансляція продовжується в новій рамці. Адаптовано з [29].

### 1.2.3. Ефективність зсуву рамки зчитування

Кілька досліджень були зосереджені на ролі кожної частини FSE в ефективності зсуву рамки шляхом введення різних мутацій в РНК. Одне з перших в історії досліджень геному SARS-CoV-1 продемонструвало різке зниження кількості пп1ab після мутації в регіоні SS в порівнянні з диким типом, таким чином підтверджуючи, що гептануклеотидна послідовність дійсно стимулює фреймшифт [30]. Як показали Varanov *et al*, навіть одноточкові мутації всередині SS у кодоні, що відповідає або Р-, або А-сайту, зменшували зсув рамки до фонового рівня. Це ж дослідження не показало суттєвих відмінностей в ефективності зсуву рамки викликаних мутаціями нуклеотидів спейсерної області, що свідчить про те, що її ідентичність не є критичною для процесу [31]. Довжина спейсера, навпаки, відіграє важливу роль у створенні напруги в ПК при вході в рибосому [32].

Мутації в область РК зазвичай вносилися окремо до кожного стовбуру. Stem 1 важливий для -1 PRF: його повне руйнування призвело до падіння ефективності зсуву рамки до рівня фреймшифту на SS без будь-яких стимуляторів нижче. У реставрованих мутантах «з ланцюгами навпаки» – з поміняними парами основ, тобто G-C стає C-G, рівень зсуву рамки піднявся назад до рівня дикого типу у разі зміни нижньої частини стовбура, перевищивши його у випадку всього стовбура [31], [33]. Примітно, що після відновлення Stem 1 шляхом «інверсії стовбура», яка перевпорядкувала пари основ у стовбурі зверху вниз, рівень фреймшифту залишався поблизу фонових рівнів, що свідчить про те, що не тільки структура, але й послідовність Stem 1 відіграє вирішальну роль у -1 PRF [31]. Аналогічні спостереження були зроблені і щодо Stem 2: його руйнування аналогічно призвело до різкого зниження рівня зсуву рамки. У той час як відновлення методом «зміною ланцюгів» призвело до підвищення рівня фреймшифту до рівня дикого типу у двох дослідженнях [31], [33], інше не виявило жодного підвищення рівня -1 PRF при такому спаровуванні основ [10]. Однак це можна пояснити подовженням Stem 2 в останній роботі, що викликає зміни в нижній частині стовбура, що само по собі спричиняє вплив на -1 PRF [10], [31]. Нагадуючи ситуацію із Stem 1, Stem 2, відновлений за допомогою «інверсії стовбура», показав низький рівень фреймшифту [31]. Точна роль Stem 3 у -1 PRF ще не визначена. Його видалення призводило до середнього зниження або навіть збільшення рівня зсуву рамки зчитування в залежності від довжини області, що видаляється. Його порушення призвело до зменшення зсуву рамки на 40-90 % залежно від дослідження. Реставрований мутант показав загальне збільшення фреймшифту, досягнувши від 60 до 100 % від рівня дикого типу у різних дослідженнях [10], [31], [33]. Крім того, була показана здатність РК утворювати димери за допомогою поцілункової взаємодії петля-петля в області Loop 2. Мовчазні мутації, спрямовані на порушення здатності до димеризації, призвели до зниження рівня зсуву рамки, що свідчить про наявність димеризації в клітинному контексті [34]. Гіпотеза Huston *et al*

висуває припущення, що Stem 3 може функціонувати як перемикач: коли він формується, відбувається зсув рамки, але в більшості випадків це не так, і тому зсув рамки не відбувається [25]. Аналогічні висновки були зроблені Pekarek *et al* після вивчення ефективності фреймшифту при різній довжині FSE SARS-CoV-2 [27]. Результати свідчать про можливість співіснування РНК-структур, які функціонують разом, щоб регулювати ефективність -1 PRF. Спільною структурною рисою, спільною для Stems 2 і 3, є наявність опуклого А-нуклеотиду. Обидва вони є критичними для -1 PRF, оскільки їхня одноточкова мутація призвела до значного зниження рівня зсуву рамки (> 94 % для мутанта Stem 2 і 26 % для Stem 3) [10]. Цей висновок підтверджується порівнянням двох реставрованих мутантів Stem 3: той, що не має опуклого А, показав незначне збільшення фреймшифту в порівнянні з мутантом, в якому порушується Stem 3, в той час як мутант з відновленим А майже досяг рівня фреймшифту дикого типу [31]. Важливість опуклості можна пояснити її участю у формуванні третинної структури [35].

Незважаючи на кількісні відмінності між дослідженнями, які, ймовірно, пов'язані з різними експериментальними умовами аналізів, консенсус полягає в тому, що роль Stem 3 значно відрізняється і не така однозначна, як у Stems 1 і 2. Цей висновок ґрунтується на спостереженні, що його повне видалення не призвело до значного зниження ефективності зсуву кадру і що його порушення викликало менш виражений ефект у порівнянні з двома іншими стовбурами [10], [31], [33].

Мутації в att HP, розташованій у 5'-напрямку від SS, також викликали зміни рівня фреймшифту. Її порушення призвело до підвищення рівня зсуву кадру. І навпаки, стабілізація шпильки призвела до зменшення рівня зсуву рамки. Введення додаткових нуклеотидів між SS і att HP також пригнічувало її атенюаторну активність [20].

Дослідження Kelly *et al* довело функціональне збереження між SARS-CoV-1 та SARS-CoV-2 FSE. Серія мутацій була застосована до різних частин елемента, що демонструють схожі ефекти для обох вірусів [6].

### 1.3. Таргетинг FSE

Не тільки зміни послідовності і структури РНК призводять до зменшення зсуву рамки. Дослідження SARS-CoV-1 та SARS-CoV-2 показали значне зменшення рівня фреймшифту, спричинене малими органічними молекулами [5], [7], [36], [37], антисмисловими пептидними нуклеїновими кислотами [38], антисмисловими олігонуклеотидами [22], [27] та химерами, що націлені на рибонуклеази [39]. Кілька факторів роблять FSE особливо хорошою мішенню для ліків. По-перше, невідомі випадки -1 PRF, що пропагується тристовбуровою структурою РК у клітинних мРНК хазяїна. Крім того, регіон FSE дуже консервативний, тому навряд чи буде мутувати, щоб уникнути взаємодії з лікарськими засобами. Нарешті, структура РК досить складна, щоб містити чітко виражені кишені зв'язування [40].

Пошук малих молекул, націлених на РНК, по суті, є пошуком молекул, що можуть зв'язуватись з РНК. Методи, орієнтовані на пошук лігандів, що зв'язуються з однією або кількома мішенями, називаються target-centric (направлені на мішень) [41]. До таких методів належать, наприклад, мас-спектрометрія афінного відбору [42], різноманітні аналізи на основі флуоресценції [43], [44], скринінг на основі мікрочипів [45], скринінг на основі фрагментів, включаючи ЯМР-скринінг [9].

#### 1.3.1. ЯМР-скринінг

Попередні скринінгові дослідження на основі ЯМР дозволили ідентифікувати хіти для різних РНК-мішеней [9], [46], [47], [48]. 15 конструктів РНК SARS-CoV-2, включаючи att NP і РК, були перевірені на бібліотеці з 768 фрагментів Sreeramulu *et al* [9]. Для РК було виявлено одинадцять хітів, вісім з яких були використані в даній роботі для скринінгу SARS-CoV-1 РК69.

У цій роботі для ідентифікації фрагментів, що зв'язуються, було застосовано три типи  $^1\text{H}$  ЯМР-експериментів: 1D  $^1\text{H}$  з пригніченням води SOGGY (Solvent-Optimized double Gradient Spectroscopy), waterLOGSY та CPMG  $T_2$ -релаксація. Оскільки в даних скринінгових експериментах детектуються сигнали ліганду,

всі описані експерименти проводяться при його значному надлишку (у 20-100 разів) [49].

**Спектри 1D  $^1\text{H}$**  вимірюються для виявлення збурень хімічного зсуву (CSP, англ. chemical shift perturbations) або розширення ліній (LB, англ. line broadening), які виникають через зв'язування лігандів з молекулою цільової РНК. Хімічний зсув є важливим параметром для опису зв'язування, оскільки він залежить від хімічного оточення ліганду. Однак хибнопозитивні результати можуть виникати на тлі великого надлишку ліганду. Тому висновки не можуть бути зроблені виключно на основі результатів 1D експериментів [50].

**Експеримент waterLOGSY** базується на вимірюванні ядерного ефекту Оверхаузера (NOE) між водою і лігандом. Якщо між водою і вільним лігандом еволюціонує NOE, то виникне невеликий негативний сумарний ефект (відносно початкової намагніченості води). У разі зв'язаного ліганду з'являється позитивний ефект. В результаті речовини, що зв'язуються, показують позитивні сигнали, в той час як сполуки, які не зв'язуються з мішенню, показують негативні сигнали. Метод відрізняється високою чутливістю і дозволяє визначати речовини, що зв'язуються, шляхом простого візуального аналізу спектрів [50], [51].

**$T_2$ -релаксація на основі CPMG** заснована на різниці часу релаксації  $T_2$  між молекулою вільного і зв'язаного ліганду. Малі молекули як ліганди релаксують повільно (довгий  $T_2$ , шкала секунд), тоді як великі біомолекули релаксують швидко (короткий  $T_2$ , шкала мілісекунд). Метод заснований на тому, що зв'язаний ліганд змінює свою релаксаційну поведінку і демонструє менший час релаксації  $T_2$  в порівнянні з вільною молекулою [49], [52].

## 2. Матеріали і методи

### 2.1. Матеріали

#### Хімічні речовини.

3-(N-морфоліно)пропансульфонова кислота (MOPS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG
Агар	Carl Roth GmbH & Co. KG
Агароза	Carl Roth GmbH & Co. KG
Акриламід/Бісакриламід (29:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ампіцилін	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ацетат калію (KOAc)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ацетат магнію (Mg(OAc) <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ацетат натрію (NaOAc)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ацетон	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Борна кислота	Carl Roth GmbH & Co. KG
Бромфеноловий синій	Carl Roth GmbH & Co. KG
Гідроксид натрію (NaOH)	AppliChem GmbH
Гідроортофосфат калію (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Гліцерин	Carl Roth GmbH & Co. KG
Дигідроортофосфат калію (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Диметилсульфоксид (DMCO)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Диметилсульфоксид-d6 (DMCO-d6)	Deutero GmbH
Дитіотреїтол (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Додецилсульфат натрію (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Екстракт дріжджів	Carl Roth GmbH & Co. KG
Етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Етиловий спирт (EtOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ізопропіловий спирт (iPrOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ксилен цианол	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Нуклеотиди, <sup>15</sup> N-мічені (rNTPs <sup>15</sup> N)	Silantes GmbH
Нуклеотиди, природний вміст ізотопів (rNTPs n.a.)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Оксид дейтерію (D <sub>2</sub> O)	Deutero GmbH
Оцтова кислота	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Персульфат амонію (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Перхлорат літію (LiClO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG
Подвійно дистильована вода (ddH <sub>2</sub> O)	Власне виробництво
Сечовина	Carl Roth GmbH & Co. KG
Спермідин	Carl Roth GmbH & Co. KG
Суміш дезоксинуклеотидів, розчин (dNTP)	New England Biolabs
Тетраметилетилендіамін (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Триметилсилілпропансульфонат натрію (DSS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Триптон	Carl Roth GmbH & Co. KG
Трис(гідроксиметил)амінометан (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Фенол:Хлороформ:Ізоаміловий спирт (25:24:1, v/v) (PCI)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Формахід	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Хлорид калію (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Хлорид магнію (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG
Хлорид натрію (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Хлоридна кислота (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Хлороформ	Carl Roth GmbH & Co. KG
<b>Клітини та ферменти.</b>	
Клітини DH5α <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	New England Biolabs
HindIII-HF®	New England Biolabs
Phusion® High Fidelity ДНК-полімераза	New England Biolabs
Invitrogen™ PureLink™ рибонуклеаза А	Fisher Scientific GmbH

T7 РНК-полімераза	Власне виробництво
Yeast Inorganic Pyrophosphatase Phosphate (YIPP)	Власне виробництво

### **Розчини та середовища.**

Усі розчини та середовища приготовані в ddH<sub>2</sub>O, якщо не вказано інше.

#### Середовища.

SOC середовище	2 % w/v триптон, 0,5 % w/v екстракт дріжджів, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM глюкоза (Fisher Scientific GmbH)
LB середовище	1 % w/v триптон, 0,5 % w/v екстракт дріжджів, 1 % w/v NaCl (Carl Roth GmbH & Co. KG)
LB-агар	1,5 % w/v агар в LB середовищі
SB середовище	3,5 % w/v триптон, 2,0 % w/v екстракт дріжджів, 0,5 % w/v NaCl, 0,005 M NaOH

#### Буферні розчини для приготування шаблону ДНК.

P1 буферний розчин	50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 мг/л рибонуклеаза А, pH 8,0
P2 буферний розчин	200 mM NaOH, 1 % w/v SDS
P3 буферний розчин	3 M KOAc, pH 5,5
QBT буферний розчин	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15 % v/v iPrOH, 0,15 % v/v Triton X-100, pH 7,0
QC буферний розчин	1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % v/v iPrOH, pH 7,0
QF буферний розчин	1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 15 % v/v iPrOH, pH 8,5
10x CutSmart®	New England Biolabs
5x Phusion® HF Buffer	New Englan Biolabs

#### Розчини для гель-електрофорезу.

ТА буферний розчин	50 mM Tris, 100 mM NaOAc, pH 8,2
TBE буферний розчин	90 mM Tris, 90 mM борна кислота, 2 mM EDTA

ТАЕ буферний розчин	40 mM Tris, 20 mM оцтова кислота, 1 mM ЕДТА
12 % денатуруючий поліакриламідний гель	12 % v/v Акриламід/Бісакриламід, 7 М сечовина в ТВЕ буферному розчині
12 % нативний поліакриламідний гель	12 % v/v Акриламід/Бісакриламід в ТА буферному розчині
6 % нативний поліакриламідний гель	6 % v/v Акриламід/Бісакриламід в ТАЕ буферному розчині
0.8 % агарозний гель	0.8 % w/v агароза в ТАЕ буферному розчині
Low Molecular Weight DNA Ladder	New England Biolabs
Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder	New England Biolabs
Завантажувальний барвник для РНК	0,25 % w/v бромфеноловий синій, 0,25 % w/v ксилен цианол у формаміді
6x Gel Loading Dye, Purple – завантажувальний барвник для ДНК	New England Biolabs
GelRed® фарбувальний розчин	0,1 % v/v GelRed® (Carl Roth GmbH & Co. KG)
StainsAll фарбувальний розчин	0,01 % StainsAll (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 30 % iPrOH, 15 mM Tris-ацетат, pH 8,5
<u>Розчини для приготування РНК.</u>	
5x транскрипційний буфер	500 mM Tris/глутамат, pH 8,1
ЯМР буфер	25 mM KPi, 50 mM KCl, pH 6,2

### **Біомолекулярні конструкти.**

Плазміди. Плазміди для подальшого транскрибування РНК були розроблені та придбані у GenScript. Як РК69, так і РК84 містили рибозим вірусу гепатиту

дельта (HDV) різної довжини, який служить для створення однорідного 3'-кінця. *In vitro* транскрипція (IVT) за допомогою T7-полімерази вимагає наявності декількох G-залишків на 5'-кінці послідовності РНК, що призвело до включення одного штучного G-нуклеотиду в послідовність РК69 і використання рибозиму hammerhead (НН) для РК84 (Рисунок 2.1).

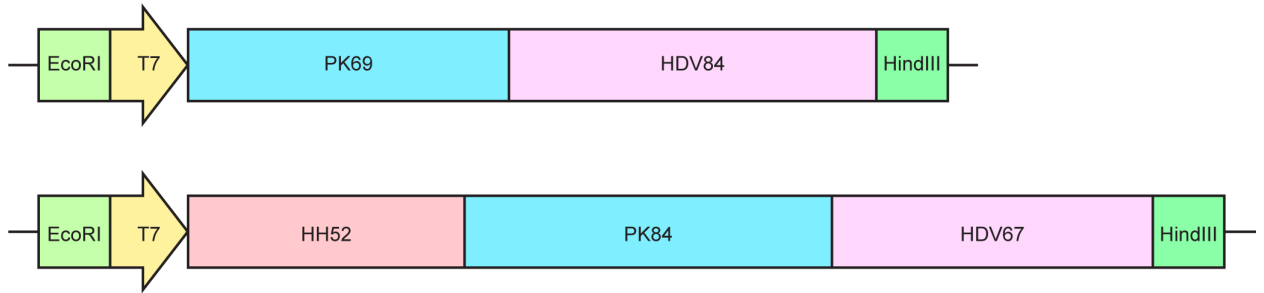


Рисунок 2.1 – Релевантні для цієї роботи регіони плазмід, використаних для подальшої транскрипції. На схемі показані рестрикційні сайти (EcoRI і HindIII), T7-промотор, рибозими (НН і HDV) і РНК конструкти, що представляють інтерес.

Праймери. Для ампліфікації ДНК РК84 на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) праймери були придбані в Eurofins Genomics (Таблиця 2.1). Послідовність прямого праймера відповідає послідовностям EcoRI, T7-промотора і перших трьох нуклеотидів НН-рибозиму. Комплементарний до 3'-кінця РК84 зворотний праймер, був розроблений у двох варіантах: 2'-дезоксі та 2'-ОМе.

Таблиця 2.1 – Праймери, що використовуються в ПЛР для виготовлення ДНК-матриці РК84.

Тип праймеру	Послідовність	Температура плавлення, °C
Прямий	5' GAATTCTAATACGACTCACTATAGGG 3'	60.1
Зворотний 2'-дезоксі	5' AAAAGCCCTGTAGACGACATCAGTAC 3'	63.2
Зворотний 2'-ОМе	5' [2OMeA][2OMeA]AAGCCCTGTAGACGAC ATCAGTAC 3'	63.2

РНК. У цій роботі було досліджено три РНК конструкти (Таблиця 2.2). РК69 і РК84 були підготовлені за допомогою IVT під час цієї роботи, а Stem 2' був придбаний у Dharmason.

Таблиця 2.2 – Огляд РНК-конструкцій, використаних у даній роботі.

Конструкт	Послідовність	Довжина, nt	Молярний коефіцієнт екстинкції $\epsilon_{260}$ , [1/(mM*mm)]
PK69	gGCGGUGUAAGUGCAG CCCGUCUUACACCGUG CGGCACAGGCACUAGU ACUGAUGUCGUCUACA GGGCU	69	629.0
PK84	UUUAAACGGGUUUGC GGUGUAAGUGCAGCCC GUCUUACACCGUGCGG CACAGGCACUAGUACU GAUGUCGUCUACAGG GCUUUU	84	995.2
Stem 2'	ACGGGUUUGCuugcGCA GCCCGU	23	211.7

## 2.2. Методи

### 2.2.1. Підготовка РНК

#### 2.2.1.1. Перетворення плазмід

50 мкл компетентних клітин DH5 $\alpha$  *E.coli* було розморожено на льоду, після чого до них було додано 15 мкл (близько 90 нг) плазмідної ДНК. Суміш було інкубовано на льоду протягом 30 хв, а потім піддано тепловому шоку при температурі 42 °C протягом 30 с. Ще через 5 хв на льоду було додано 950 мкл середовища SOC кімнатної температури, і суміш далі було струшено при 37 °C і 120 об/хв протягом 1 год. 100 мкл нерозбавлених, а також 10х-, 25х- і 50х-

розведених клітин було розподілено на чотири різні LB-агарові чашки, що містили ампіцилін. Чашки було інкубовано при температурі 37 °C протягом ночі.

### **2.2.1.2. Ампліфікація плазмід за допомогою бактеріальної культури *E. coli***

Початкову культуру було розпочато шляхом відбору однієї колонії з чашки LB-агару та перенесення її до 50 мл середовища LB, що містило 50 мкл 100 мкг/мл ампіциліну. Культуру було інкубовано при температурі 37 °C і 160 об/хв протягом 12 год. Для вирощування основної культури до 1 л середовища SB, що містить 1 мл 100 мкг/мл ампіциліну, було додано 10 мл стартової культури. Основну культуру було інкубовано при температурі 37 °C і 120 об/хв протягом 12-16 год. Після інкубації культуру було центрифуговано при 4000 об/хв і 4 °C протягом 1 год. Виділення плазмід проведено за допомогою колонки NucleoBond™ PC 10000 EF (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG). Отриманий клітинний осад було суспендовано в 120 мл буфера P1. Згодом до суспензії було додано 120 мл буфера P2, і перемішано, перевертаючи ємність 8 разів. Далі суміш було інкубовано при кімнатній температурі протягом 5 хв. Попередньо охолоджений до 4 °C буфер P3 було додано до суміші, що була послідовно перемішана та інкубована на льоду протягом 30 хв. Для видалення осаду з лізату суміш було центрифуговано при 4000 об/хв і 4 °C протягом 1 год. Колонка NucleoBond™ була врівноважена 100 мл QBT-буфера і до неї було завантажено очищений лізат. Колонку було двічі промито 100 мл буфера QC, та елюйовано ДНК за допомогою 100 мл попередньо нагрітого до 65 °C буфера QF. Плазмід було осаджено з розчину додаванням 0,7 об'ємів іPrOH з подальшим центрифугуванням при 8500 об/хв і 4 °C протягом 50 хв. Після висушування осаду ДНК на повітрі протягом 15 хв, його було розчинено в 1,4 мл ddH<sub>2</sub>O.

### **2.2.1.3. Лінеаризація плазмід**

Лінеаризацію плазмід було проведено за допомогою ферменту HindIII в об'ємі 2400 мкл, що містив 240 мкл 10x буфера CutSmart, 40 мкл ферменту

рестрикції та відповідну кількість розчину плазмід. Реакційну суміш було інкубовано протягом ночі при температурі 37 °С.

#### **2.2.1.4. Екстракція з використанням РСІ**

Для очищення плазмід від ферменту рестрикції було використано суміш РСІ. До реакційної суміші було додано один об'єм РСІ. Отриману двофазну суміш було енергійно перемішано та центрифуговано при 8300 об/хв протягом 10 хв, щоб розділити фази. Потім водну фазу було перенесено в нову ємність і екстракцію повторено. Ще один етап екстракції хлороформом було проведено для усунення слідів фенолу. До водної фази було додано 240 мкл 3 М NaOAc з подальшим додаванням 1,8 мл iPrOH та інкубацією при -20 °С протягом 1 год для осадження. Суміш було центрифуговано при 8500 об/хв і 4 °С протягом 50 хв. Після цього осад було промито 5 мл 70% EtOH і знову центрифуговано при 8500 об/хв і 4 °С протягом 15 хв. Осад було висушено на повітрі протягом 10 хв, потім розчинено в 500 мкл ddH<sub>2</sub>O. Концентрацію отриманої ДНК було виміряно. Для перевірки ефективності лінеаризації було проведено агарозний гель-електрофорез.

#### **2.2.1.5. Температурна денатурація фермента**

Як було помічено під час підготовки матриці ДНК РК69, РСІ екстракція призвела до значної втрати продукту. У зв'язку з цим було прийнято рішення деактивувати фермент нагріванням замість РСІ екстракції. Реакційна суміш нагрівалась до 80 °С протягом 20 хв, як рекомендував виробник [53]. Наступні дії були виконані так само, як і після РСІ екстракції.

#### **2.2.1.6. Ампліфікація плазмід методом ПЛР**

Для ампліфікації плазмід методом ПЛР придбану плазмиду було трансформовано в компетентні клітини DH5α *E.coli* і розмножено бактеріальною культурою, як описано вище. Плазміда не була лінеаризована і використовувалася в циркулярній формі.

ПЛР було проведено в невеликих об'ємах (50 мкл) у 14 ПЛР-пробірках. Компоненти реакції та їх концентрації перераховані у Таблиці 2.3. Послідовності і температури плавлення праймерів наведені в Таблиці 2.1.

Таблиця 2.3 – Компоненти ПЛР.

Компонент	Фінальна концентрація
5x Phusion® HF buffer	1x
Плазміда	2 нг/мкл
Прямий праймер	0.5 мкМ
Зворотній праймер	0.5 мкМ
dNTP mix	0.2 мМ
Phusion® High Fidelity DNA Polymerase	0.8 одиниць/50 мкл

Реакцію було проведено в Biometra® Tone Thermocycler за схемою на Рисунок 2.2. Початковий етап денатурації, перша стадія ПЛР, передбачає нагрівання реакційної суміші до 98 °С протягом 5 хв. Друга стадія ПЛР, що включає три температурні етапи, повторюється 32 рази за цикл. Спочатку реакційна суміш витримується при температурі 98 °С протягом 10 сек для денатурації дволанцюгової матриці ДНК. Згодом температура знижується, щоб дозволити праймерам спаруватись з окремими ланцюгами ДНК. Температура відпалу обирається відповідно до температури плавлення праймерів. Перед повномасштабною ПЛР було проведено оптимізацію температури відпалу в діапазоні від 52,9 °С до 65,8 °С. На завершальному етапі циклу температура підвищується до 72 °С і підтримується протягом 30 секунд. На цьому етапі елонгації новий ланцюг ДНК синтезується шляхом додавання dNTP до праймера, комплементарного до матриці ДНК. Після заключного циклу реакційна суміш витримується при температурі 72 °С протягом 5 хв, за цей час відбувається процес остаточного подовження. Після закінчення ампліфікації суміш зберігається в термоциклері при температурі 4 °С протягом короткого часу.

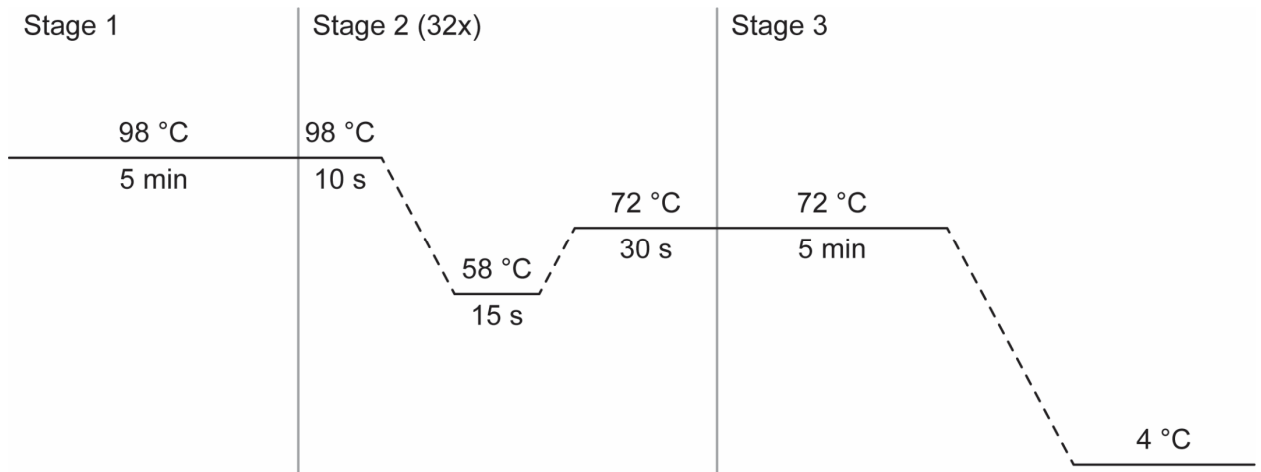


Рисунок 2.2 – Схема термоциклера ПЛР.

### 2.2.1.7. *In vitro* транскрипція

IVT проводили в об'ємі 15 мл з лінеаризованою плазмідною або ПЛР-продуктом в якості ДНК-матриці. Реакційні суміші було інкубовано протягом 12-16 год при температурі 37 °C і слабкому струшуванні 60 об/хв. Компоненти реакції перераховані в Таблиці 2.4. ДМСО додавали лише у випадку ДНК, виробленої методом ПЛР. Концентрація ДНК-матриці вказується в нг/мкл для лінеаризованої плазмиди або у % v/v для продукту ПЛР. YIPR додавали через 1-2 год інкубації при видимому помутнінні суміші.

Перед проведенням повномасштабної IVT було проведено тестові транскрипції (ТТ) для визначення оптимальних концентрацій Mg(OAc)<sub>2</sub>, ДМСО, NTP та ДНК-матриці для кожного конструкту РНК.

Таблиця 2.4 – Компоненти IVT .

Компонент	Фінальна концентрація
5x транскрипційний буфер	1x
Mg(OAc) <sub>2</sub>	0-60 мМ
DTT	20 мМ
Спермідин	2 мМ
ДМСО	0-20 %
NTPs	8-16 мМ
ДНК-матриця	50 нг/мкл або 2-6 % v/v

T7 полімераза	64 мкг/мл
YIPР	9.6 мкг/мкл

### 2.2.1.8. Очищення РНК

Різні конструкти РНК було очищено дещо по-різному залежно від методу підготовки ДНК-матриці. Суміш IVT, що містить ДМСО, було сконцентровано за допомогою центрифужного концентратора Vivaspin® 20 Centrifugal Concentrator Polyethersulfone (Sartorius AG) з перерізом мембрани (MWCO) 5 кДа перед завантаженням на препаративний поліакриламідний гель-електрофорез. До реакційної суміші без ДМСО в ній було додано 3 мл 0,5 М ЕДТА і 0,18 мл 3 М NaOAc до осадження з 20 мл iPrOH при -20 °C протягом 2 год. Зразок було центрифужовано при 8500 об/хв і 4 °C протягом 1 год. Осад було промито 10 мл 70 % EtOH для видалення солей і знову центрифужовано при 8500 об/хв і 4 °C протягом 15 хв. Після висушування осаду на повітрі його було розчинено в ddH<sub>2</sub>O. Відділення РНК було проведено з використанням препаративного поліакриламідного гель-електрофорезу. Смуга РНК, що представляє інтерес, була візуалізована під ультрафіолетовим світлом, вирізана скальпелем і гранульована. Елюювання РНК з гелю було проведено з 0,3 М NaOAc шляхом інкубації зразка при температурі -70 °C протягом 30 хв з подальшим нагріванням до 65 °C протягом 15 хв і подальшим струшуванням при 1300 об/хв протягом ночі. Шматочки гелю було видалено стерильною фільтрацією, а процедуру елюювання проведено ще раз з коротшим часом струшування – 1 год. РНК з елюату було осаджено додаванням 4 об'ємів EtOH і зберіганням при температурі -70 °C протягом ночі. Після цього суміш було центрифужовано при 8500 об/хв і 4 °C протягом 1 год. Після сушіння на повітрі осад було розчинено в ddH<sub>2</sub>O. Для видалення залишків поліакриламідну було проведено очищення методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC). Після HPLC зразок було ліофілізовано, розчинено в 500 мкл ddH<sub>2</sub>O та осаджено додаванням 2,5 мл 2 % w/v LiClO<sub>4</sub> в ацетоні та подальшою інкубацією при -

20 °C протягом 2 год. Суміш було центрифуговано при 8500 об/хв і 4 °C протягом 1 год. Отриманий осад РНК було розчинено в ЯМР-буфері.

### **2.2.1.9. Підготовка ЯМР зразків**

Для видалення слідів ацетону РНК було промито і сконцентровано у ЯМР-буфері за допомогою центрифужного концентратора 2 mL Vivaspin® 2 Centrifugal Concentrator Polyethersulfone (Sartorius AG) з MWCO 5 кДа для РК69 і РК84 та MWCO 2 кДа для конструкта Stem 2'. Було використано два різні методи згортання РНК: миттєве охолодження (snap-cooling) та повільне охолодження (slow-cooling). Перший передбачав нагрівання зразка до 95 °C протягом 30 с і його швидке охолодження на льоду протягом 10 хв. На противагу цьому, протокол повільного охолодження передбачав охолодження зразка при кімнатній температурі після етапу нагрівання. Ефективність згортання перевіряли за допомогою нативного поліакриламідного геле-електрофорезу. Кожен зразок ЯМР, за винятком скринінгових зразків, був підготовлений з використанням 7,5 % v/v D<sub>2</sub>O в якості розчинника лока, 10 мкМ DSS як внутрішнього стандарту та відповідної кількості РНК у ЯМР-буфері. Кінцевий об'єм зразку становив 280 мкл. Зразки були перенесені в 5-мм ампули Shigemi.

## **2.2.2. Гель-електрофорез**

### **2.2.2.1. Агарозний гель-електрофорез**

Для перевірки ефективності лінеаризації плазмиди було використано агарозний гель-електрофорез. Для приготування гелю було задіяно 0,8 % розчин агарози в буфері ТАЕ. В одну ланку гелю було завантажено зразок об'ємом 3 мкл, що містив 20-30 нг ДНК у розчині 1:2 ddH<sub>2</sub>O/завантажувальний буферний розчин. Як еталон було використано маркер Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs). Електрофорез було проведено при постійній напрузі 120 В протягом 1 год з ТАЕ в якості робочого буфера. Візуалізацію гелю було проведено розчином GelRed.

### 2.2.2.2. Денатуруючий поліакриламідний гель-електрофорез

Для аналізу та очищення РНК проводився денатуруючий поліакриламідний гель-електрофорез. Для приготування гелю було використано 12 % розчин акриламіду/бісакриламіду з 7 М сечовиною в буфері ТВЕ. Для полімеризації поліакриламідного гелю будь-якої концентрації було додано 1 мкл/мл TEMED і 10 мкл/мл APS. В якості робочого буфера використовувався ТВЕ. Поліакриламідний гель-електрофорез виконувався як в аналітичних, так і в препаративних масштабах. Зразок РНК для аналітичного електрофорезу містив приблизно 2 пмоль РНК у завантажувальному буфері. Його проводили при постійній напрузі 240 В протягом різного періоду часу в залежності від довжини аналізованого конструкту РНК. Розчин GelRed використовувався для візуалізації аналітичних гелів. Зразок РНК для препаративного гель-електрофорезу містив РНК у розчині 1:1 ddH<sub>2</sub>O/формаїд. Його проводили під постійною напругою 260 В протягом різного періоду часу, залежно від довжини конструкта РНК, що очищається. Препаративний гель було візуалізовано за допомогою ультрафіолетового світла.

### 2.2.2.3. Нативний поліакриламідний гель-електрофорез

Для того, щоб перевірити згортання РНК, було виконано нативний поліакриламідний гель-електрофорез. Для приготування гелю було використано 12 % розчин акриламіду/бісакриламіду в буфері ТА. Для порівнянності зі зразком ЯМР на гель було завантажено 6 мкл зразок, що містить 250 пмоль РНК в 10 % розчині гліцерину. Експеримент проводився при постійній напрузі 35 В протягом 6 год з водяним охолодженням, з ТА в якості робочого буфера. Візуалізацію гелю проводили за допомогою ультрафіолетового світла та розчину StainsAll.

Для аналізу тестових ПЛР-продуктів було проведено нативний 6 % поліакриламідний гель-електрофорез. Зразок містив 0,25 мкл реакційної суміші ПЛР з 1 мкл завантажувального буферу 6x Purple Gel Loading Dye (New England Biolabs) в об'ємі 6 мкл. Як еталон був використаний маркер Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs). Експеримент проводився

при постійній напрузі 120 В, з ТАЕ в якості робочого буфера. Візуалізацію гелю проводили за допомогою розчину GelRed.

### 2.2.3. Визначення концентрації нуклеїнових кислот

Концентрації нуклеїнових кислот визначалися вимірюванням поглинання при 260 нм використовуючи NanoDrop One (Fisher Scientific GmbH). Перед вимірюванням поглинання зразку нуклеїнової кислоти, проводилося бланкування за допомогою відповідного розчинника. Концентрація розраховується відповідно до закону Бугера-Ламберта-Бера (1), де  $A$  – поглинання,  $\varepsilon$  – молярний коефіцієнт екстинкції РНК,  $l$  – довжина оптичного шляху,  $l = 1$  мм,  $c$  – концентрація РНК. Молярні коефіцієнти екстинкції для кожного конструкта РНК наведені в Таблиці 2.2.

$$A = \varepsilon lc \rightarrow c = \frac{A}{\varepsilon l} \quad (1)$$

### 2.2.4. ЯМР-спектроскопія

#### 2.2.4.1. Спектрометри

Експерименти ЯМР у цій роботі вимірювалися на різних спектрометрах, які перелічені в Таблиці 2.5. Дані були оброблені та проаналізовані за допомогою TopSpin (версія 4.3.0, Bruker) та Sparky [54].

Таблиця 2.5 – ЯМР-спектрометри, використані для цього дослідження.

Спектрометр	Частота поля, МГц	Датчик
Bruker AV600 NEO	600	1.7 mm TCI cryo $^1\text{H}$ [ $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ ] Z-GRD
Bruker AVII 600	600	5 mm TCI cryo $^1\text{H}$ [ $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ ] Z-GRD
Bruker AVIII 600 HD	600	5 mm TCI Prodigy $^1\text{H}$ [ $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ ] Z-GRD
Bruker AVIII 700 HD	700	5 mm QCI cryo $^1\text{H}$ [ $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ , $^{31}\text{P}$ ] Z-GRD
Bruker AVIII 950	950	5 mm TCI cryo $^1\text{H}$ [ $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ ] Z-GRD

### 2.2.4.2. Скринінг

Для ЯМР-скринінгу на основі фрагментів було підготовлено два набори зразків: 250 мкМ ліганду в ЯМР-буфері та 5 % ДМСО-d6 в якості розчинника лока з додаванням та без додавання 10 мкМ цільової РНК. Вимірювання ЯМР проводили в ампулах ЯМР діаметром 1,7 мм при 298 К.

Кількісна оцінка експерименту waterLOGSY полягала в розрахунку LOGSY factor, (2). Значення  $I_{Target}$  і  $I_{Blank}$  відповідають абсолютній інтегральній інтенсивності сигналу в спектрі waterLOGSY з додаванням цільової РНК і без нього відповідно.

$$LOGSY\ factor = \left| \frac{I_{Target} - I_{Blank}}{I_{Blank}} \right| \quad (2)$$

Спад  $T_2$  релаксації розраховувався за рівнянням (3). Значення  $I^{100ms}$  і  $I^{5ms}$  дорівнюють абсолютній інтегральній інтенсивності сигналу в спектрах з  $T_2 = 100$  мс і  $T_2 = 5$  мс відповідно.

$$T_2 - reduction = \left( 1 - \frac{\frac{I_{Target}^{100ms}}{I_{Blank}^{100ms}}}{\frac{I_{Target}^{5ms}}{I_{Blank}^{5ms}}} \right) \times 100\% \quad (3)$$

### 2.2.5. Флуоресценція

Інтенсивність флуоресценції було виміряно за допомогою Tecan Spark® multimode microplate reader. Вимірювання проводилися в чорній мікроплаті при кімнатній температурі. Шістнадцять точок титрування були виміряні з постійною концентрацією лігандів 2 мкМ і поступово зростаючою концентрацією РНК від 0 до 75 мкМ. Зразки об'ємом 60 мкл було приготовано в ЯМР-буфері. Кожна точка титрування була приготована і виміряна в трьох примірниках, отримане значення інтенсивності флуоресценції нормовано.

Визначення константи дисоціації  $K_D$  проводилось побудовою графіку в координатах  $V - c_{RNA}$  відповідно до рівняння Хілла (4). У рівнянні  $V$  – інтенсивність флуоресценції,  $c_{RNA}$  – концентрація РНК,  $n$  – коефіцієнт Хілла.

$$V = V_{max} \frac{c_{RNA}^n}{c_{RNA}^n + K_D} \quad (4)$$

### 3. Результати та обговорення

#### 3.1. Підготовка РНК

##### 3.1.1. Підготовка ДНК-шаблону

ДНК-шаблони для транскрипції РНК було підготовлено двома різними методами. Спеціально закуплені плазмиди РК69 і РК84 були перетворені у компетентні клітини DH5α *E.coli* та розмножені, як описано в 2.2.1.2. Однак, вихід РНК РК84 при використанні цього методу був низьким, що спонукало перейти до ПЛР-підходу.

##### 3.1.1.1. Ампліфікація на основі кишкової палички – РК69 і РК84

Плазмиди було ампліфіковано, очищено колонкою NucleoBond™ PC 10000 EF та лінеаризовано ферментом HindIII. Виходи ДНК до та після лінеаризації наведено в Таблиці 3.1. У зв'язку з великими втратами плазмиди РК69 під час екстракції РСІ було вирішено пропустити цей етап для очищення плазмиди РК84 і виконати теплову дезактивацію ферменту, як описано в 2.2.1.5.

Таблиця 3.1 – Вихід клітинних осадів і плазмід після ампліфікації РК69 і РК84.

Плазміда	Кількість 1 л бактеріальних культур	Вихід осаду клітин, г	Вихід плазмиди до лінеаризації, мг	Вихід плазмиди після лінеаризації, мг
РК69	6	53.88	5.4	4.4
РК84	4	29.66	8.5	8.5

Для перевірки ефективності процесу лінеаризації було проведено агарозний гель-електрофорез (Рисунок 3.1). Обидві кільцеві плазмиди мігрували далі, ніж відповідні лінійні продукти. Лінеаризовані зразки не показали жодних додаткових смуг кільцевої ДНК, що вказує на високий ступінь розщеплення. Лінійна плазміда у подальшому використана для транскрипції РК69.

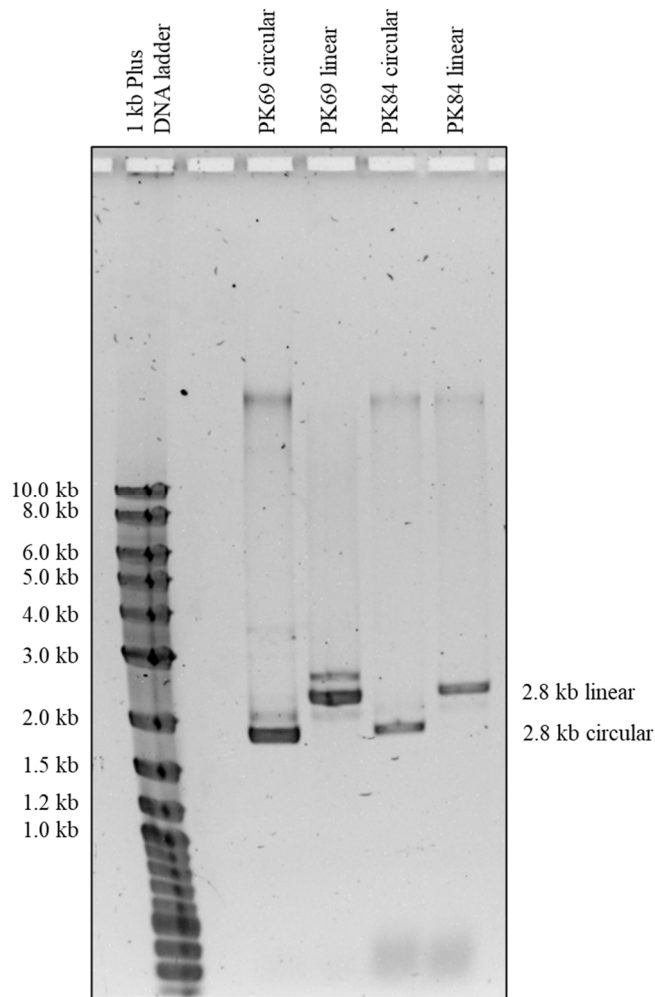


Рисунок 3.1 – Агарозний гель-електрофорез (0,8 %, 120 В, 1 год), що показує зразки ДНК РК69 і РК84 до і після лінеаризації плазмід.

### 3.1.1.2. Ампліфікація на основі ПЛР – РК84

Як зазначалося вище, метод підготовки ДНК для РК84 було змінено для покращення виходу РНК. Очікуваний вихід був досягнутий за рахунок відмови від використання рибозиму HDV. РНК РК84 було транскрибовано з олігонуклеотиду ДНК, ампліфікованого методом ПЛР. В якості шаблону було використано циклічну плазмід. Умови ПЛР було оптимізовано перед препаративною реакцією. Для забезпечення однорідності 3'-кінця через відсутність рибозиму HDV були випробувані два варіанти зворотного праймера: 2'-дезоксид і 2'-ОМе праймери. Оптимізація температури відпалу ПЛР проводилася в діапазоні від 52,9 до 65,8 °С для кожного праймера відповідно до їхніх температур плавлення (Таблиця 2.1).

Результати тесту ПЛР були проаналізовані за допомогою аналітичного поліакриламідного гель-електрофорезу (Рисунок 3.2). Продукти ПЛР з 2'-дезоксизворотнім праймером показують смугу низької інтенсивності більш високомолекулярного побічного продукту незалежно від температури, тоді як продукти 2'-ОМе зворотного праймера показують найменшу кількість побічних продуктів при середніх температурах. Для препаративної ПЛР був обраний зворотний праймер 2'-ОМе і температура відпалу 58,0 °С.

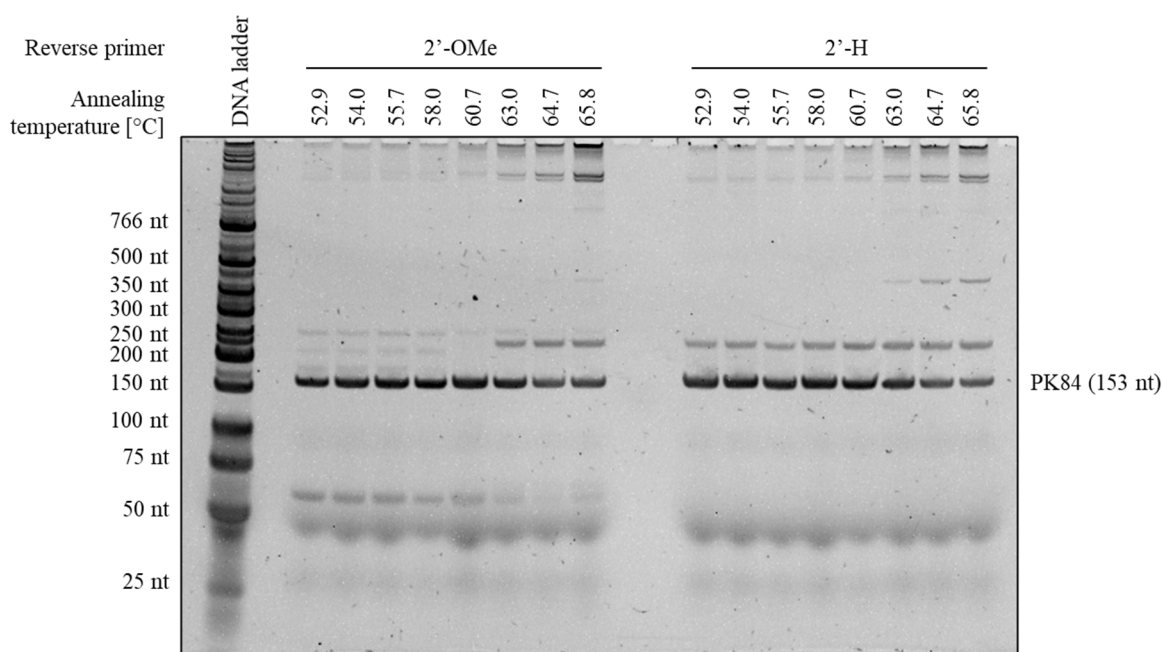


Рисунок 3.2 – Оптимізація температури відпалу ПЛР. 2'-ОМе та 2'-дезоксизворотні праймери з градієнтом температури в діапазоні від 52,9 до 65,8 °С. Аналітичний нативний поліакриламідний гель-електрофорез (6 %, 120 В, 35 хв).

### 3.1.2. IVT

Перед виконанням було оптимізовано умови 15 мл IVT. Тестові транскрипції (ТТ) було проведено у зразках по 20 мкл та інкубовано при 37 °С протягом 2 год. Для реакцій IVT на основі лінеаризованої плазмиди були оптимізовані лише концентрації  $Mg(OAc)_2$  та NTP. При використанні ПЛР-продукта як матриці ДНК, його концентрація та концентрація ДМСО також були оптимізовані.

### 3.1.2.1. Оптимізація концентрації $Mg(OAc)_2$ та NTP

Концентрація NTP варіювалася в діапазоні від 8 до 16 мМ для немічених і від 8 до 12 мМ для  $^{15}N$ -мічених зразків. Діапазон концентрації  $Mg(OAc)_2$  залежав від конструкта. Умови реакції для продукування РК69 були обрані на основі попередніх досліджень співробітниками аналогічного SARS-CoV-2 РК69, концентрація  $Mg(OAc)_2$  була оптимізована у вузькому діапазоні від 20 до 40 мМ. У випадку РК84 потрібна була більш ретельна оптимізація в діапазоні від 0 до 50 мМ.

Результати ТТ були проаналізовані за допомогою 12 % поліакриламідного гель-електрофорезу. Рисунок 3.3 показує оптимізацію умов IVT для РК69 п.а., а на Рисунку 3.4 наведені результати оптимізації для РК69  $^{15}N$ . В обох випадках найбільш інтенсивна смуга продукту спостерігається при 12 мМ NTP і 20 мМ  $Mg(OAc)_2$ .

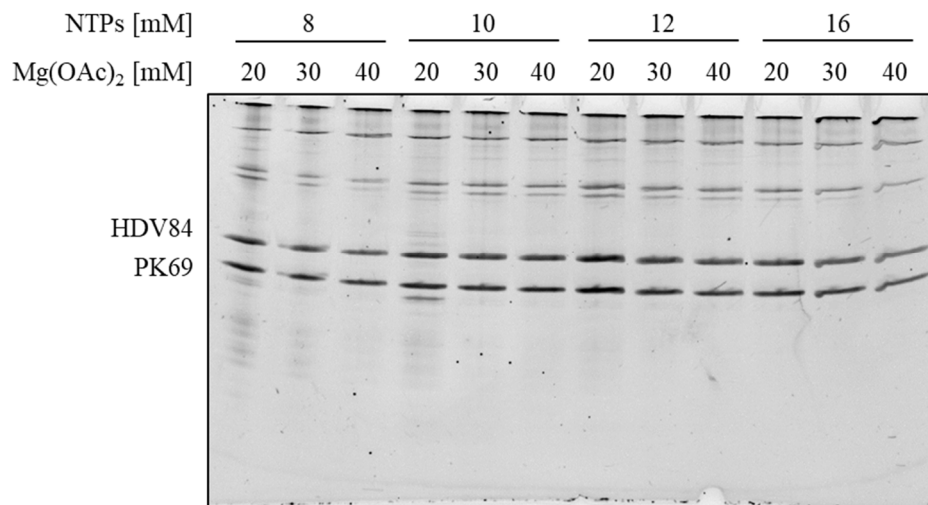


Рисунок 3.3 – Оптимізація концентрації  $Mg(OAc)_2$  і NTP для РК69 п.а. IVT.

Градiєнт концентрації  $Mg(OAc)_2$  від 20 до 40 мМ. Градiєнт сумарної концентрації NTP від 8 до 16 мМ. Аналітичний денатуруючий поліакриламідний гель-електрофорез (12 %, 240 В, 30 хв).

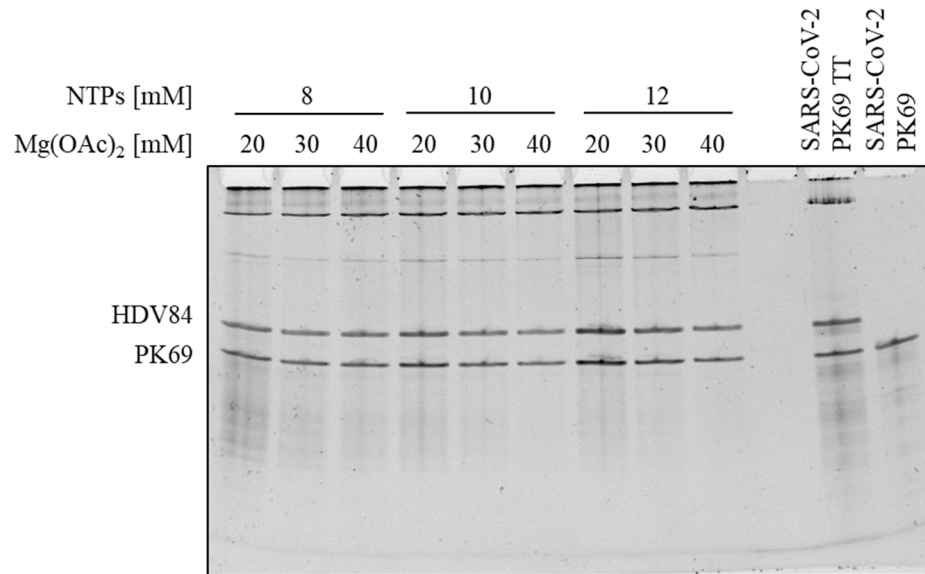


Рисунок 3.4 – Оптимізація концентрації Mg(OAc)<sub>2</sub> і NTP для PK69 <sup>15</sup>N IVT.

Градiєнт концентрації Mg(OAc)<sub>2</sub> від 20 до 40 мМ. Градiєнт сумарної концентрації NTP від 8 до 16 мМ. Аналітичний денатуруючий поліакриламідний гель-електрофорез (12 %, 240 В, 30 хв).

Оптимальними умовами для PK84 (версія з HDV) є 12 мМ NTP і 40 мМ Mg(OAc)<sub>2</sub>, як показано на Рисунку 3.5. При такій концентрації Mg(OAc)<sub>2</sub> розщеплення з рибозимом виявляється найбільш ефективним. Варто відзначити, що проміжок між смугами PK84 і HDV67 вузький, що і стало однією з причин вилучення рибозиму HDV з процесу підготовки РНК.

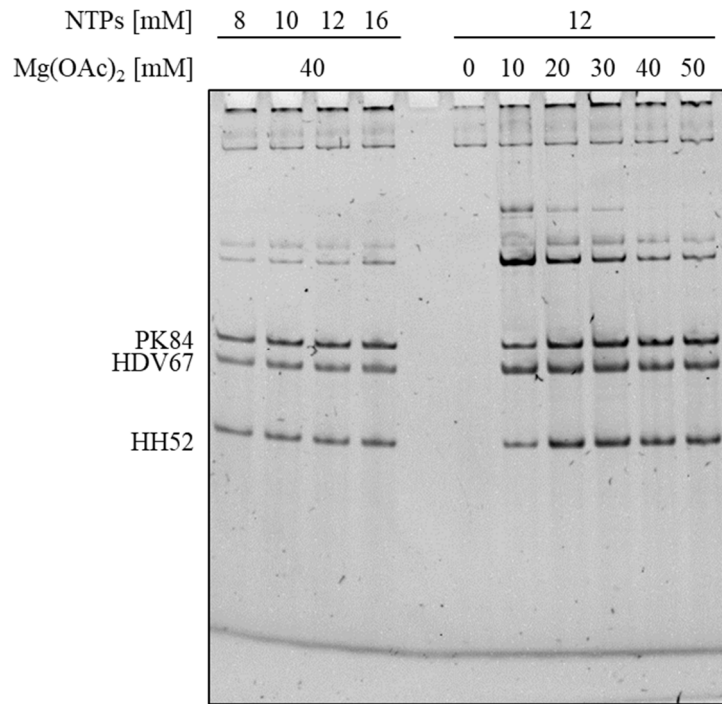


Рисунок 3.5 – Оптимізація концентрації Mg(OAc)<sub>2</sub> і NTP для РК84 (HDV) п.а.

IVT. Градієнт концентрації Mg(OAc)<sub>2</sub> від 0 до 50 мМ. Градієнт сумарної концентрації NTP від 8 до 16 мМ. Аналітичний денатуруючий поліакриламідний гель-електрофорез (12 %, 240 В, 30 хв).

Для РК84 (ПЛР версія) <sup>15</sup>N GC оптимізацію концентрацій Mg(OAc)<sub>2</sub> та NTP було проведено при постійній концентрації ДНК і ДМСО (2 % і 20 % відповідно). Концентрація Mg(OAc)<sub>2</sub> варіювалася від 10 до 40 мМ з кроком 10 мМ, виходячи з результатів оптимізації РК84 (версія з HDV). В якості оптимальних концентрацій для подальшої препаративної IVT було обрано значення 12 мМ NTP і 30 мМ Mg(OAc)<sub>2</sub> (Рисунок 3.6).

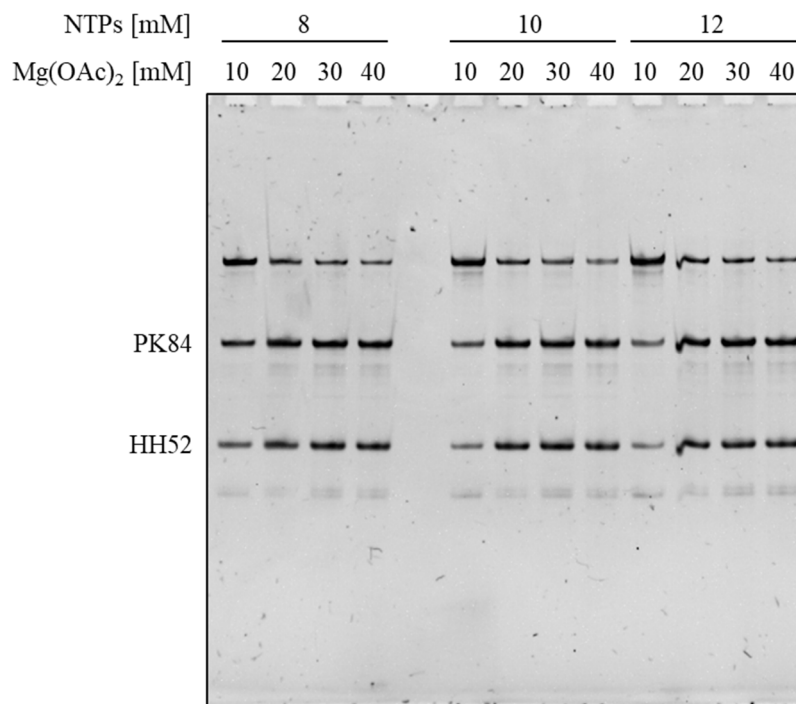


Рисунок 3.6 – Оптимізація концентрації Mg(OAc)<sub>2</sub> і NTP для PK84 <sup>15</sup>N GC IVT. Градієнт концентрації Mg(OAc)<sub>2</sub> від 10 до 40 мМ. Градієнт сумарної концентрації NTP від 8 до 12 мМ. Аналітичний денатуруючий поліакриламідний гель-електрофорез (12 %, 240 В, 30 хв).

### 3.1.2.2. Оптимізація концентрації ДМСО та ДНК

ДМСО було додано до PK84 <sup>15</sup>N GC ТТ, щоб зменшити кількість побічних продуктів, що утворюються через ПЛР. Його концентрація коливалася від 0 до 20 %. Концентрація продукту ПЛР була оптимізована в діапазоні від 2 до 6 % (Рисунок 3.7). ТТ було проведено при постійній концентрації Mg(OAc)<sub>2</sub> 30 мМ і NTP 10 мМ. Найменша кількість побічних продуктів спостерігалася при найбільшій концентрації ДМСО в реакційній суміші для різних концентрацій ДНК.

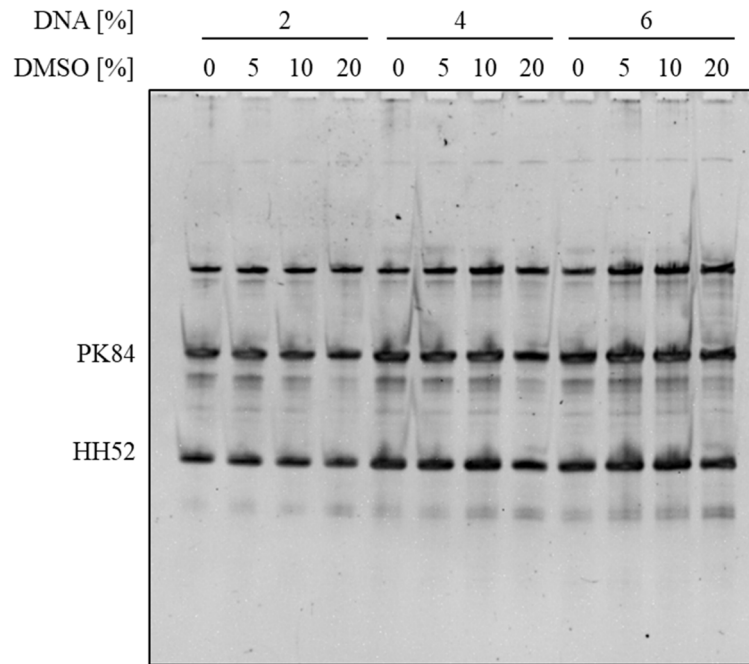


Рисунок 3.7 – Оптимізація концентрації ДМСО та ДНК для РК84 <sup>15</sup>N GC IVT. Градієнт концентрації ДМСО від 0 до 20 %. Градієнт концентрації ДНК від 2 до 6 %. Аналітичний денатуруючий поліакриламідний гель-електрофорез (12 %, 240 В, 30 хв).

Результати оптимізації IVT узагальнені в Таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 – Оптимізовані умови для IVT РК69 та РК84.

Сполука	РК69 n.a.	РК69 <sup>15</sup> N	РК84 n.a. (HDV)	РК84 <sup>15</sup> N GC (PCR)
	Концентрація			
Mg(OAc) <sub>2</sub>	20 мМ	20 мМ	40 мМ	30 мМ
ДНК-матриця	50 мМ	50 мМ	50 мМ	4 %
NTPs	12 мМ	12 мМ	12 мМ	12 мМ
ДМСО	0	0	0	20 %

### 3.1.2.3. Препаративна IVT і очищення РНК

Препаративну (15 мл) IVT для кожного конструкту було виконано відповідно до оптимізованих умов (Таблиця 3.2). Після IVT реакційні суміші було осаджено іPrOH і очищено за допомогою 12 % препаративного поліакриламідного гель-електрофорезу. Рисунок 3.8 демонструє гелі, використані для очищення кожного з конструктів.

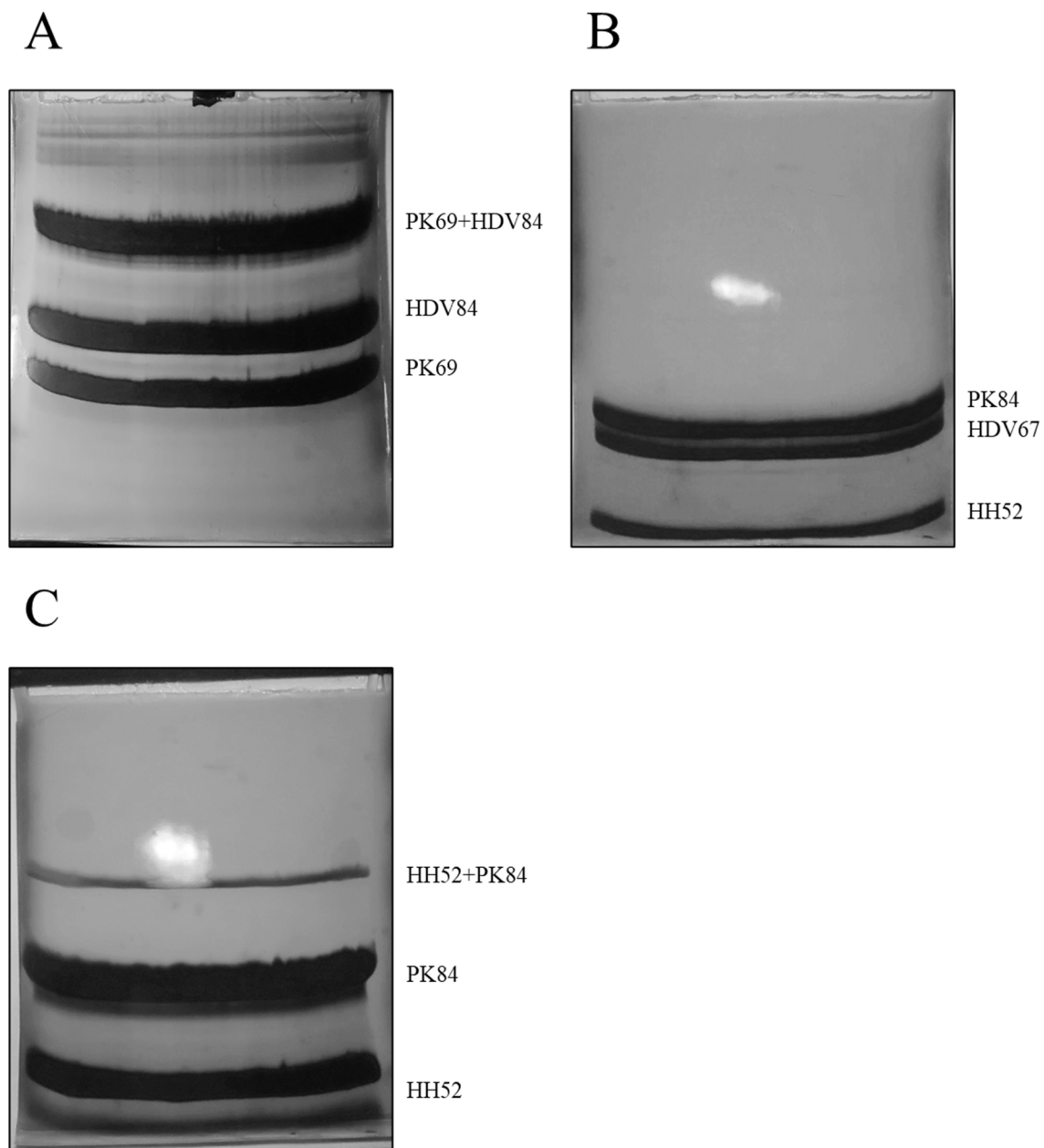


Рисунок 3.8 – Очищення РНК після IVT за допомогою препаративного поліакриламідного гель-електрофорезу. (А) РК69 п.а.; препаративний денатуруючий поліакриламідний гель-електрофорез (12 %, 260 В, 7 год). З 15 мл IVT було завантажено 7,5 мл. (В) РК84 (HDV) п.а.; препаративний денатуруючий поліакриламідний гель-електрофорез (12 %, 260 В, 8 год).

Було завантажено 3,75 мл з 15 мл IVT. (С) РК84 (PCR)  $^{15}\text{N}$  GC; препаративний денатуруючий поліакриламідний гель-електрофорез (12 %, 260 В, 7 год). Було завантажено 7,5 мл з 15 мл IVT.

Гелі РК69 п.а. та РК84 (PCR)  $^{15}\text{N}$  GC демонструють адекватне розділення смуг, що призводить до чистої РНК без значних домішок після її елюювання. Для досягнення розділення смуг у випадку РК84 (HDV) п.а., на гель було завантажено четверту частину зразка IVT. Після елюювання РНК з гелю її концентрація відповідала зразку ЯМР близько 170 мкМ, що було недостатньо для запланованих експериментів ЯМР. Тому було прийнято рішення припинити роботу над цим зразком і перейти до ПЛР.

Для того щоб видалити залишки поліакриламідну, зразки РНК були очищені за допомогою HPLC з подальшим осадженням  $\text{LiClO}_4$  в ацетоні та підготовкою зразків ЯМР, як описано в розділах 2.2.1.8 і 2.2.1.9. Основні етапи очищення кожного конструкту узагальнені на Рисунку 3.9.

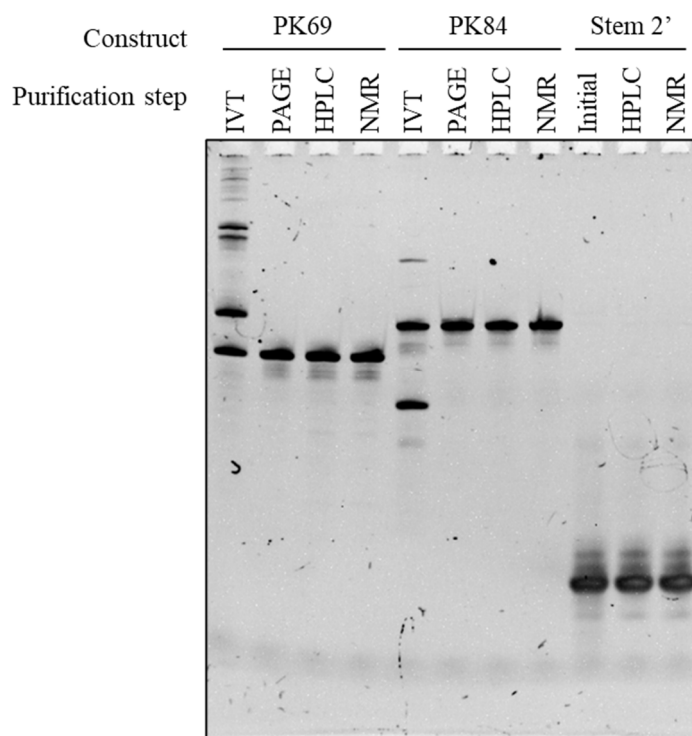


Рисунок 3.9 – Етапи очищення РНК від IVT до остаточного зразка ЯМР. Для

РК69 і РК84 показані кроки «IVT», «PAGE» – поліакриламідний гель-електрофорез, «HPLC» і «NMR» – зразок для ЯМР експериментів. Оскільки Stem 2' було придбано, етапи «IVT» і «PAGE» відсутні, натомість присутня смуга під назвою «Initial», на якій представлений зразок РНК від виробника.

Аналітичний денатуруючий поліакриламідний гель-електрофорез (12 %, 240 В, 25 хв).

### 3.1.3. Нативний поліакриламідний гель-електрофорез

Для перевірки наявних конформацій конструктів було виконано нативний поліакриламідний гель-електрофорез (Рисунок 3.10). Було проаналізовано два конструкти РНК: РК69 п.а та РК84 <sup>15</sup>N GC. Кожна РНК була представлено трьома зразками: один, який не згортався, інший – згортався за допомогою миттєвого охолодження, і третій, який згортався за допомогою повільного охолодження. Незгорнутий зразок кожної РНК показує додаткові смуги, ймовірно, димера і тримера, які зникають після згортання за обома протоколами. Зразок РК84 <sup>15</sup>N GC має велику кількість димеру. Для перевірки швидкості димеризації та її потенційного впливу на ЯМР було проведено ще один аналіз з нативним поліакриламідним гель-електрофорезом. Для цього зразки РК 84 <sup>15</sup>N GC були згорнуті за різними протоколами і зберігалися при кімнатній температурі та 4 °С протягом восьми днів перед завантаженням на гель. Гель не виявляє присутності димеру в згорнутих зразках навіть після інкубації при кімнатній температурі, що свідчить про ефективність обох протоколів згортання (Рисунок 3.11).

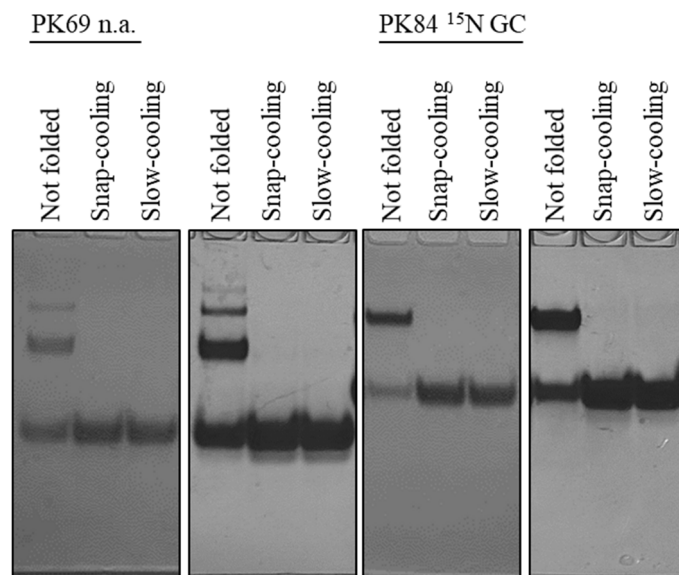


Рисунок 3.10 – Нативний поліакриламідний гель-електрофорез (12 %, 33 В, 4,5 год) зразків РК69 п.а. і РК84 <sup>15</sup>N GC, згорнутих за різними протоколами.

Візуалізація гелів проводилася за допомогою ультрафіолетового світла (ліворуч) та StainsAll (праворуч).

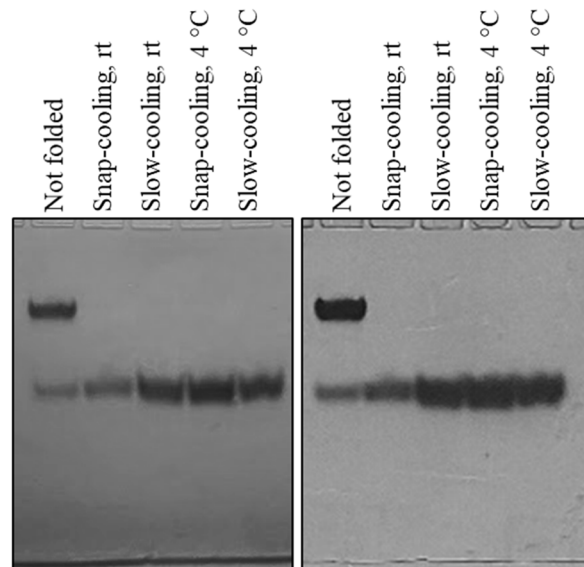


Рисунок 3.11 – Нативний поліакриламідний гель-електрофорез (12 %, 33 В, 4,5 год) зразків PK84 <sup>15</sup>N GC, згорнутих за різними протоколами і збережених в різних умовах перед електрофорезом. Візуалізація гелю проводилася за допомогою ультрафіолетового світла (ліворуч) та StainsAll (праворуч).

### 3.2. ЯМР

Експерименти ЯМР, проведені під час цього дослідження, можна розділити на три групи залежно від їхнього завдання: віднесення сигналів, ліганд-спостережуваний скринінг, і РНК-спостережувані титрування. Таблиця 3.3 надає зведену інформацію про підготовлені для цих цілей зразки ЯМР.

Таблиця 3.3 – Огляд зразків РНК, що було використано для ЯМР експериментів.

Назва зразка	Концентрація РНК, мкМ
PK69 <sup>15</sup> N	675
PK69 п.а.	577
PK69 п.а. титрування <b>HSJA1012</b>	100
PK69 п.а. титрування MgCl <sub>2</sub>	100
PK69 п.а. скринінг	10
PK84 <sup>15</sup> N GC	660
Stem 2'	770

### 3.2.1. Скринінг

Для порівняння зданості SARS-CoV-1 PK69 та SARS-CoV-2 PK69 до взаємодії з малими молекулами – потенційними лікарськими засобами – було проведено скринінг на основі ЯМР. Скринінг PK69 було проведено з 8 сполуками з бібліотеки iNEXT, раніше ідентифікованих як хіти для SARS-CoV-2 PK69, і з 14 сполуками з бібліотеки iNEXT50L. З останніх, два були ідентифіковані як хіти для SARS-CoV-2 PK69. Скринінг SARS-CoV-2 PK69 був проведений та частково опублікований співробітниками групи [9].

Для кожного фрагмента з РНК і без неї (бланк) було проведено три типи експериментів: 1D  $^1\text{H}$  з пригніченням води SOGGY, waterLOGSY, і  $T_2$ -релаксація. Скринінг проводили одиночними фрагментами, на відміну від сумішей, що використовуються для скринінгу SARS-CoV-2. Критерії зв'язування були обрані на основі раніше опублікованих скринінгових експериментів. З'єднання класифікувалося як сполучна речовина, якщо воно відповідало щонайменше двом з трьох критеріїв:  $\text{CSP} \geq 6$  Гц, зміна знаків у waterLOGSY та зниження інтенсивності сигналу в  $T_2$ -релаксаційному експерименті на  $\geq 20\%$  [9]. Спочатку спектри оцінювалися візуально. Тим, у кого спостерігалися зміни, було надано кількісну оцінку. Серед усіх сполук лише Z6 і D01 демонструють зміну знака waterLOGSY, тоді як інші або не мають сигналу в цих спектрах, або лише незначні зміни інтенсивності сигналу. Рисунок 3.12 демонструє спектри потенційних сполучних речовин. Спектри D01 з РНК не показують жодних сигналів через LB поза виявленням, що свідчить про сильне зв'язування. Результати по кожному фрагменту узагальнені в Таблиці 3.4. Виходячи з наведених критеріїв, тільки сполуки Z6 і D01 можуть бути віднесені до зв'язників, на відміну від десяти хітів, виявлених для SARS-CoV-2 PK69. Однак усі Z-сполуки продемонстрували значне зниження  $T_2$ , що свідчить про можливе слабе зв'язування. Різниця між результатами SARS-CoV-1 та SARS-CoV-2 не обов'язково пов'язана з нижчою здатністю SARS-CoV-1 PK69 до зв'язування, а скоріше виникає через різні умови експерименту, такі як використання лігандних сумішей для скринінгу

SARS-CoV-2 та окремих сполук для SARS-CoV-1. Виходячи з вищесказаного, повторення експериментів зі скоригованими умовами як для SARS-CoV-1, так і для SARS-CoV-2 PK69 може бути корисним.

Таблиця 3.4 – Резюме результатів скринінгу SARS-CoV-1 PK69. Жирним шрифтом виділено раніше ідентифіковані хіти для SARS-CoV-2 PK69.

Значення для CSP і спаду  $T_2$  для D01 позначені знаками питання через відсутність сигналів у спектрах. Хіти для PK69 цього дослідження виділені зеленим кольором.

Фрагмент	CSP, Гц		waterLOGSY factor		$T_2$ reduction, %	
	SARS-CoV-2	SARS-CoV-1	SARS-CoV-2	P2 (буфер лізису)	SARS-CoV-2	SARS-CoV-1
<b>Z1</b>	<b>3.0</b>	<b>1.4</b>	<b>2.0</b>	<b>0.66</b>	<b>31</b>	<b>28</b>
<b>Z2</b>	<b>1.0</b>	<b>&lt; 1</b>	<b>2.5</b>	-	<b>70</b>	<b>16</b>
<b>Z3</b>	<b>5.0</b>	<b>4.0</b>	<b>1.9</b>	-	<b>38</b>	<b>28</b>
<b>Z4</b>	<b>7.0</b>	<b>4.0</b>	<b>1.5</b>	-	<b>39</b>	<b>21</b>
<b>Z5</b>	-	<b>4.0</b>	<b>4.9</b>	<b>0.47</b>	<b>46</b>	<b>26</b>
<b>Z6</b>	-	<b>7.0</b>	<b>2.5</b>	<b>4.26</b>	<b>80</b>	<b>26</b>
<b>Z7</b>	-	<b>2.5</b>	<b>1.5</b>	-	<b>59</b>	<b>25</b>
<b>Z8</b>	-	<b>1.0</b>	<b>3.8</b>	-	<b>80</b>	<b>26</b>
A04	-	1.0	-	-	-	-
A05	-	-	-	-	-	-
<b>B04</b>	<b>&lt; 1</b>	<b>2.0</b>	<b>+</b>	-	<b>50</b>	<b>36</b>
B05	1.0	11.0	-	-	-	6
C02	-	-	-	-	-	-
C05	-	-	-	-	-	-
<b>D01</b>	<b>38</b>	<b>?</b>	<b>+</b>	<b>2.43</b>	<b>+</b>	<b>?</b>
D02	-	1.0	-	-	-	-
<b>Z1</b>	<b>3.0</b>	<b>1.4</b>	<b>2.0</b>	<b>0.66</b>	<b>31</b>	<b>28</b>
<b>Z2</b>	<b>1.0</b>	<b>&lt; 1</b>	<b>2.5</b>	-	<b>70</b>	<b>16</b>

<b>Z3</b>	<b>5.0</b>	<b>4.0</b>	<b>1.9</b>	<b>-</b>	<b>38</b>	<b>28</b>
<b>Z4</b>	<b>7.0</b>	<b>4.0</b>	<b>1.5</b>	<b>-</b>	<b>39</b>	<b>21</b>
<b>Z5</b>	<b>-</b>	<b>4.0</b>	<b>4.9</b>	<b>0.47</b>	<b>46</b>	<b>26</b>
<b>Z6</b>	<b>-</b>	<b>7.0</b>	<b>2.5</b>	<b>4.26</b>	<b>80</b>	<b>26</b>

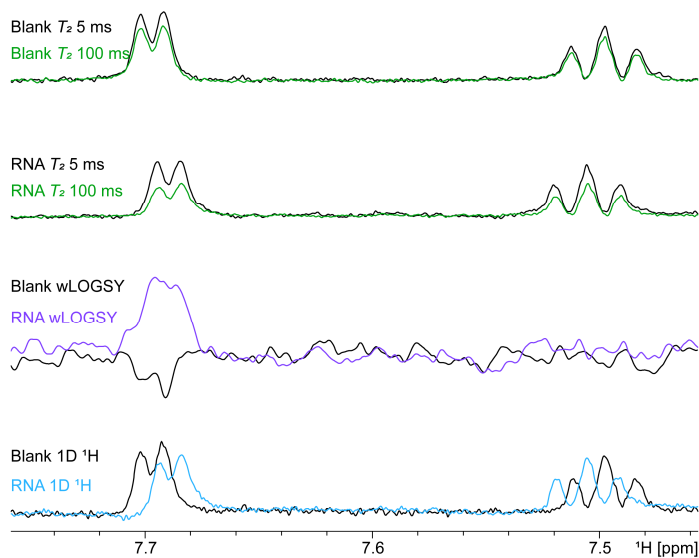
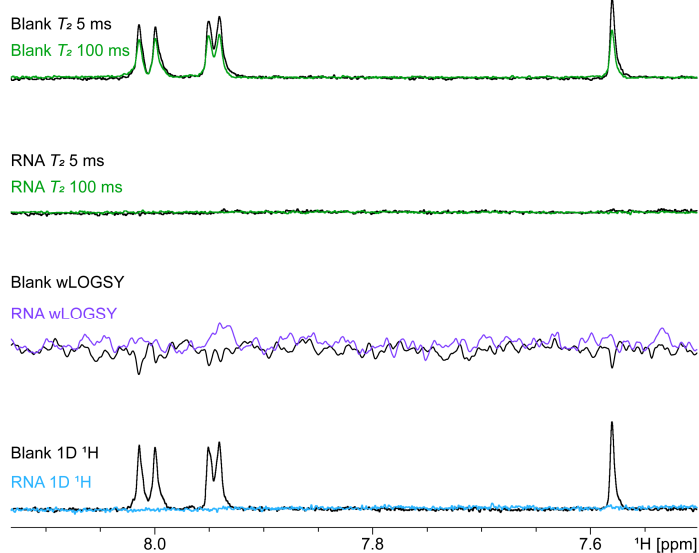
**Z6****D01**

Рисунок 3.12 – ЯМР-скрінінг експерименти потенційних зв'язників Z6 і D01 з РК69. Спектри було зареєстровано на частоті 600 МГц; 298 К, 5 % ДМСО- $d_6$ , 25 мМ КРі (рН = 6,2), 50 мМ КСІ. Концентрація РНК 10 мкМ, концентрація фрагменту 250 мкМ.

### 3.2.2. Дослідження вторинної структури

#### 3.2.2.1. РК69

ЯМР-експерименти для віднесення сигналів іміно-протонів були проведені з РК69 для порівняння вторинної структури з опублікованими даними [10]. Отримані результати відповідають опублікованим.

Спочатку, для спостереження можливих відмінностей у вторинній структурі зі зміною температури та визначення оптимальної температури для подальшого віднесення іміно сигналів з застосуванням 2D спектрів, були зареєстровані 1D  $^1\text{H}$  спектри з подавленням води зі стрибком-поверненням (JR, англ. Jump-return) при п'яти різних температурах в діапазоні від 283 К до 303 К з інтервалом 5 К. З підвищенням температури покращується ширина сигналу, а отже, і роздільна здатність. У той час як більшість сигналів демонструють лише незначні зрушення, сигнал U524 при 14,2 ppm зазнає зсуву на 0,2 ppm в сильне поле з підвищенням температури. Крім того, спостерігається помітне розширення сигналів у неканонічній області. При зміні температури додаткові сигнали не з'являються, що свідчить про те, що згортання РНК стабільне в межах даного діапазону температур. Для детектування сигналу U524 було проведено набір 2D ЯМР-експериментів при 283 К. З іншого боку, для поліпшення роздільної здатності в спектрах той же набір було виміряно при 298 К.

Характер спарювання основ і, отже, мотив вторинної структури РНК можна визначити на основі сигналів іміно-протонів основ G і U, які спостерігаються при захисті протонів від обміну з водою, тобто за рахунок водневого зв'язку в парах основ. Ці резонанси спостерігаються в  $^1\text{H}$ -спектрах приблизно при 10-15 ppm.

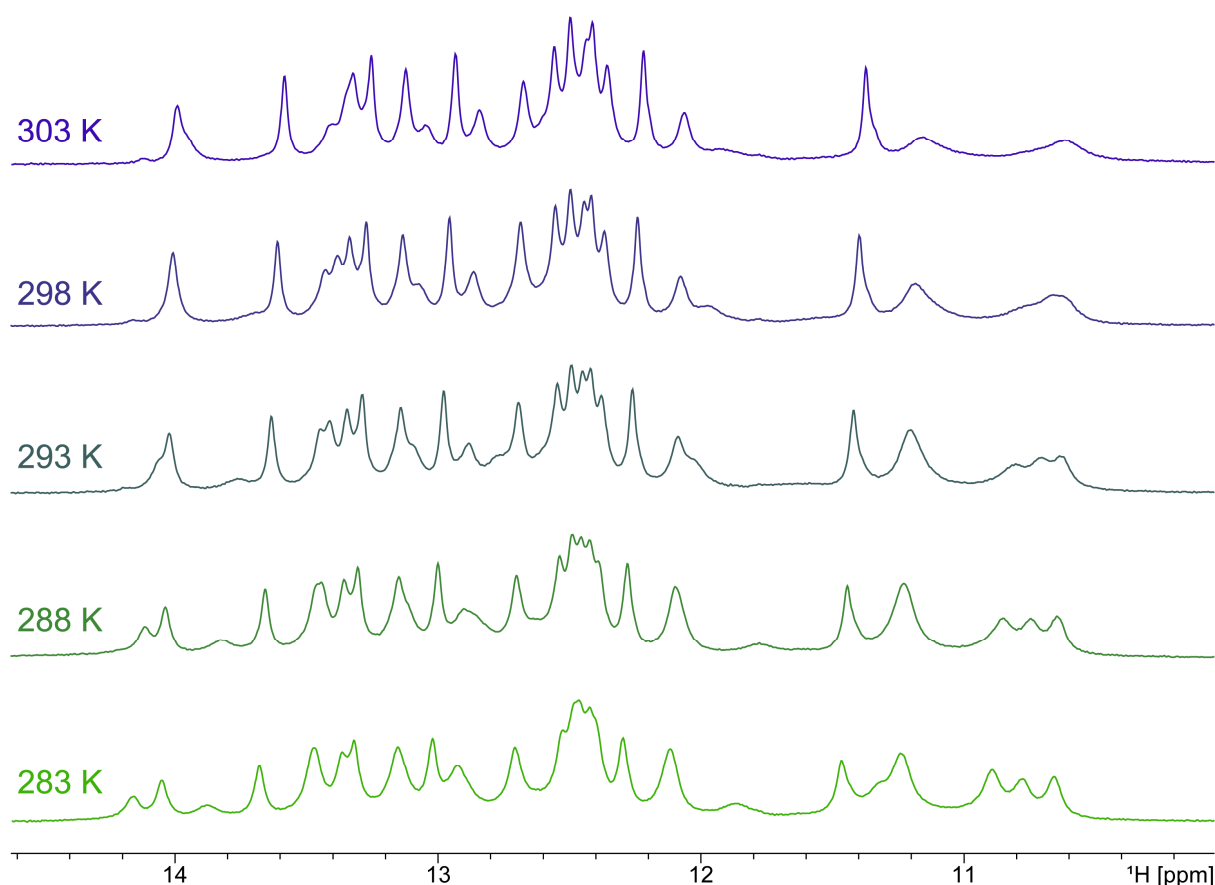


Рисунок 3.13 – Іміно регіон 1D  $^1\text{H}$  JR спектрів SARS-CoV-1 PK69 n.a. при 283-303 К. Спектри було зареєстровано на частоті 700 МГц; 7,5 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 мМ KPi (pH = 6,2), 50 мМ KCl. Концентрація РНК 577 мкМ.

Віднесення іміно-протонів було виконано на основі трьох типів експериментів:  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY,  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -TROSY та HNN-COSY. В експериментах NOESY між проксимальними (до 5 Å) протонами з'являються крос-піки [55], що дає можливість побачити парні або послідовні основи. Послідовні основи в стовбурі утворюють «NOE-шлях», який можна прослідкувати і таким чином визначити вторинну структуру. Експеримент  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -TROSY пригнічує поперечну релаксацію, що призводить до збільшення спектральної роздільної здатності та чутливості порівняно з експериментами HSQC [56]. Спектри  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -TROSY використовувалися для розрізнення сигналів іміно-протонів гуаніну (зсув  $^{15}\text{N}$  в районі 145-150 ppm) та урацил (зсув  $^{15}\text{N}$  в районі 155-165 ppm). Експеримент HNN-COSY виявляє скалярний спіновий зв'язок між донором та акцептором водневого зв'язку у N—H...N зв'язку пари основ, тобто N3 цитозину і N1-H гуаніну з пари основ

C-G або N1 аденіну і N3-Н урацилу з пари основ A-U. Неканонічні пари основ G-U не мають такого водневого зв'язку і тому не виявляються даним експериментом (Рисунок 1.1, А) [55].

Вторинну структуру РК69 було визначено та опубліковано Plant *et al* [10]. Вона містить 26 пар основ, включаючи три неканонічні пари G-U, що потенційно можна спостерігати в описаних експериментах (Рисунок 3.14). Кілька додаткових сигналів можуть виникнути через можливі взаємодії всередині петлі. Однак через лабільність замикаючих пар основ сигналів спостерігається менше. Зокрема, у спектрі  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -TROSY при 298 К виявляється тільки 13 сигналів G і 5 розділених сигналів U (Рисунок 3.15). Рисунок 3.16 показує спектр HNN-COSY при цій температурі, в якому спостерігається 12 сигналів канонічно спарованих G і 4 сигнали канонічно спарованих U. Спектри при нижчій температурі містять додаткові сигнали, які буде обговорено далі. Спектри NOESY відображають чотири окремі шляхи для Stem 1, Stem 2 і двох областей Stem 3.

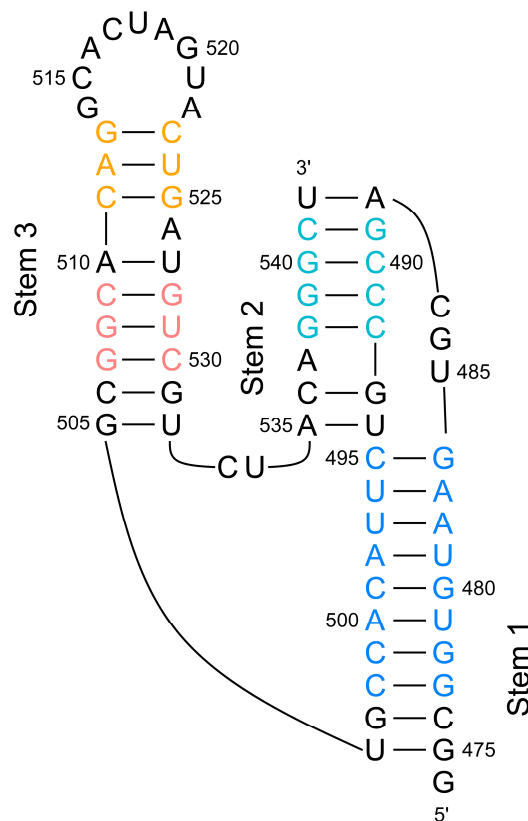


Рисунок 3.14 – Вторинна структура РК69. Нуклеотиди, які були віднесено, забарвлені відповідно до стовбура, до якого вони належать.

Сім крос-пиків, які утворюють шлях, що відповідає Stem 1, починаючи з G484 і закінчуючи G477, охоплюючи всю довжину стовбура, за винятком двох замикаючих пар основ (G503-C476 і G475-U504). Всі спостережувані нуклеотиди утворюють канонічні пари основ, про що свідчать спектри HNN-COSY.

Як і очікувалося, спостерігалася лише верхня частина Stem 2 через гнучкість нижньої частини. Шлях в спектрі NOESY складається з чотирьох сигналів канонічно спарованих G-основ, про що свідчить спектр HNN-COSY. Напрямок NOE-шляху (G489-G540-G539-G538 або G538-G539-G540-G489) було отримано з [10].

Stem 3 було умовно розділено на дві окремі області через наявність асиметричної опуклості, утвореної A526. Нижня частина стовбура містить єдину в цьому РНК конструкті неканонічну некінцеву пару основ G508-U529. Її крос-пик має високу інтенсивність, а сигнали нуклеотидів чітко проявляються в спектрах HNN-COSY, оскільки не мають відповідних сигналів від С- та А-нуклеотидів. Крім того, від цих основ спостерігаються крос-піки до G507 і G528, обидва з яких беруть участь у канонічному спаруванні основ.

Гнучка верхня область Stem 3 демонструє сигнали NOE низької інтенсивності, які майже не спостерігаються при 298 К через близькість до петлі. Диференціацію між G513 і G525 було проведено на основі опублікованих даних [10], [11].

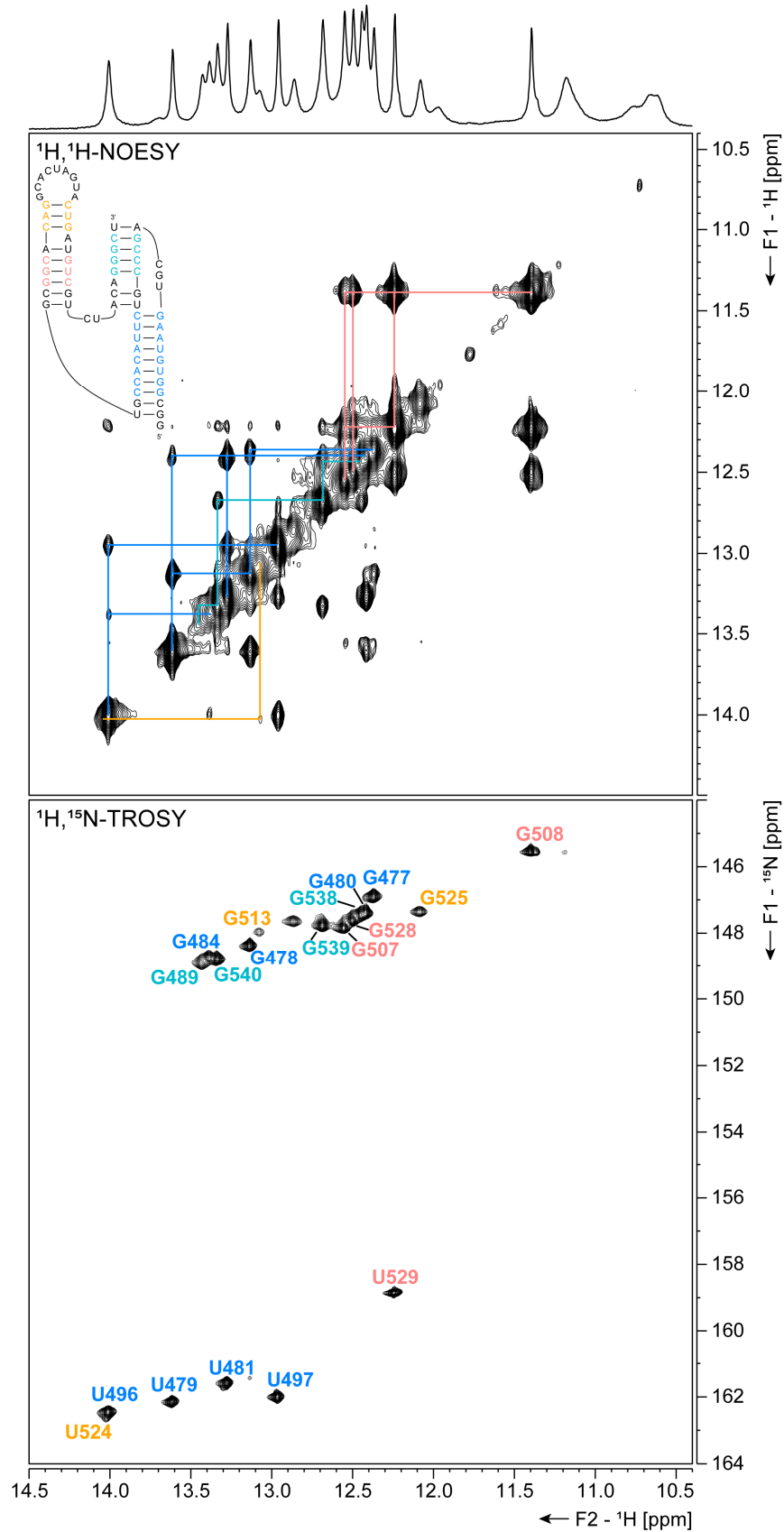


Рисунок 3.15 – Іміно регіон спектрів  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY та  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -TROSY SARS-CoV-1 PK69  $^{15}\text{N}$  при 298 К. Спектри було зареєстровано на частоті 950 МГц;

7,5 % D<sub>2</sub>O, 25 mM KPi (pH = 6,2), 50 mM KCl. Концентрація РНК 675 мкМ.

Час змішування NOESY = 150 мс.

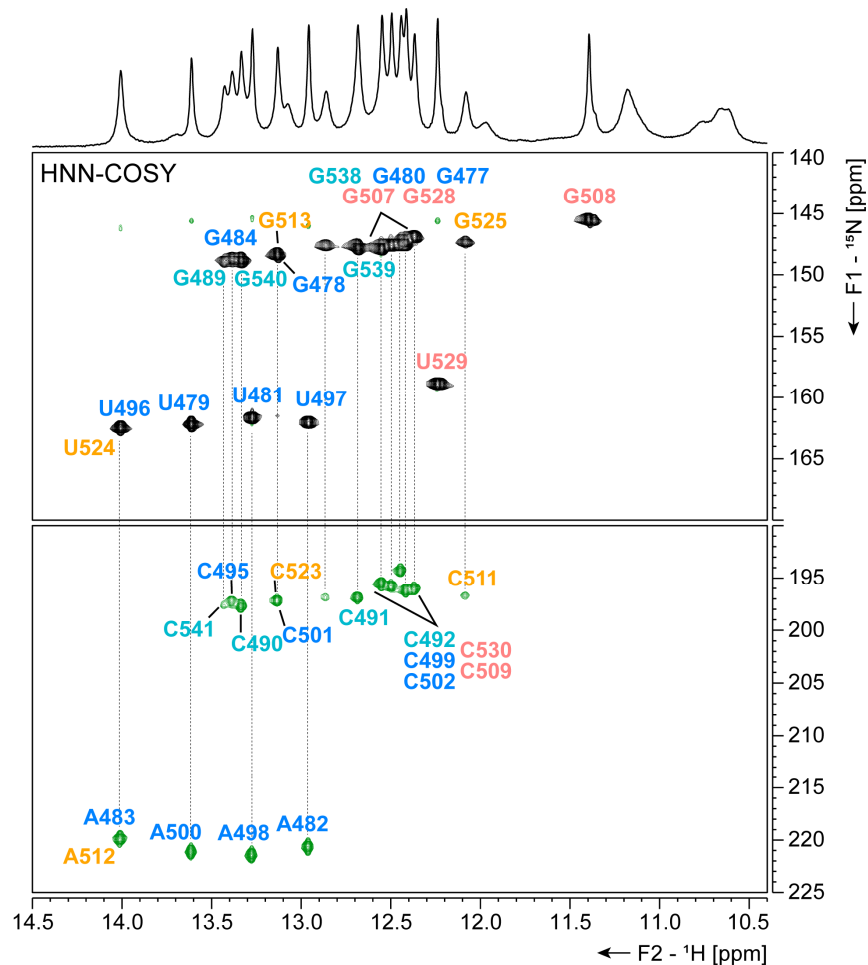


Рисунок 3.16 – HNN-COSY SARS-CoV-1 PK69 <sup>15</sup>N РНК при 298 К. Спектр було зареєстровано на частоті 950 МГц; 7,5 % D<sub>2</sub>O, 25 mM KPi (pH = 6,2), 50 mM KCl. Концентрація РНК 675 мкМ.

Спектри при 283 К містять деякі додаткові сигнали, які не спостерігаються при 298 К, ймовірно, через підвищену лабільність відповідних пар основ при більш високій температурі. До них відносяться сильнополярні сигнали G і U в HNN-COSY (Рисунок 3.17) і TROSY (Рисунок 3.18) при 283 К, які пов'язані з потенційними взаємодіями в регіоні петлі. Іншим прикладом гнучких областей в молекулі можуть бути замикаючі пари основ Stem 1 і Stem 3. При 11,2 ppm спостерігаються два сигнали G, що перетинаються. Згідно зі спектром TROSY ці сигнали беруть участь у парі G-U та мають крос-пик у спектрі NOESY при нижчій температурі до канонічно спарованого G при 12,9 ppm. Цим двом сигналам може відповідати залишок G475 або G505, або

обидва. Крім того, сигнал має крос-піки низької інтенсивності до сигналу U при 12,15 ppm, який можна спостерігати лише при масштабуванні інтенсивності (Рисунок S.2). Це віднесення сигналів підтверджується тим, що опубліковане для SARS-CoV-2 PK69 [11].

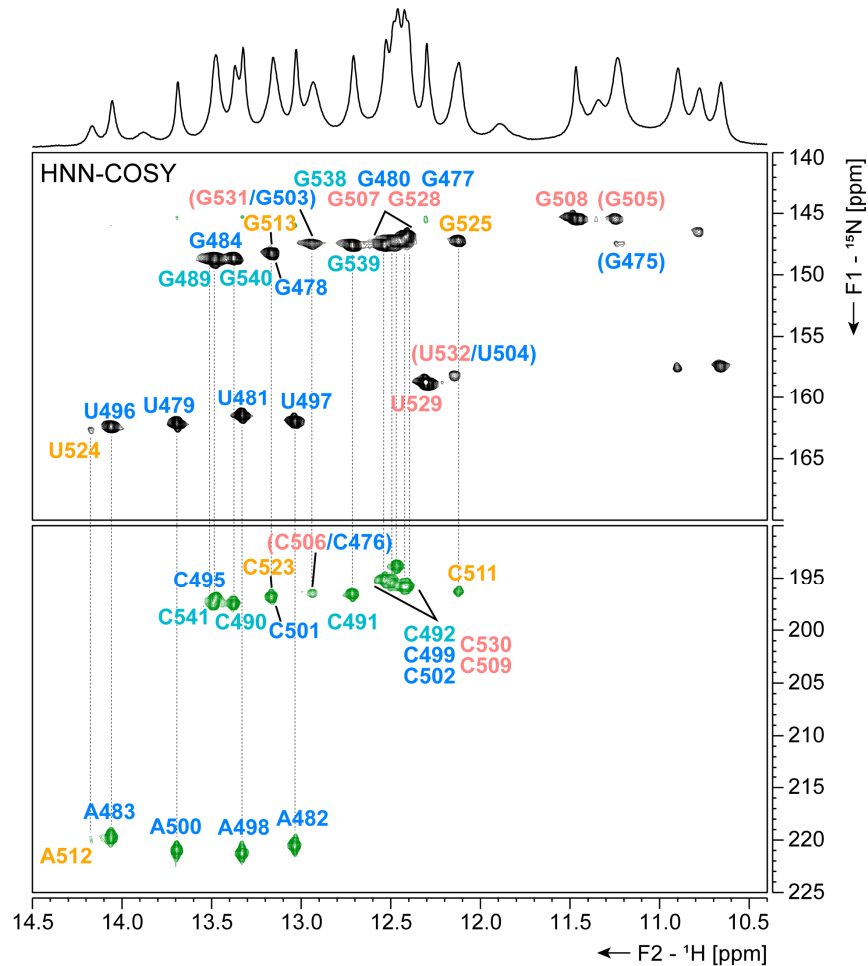


Рисунок 3.17 – HNN-COSY SARS-CoV-1 PK69  $^{15}\text{N}$  РНК при 283 К. Неоднозначно віднесені сигнали нуклеотидів позначені в дужках. Спектр було зареєстровано на частоті 950 МГц; 7,5 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 мМ КРі (рН = 6,2), 50 мМ КСl. Концентрація РНК 675 мкМ.

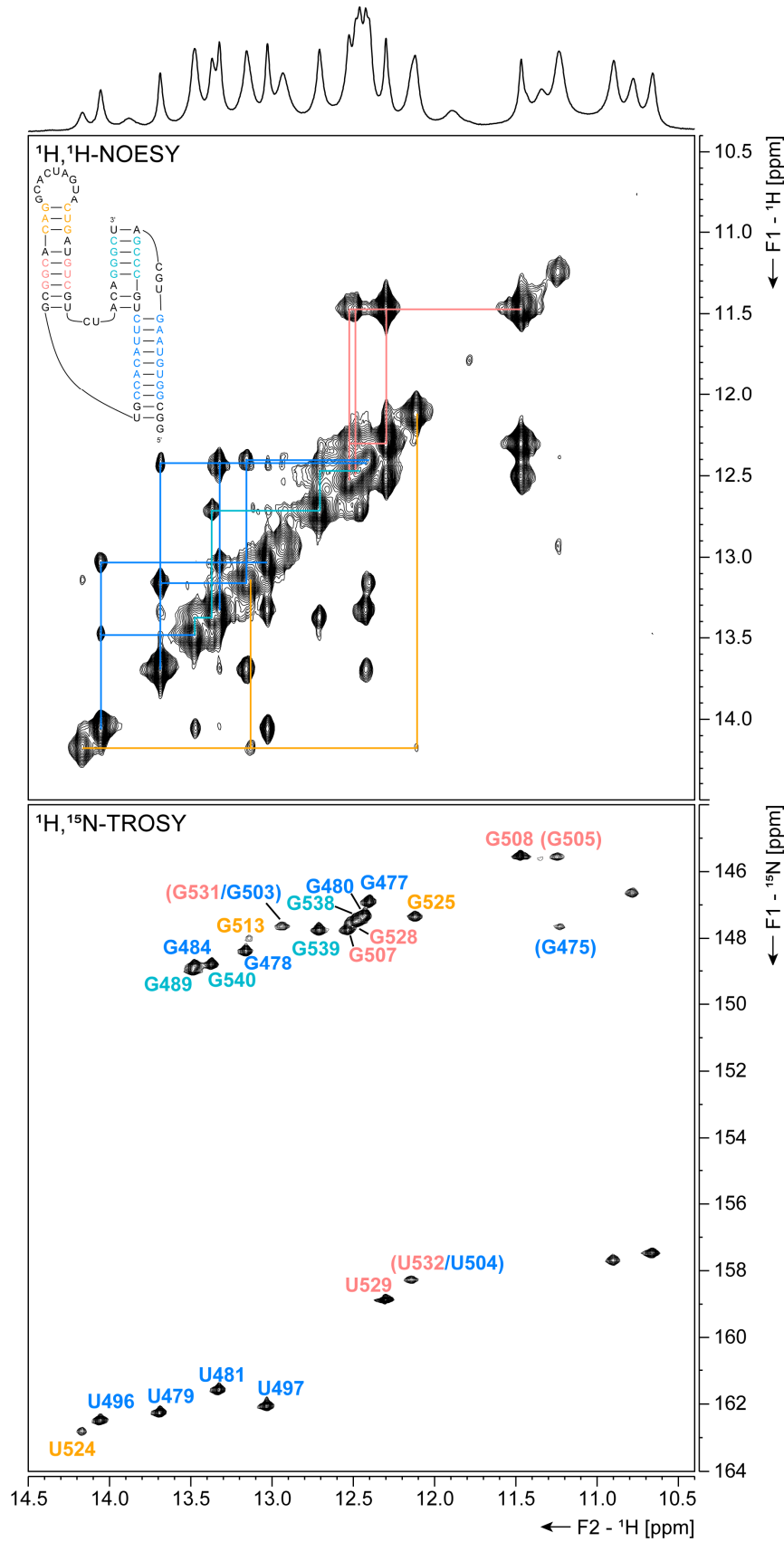


Рисунок 3.18 – Іміно регіон спектрів <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-NOESY та <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-TROSY SARS-CoV-1 PK69 <sup>15</sup>N при 283 К. Неоднозначно віднесені сигнали нуклеотидів позначені в дужках. Спектри було зареєстровано на частоті 950 МГц; 7,5 %



структурних елементів в довшій РНК (Рисунок 3.20). Сигнали G508, G528 і U529 присутні в двох різних станах, що вказує на те, що РНК утворює дві різні структурні конформації.

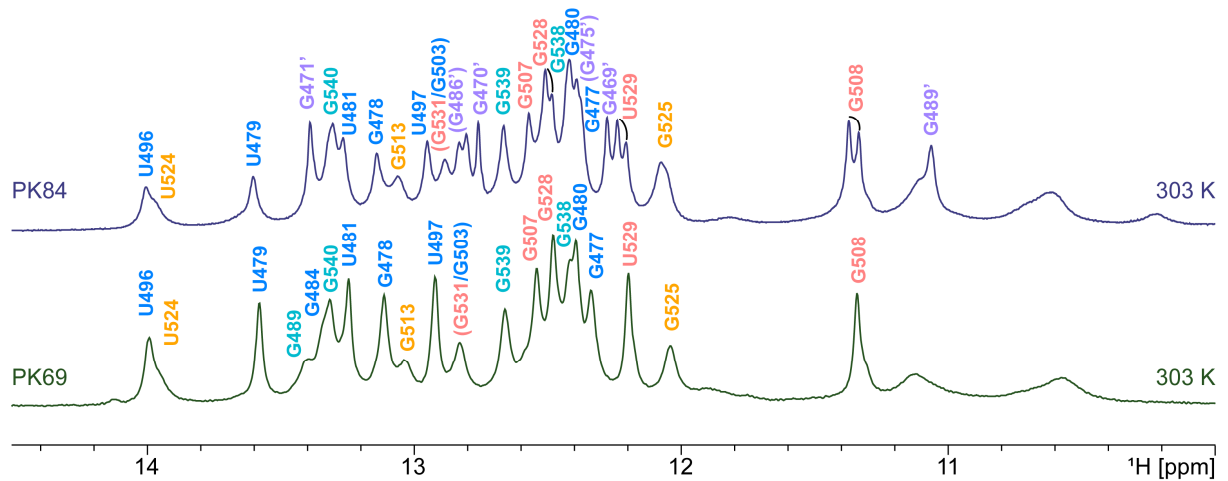


Рисунок 3.20 – Іміно регіон 1D  $^1\text{H}$  JR спектрів SARS-CoV-1 PK69 п.а. (знизу) та PK84  $^{15}\text{N}$  GC (вгорі) при 303 К. Неоднозначно віднесені сигнали нуклеотидів позначені в дужках. Сигнали, що відповідають Stem 2', позначаються апострофом. Спектр PK69 було зареєстровано на частоті 700 МГц; 7,5 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 мМ  $\text{KPi}$  (рН = 6,2), 50 мМ  $\text{KCl}$ . Концентрація РНК 577 мкМ. Спектр PK84 було зареєстровано на частоті 950 МГц; 7,5 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 мМ  $\text{KPi}$  (рН = 6,2), 50 мМ  $\text{KCl}$ . Концентрація РНК 660 мкМ.

2D-спектри для подальшого віднесення сигналів були виміряні при 303 К для досягнення бажаної роздільної здатності. Патерн крос-пиків, що спостерігається в спектрі  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY PK84 (Рисунок 3.21) близький до PK69 з невеликими відмінностями, такими як відсутність крос-пиків для верхньої частини Stem 3 і відсутність крос-піку між U496 і G484. Однак ці сигнали присутні в 1D-спектрі і були віднесені на основі подібності їхніх хімічного зсуву до відповідних сигналів в спектрах PK69 (Рисунок 3.20). Істотною відмінністю є наявність додаткових крос-пиків, які ймовірно свідчать про наявність одного або декількох нових елементів вторинної структури, у порівнянні з PK69.

Нові структурні фрагменти було охарактеризовано з використанням спектрів  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY і HNN-COSY. Через GC  $^{15}\text{N}$  мічення в спектрах не

спостерігаються сигнали U-нуклеотидів. Відповідно до  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY нові сигнали утворюють два окремі шляхи: один з трьома крос-піками, що з'єднують чотири різні нуклеотиди, а другий з лише одним крос-піком між двома сигналами. Всі ці сигнали походять від нуклеотидів G, і п'ять з них утворюють канонічні пари основ (Рисунок 3.22). Неканонічна пара основ G-U є частиною довшого шляху. Ця модель відповідає Stem 2' в обох альтернативних структурах (2) і (3) з довшим шляхом відповідним верхній частині стовбура, і коротшим шляхом, до якого належать двом парам основ G-C нижньої частини стовбура. Жодних ознак існування Stem 4 зі структури (3) не було виявлено.

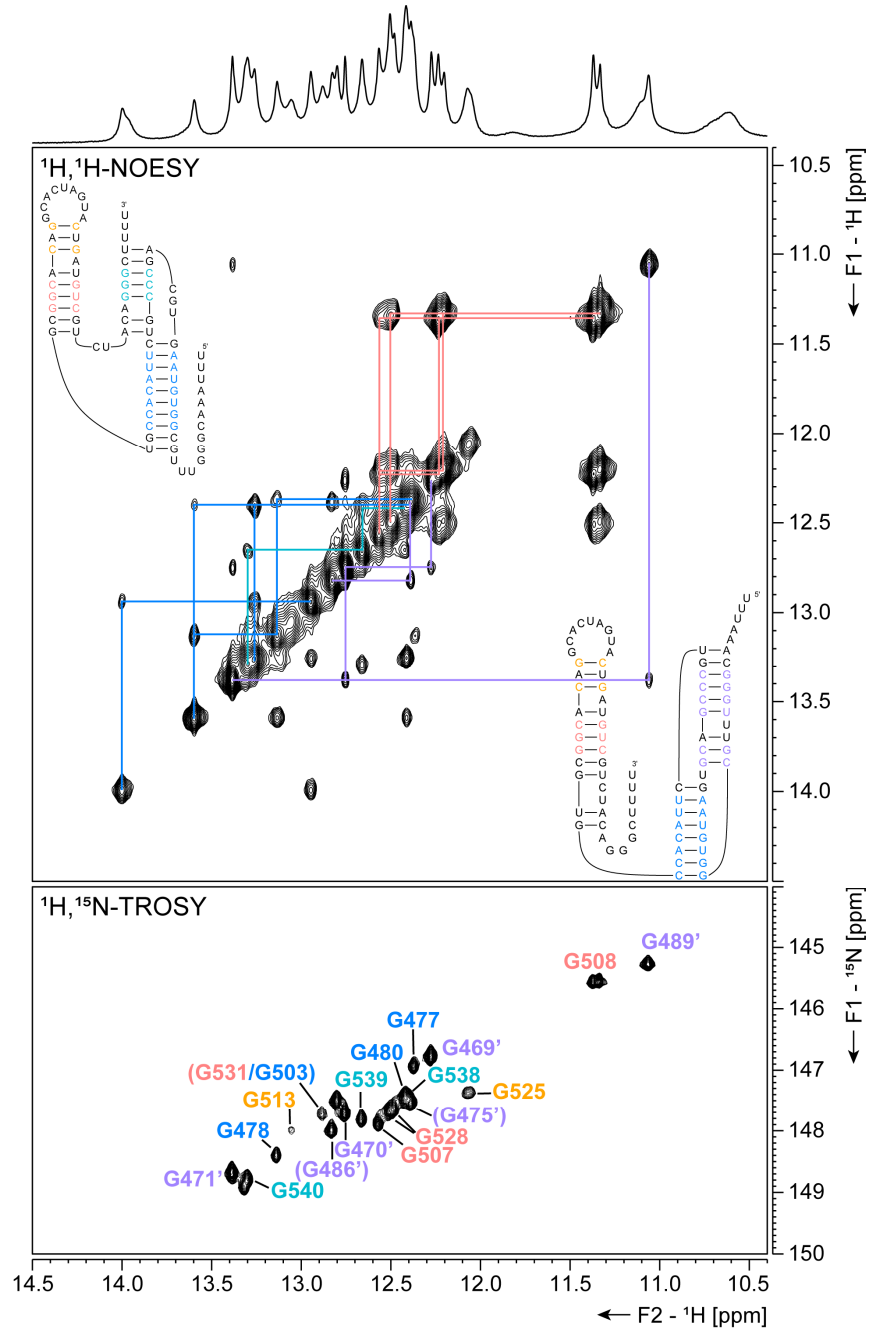


Рисунок 3.21 – Іміно регіон спектрів  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY та  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -TROSY SARS-CoV-1 PK84  $^{15}\text{N}$  GC при 303 К. Спектри було зареєстровано на частоті 950 МГц; 7,5 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 мМ КРі (рН = 6,2), 50 мМ КСІ. Концентрація РНК 660 мкМ. Час змішування NOESY = 150 мс.

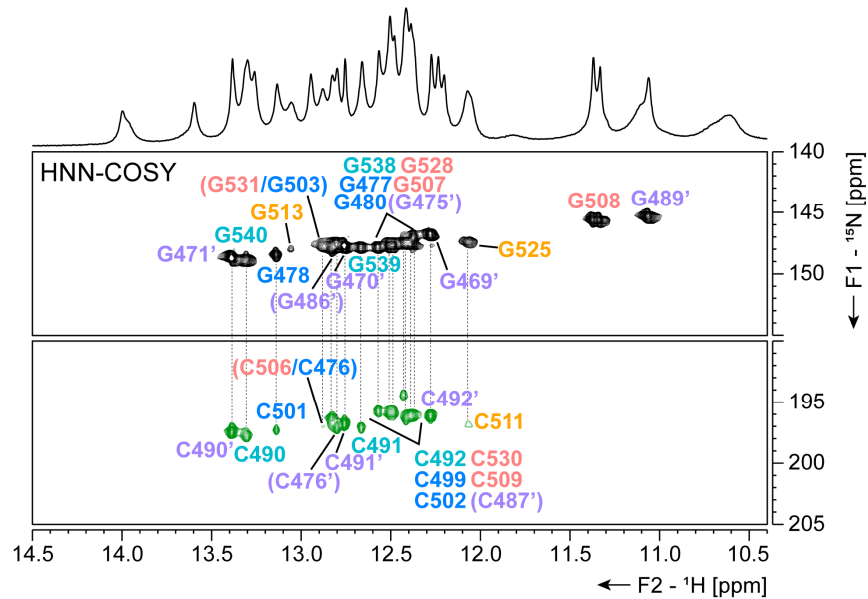


Рисунок 3.22 – HNN-COSY SARS-CoV-1 PK84  $^{15}\text{N}$  GC при 303 К. Спектр було зареєстровано на частоті 950 МГц; 7,5 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 мМ КРі (рН = 6,2), 50 мМ КСІ. Концентрація РНК 660 мкМ.

**Залежність від температури.** Зміна температури від 303 К до 313 К призводить до значних змін у спектрах. Крім звичайних температурно залежних зсувів сигналів, відбуваються ще два типи змін. Перший – це об'єднання раніше подвоєних сигналів, таких як G508, U529 або G528 (позначені синіми прямокутниками на Рисунку 3.23). Друга – зміна інтенсивності сигналів (позначена сірими прямокутниками). Інтенсивність сигналів G470' і G469' Stem 2' значно зростає, тоді як сигнал G539 Stem 2 зменшується за інтенсивністю. Крім того, у спектрі NOESY при цій температурі відсутні крос-піки, що відповідають Stem 2, тоді як шляхи, що відповідають іншим стовбурам, зберігаються (Рисунок 3.24). Можливою причиною цього може бути зміна чисельності населення двох досліджуваних структур.

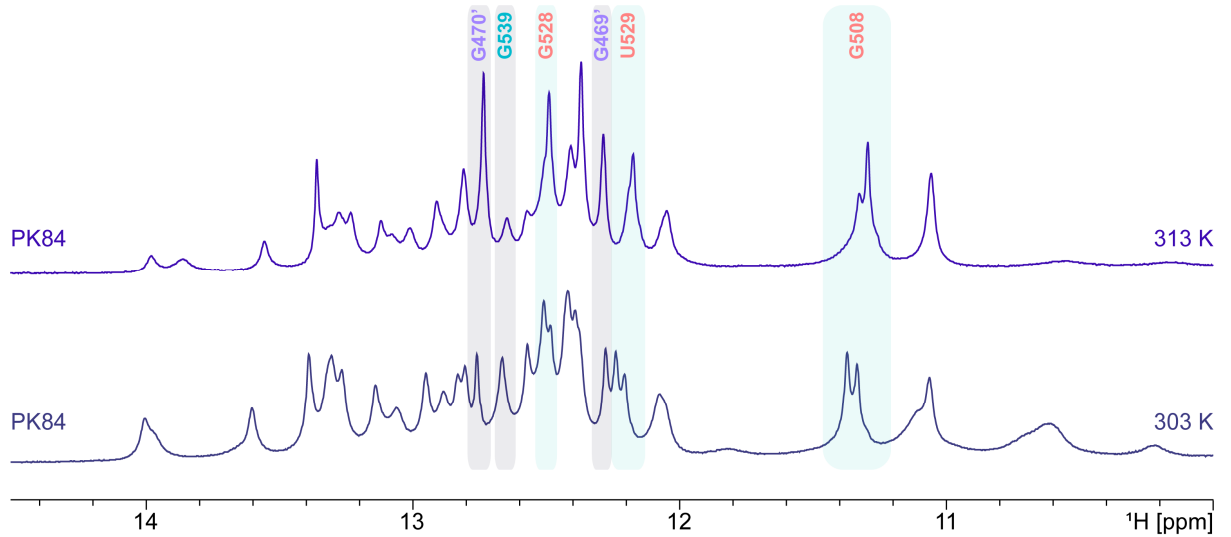


Рисунок 3.23 – Іміно-область 1D  $^1\text{H}$  JR SARS-CoV-1 PK84  $^{15}\text{N}$  GC при 303 К (знизу) та при 313 К (вгорі). Спектри було зареєстровано на частоті 950 МГц; 7,5 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 мМ КРі (рН = 6,2), 50 мМ КСІ. Концентрація РНК 660 мкМ.

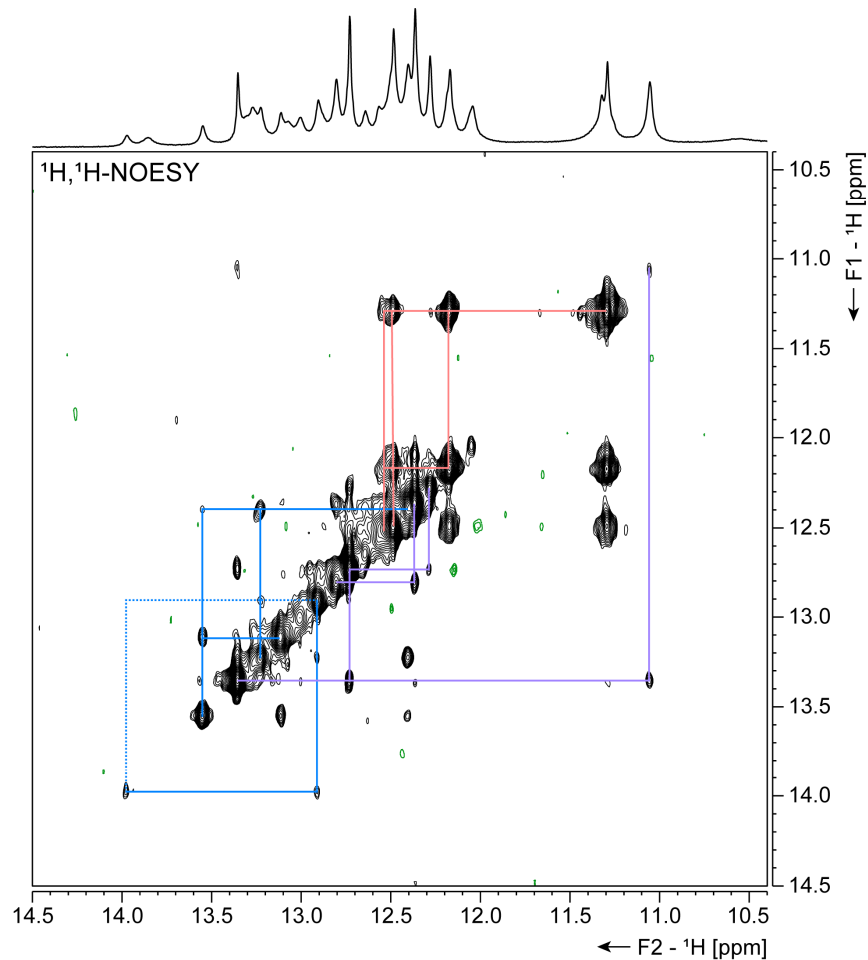


Рисунок 3.24 – Іміно регіон спектру  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY SARS-CoV-1 PK84  $^{15}\text{N}$  GC при 313 К. Спектр було зареєстровано на частоті 950 МГц; 7,5 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 мМ

KPi (pH = 6,2), 50 mM KCl. Концентрація РНК 675 мкМ. Час змішування  
NOESY = 150 мс.

### 3.2.2.3. Stem 2'

Щоб довести наявність альтернативного Stem 2' у вторинній структурі РК84, був розроблений та придбаний коротших конструкт РНК, що його імітує. Стовбур побудовано з нуклеотидів 466-476 і 486-494, а також UUGC-тетрапетлі, що їх з'єднує. У той час як верхня частина стовбура стабільна за рахунок чотирьох G-C пар, три послідовні U-основи створюють кілька можливостей для парування основ у середині стовбура, як показано на Рисунку 3.25. Для віднесення іміно сигналів даного конструкта були виміряні наступні спектри: температурний ряд 1D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY і  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -SOFAST-NMQC (Рисунок 3.26).  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -SOFAST-NMQC дозволяє отримати кореляційні спектри  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  з високим співвідношенням сигнал/шум за короткий час реєстрації спектра порівняно з іншими методами. Швидкий збір даних в SOFAST-NMQC здійснюється за допомогою дуже коротких затримок між сканами [57]. Ця особливість експерименту дозволила отримати спектр для неміченого зразка Stem 2'. Аналогічно до  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -TROSY,  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -SOFAST-NMQC використовувався для виявлення резонансів іміно протонів.

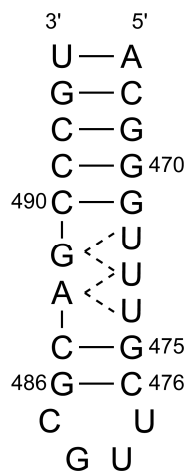


Рисунок 3.25 – Вторинна структура конструкта Stem 2'.

У спектрі  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -SOFAST-NMQC було зареєстровано шість сигналів G. U-сигналів не спостерігалось через гнучкість усіх U-основ у молекулі. Подібно до РК84, два шляхи спостерігаються в спектрах  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY Stem 2',

причому один з шляхів складається лише з одного крос-піку між G475' і G486'. Довший шлях включає крос-пік низької інтенсивності між G493' і G469', який не був виявлений у випадку РК84. Сигнали в області 11,5-12,3 ppm, ймовірно, пов'язані з гнучкою областю UUU. Кількість сигналів і наявність між ними крос-піків свідчать про обмін між декількома станами.

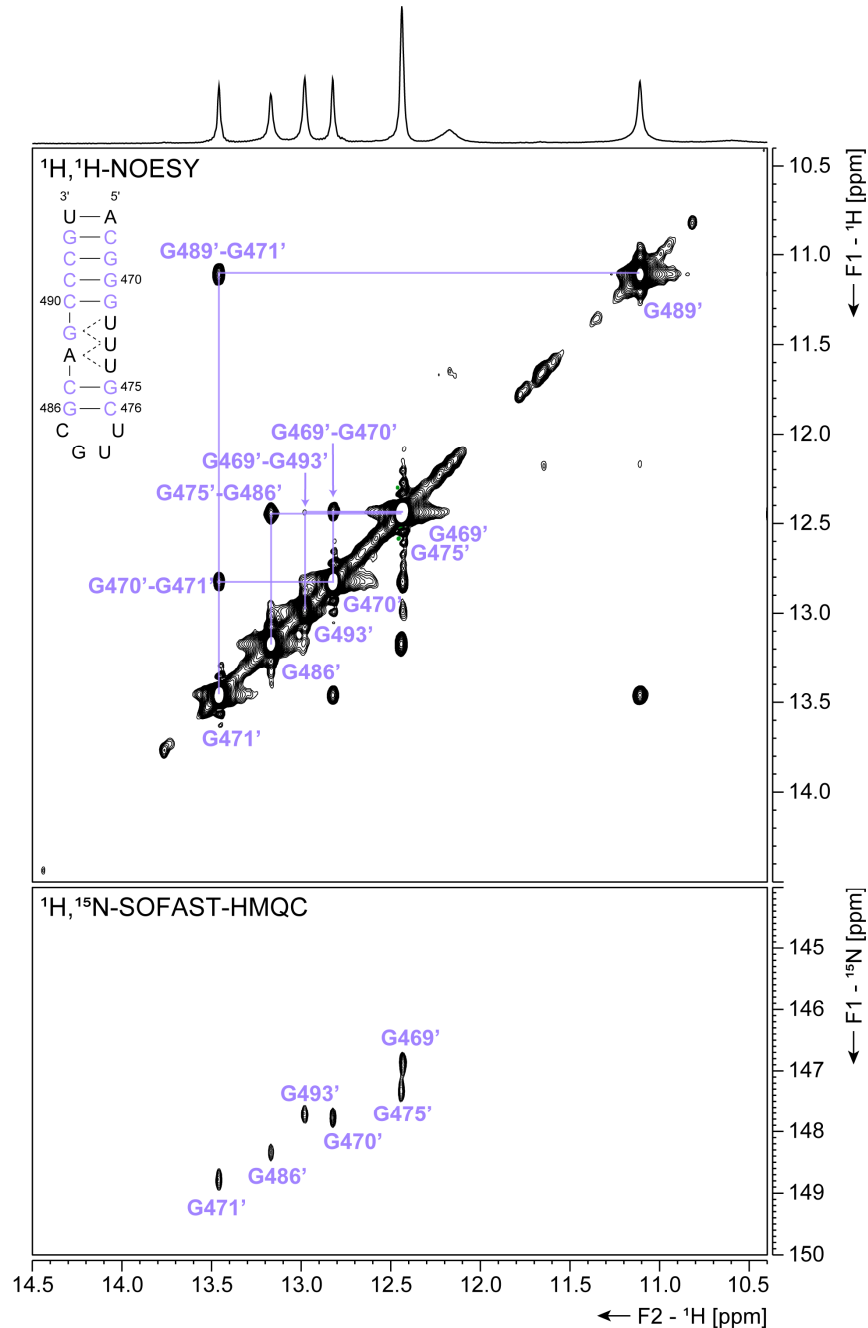


Рисунок 3.26 – Іміно регіон спектрів  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY та  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -SOFAST-HMQC SARS-CoV-1 Stem 2' п.а. при 288 К. Спектри було зареєстровано на частоті 600 МГц; 7,5 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 мМ КРі (рН = 6,2), 50 мМ КСІ. Концентрація РНК 770 мкМ. Час змішування NOESY = 150 мс.

На Рисунку 3.27 показано порівняння 1D  $^1\text{H}$  спектрів зразків Stem 2' та PK84. Деякі сигнали, такі як G471', G470' і G489', мають лише незначну різницю в хімічних зсувах між конструктами. Сигнали G475' і G469' мають більш виражену різницю. Сигнал G486' зсувається приблизно на 0,3 ppm між конструктами. Високе значення зсуву для кінцевої пари основ пояснюється різкою зміною оточення від нативної структури РНК до штучної тетрапетлі. Сигнал G493' в спектрах Stem 2' має відповідний сигнал канонічно спареного G в спектрах PK84, який раніше не було віднесено. В цілому, два РНК конструкти мають схожий NOE-патерн та значення хімічних зсувів, що вказує на наявність Stem 2' в одній зі структур PK84.

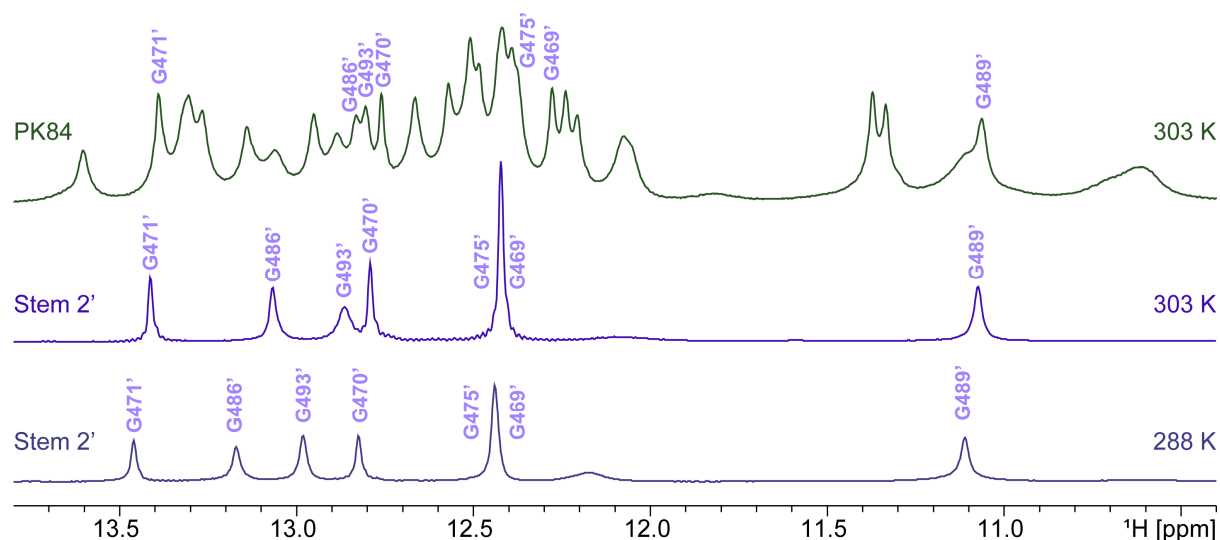


Рисунок 3.27 – Іміно регіон 1D  $^1\text{H}$  JR спектрів SARS-CoV-1 Stem 2' n.a. при 288 та 303 К (знизу) та SARS-CoV-1 PK84 15N GC при 303 К (вгорі). Спектри

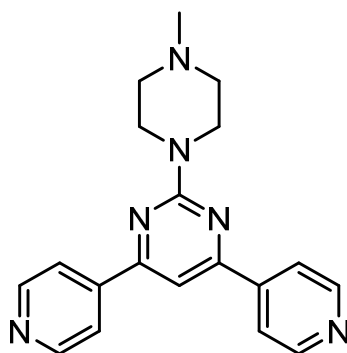
Stem 2' було зареєстровано на частоті 600 МГц; 7,5 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 мМ КРі (рН = 6,2), 50 мМ КСІ. Концентрація РНК 770 мкМ. Спектри PK84 було зареєстровано на частоті 950 МГц; 7,5 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 мМ КРі (рН = 6,2), 50 мМ КСІ. Концентрація РНК 660 мкМ.

### 3.2.3. Титрування РК69

#### 3.2.3.1. Титрування лігандом

Для порівняння спорідненості SARS-CoV-1 РК69 та SARS-CoV-2 РК69 до зв'язування з лігандом було проведено РНК-спостережуване титрування лігандом **HSJA1012**. Експерименти з SARS-CoV-2 РК69 раніше були

проведені Jennifer Adam, учасницею групи, і показали повільний обмін у спектрах 1D  $^1\text{H}$  ЯМР. Було продемонстровано, що зв'язування відбувається в межах області Stem 3, зокрема поблизу опуклості A526. Під час титрування концентрація РНК залишалася постійною на рівні 100 мкМ, тоді як концентрація ліганду **HSJA1012** змінювалася від 0 до 500 мкМ. Спектри 1D  $^1\text{H}$  вимірювали при трьох різних температурах (283, 298 і 303 К) для кожного кроку титрування.



**HSJA1012**

Охарактеризувати обмін при 283 К складно через широту сигналу. Хоча зовнішній вигляд спектра змінюється при додаванні ліганду, зміни в спектрах нагадують розширення сигналу, а не чіткий другий стан при повільному обміні (Рисунок S.5).

Рисунок 3.28 показує порівняння титрувань SARS-CoV-1 PK69 та SARS-CoV-2 PK69 при 298 К. Конструкти демонструють подібну поведінку під час титрування, більшість сигналів мають CSP і LB. Найбільші зміни відбулися з U524, U529, G525 і G508 (виділено на Рисунку 3.28), що підтверджує теорію зв'язування поряд з A526. Останні три сигнали розділяються на два і розширюються, в той час як сигнал другого стану U524 з'являється зсунутим на 0,2 ppm в сильне поле. Це було підтверджено ЯМР експериментами з визначення сайтів зв'язування, які були проведені для SARS-CoV-2 PK69.

Основна відмінність між двома вірусами полягає в необхідній кількості ліганду для індукції змін, тобто спорідненості до ліганду. У випадку SARS-CoV-2 PK69 сигнал G508 розщеплюється на дві частини з додаванням лише

0,5 еквівалента ліганду, тоді як SARS-CoV-1 PK69 для досягнення аналогічного ефекту потрібно 2 еквіваленти. Це спостереження свідчить про те, що, хоча зв'язування відбувається всередині консервативного Stem 3, воно якимось чином залежить від мутації. Наявність другого сайту зв'язування, що примикає до області мутації, може бути можливим поясненням.

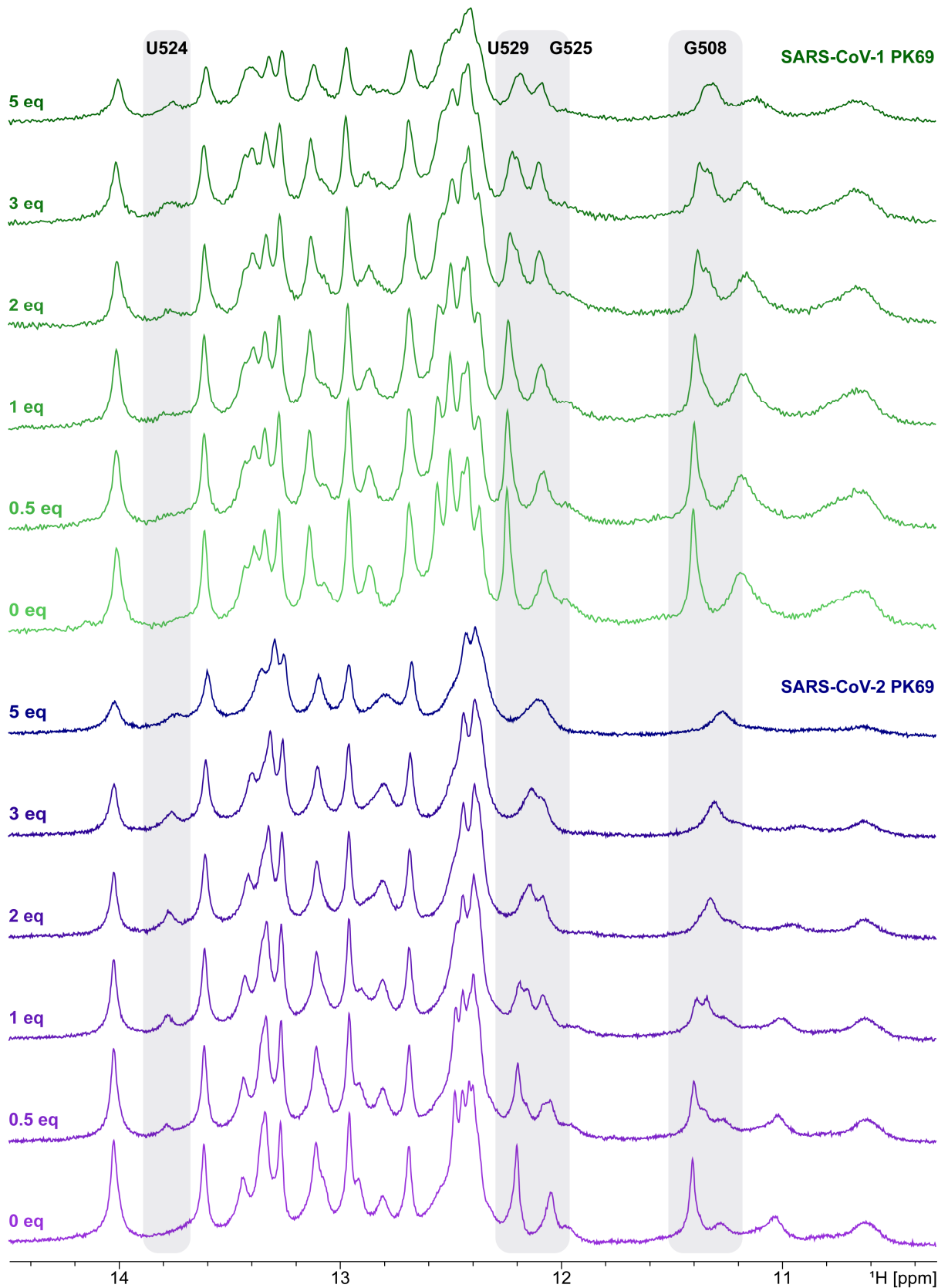


Рисунок 3.28 – Іміно регіон 1D  $^1\text{H}$  JR ЯМР-титрування лігандом (від 0 до 5 екв **HSJA1012**) SARS-CoV-1 (вгорі, зелений) та SARS-CoV-2 PK69 (знизу, фіолетовий). Спектри було зареєстровано на частотах 600 МГц (SARS-CoV-1

PK69) та 800 МГц (SARS-CoV-2 PK69); 298 К, 1-5 % DMSO-d<sub>6</sub>, 7,5 % D<sub>2</sub>O, 25 мМ Крі (рН = 6,2), 50 мМ КСl. Концентрація РНК 100 мкМ.

### 3.2.3.2. Титрування магній-іоном

Щоб дослідити потенційну димеризацію або структурні зміни PK69, викликані Mg<sup>2+</sup>, було проведено РНК-спостережуване титрування MgCl<sub>2</sub>. Концентрація РНК підтримувалася постійною на рівні 100 мкМ протягом титрування, а концентрація MgCl<sub>2</sub> варіювалася від 0 до 2000 мкМ. Як і у випадку з лігандним титруванням, спектри 1D <sup>1</sup>H ЯМР було виміряно при трьох різних температурах (283, 298 і 303 К) для кожного етапу титрування.

Вигляд спектрів залишається відносно незмінним при низьких концентраціях MgCl<sub>2</sub>, але після додавання 5 еквівалентів солі спостерігаються значні відмінності в ЯМР спектрах (Рисунок 3.29). Подібно до лігандного титрування, сигнали U524, U529 і G525 зазнали сильного впливу. Однак, U524 змістився на 0,2 ppm в слабке поле, на відміну від сильнопольного зсуву, який спостерігався під час титрування лігандом **HSJA1012**. Ще один сигнал, який значно змістився – G513. Всі ці сигнали відносяться до Stem 3, де має тенденцію відбуватися димеризація. Однак інші сигнали також показують деякі CSP. Деякі зсуви сигналів відбулися у скупченому районі 12,3-12,6 ppm, хоча робити якісь висновки про них складно. Тому, ґрунтуючись виключно на 1D-експериментах, важко визначити, чи відбулася димеризація, чи зміщення були пов'язані зі зміною складу розчину.

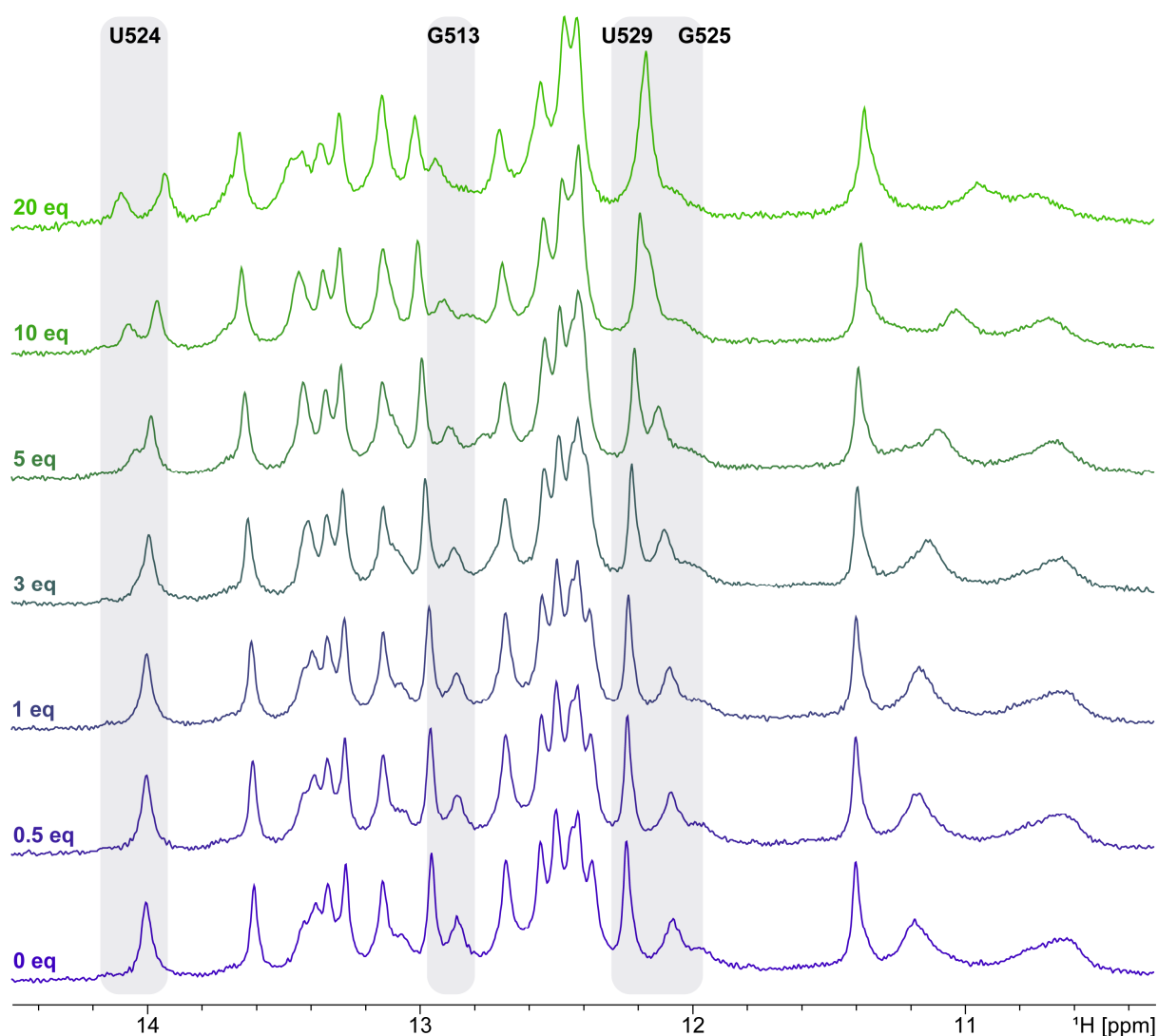


Рисунок 3.29 – Іміно регіон 1D  $^1\text{H}$  JR ЯМР-титрування  $\text{Mg}^{2+}$  (від 0 до 20 екв  $\text{MgCl}_2$ ) SARS-CoV-1 PK69. Спектри було зареєстровано на частоті 600 МГц; 298 К, 7,5 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 мМ Крі (рН = 6,2), 50 мМ КСІ. Концентрація РНК 100 мкМ.

### 3.3. Флуоресцентне титрування

Для кількісного визначення спорідненості зв'язування РК69 з **HSJA1012**, було проведено флуоресцентне титрування. Метод заснований на зміні флуоресценції ліганду у зв'язаному стані порівняно з вільним. Титрування проводили при постійній концентрації **HSJA1012**, що дорівнювала 2 мкМ, та поступово зростаюча концентрація РК69 в діапазоні від 0 до 75 мкМ. Спочатку було визначено оптимальні довжини хвиль збудження і випромінювання **HSJA1012** шляхом вимірювання матриці збудження-випромінювання (Рисунок 3.30). Спектроскопічні властивості ліганду раніше були визначені

Jennifer Adam, та його максимальне поглинання було виявлено на довжині хвилі 280 нм. Однак, щоб уникнути поглинання РНК при 260 нм, вимірювання в цій роботі проводилися на більш довгих хвилях. Визначено, що максимальна довжина хвилі збудження становить  $\lambda_{ex} = 363$  нм, а максимальна довжина хвилі випромінювання дорівнює  $\lambda_{em} = 452$  нм.

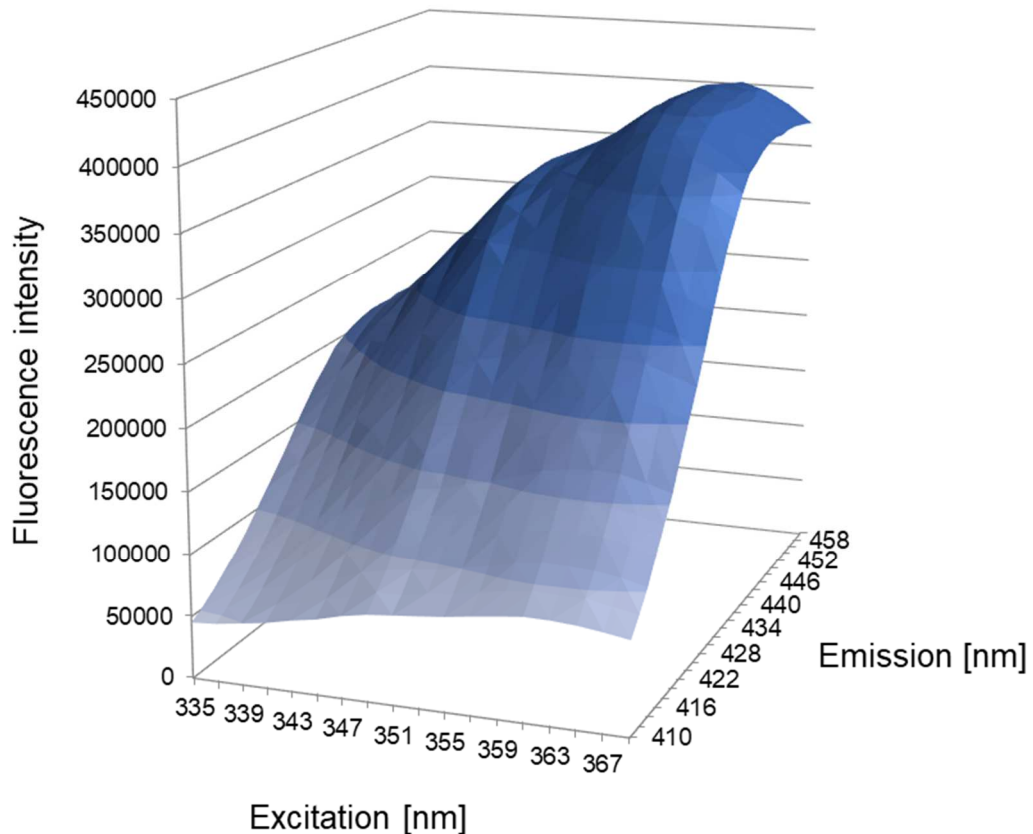


Рисунок 3.30 – Інтенсивність флуоресценції 2 мкМ **HSJA1012** як функція довжин хвиль збудження і випромінювання.

Інтенсивність флуоресценції було виміряно при максимальних довжинах хвиль збудження та випромінювання, та побудовано графік в координатах рівняння Хілла (Рисунок 3.31). Отримано значення константи дисоціації  $K_D = 5,2 \pm 0,4$  мкМ. Коефіцієнт Хілла  $n$  є мірою кооперативності зв'язування ліганд-мішень. Значення  $n = 0,93$  вказує на незначну негативну кооперативність, яка означає, що зв'язування однієї молекули ліганду пригнічує зв'язування наступних молекул. Флуоресцентне титрування раніше було виконано Jennifer Adam для SARS-CoV-2 PK69. Отримане значення  $K_D$  є

однаковим для обох вірусів, що свідчить про їхню однакову спорідненість до зв'язування з досліджуваним лігандом.

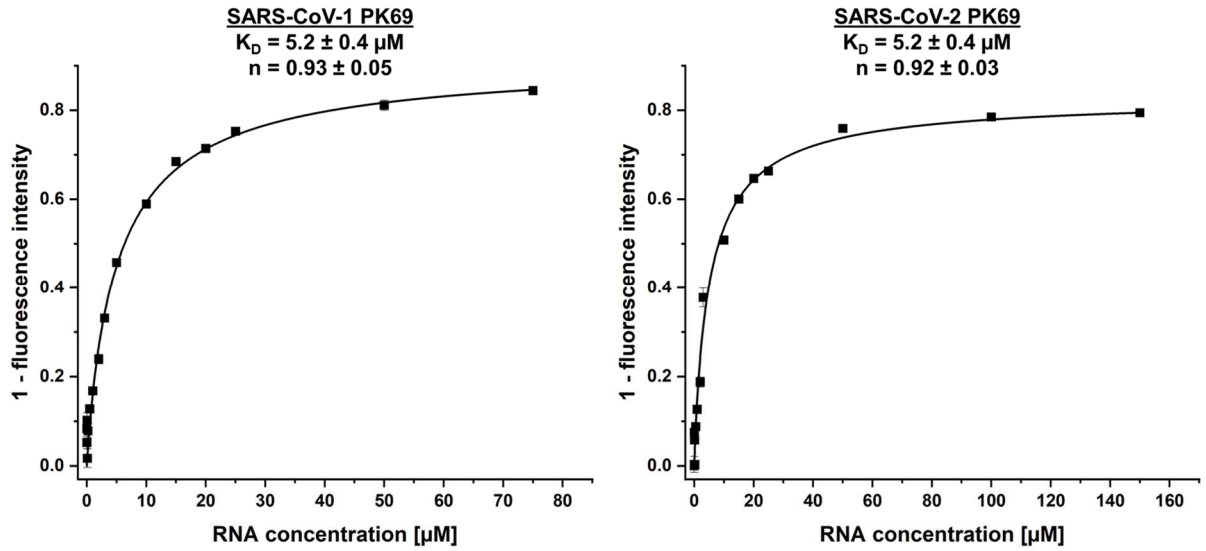


Рисунок 3.31 – Криві флуоресцентного титрування та константи дисоціації **HSJA1012** з SARS-CoV-1 (ліворуч) та SARS-CoV-2 (праворуч) PK69. SARS-CoV-1 PK69: 2 мкМ **HSJA1012**, 0-75 мкМ РНК,  $\lambda_{Ex} = 363$  нм,  $\lambda_{Em} = 452$  нм.  
SARS-CoV-2 PK69: 0,5 мкМ **HSJA1012**, 0-150 мкМ РНК,  $\lambda_{Ex} = 352$  нм,  
 $\lambda_{Em} = 464$  нм.

## Висновки

1. Проведено віднесення сигналів іміно-протонів в ЯМР спектрах конструкта РК69. Отриманий патерн поєднання основ та вторинна структура РНК конструкта узгоджуються з канонічним псевдовузлом.
2. ЯМР-скринінг РК69 визначив меншу кількість хітів, в порівнянні з попереднім скринінгом SARS-CoV-2 РК69. Подальше дослідження зв'язування при скоригованих умовах експерименту може виявитись результативним. Інша перспектива розвитку – розробка та дослідження зв'язування похідних лігандів, що вже показали сильне зв'язування.
3. За допомогою ЯМР- та флуоресцентного титрувань досліджено зв'язування РК69 з лігандом HSJA1012. Показано зв'язування в тому ж сайті зв'язування, що й у випадку SARS-CoV-2 РК69 – в районі опуклого нуклеотиду A526, що знаходиться в Stem 3. Значення константи дисоціації  $K_D$ , визначене за допомогою флуоресцентного титрування, співпадає для РК69 обох вірусів.
4. Проведено віднесення сигналів іміно-протонів в ЯМР спектрах конструкту РК84. Вперше показано наявність другої структури даного конструкта за допомогою спектроскопії ЯМР. Її наявність була додатково підтверджена дослідженням ЯМР спектрів малої РНК, що мімікрує визначний елемент альтернативної структури – Stem 2'. Подальший розвиток проекту полягає в дослідженні структури подовжених фрагментів FSE для більш комплексного розуміння процесів, що відбуваються під час трансляції.

## Бібліографія

- [1] “Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003.” Accessed: Dec. 19, 2023. [Online]. Available: <https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003>
- [2] “WHO EMRO | MERS outbreaks | MERS-CoV | Health topics.” Accessed: Apr. 26, 2024. [Online]. Available: <https://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html>
- [3] “COVID-19 cases | WHO COVID-19 dashboard.” Accessed: Apr. 26, 2024. [Online]. Available: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>
- [4] E. P. Plant, R. Rakauskaitė, D. R. Taylor, and J. D. Dinman, “Achieving a Golden Mean: Mechanisms by Which Coronaviruses Ensure Synthesis of the Correct Stoichiometric Ratios of Viral Proteins,” *J Virol*, vol. 84, no. 9, pp. 4330–4340, 2010, doi: 10.1128/JVI.02480-09.
- [5] S. J. Park, Y. G. Kim, and H. J. Park, “Identification of RNA Pseudoknot-Binding Ligand that Inhibits the -1 Ribosomal Frameshifting of SARS-Coronavirus by Structure-Based Virtual Screening,” *J Am Chem Soc*, vol. 133, no. 26, pp. 10094–10100, Jul. 2011, doi: 10.1021/ja1098325.
- [6] J. A. Kelly *et al.*, “Structural and functional conservation of the programmed -1 ribosomal frameshift signal of SARS coronavirus 2 (SARS-CoV-2),” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 295, no. 31, pp. 10741–10748, Jul. 2020, doi: 10.1074/jbc.AC120.013449.
- [7] Y. Sun *et al.*, “Restriction of SARS-CoV-2 replication by targeting programmed -1 ribosomal frameshifting,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 118, no. 26, p. e2023051118, Jun. 2021, doi: 10.1073/PNAS.2023051118/SUPPL\_FILE/PNAS.2023051118.SD01.XLSX.
- [8] P. R. Bhatt *et al.*, “Structural basis of ribosomal frameshifting during translation of the SARS-CoV-2 RNA genome,” *Science (1979)*, vol. 372, no. 6548, pp. 1306–1313, Jun. 2021, doi: 10.1126/SCIENCE.ABF3546.

- [9] S. Sreeramulu *et al.*, “Exploring the Druggability of Conserved RNA Regulatory Elements in the SARS-CoV-2 Genome,” *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 60, no. 35, pp. 19191–19200, Aug. 2021, doi: 10.1002/anie.202103693.
- [10] E. P. Plant, G. C. Pérez-Alvarado, J. L. Jacobs, B. Mukhopadhyay, M. Hennig, and J. D. Dinman, “A three-stemmed mRNA pseudoknot in the SARS coronavirus frameshift signal,” *PLoS Biol*, vol. 3, no. 6, pp. 1012–1023, 2005, doi: 10.1371/journal.pbio.0030172.
- [11] A. Wacker *et al.*, “Secondary structure determination of conserved SARS-CoV-2 RNA elements by NMR spectroscopy,” *Nucleic Acids Res*, vol. 48, no. 22, pp. 12415–12435, Dec. 2020, doi: 10.1093/NAR/GKAA1013.
- [12] T. Schlick, Q. Zhu, A. Dey, S. Jain, S. Yan, and A. Laederach, “To Knot or Not to Knot: Multiple Conformations of the SARS-CoV-2 Frameshifting RNA Element,” *J Am Chem Soc*, vol. 143, no. 30, pp. 11404–11422, Aug. 2021, doi: 10.1021/jacs.1c03003.
- [13] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 8th ed. New York: WH Freeman, 2021.
- [14] D. W. Staple and S. E. Butcher, “Pseudoknots: RNA Structures with Diverse Functions,” *PLoS Biol*, vol. 3, no. 6, p. e213, Jun. 2005, doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.0030213.
- [15] P. A. Rota *et al.*, “Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome,” *Science (1979)*, vol. 300, no. 5624, pp. 1394–1399, May 2003, doi: 10.1126/SCIENCE.1085952/SUPPL\_FILE/ROTA.SOM.PDF.
- [16] E. Hartenian, D. Nandakumar, A. Lari, M. Ly, J. M. Tucker, and B. A. Glaunsinger, “The molecular virology of coronaviruses,” *J. Biol. Chem*, no. 37, pp. 12910–12934, 2020, doi: 10.1074/jbc.REV120.013930.
- [17] J. D. Dinman, M. J. Ruiz-Echevarria, and S. W. Peltz, “Translating old drugs into new treatments: ribosomal frameshifting as a target for antiviral agents,”

- Trends Biotechnol*, vol. 16, no. 4, p. 190, Apr. 1998, doi: 10.1016/S0167-7799(97)01167-0.
- [18] E. P. Plant, A. C. Sims, R. S. Baric, J. D. Dinman, and D. R. Taylor, “Altering SARS Coronavirus Frameshift Efficiency Affects Genomic and Subgenomic RNA Production,” *Viruses* 2013, Vol. 5, Pages 279-294, vol. 5, no. 1, pp. 279–294, Jan. 2013, doi: 10.3390/V5010279.
- [19] F. Dos Ramos, M. Carrasco, T. Doyle, and I. Brierley, “Programmed -1 ribosomal frameshifting in the SARS coronavirus,” *Biochem Soc Trans*, vol. 32, no. Pt 6, pp. 1081–1083, Dec. 2004, doi: 10.1042/BST0321081.
- [20] C. P. Cho, S. C. Lin, M. Y. Chou, H. T. Hsu, and K. Y. Chang, “Regulation of Programmed Ribosomal Frameshifting by Co-Translational Refolding RNA Hairpins,” *PLoS One*, vol. 8, no. 4, p. e62283, Apr. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0062283.
- [21] C. Roman, A. Lewicka, D. Koirala, N. S. Li, and J. A. Piccirilli, “The SARS-CoV-2 Programmed -1 Ribosomal Frameshifting Element Crystal Structure Solved to 2.09 Å Using Chaperone-Assisted RNA Crystallography,” *ACS Chem Biol*, vol. 16, no. 8, pp. 1469–1481, Aug. 2021, doi: 10.1021/ACSCHEMBIO.1C00324/ASSET/IMAGES/LARGE/CB1C00324\_0005.JPEG.
- [22] K. Zhang *et al.*, “Cryo-EM and antisense targeting of the 28-kDa frameshift stimulation element from the SARS-CoV-2 RNA genome,” *Nature Structural & Molecular Biology* 2021 28:9, vol. 28, no. 9, pp. 747–754, Aug. 2021, doi: 10.1038/s41594-021-00653-y.
- [23] T. C. T. Lan *et al.*, “Secondary structural ensembles of the SARS-CoV-2 RNA genome in infected cells,” *Nature Communications* 2022 13:1, vol. 13, no. 1, pp. 1–14, Mar. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-28603-2.
- [24] S. Yan, Q. Zhu, J. Hohl, A. Dong, and T. Schlick, “Evolution of coronavirus frameshifting elements: Competing stem networks explain conservation and variability,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 120, no. 20, May 2023, doi: 10.1073/PNAS.2221324120.

- [25] N. C. Huston, H. Wan, M. S. Strine, R. de Cesaris Araujo Tavares, C. B. Wilen, and A. M. Pyle, “Comprehensive in vivo secondary structure of the SARS-CoV-2 genome reveals novel regulatory motifs and mechanisms,” *Mol Cell*, vol. 81, no. 3, pp. 584-598.e5, Feb. 2021, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2020.12.041.
- [26] I. Manfredonia *et al.*, “Genome-wide mapping of SARS-CoV-2 RNA structures identifies therapeutically-relevant elements,” *Nucleic Acids Res*, vol. 48, no. 22, pp. 12436–12452, Dec. 2020, doi: 10.1093/NAR/GKAA1053.
- [27] L. Pekarek, M. M. Zimmer, A. S. Gribling-Burrer, S. Buck, R. Smyth, and N. Caliskan, “Cis-mediated interactions of the SARS-CoV-2 frameshift RNA alter its conformations and affect function,” *Nucleic Acids Res*, vol. 51, no. 2, pp. 728–743, Jan. 2023, doi: 10.1093/NAR/GKAC1184.
- [28] J. Choi, S. O’Loughlin, J. F. Atkins, and J. D. Puglisi, “The energy landscape of  $-1$  ribosomal frameshifting,” *Sci Adv*, vol. 6, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1126/SCIADV.AAX6969/SUPPL\_FILE/AAX6969\_SM.PDF.
- [29] E. P. Plant and J. D. Dinman, “The role of programmed-1 ribosomal frameshifting in coronavirus propagation,” *Frontiers in Bioscience*, vol. 13, no. 13, pp. 4873–4881, May 2008, doi: 10.2741/3046/PDF.
- [30] V. Thiel *et al.*, “Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression,” *Journal of General Virology*, vol. 84, no. 9, pp. 2305–2315, Sep. 2003, doi: 10.1099/VIR.0.19424-0/CITE/REFWORKS.
- [31] P. V. Baranov, C. M. Henderson, C. B. Anderson, R. F. Gesteland, J. F. Atkins, and M. T. Howard, “Programmed ribosomal frameshifting in decoding the SARS-CoV genome,” *Virology*, vol. 332, no. 2, pp. 498–510, Feb. 2005, doi: 10.1016/J.VIROL.2004.11.038.
- [32] Z. Lin, R. J. C. Gilbert, and I. Brierley, “Spacer-length dependence of programmed  $-1$  or  $-2$  ribosomal frameshifting on a U6A heptamer supports a role for messenger RNA (mRNA) tension in frameshifting,” *Nucleic Acids Res*, vol. 40, no. 17, p. 8674, Sep. 2012, doi: 10.1093/NAR/GKS629.

- [33] M. C. Su, C. Te Chang, C. H. Chu, C. H. Tsai, and K. Y. Chang, “An atypical RNA pseudoknot stimulator and an upstream attenuation signal for -1 ribosomal frameshifting of SARS coronavirus,” *Nucleic Acids Res*, vol. 33, no. 13, pp. 4265–4275, 2005, doi: 10.1093/NAR/GKI731.
- [34] D. Ishimaru *et al.*, “RNA dimerization plays a role in ribosomal frameshifting of the SARS coronavirus,” *Nucleic Acids Res*, vol. 41, no. 4, pp. 2594–2608, Feb. 2013, doi: 10.1093/nar/gks1361.
- [35] S. A. Strobel, “Biochemical identification of A-minor motifs within RNA tertiary structure by interference analysis,” *Biochem Soc Trans*, vol. 30, no. 6, pp. 1126–1131, Nov. 2002, doi: 10.1042/BST0301126.
- [36] C. Varricchio *et al.*, “Geneticin shows selective antiviral activity against SARS-CoV-2 by interfering with programmed -1 ribosomal frameshifting,” *Antiviral Res*, vol. 208, p. 105452, Dec. 2022, doi: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2022.105452.
- [37] S. Munshi *et al.*, “Identifying Inhibitors of -1 Programmed Ribosomal Frameshifting in a Broad Spectrum of Coronaviruses,” *Viruses*, vol. 14, no. 2, Feb. 2022, doi: 10.3390/V14020177/S1.
- [38] D. G. Ahn *et al.*, “Interference of ribosomal frameshifting by antisense peptide nucleic acids suppresses SARS coronavirus replication,” *Antiviral Res*, vol. 91, no. 1, pp. 1–10, Jul. 2011, doi: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2011.04.009.
- [39] H. S. Haniff *et al.*, “Targeting the SARS-COV-2 RNA genome with small molecule binders and ribonuclease targeting chimera (RiboTAC) degraders,” *ACS Cent Sci*, vol. 6, no. 10, pp. 1713–1721, Oct. 2020, doi: 10.1021/ACSCENTSCI.0C00984/ASSET/IMAGES/LARGE/OC0C00984\_0004.JPEG.
- [40] J. A. Kelly, M. T. Woodside, and J. D. Dinman, “Programmed 1 Ribosomal Frameshifting in coronaviruses: A therapeutic target,” *Virology*, vol. 554, pp. 75–82, 2021, doi: 10.1016/j.virol.2020.12.010.
- [41] J. L. Childs-Disney, X. Yang, Q. M. R. Gibaut, Y. Tong, R. T. Batey, and M. D. Disney, “Targeting RNA structures with small molecules,” *Nature Reviews*

- Drug Discovery* 2022 21:10, vol. 21, no. 10, pp. 736–762, Aug. 2022, doi: 10.1038/s41573-022-00521-4.
- [42] N. F. Rizvi *et al.*, “Discovery of Selective RNA-Binding Small Molecules by Affinity-Selection Mass Spectrometry,” *ACS Chem Biol*, vol. 13, no. 3, pp. 820–831, Mar. 2018, doi: 10.1021/ACSCHEMBIO.7B01013/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CB-2017-010139\_0007.GIF.
- [43] S. L. Wicks and A. E. Hargrove, “Fluorescent indicator displacement assays to identify and characterize small molecule interactions with RNA,” *Methods*, vol. 167, pp. 3–14, Sep. 2019, doi: 10.1016/J.YMETH.2019.04.018.
- [44] J. L. Chen *et al.*, “Design, Optimization, and Study of Small Molecules That Target Tau Pre-mRNA and Affect Splicing,” *J Am Chem Soc*, vol. 142, no. 19, pp. 8706–8727, May 2020, doi: 10.1021/JACS.0C00768/SUPPL\_FILE/JA0C00768\_SI\_006.XLSX.
- [45] C. M. Connelly, F. A. Abulwerdi, and J. S. Schneekloth, “Discovery of RNA binding small molecules using small molecule microarrays,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 1518, pp. 157–175, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-6584-7\_11/COVER.
- [46] O. Binas *et al.*, “<sup>19</sup>F NMR-Based Fragment Screening for 14 Different Biologically Active RNAs and 10 DNA and Protein Counter-Screens,” *ChemBioChem*, vol. 22, no. 2, pp. 423–433, Jan. 2021, doi: 10.1002/CBIC.202000476.
- [47] M. D. Shortridge and G. Varani, “Efficient NMR Screening Approach to Discover Small Molecule Fragments Binding Structured RNA,” *ACS Med Chem Lett*, vol. 12, no. 8, pp. 1253–1260, Aug. 2021, doi: 10.1021/ACSMEDCHEMLETT.1C00109/SUPPL\_FILE/ML1C00109\_SI\_003.PDF.
- [48] D. Hymon *et al.*, “NMR <sup>1</sup>H,<sup>19</sup>F-based screening of the four stem-looped structure 5\_SL1–SL4 located in the 5'-untranslated region of SARS-CoV 2

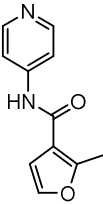
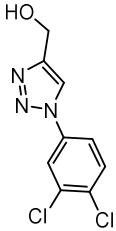
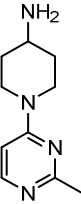
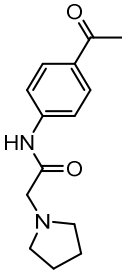
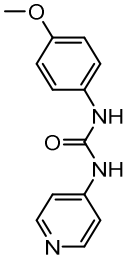
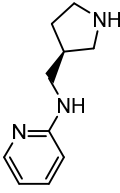
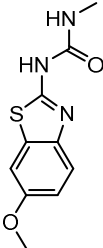
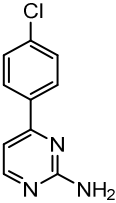
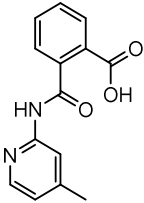
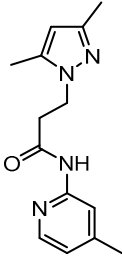
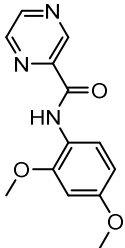
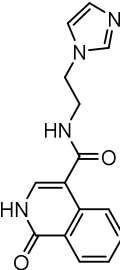
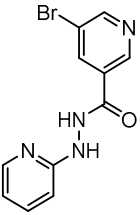
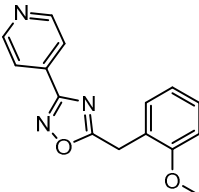
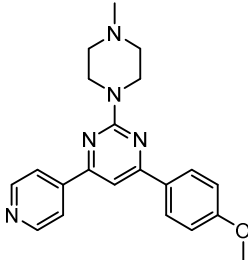
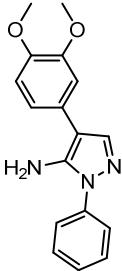
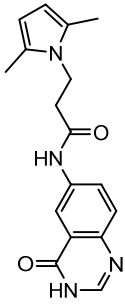
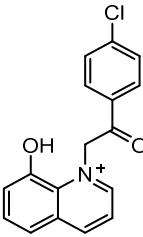
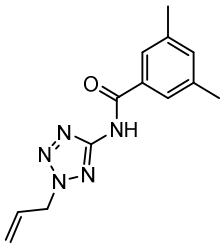
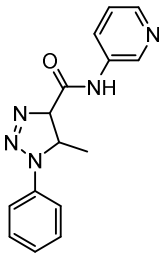
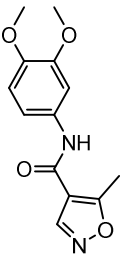
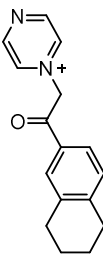
- RNA,” *RSC Med Chem*, vol. 15, no. 1, pp. 165–177, Jan. 2024, doi: 10.1039/D3MD00322A.
- [49] D. R. Calabrese, C. M. Connelly, and J. S. Schneekloth, “Ligand-observed NMR techniques to probe RNA-small molecule interactions,” in *Methods in Enzymology*, vol. 623, Academic Press Inc., 2019, pp. 131–149. doi: 10.1016/bs.mie.2019.05.030.
- [50] A. D. Gossert and W. Jahnke, “NMR in drug discovery: A practical guide to identification and validation of ligands interacting with biological macromolecules,” *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, vol. 97, pp. 82–125, Nov. 2016, doi: 10.1016/J.PNMRS.2016.09.001.
- [51] C. Dalvit, P. Pevarello, M. Tato, M. Veronesi, A. Vulpetti, and M. Sundström, “Identification of compounds with binding affinity to proteins via magnetization transfer from bulk water,” *J Biomol NMR*, vol. 18, no. 1, pp. 65–68, 2000, doi: 10.1023/A:1008354229396/METRICS.
- [52] P. J. Hajduk, E. T. Olejniczak, and S. W. Fesik, “One-dimensional relaxation- and diffusion-edited NMR methods for screening compounds that bind to macromolecules,” *J Am Chem Soc*, vol. 119, no. 50, pp. 12257–12261, Dec. 1997, doi: 10.1021/JA9715962/ASSET/IMAGES/LARGE/JA9715962F00004.JPEG.
- [53] “Heat Inactivation | NEB.” Accessed: Apr. 25, 2024. [Online]. Available: <https://www.neb.com/en/tools-and-resources/usage-guidelines/heat-inactivation>
- [54] W. Lee, M. Tonelli, and J. L. Markley, “NMRFAM-SPARKY: enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy,” *Bioinformatics*, vol. 31, no. 8, p. 1325, Apr. 2015, doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTU830.
- [55] B. Fürtig, C. Richter, J. Wöhnert, and H. Schwalbe, “NMR spectroscopy of RNA,” *ChemBioChem*, vol. 4, no. 10, pp. 936–962, Oct. 06, 2003. doi: 10.1002/cbic.200300700.
- [56] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, and K. Wüthrich, “Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy

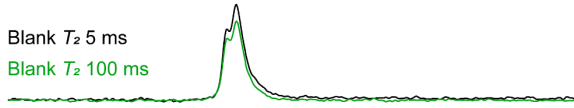
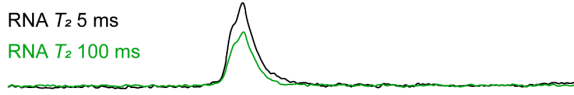
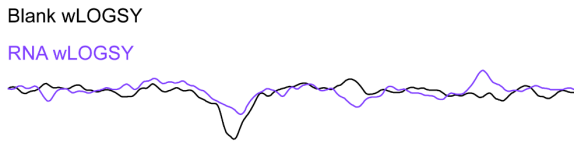
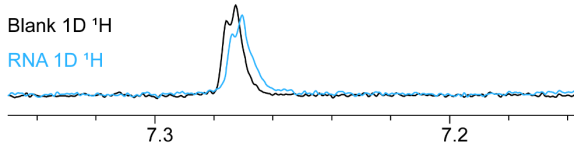
indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, no. 23, pp. 12366–12371, Nov. 1997, doi: 10.1073/PNAS.94.23.12366/ASSET/FA9E3DFC-A01F-45E8-B4EF-A0776E664181/ASSETS/GRAPHIC/PQ2272904004.JPEG.

- [57] P. Schanda and B. Brutscher, “Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds,” *J Am Chem Soc*, vol. 127, no. 22, pp. 8014–8015, Jun. 2005, doi: 10.1021/JA051306E/SUPPL\_FILE/JA051306ESI20050412\_060033.PDF.

## Додатки

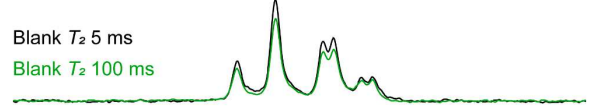
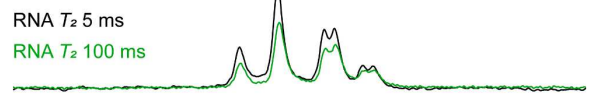
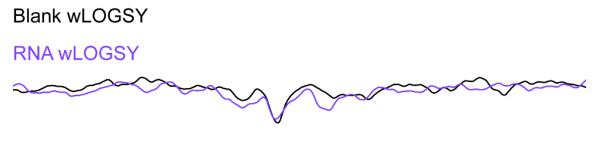
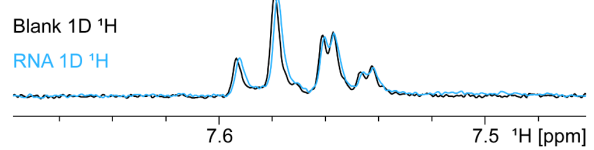
Таблиця S.1 – Сполуки, що було використано для скринінгу.

<p><b>Z1</b></p> 	<p><b>Z2</b></p> 	<p><b>Z3</b></p> 	<p><b>Z4</b></p> 	<p><b>Z5</b></p> 	<p><b>Z6</b></p> 
<p><b>Z7</b></p> 	<p><b>Z8</b></p> 	<p><b>A04</b></p> 	<p><b>A05</b></p> 	<p><b>B04</b></p> 	<p><b>B05</b></p> 
<p><b>C02</b></p> 	<p><b>C05</b></p> 	<p><b>D01</b></p> 	<p><b>D02</b></p> 	<p><b>D05</b></p> 	<p><b>D06</b></p> 
<p><b>E02</b></p> 	<p><b>F04</b></p> 	<p><b>G05</b></p> 	<p><b>H06</b></p> 		

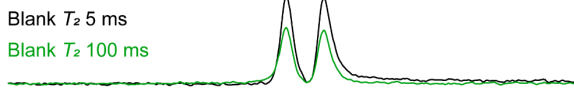
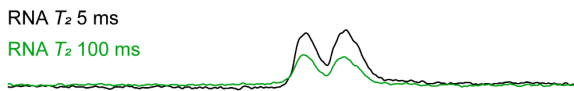
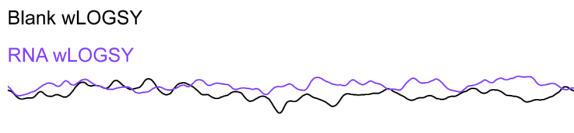
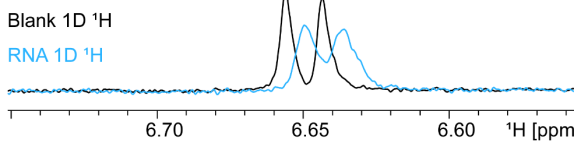
**Z1**Blank  $T_2$  5 ms  
Blank  $T_2$  100 msRNA  $T_2$  5 ms  
RNA  $T_2$  100 msBlank wLOGSY  
RNA wLOGSYBlank 1D  $^1\text{H}$   
RNA 1D  $^1\text{H}$ 

7.3

7.2

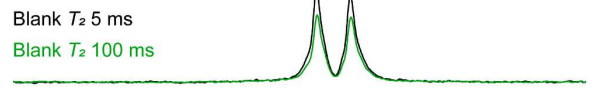
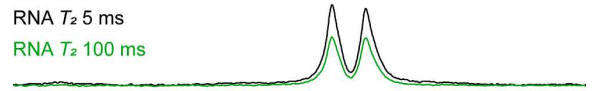
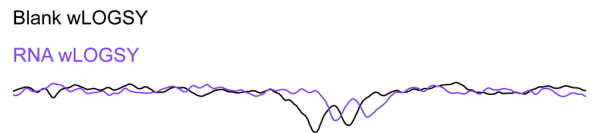
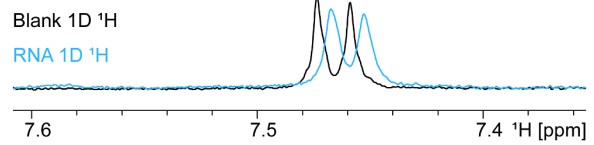
**Z2**Blank  $T_2$  5 ms  
Blank  $T_2$  100 msRNA  $T_2$  5 ms  
RNA  $T_2$  100 msBlank wLOGSY  
RNA wLOGSYBlank 1D  $^1\text{H}$   
RNA 1D  $^1\text{H}$ 

7.6

7.5  $^1\text{H}$  [ppm]**Z3**Blank  $T_2$  5 ms  
Blank  $T_2$  100 msRNA  $T_2$  5 ms  
RNA  $T_2$  100 msBlank wLOGSY  
RNA wLOGSYBlank 1D  $^1\text{H}$   
RNA 1D  $^1\text{H}$ 

6.70

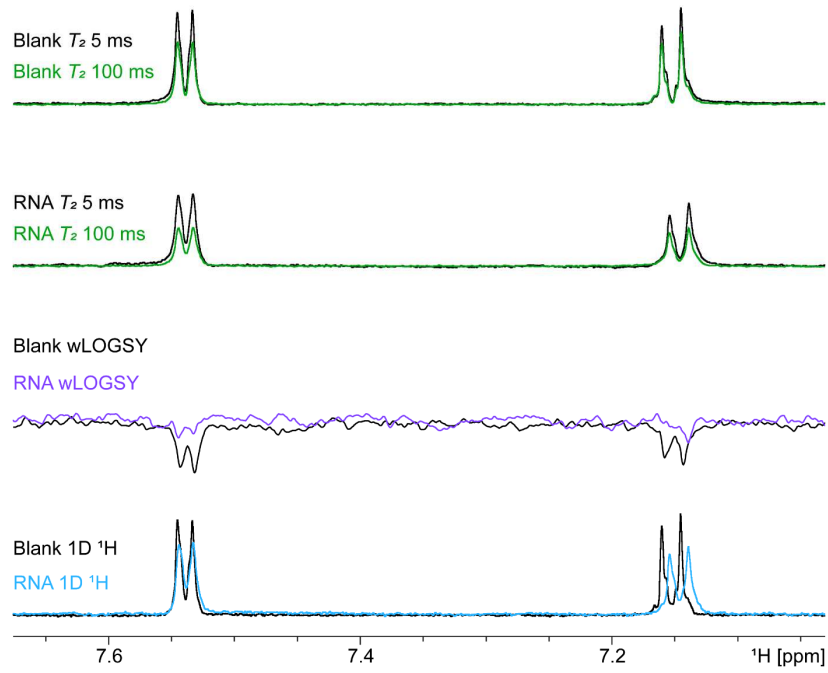
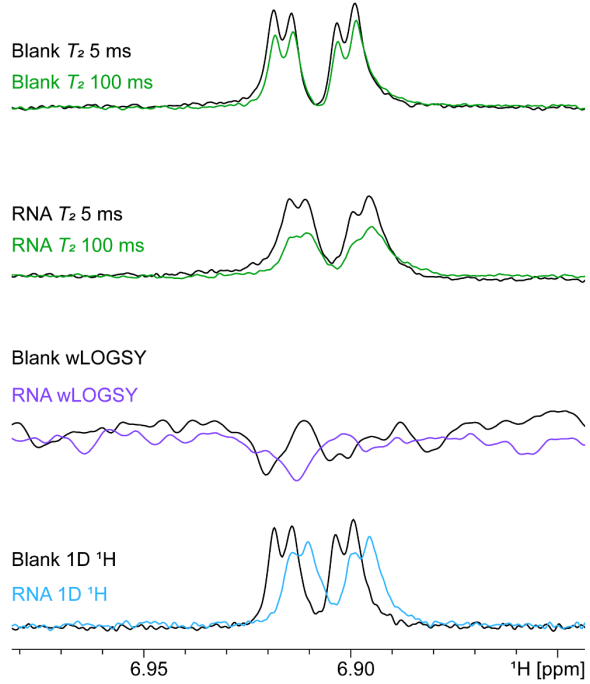
6.65

6.60  $^1\text{H}$  [ppm]**Z4**Blank  $T_2$  5 ms  
Blank  $T_2$  100 msRNA  $T_2$  5 ms  
RNA  $T_2$  100 msBlank wLOGSY  
RNA wLOGSYBlank 1D  $^1\text{H}$   
RNA 1D  $^1\text{H}$ 

7.6

7.5

7.4  $^1\text{H}$  [ppm]

**Z5****Z7**

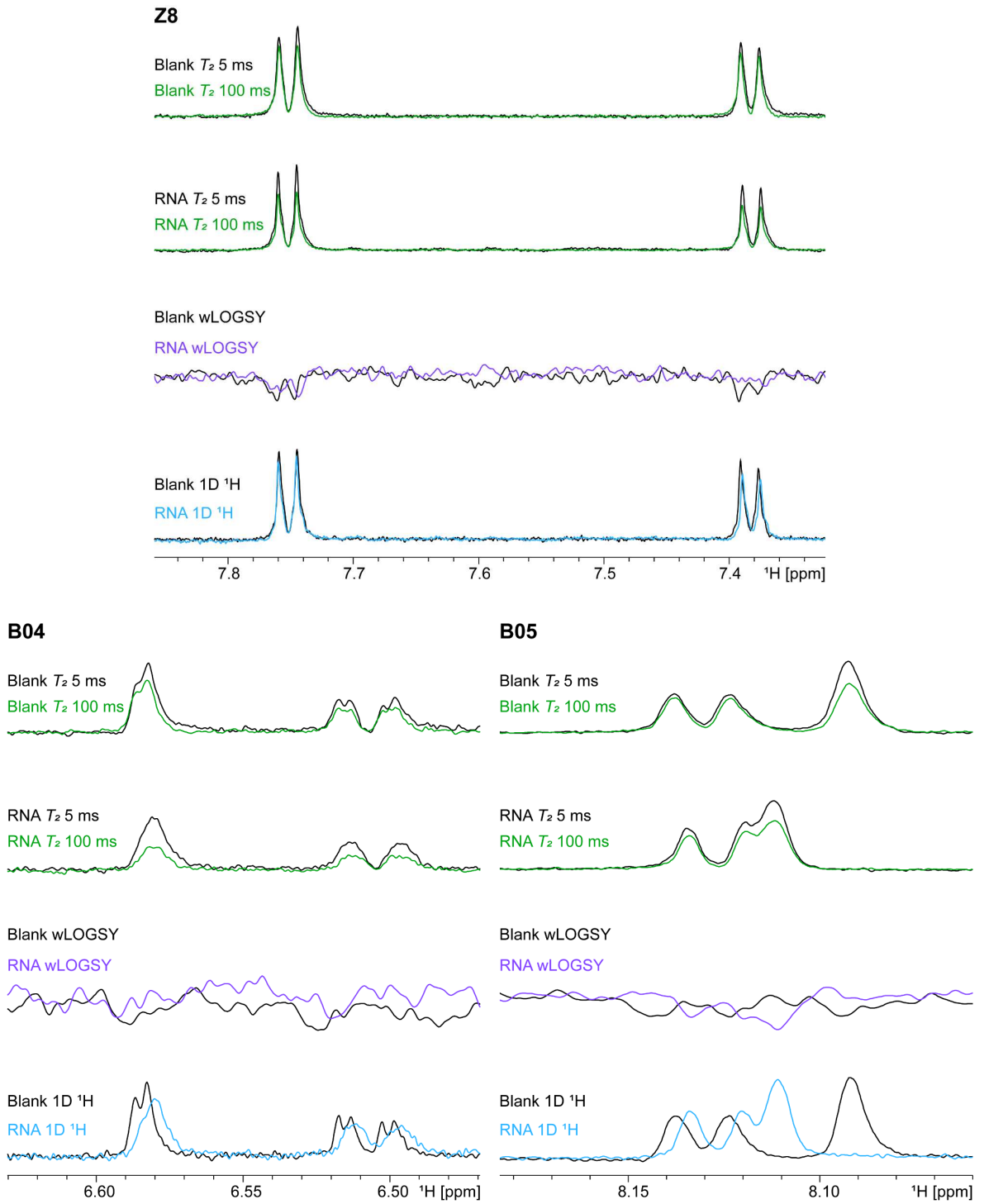


Рисунок S.1 – ЯМР-скрінінг експерименти потенційних слабких зв'язників з РК69. Спектри було зареєстровано на частоті 600 МГц; 298 К, 5 % ДМСО- $d_6$ , 25 мМ КРі (рН = 6,2), 50 мМ КСІ. Концентрація РНК 10 мкМ, концентрація фрагменту 250 мкМ.

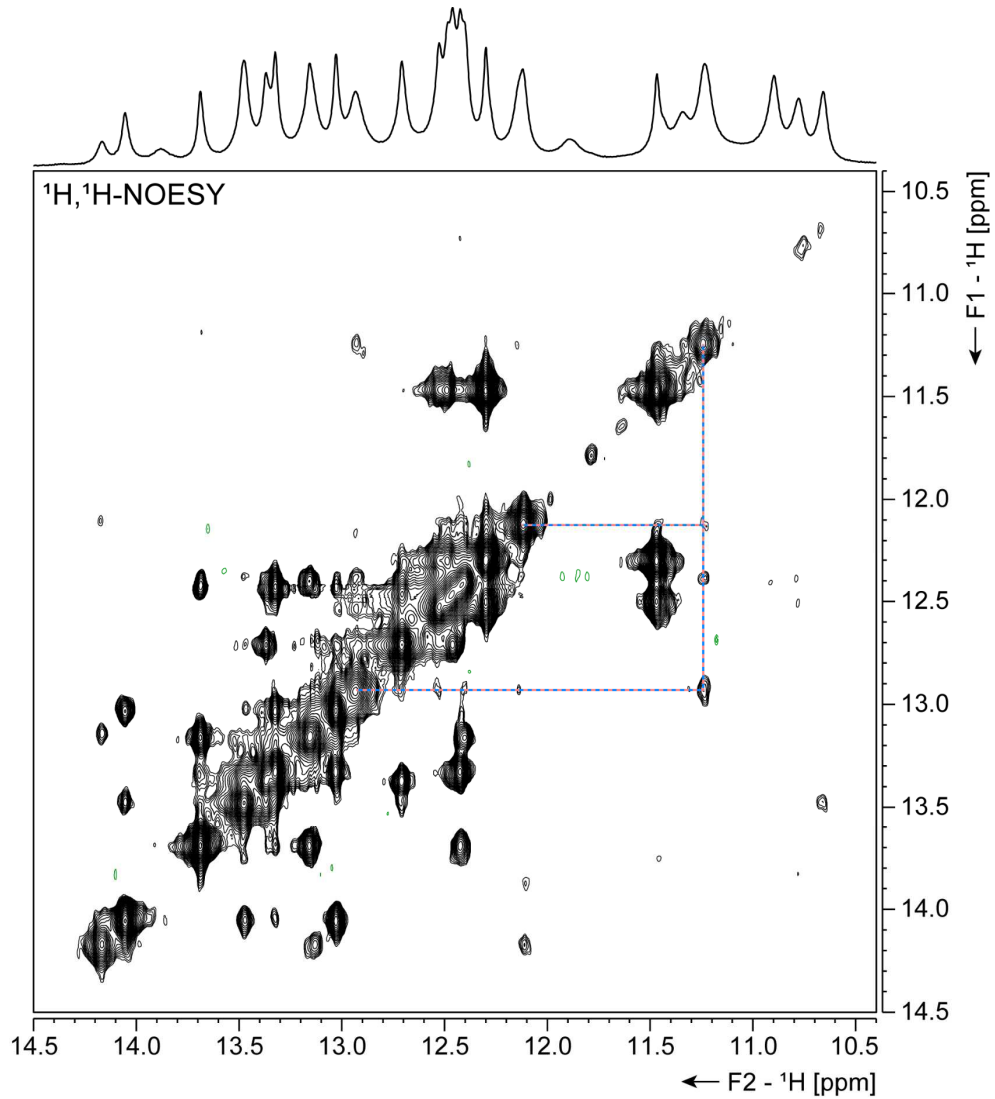


Рисунок S.2 – Іміно регіон спектру  $^1\text{H}, ^1\text{H}\text{-NOESY SARS-CoV-1 PK69 } ^{15}\text{N}$  при 283 К. Спектр було зареєстровано на частоті 950 МГц; 7,5 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 мМ КРі (рН = 6,2), 50 мМ КСІ. Концентрація РНК 675 мкМ.

Час змішування = 150 мс.

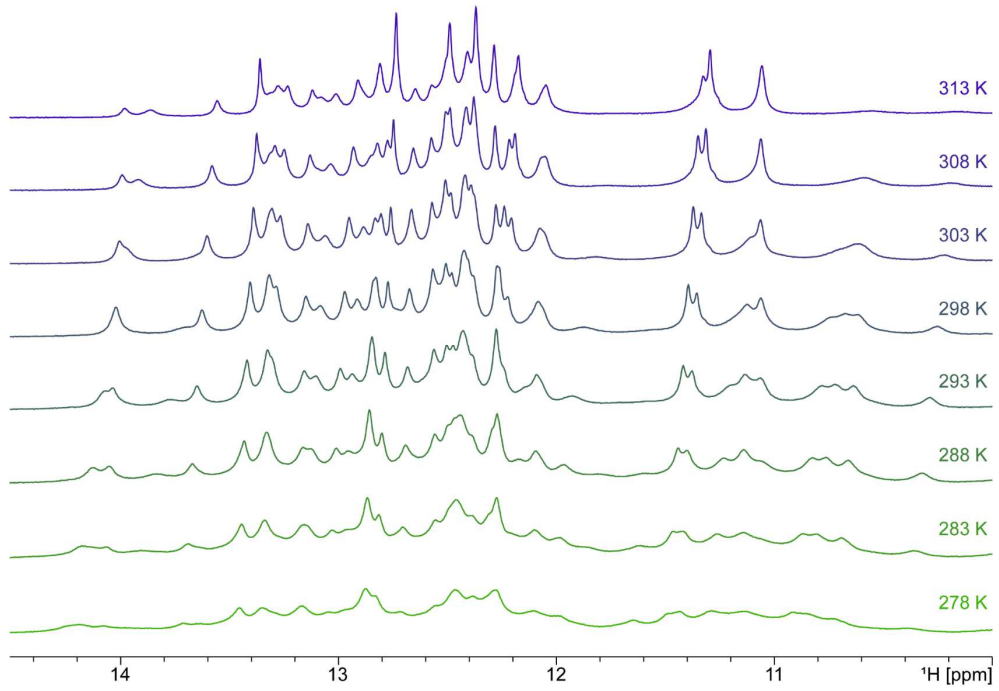


Рисунок S.3 – Іміно регіон 1D  $^1\text{H}$  JR спектрів SARS-CoV-1 PK84  $^{15}\text{N}$  GC п.а. при 278-313 К. Спектри було зареєстровано на частоті 950 МГц; 7,5 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 мМ КРі (рН = 6,2), 50 мМ КСІ. Концентрація РНК 660 мкМ.

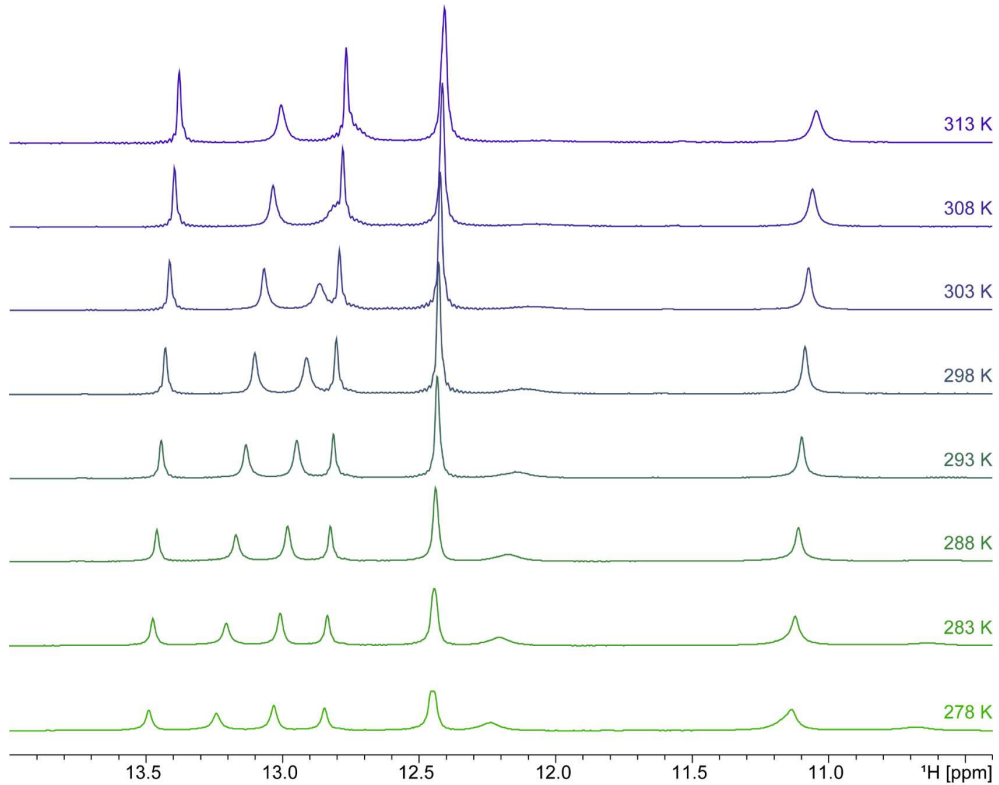


Рисунок S.4 – Іміно регіон 1D  $^1\text{H}$  JR спектрів SARS-CoV-1 Stem 2' п.а. при 278-313 К. Спектри було зареєстровано на частоті 600 МГц; 7,5 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 мМ КРі (рН = 6,2), 50 мМ КСІ. Концентрація РНК 770 мкМ.

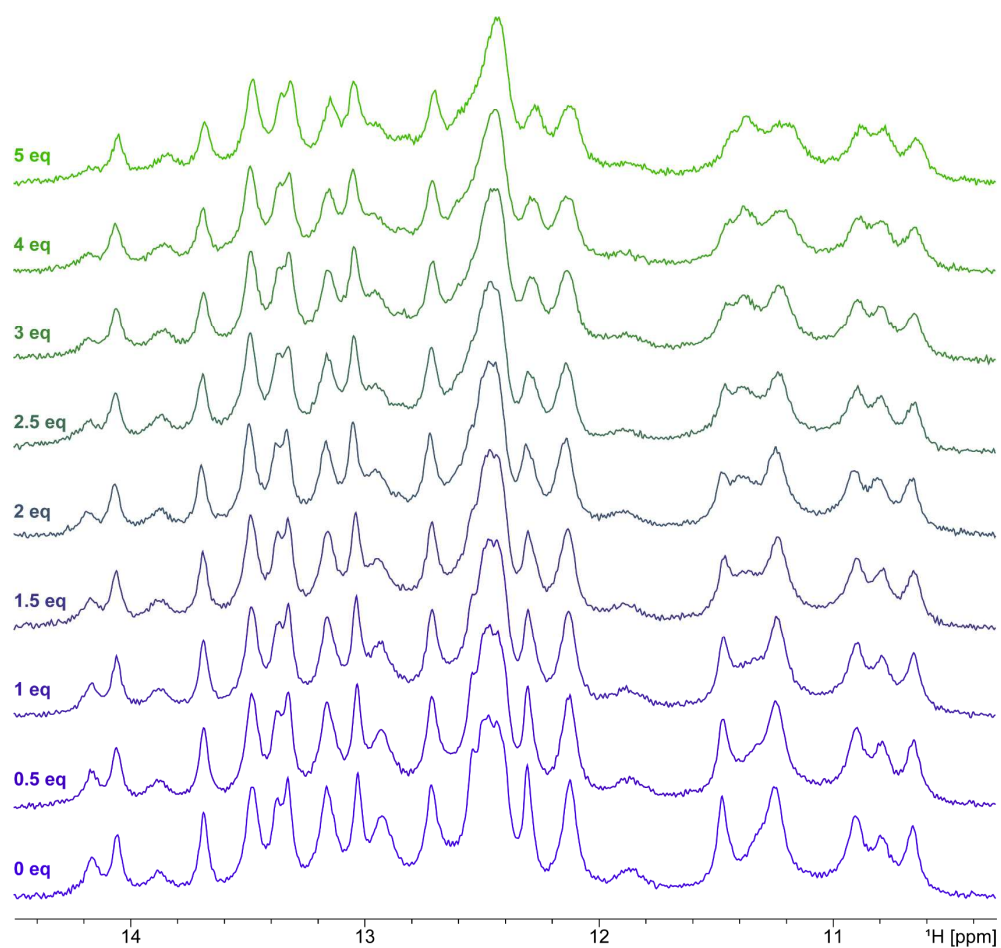


Рисунок S.5 – Іміно регіон 1D <sup>1</sup>H JR ЯМР-титрування лігандом (від 0 до 5 екв **HSJA1012**) SARS-CoV-1 РНК69 при 283 К. Спектри було зареєстровано на частоті 600 МГц; 1-5 % ДМСО-d<sub>6</sub>, 7,5 % D<sub>2</sub>O, 25 мМ Крі (рН = 6,2), 50 мМ КСІ. Концентрація РНК 100 мкМ.

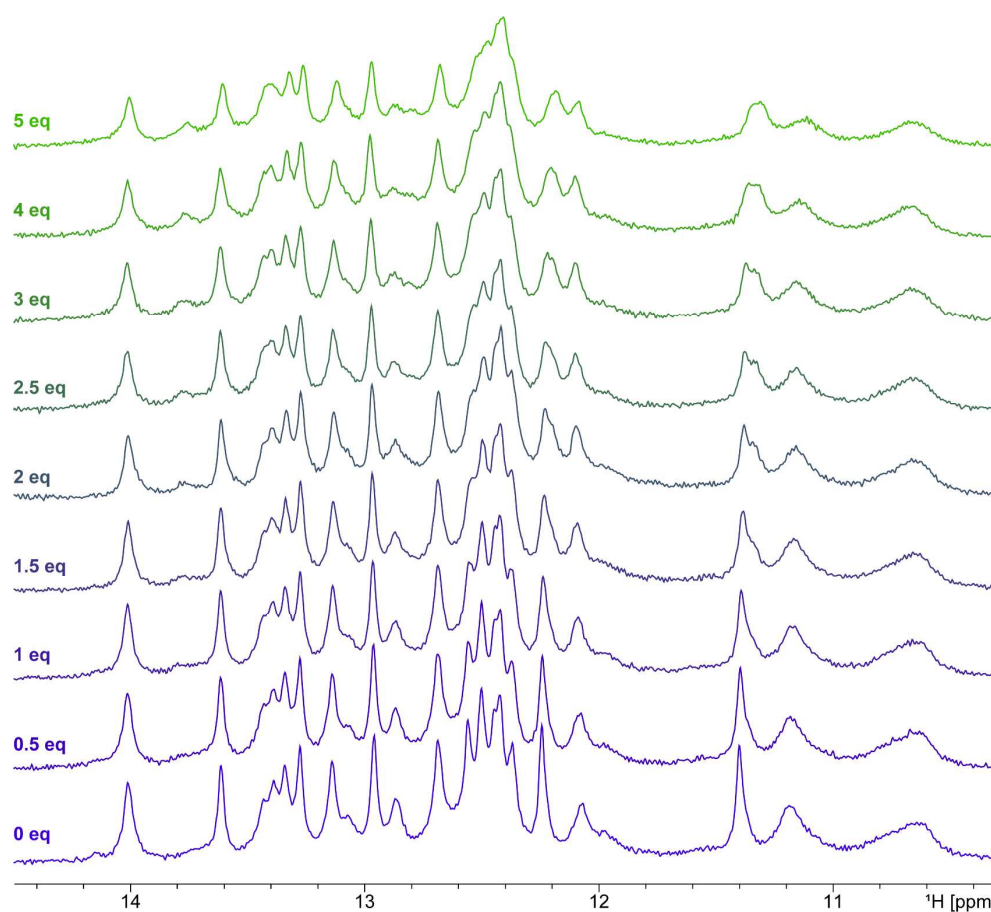


Рисунок S.6 – Іміно регіон 1D  $^1\text{H}$  JNMR ЯМР-титрування лігандом (від 0 до 5 екв **HSJA1012**) SARS-CoV-1 PK69 при 298 К. Спектри було зареєстровано на частоті 600 МГц; 1-5 % ДМСО- $d_6$ , 7,5 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 мМ Крі (рН = 6,2), 50 мМ КСІ. Концентрація РНК 100 мкМ.

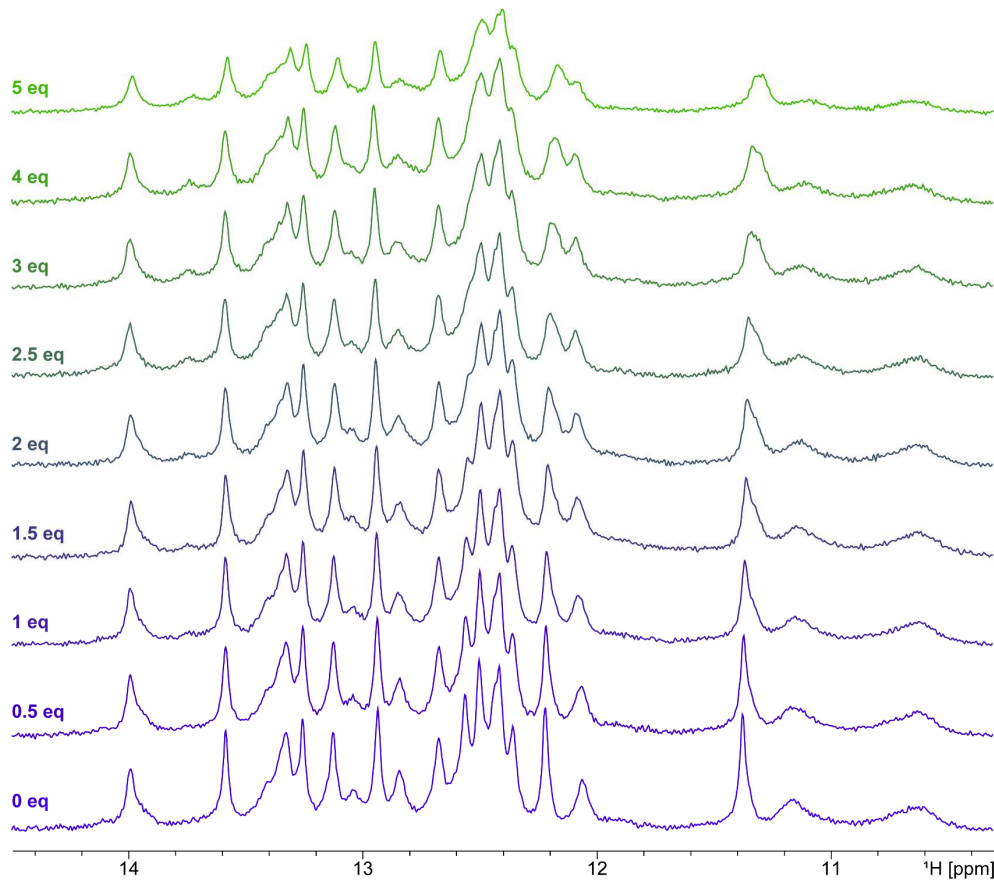


Рисунок S.7 – Іміно регіон 1D <sup>1</sup>H JR ЯМР-титрування лігандом (від 0 до 5 екв **HSJA1012**) SARS-CoV-1 РНК69 при 303 К. Спектри було зареєстровано на частоті 600 МГц; 1-5 % ДМСО-d<sub>6</sub>, 7,5 % D<sub>2</sub>O, 25 мМ Крі (рН = 6,2), 50 мМ КСІ. Концентрація РНК 100 мкМ.

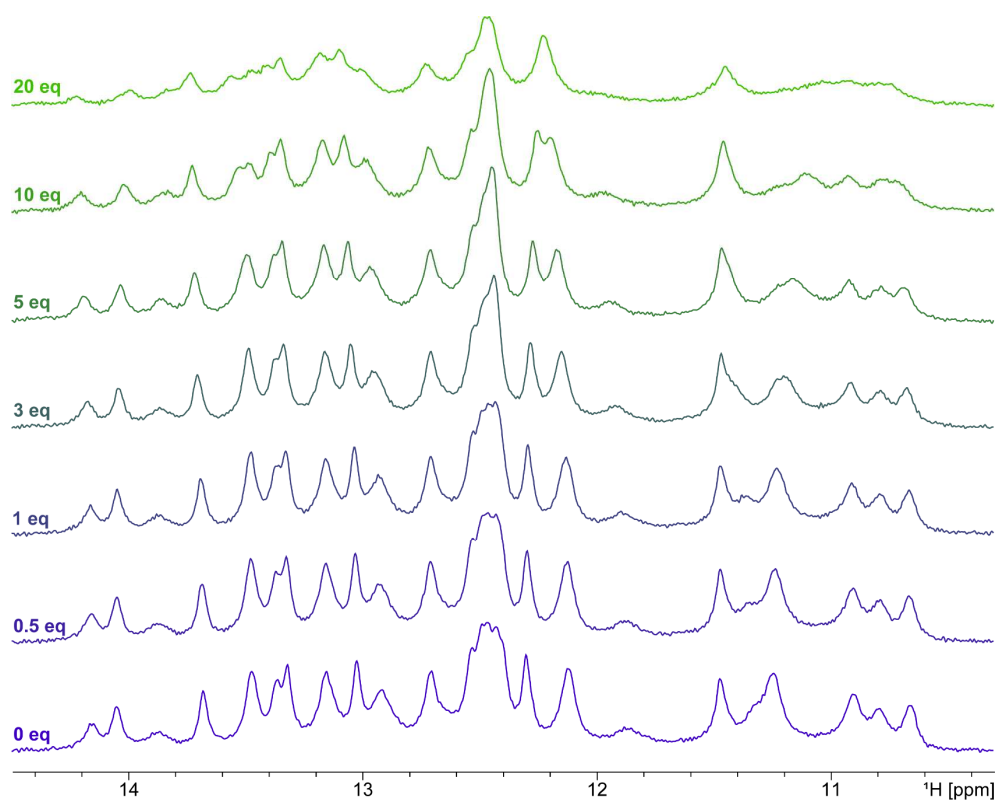


Рисунок S.8 – Іміно регіон 1D <sup>1</sup>H JNMR ЯМР-титрування Mg<sup>2+</sup> (від 0 до 20 екв MgCl<sub>2</sub>) SARS-CoV-1 РК69. Спектри було зареєстровано на частоті 600 МГц; 283 К, 7,5 % D<sub>2</sub>O, 25 мМ Крі (рН = 6,2), 50 мМ КСІ. Концентрація РНК 100 мкМ.

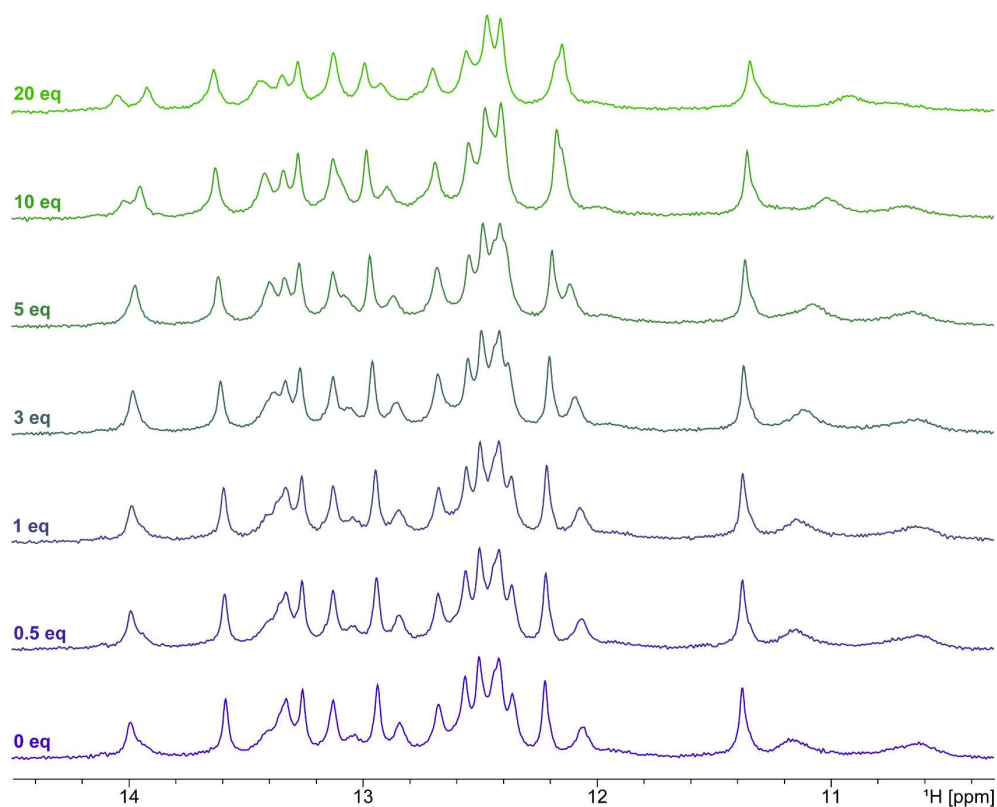


Рисунок S.9 – Іміно регіон 1D <sup>1</sup>H JR ЯМР-титрування Mg<sup>2+</sup> (від 0 до 20 екв MgCl<sub>2</sub>) SARS-CoV-1 РК69. Спектри було зареєстровано на частоті 600 МГц; 303 К, 7,5 % D<sub>2</sub>O, 25 мМ Крі (рН = 6,2), 50 мМ КСІ. Концентрація РНК 100 мкМ.