



**VILNIAUS UNIVERSITETAS**  
**CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS**  
**CHEMIJOS INSTITUTAS**  
**ORGANINĖS CHEMIJOS KATEDRA**

**Laurynas Vaitkus**  
Farmacinė chemija  
Magistro baigiamasis darbas

**SARS-COV-2 VIRUSO HELIKAZĖS NSP13 MECHANISTINIAI  
TYRIMAI**

Darbo vadovas  
dr. Algirdas Toleikis

Vilnius 2023

## TURINYS

<b>SANTRUMPOS</b> .....	<b>3</b>
<b>IVADAS</b> .....	<b>4</b>
<b>1.LITERATŪROS APŽVALGA</b> .....	<b>5</b>
1.1 Korona virusų struktūra ir geno organizacija.....	5
1.2 Viruso Sars-CoV-2 vystymosi ciklas.....	6
1.3 Helikazių struktūra ir funkcija.....	9
1.4 Helikazės kaip antivirusinių vaistų taikymas.....	11
1.5 Koronavirusų helikazės nsp13 struktūra ir funkcija.....	13
1.6 Junginių, nukreiptų prieš Sars-CoV-2 helikazę nsp13, terapinis potencialas.....	14
<b>2.MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODIKA</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1 Medžiagos ir prietaisai</b> .....	<b>16</b>
2.1.1 Reagentai.....	16
2.1.2 Oligonukleotidai.....	16
2.1.3 Fermentai.....	17
2.1.4 Rinkiniai.....	17
2.1.5 Naudoti buferiniai tirpalai.....	17
2.1.6 Dažai ir žymenys.....	19
2.1.7 Priemonės.....	19
2.1.8 Prietaisai.....	19
2.1.9 Plazmidės.....	20
2.1.10 Bakterijų kamienai.....	20
<b>2.2 Metodai</b> .....	<b>20</b>
2.2.1 <i>E.coli</i> transformacija.....	20
2.2.2 Baltymų raiška.....	20
2.2.3 Baltymų gryninimas.....	21
2.2.4 Baltymų elektroforezė.....	21
2.2.5 Bradford baltymų koncentracijos nustatymo metodas.....	21
2.2.6 Mutacijų įvedimas į nsp13 aktyvų centrą.....	22
2.2.7 Malachito žalumos ATPazinio aktyvumo tyrimas.....	22
2.2.8 ATP/NADH jungtinis fermentinis ATPazinio aktyvumo tyrimas.....	23
2.2.9 Šakoto DNR substrato sintezė.....	24
2.2.10 DNR elektroforezė.....	25
2.2.11 Helikazinio aktyvumo kokybinis tyrimas.....	25
2.2.12 Denatūruojanti RNR elektroforezė.....	25
2.2.13 Polimerazinio aktyvumo kokybinis tyrimas.....	25
<b>3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS</b> .....	<b>27</b>
3.1 Nsp13 ekspresija ir gryninimas.....	27
3.2 Nsp13 neaktyvių mutantų kūrimas.....	29
3.3 Nsp13 ATPazinio aktyvumo matavimai.....	30
3.4 Nsp13 helikazinio aktyvumo matavimai.....	30
3.5 Nsp13 įtakos polimerazės nsp12 polimeraziniui aktyvumui matavimai.....	35
<b>IŠVADOS</b> .....	<b>37</b>
<b>LITERATŪROS SĄRAŠAS</b> .....	<b>38</b>
<b>SANTRAUKA</b> .....	<b>42</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>43</b>

## SANTRUMPOS

ADP – adenosin-5'-difosfatas

ATP – adenzin-5'- trifosfatas

BSA – jaučio serumo albuminas

DTT- ditiotreitolis

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis

ERGIC – šiurkščiojo endoplazminio tinklo ir Goldžio komplekso tarpinis kompartmentas

IMAC – imobilizuotų metalų jonų chromatografija

IPTG – izopropiltio-β -D-galaktozidas

iRNR – informacinė RNR

NTP – nukleotidų trifosfatas

ORF – atviro skaitymo rėmelis

PAGE – poliakrilamidinio gelio elektroforezė

RTC – replikazės transkriptazės kompleksas

SDS – natrio dodecil sulfatas

UTR – netransliuojamas regionas

ZBD – cinką surišantis domenas

## ĮVADAS

Koronavirusai, pirma kartą identifikuoti XX a. septintajame dešimtmetyje, žmonių populiacijose periodiškai sukelia didelio masto epidemijas. Per pastaruosius dvidešimt metų įvyko trys koronavirusų protrūkiai: 2003 metais SARS (angl. *severe acute respiratory syndrome*), 2012 metais MERS (angl. *Middle East Respiratory Syndrome*), ir 2020 metais COVID-19 (angl. *Coronavirus Disease 2019*). 2019 metais pasirodžiusi liga COVID-19 sukėlė pasaulinio masto krizę. Šią ligą sukelia SARS-Cov-2 (angl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) – viengrandės RNR virusas. Šis oro lašeliniu būdu perduodamas virusas pasireiškia įvairiais simptomais, įskaitant karščiavimą, kosulį, skonio ir kvapo praradimą, raumenų skausmus, bei gal sukelti rimtas sveikatos komplikacijas – plaučių uždegimą, kraujo krešulius ir mirtį. Dėka turimų vaistų ir vakcinų nekontroliuojamas viruso plitimas buvo suvaldytas ir visuomenės prisitaikė gyventi su virusu. Tačiau ši liga vis dar kasdien yra diagnozuojama milijonams žmonių visame pasaulyje ir dėl jos sukeltų padarinių miršta tūkstančiai žmonių. Dėl sparčios viruso genomo mutacijos vis pasireiškia naujos viruso atmainos, todėl negalima atmesti, žymiai pavojingesnių SARS-CoV-2 atmainų atsiradimo ateityje, galimybės. Todėl labai svarbi išlieka vaistų, nukreiptų į visas SARS-CoV-2 viruso atmainas paieška. Tam reikalingas konservatyvus, nekintantis skirtingose viruso atmainose, baltyminis taikynys. Tokiu taikiniu galėtų būti vienas iš svarbiausių viruso replikacijoje dalyvaujančių fermentų – helikazė nsp13.

Helikazių funkcija replikacijos metu yra išvynioti DNR ar RNR grandines. Nsp13 inaktyvacija užkirstų kelią viruso pasidauginimui ir tolimesnei ligos eigai. Deja, nsp13 veikimo mechanizmas nėra iki galo suprastas. Taip pat nėra iki galo suprastas nsp13 vaidmuo SARS-CoV-2 replikaciniame komplekse, kuriame svarbiausią funkciją atlieka RNR polimerazė nsp12, tačiau tikėtina, kad nsp13 turi didelę įtaką nsp12 veiklai.

Gilesnis nsp13 mechanistinių sąvybių supratimas, galėtų padėti sukurti priemones, padedančias suvaldyti koronavirusų protrūkius, ateityje, todėl savo darbo objektu pasirinkome SARS-CoV-2 helikazės nsp13 mechanistinius tyrimus.

### **Darbo tikslas:**

Ištirti SARS-CoV-2 helikazės nsp13 mechanistines sąvybes.

### **Darbo uždaviniai:**

- *E.coli* ląstelėse atlikti nsp13 baltymo raišką ir gryninimą.
- Įvertinti nsp13 ATPazinį ir helikazinį aktyvumą.
- Nustatyti kokią įtaką nsp13 helikazė turi polimerazės nsp12 aktyvumui.

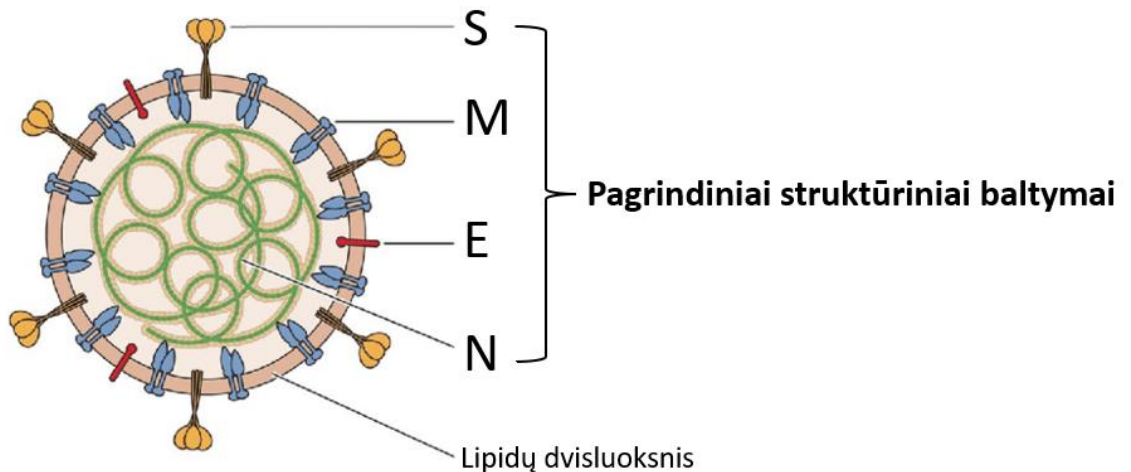
# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Korona virusų struktūra ir genomo organizacija

Koronavirusais vadinami RNR genomą turintys virusai, priklausantys *Coronaviridae* šeimai, *Nidovirales* būriui. Jie yra žinomi kaip kvėpavimo takų infekcijų sukėlėjai – nuo paprasto peršalimo iki sunkesnių ligų. Šiuo metu yra nustatyti septyni žmogaus koronavirusai, keturi iš jų sveikatai nepavojingi – 229E, OC43, NL63, HKU1, o trys yra patogeniniai – SARS-CoV, Mers-CoV (angl. *Middle East respiratory syndrome coronavirus*) ir SARS-CoV-2 (Malik, 2020).

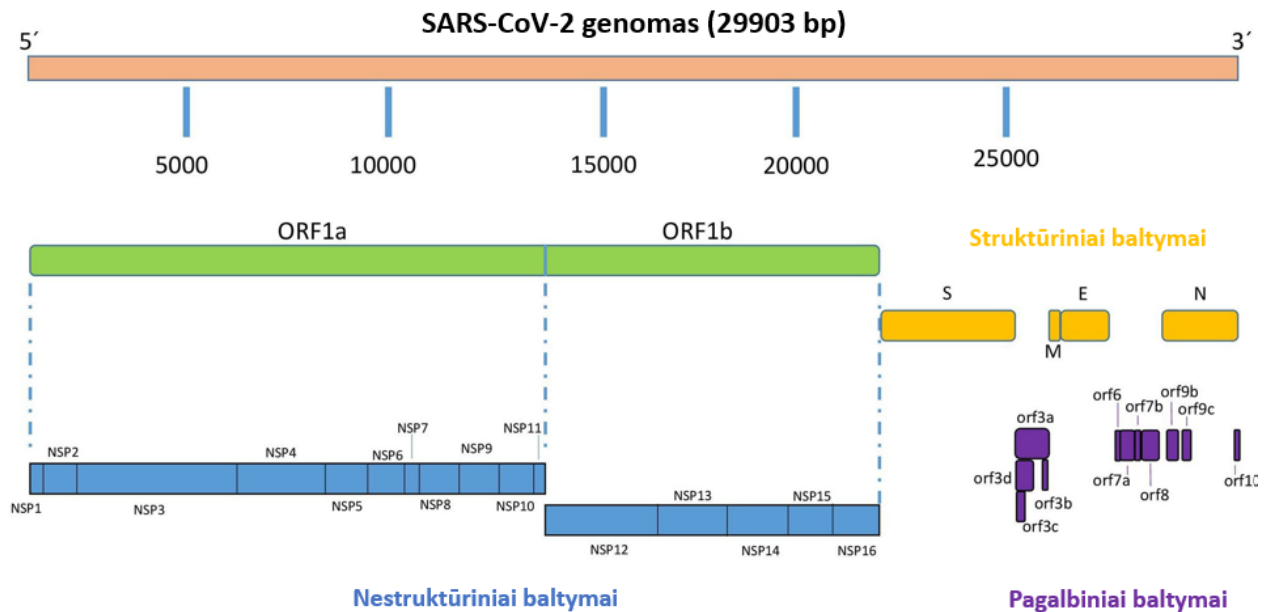
Pavadinimas „koronavirusas“ kilęs iš lotyniško žodžio „corona“, reiškiančio karūną arba aureolę, kadangi viruso paviršiuje yra charakteringi spygliai, primenantys karūną. Šie virusai dažniausiai aptinkami gyvūnų organizmuose, tačiau kartais zoonozės būdu gali būti perduodami žmonėms ir sukelti ligos protrūkį (Pal ir kt., 2020).

SARS-CoV-2 yra sferinės formos dalelė, kurios skersmuo yra 65-125 nm. Virusas turi keletą pagrindinių struktūrinių komponentų, kurie yra svarbūs jo veikimui ir dauginimuisi (1 pav.). SARS-CoV-2 virusą sudaro keturi struktūriniai baltymai: apvalkalo baltymas (E), membranos baltymas (M), nukleokapsidės baltymas (N) ir spyglio baltymas (S). E sudaro išorinį viruso sluoksnį ir sąveikauja su šeimininko ląstelėmis. E taip pat supa viruso genetinę informaciją apsaugantis lipidų dvisluoksnis. M padeda išlaikyti viriono formą ir stabilumą. N apsaugo viruso genetinę medžiagą ir dalyvauja viruso genomo replikacijoje. S reikalingas, kad virusas galėtų prisijungti prie šeimininko ląstelių ir jas užkrėsti (Astuti ir Ysrafil, 2020).



**1 pav.** Sars-CoV-2 struktūriniai elementai (Khan et al., 2021). Pagrindiniai struktūriniai baltymai: S – spyglio baltymas, M – membranos baltymas, E – apvalkalo baltymas, N – nukleokapsidės baltymas.

Koronavirusai turi nesegmentuotą, prasminės (angl. *positive-sense*) viengrandės RNR genomą, kurio ilgis yra apie 30 kb, kas yra didžiausi žinomi virusiniai RNR genomai (2 pav.). Genomas turi 5' kepurės struktūrą ir 3' poli(A) uodegą, todėl jis gali veikti kaip iRNR. Du dideli atvyro skaitymo rėmeliai (angl. *open reading frames*) ORF1a ir ORF1b koduojantys 16 nestruktūrinių baltymų, užima apie 20 kb, iš kurių struktūrinių ir pagalbinių baltymų genai sudaro tik apie 10 kb. Virusų genomo 5' gale yra lyderinė seka ir netransliuojama sritis (UTR), kurioje yra daugybė stiebo kilpų (angl. *stem loops*) struktūrų, reikalingų RNR replikacijai ir transkripcijai.

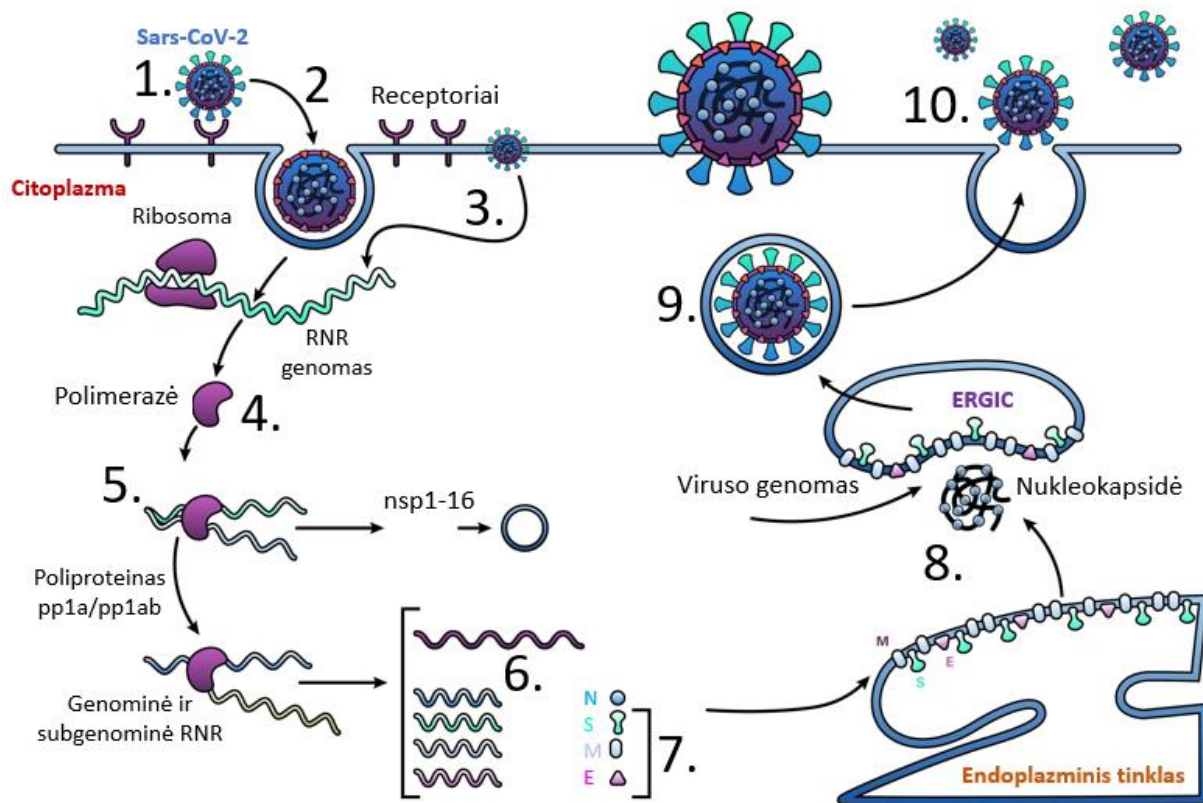


**2 pav.** Sars-CoV-2 viruso genomo organizacija. Viruso genomas sudarytas iš RNR 29903 nt ir koduoja 16 nestruktūrinius, 4 struktūrinius ir pagalbinius baltymus (Redondo et al., 2021).

SARS-CoV-2 viruso struktūros ir genomo organizacijos supratimas yra labai svarbus, siekiant daugiau išsiaiškinti apie viruso elgseną ir dauginimosi mechanizmus. Tai yra būtina norint sukurti efektyvius šio ir panašių viruso sukeltų ligų prevencijos ir gydymo būdus.

## 1.2 Viruso Sars-CoV-2 vystymosi ciklas

Viruso SARS-CoV-2 vystymosi ciklą galima suskirstyti į keletą etapų: 1) prisijungimas (angl. *attachment*), 2) įsiskverbimas (angl. *entry*), 3) viruso apvalkalo pašalinimas (angl. *uncoating*), 4) viruso replikacinės mašinerijos transliacija, 5) RNR replikacija, 6) transkripcija, 7) viruso struktūrinių baltymų transliacija, 8) replikuotos RNR supakavimas nukleokapsidėje, 9) naujų virionų susiformavimas (angl. *virion assembly*) ir 10) viruso išsiskyrimas iš ląstelės (3 pav.) (Abebe ir Dejenie, 2022). Gilus viruso vystymosi ciklo suvokimas yra būtinas norint suprasti šiuo metu naudojamus gydymo būdus ir kuriant potencialias terapines priemones kiekvienam etapui (Astuti ir Ysrafil, 2020).



**3 pav.** Sars-CoV-2 vystymosi ciklas. 1 – prisijungimas, 2 – įsiskverbimas, 3 – viruso apvalkalo pašalinimas, 4 – viruso replikacinės mašinerijos transliacija, 5 – RNR replikacija, 6 – transkripcija, 7 – struktūrinių baltymų transliacija, 8 – RNR supakavimas nukleoplazmidėje, 9 – naujų virionų susiformavimas, 10 – viruso išsiskyrimas iš ląstelės (Burmer ir Pabuwal, 2020).

SARS-CoV-2 prisijungimas prie šeimininko ląstelių yra ypač svarbi šio viruso vystymosi ciklo ir COVID-19 patogenezės stadija. Virusas naudoja savo spyglio (S) baltymą, kad prisijungtų prie angiotenziną konvertuojančio fermento 2 (ACE2) receptoriaus šeimininko ląstelių paviršiuje (Letko ir kt., 2020) Subrendusio viriono S baltymą sudaro jungtuku (angl. *linker*) sujungti subvienetai S1 ir S2. Subvienete S1 esantis fragmentas RBD (angl. *receptor binding domain*) atpažįsta receptorių ACE2, o S2 subvienetas įtvirtina S baltymą prie viruso membranos. S2 subvienete taip pat yra suliejimo peptidas (angl. *fusion peptide*) būtinas susiliejimui su šeimininko ląstelės membrana (Jackson ir kt., 2022).

SARS-CoV-2 į šeimininko ląsteles įsiskverbia keletu būdų, kas lemia jo užkrečiamumą ir patogeniškumą. Dažniausias įsiskverbimo būdas yra per ląstelės paviršių, kur viruso S baltymas prisijungia prie šeimininko ląstelės ACE2 receptorių. Šiuo patekimo į ląstelę būdu S baltymas yra aktyvuojamas neutraliame pH, šeimininko proteazėms sukarpanč jį tarp subvienetų S1/S2 (Nejat ir kt., 2023). Tai lemia viruso ir ląstelės šeimininkės membranų susiliejimą, ir virusas patenka į šeimininko ląstelę. Tačiau jeigu šalia nėra egzogeninių S baltymą aktyvinančių proteazių, SARS-CoV-2 į šeimininko ląsteles gali patekti ir per nuo klatrino priklausomą endocitozę – mechanizmą, kuris leidžia integruoti į ląsteles įvairias medžiagas, įskaitant virusus. Sars-CoV-2 įsiskverbis į šeimininko ląstelės vidų per ląstelės paviršiaus ar endocitozės būdus sekantis žingsnis viruso vystymosi cikle yra nukleokapsidės išardymas. Šis procesas įvyksta dėl šeimininko ląstelėje esančių proteazių, suardančių nukleokapsidės N baltymą, taip išleisdamos viruso genomą į citozolį (Jackson ir kt., 2022).

Sars-CoV-2 RNR genomui patekus į ląstelės šeimininkės citoplazmą, pradedama viruso replikacinės mašinerijos ekspresija. Kad galėtų pasinaudoti ląstelės šeimininkės translacijos sistema, Sars-CoV-2, kaip ir kiti RNR virusai, imituoja šeimininko iRNR, turinčią 5' kepurę, 3' poliadenilintą uodegą ir netransliuojamas sritis 5' ir 3'. Replikazė yra koduojama ORF1a ir ORF1b, iš kurių transliuojami du koterminaliniai poliproteinai (angl. *polyprotein*) – pp1a ir pp1ab. Vykstant pp1ab translacijai, SARS-CoV-2 baltymo raišką lemia molekulinis mechanizmas, vadinamas programuojamu ribosominių rėmelių poslinkiu (Romano ir kt., 2020). Ribosominių rėmelių poslinkio mechanizmas yra išlikęs visuose koronavirusuose, įskaitant ir SARS-CoV-2. Tai procesas, kurio iš vienos iRNR yra nuskaitomi keli atviro skaitymo rėmeliai, kas leidžia efektyviau naudoti genetinę informaciją, taip išplečiant ir patobulinant išreiškiamų baltymų spektrą ir stochiometriją. Ribosominių rėmelių poslinkio dėka, iš vienos viruso iRNR yra ištransliuojama nuo RNR priklausoma RNR polimerazė nsp12, ir už jos koduojami nestruktūriniai baltymai, dalyvaujantys RNR modifikavime, apdorojime ir koregavime. Vėliau pp1a ir pp1ab yra autoproteolitiškai suskaidomi į 16 atskirų nestruktūrinių baltymų (nsps) veikat papaino tipo proteazę nsp3 ir pagrindinę chimotripsino tipo proteazę nsp5. Proteazė nsp3 yra atsakinga už baltymų nsp1, nsp2, nsp3 ir nsp4 atskyrimą, o nsp5 – už likusių vienuolikos nestruktūrinių baltymų atskyrimą (V.Kovski ir kt., 2021). Susidarę nsp baltymai suformuoja RNR replikazės-transkriptazės kompleksą (RTC), kurį sudaro nsp7-nsp8 praimazės kompleksas, polimerazė nsp12, RNR helikazė nsp13 ir RNR modifikuojantys fermentai nsp14, nsp15 ir nsp16. RTC yra būtinas RNR replikacijai ir transkripcijai naudojant genomine RNR kaip matricą (angl. *template*). Be to, RTC sukuria palankią aplinką RNR sintezei, tarpininkaudamas pertvarkant šiurkščiojo endoplazminio tinklo membranas, tam, kad užkrėstos ląstelės citoplazmoje susidarytų dvigubos membranos pūslelės (DMV), kuriose vyksta viruso replikacija ir transkripcija (Mishchenko ir Ivanisenko, 2022).

Susiformavus viruso RTC, pradedama viruso genominės ir subgenominės RNR sintezė. Genominė RNR naudojama kaip genetinė medžiaga formuojant naujiems virionams, o subgenominė RNR – kaip iRNR struktūrinių ir pagalbinių viruso baltymų translacijoje. Išskirtinis *Nidovirales* būrio bruožas yra tas, kad visos prasminės subgenominės RNR turi bendrą 3' koterminalinę seką su viruso RNR genomu, kas leidžia susiformuoti genominės ir subgenominės RNR tinklui (angl. *Nested RNA's*) (Alexandersen ir kt., 2020). Koronavirusai pasižymi gebėjimu rekombinuotis tiek homologinės, tiek nehomologinės rekombinacijos būdu, kas reiškia, kad virusas gali dalintis genetinė informacija tiek su panašiomis, tiek su skirtingomis nukleotidų sekomis. Šis gebėjimas susijęs su nuo RNR priklausomos RNR polimerazės (RdRp) gebėjimu perjungti grandines. Ši rekombinacija atlieka svarbų vaidmenį Sars-CoV-2 evoliucijoje, kas lemia spartų naujų viruso atmainų atsiradimą (Focosi ir Maggi, 2022).

Viruso struktūriniai baltymai yra transliuojami iš subgenominės viruso iRNR, ląstelės šeimininkės baltymus sintetinančiose organelėse. Dauguma su membrana susijusių struktūrinių ir pagalbinių baltymų, tokių kaip S, M ir E yra sintetinami šiurkščiojo endoplazminio tinklo ribosomose, o kiti viruso baltymai, įskaitant N baltymą, yra transliuojami ląstelės citozolyje esančiose ribosomose. Be to, šiems struktūriniams baltymams taip pat atliekamos potranslacinės modifikacijos kurios pritaiko juos savo atliekamoms funkcijoms (Wong & Saier, 2021). Pats virionas suformuojamas šiurkščiojo endoplazminio tinklo ir Goldžio komplekso tarpiniame kompartimente ERGIC (angl. *ER-Golgi intermediate compartment*). M baltymas yra pagrindinis viruso morfogenezėje, kadangi virionas formuojasi dėl šio baltymo heterotipinių sąveikų – M-S ir M-E. Viruso nukleokapsidė susiformuoja citoplazmoje, kai supakuota viruso genominė RNR, yra apgaubiamą N baltymu. Virionas pilnai susiformuoja, kai dėl M-N sąveikos įvyksta viruso nukleokapsidės ir apvalkalo kondensacija (Wong ir Saier, 2021).



Kaip ir kitų koronavirusų, SARS-CoV-2 viruso išsiskyrimo iš ląstelės mechanizmas yra vienas iš mažiausiai ištirtų SARS-CoV-2 infekcinio ciklo etapų. Dauguma apvalkalą turinčių RNR virusų išsiskiria dėl pumpuravimosi (angl. *budding*) proceso plazminėje membranoje arba pumpuruojantis vidiniuose šeimino kompartmentuose, tada biosintezės sekrecijos keliu jie egzocituoja į užląstelinę ertmę. SARS-CoV-2 pumpurų susidarymas ERGIC ir Goldžio komplekse rodo, kad šis virusas taip pat išsiskiria iš ląstelės šeiminkės biosintetiniu sekrecijos būdu. Tačiau viename neseniai atliktame tyrime pasiūlytas modelis, pagal kurį koronavirusai, įskaitant SARS-CoV-2, iš ląstelės išsiskiria naudodami lizosomas, o ne biosintetinį sekrecinį kelią (Wong ir Saier, 2021).

Apibendrinant galima daryti išvadą, kad SARS-CoV-2 replikacijos ciklas yra sudėtingas ir dinamiškas procesas, apimantis viruso sąveiką su šeiminko ląstelės veiksniais ir ląstelės procesais. Išsamus SARS-CoV-2 replikacijos ciklo mechanizmų ir etapų supratimas yra labai svarbus, kuriant veiksmingas gydymo strategijas COVID-19 prevencijai.

### 1.3 Helikazių struktūra ir funkcija

Helikazės yra motoriniai baltymai, naudojantys energiją gautą iš ATP hidrolizės ir atskiriantys nukleorūgščių grandines. Priėjimas prie viengrandės nukleorūgščių grandinės yra būtinas DNR ir RNR metabolizmo procesuose, tokiuose kaip replikacija, transkripcija, reparacija. Helikazės sudaro sąlygas vykti šiems procesams, nes atskiria dvigrandę DNR, RNR ar DNR-RNR kompleksą ir pertvarko chromatiną. Šias funkcijas helikazės atlieka kryptingai judėdamos viengrande ar dvigrande nukleorūgščių grandine, naudojant nukleotidų trifosfato (NTP) hidrolizės energiją. Dėl gyvybiškai svarbaus vaidmens nukleorūgščių apytakoje helikazės yra paplitusios visose gyvosios gamtos karalystėse ir virusuose ir yra išskirtinai konservatyvios baltymų sekos bei struktūros (Awate ir Brosh, 2017).

Helikazės gali būti klasifikuojamos pagal substratą, translokacijos kryptį, oligomerinę struktūrą ir pirminę struktūrą. Pagal substratą, helikazės skirstomos į RNR ir DNR helikazes. Tačiau ši klasifikacija nėra labai griežta, kadangi dauguma helikazių yra aktyvios tiek su DNR tiek su RNR substratais. Pagal translokacijos kryptį helikazės skirstomos į  $3' \rightarrow 5'$  ir  $5' \rightarrow 3'$  helikazes. Išsikišęs viengrandės nukleorūgšties motyvas yra reikalingas daugumai helikazių norint prisijungti prie substrato ir inicijuoti dvigubos grandinės išvyniojimą. Pagal oligomerinę struktūrą helikazės skirstomos į žiedines (angl. *ring-shaped*) ir nežiedines (angl. *non-ring-shaped*) (Raney ir kt., 2013). Dauguma nežiedinių helikazių veikia  $3' \rightarrow 5'$  kryptimi, o žiedinės helikazės dažniausiai veikia  $5' \rightarrow 3'$  kryptimi. Tačiau papildomos viruso nežiedinė helikazė E1 veikia  $3' \rightarrow 5'$ , o bakteriofago T4 žiedinė helikazė Dda –  $5' \rightarrow 3'$  kryptimi. Pati detaliausia helikazių klasifikacija yra paremta jų pirmine struktūra. Ši klasifikacija, pirmą kartą sudaryta 1993 m. rusų virusologų A. Gorbalenya ir E. Koonin, yra paremta konservatyvių amino rūgščių sekos motyvų panašumais (Cameron ir kt., 2009). Pagal konservatyvių motyvų panašumą visos helikazės gali būti suskirstytos į 6 superšeimas (angl. *superfamilies*) iš kurių kiekviena detaliau yra skirstoma į keletą skirtingų šeimų (Meir ir Greene, 2021).

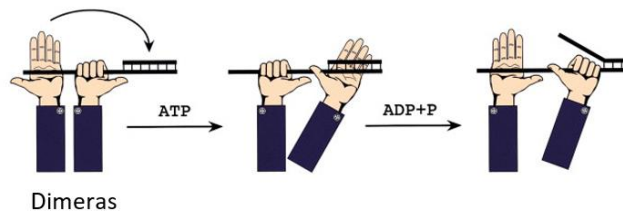
Visos helikazės pasižymi dviem ypač konservatyviais motyvais I ir II, dar vadinamais Volkerio motyvais (angl. *Walker motifs*), dalyvaujančiais NTP prisijungime ir hidrolizėje. Volkerio A motyvas turi lizino liekaną, kuri prisijungia prie ATP  $\beta$ -fosfato grupės ir taip stabilizuoja pereinamąją būseną ATP hidrolizės metu. Volkerio B motyvas turi konservatyvią DExx seką, kurioje aspartatas koordinuoja katalitinį magnio joną, kuris be pereinamosios būsenos stabilizavimo reikalingas ir netoliese esančios nukleofilinės vandens molekulės aktyvavimui fosfoanhidrido hidrolizėje (Byrd ir Raney, 2012).

Pagrindinis kiekvienos helikazės funkcinis vienetas yra vadinamoji helikazės šerdis (angl. *helicase core*), kurią sudaro du baltyminiai domenai RecA. Helikazių veikimo mechanizmą lemia jų

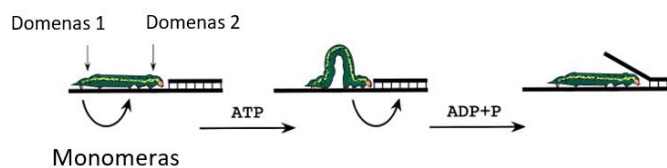
oligomerinė struktūra. SF1 ir SF2 superšeimų helikazės yra nežiedinės ir monomerinės, jų RecA domenai yra išsidėstę tandemiškai toje pačioje polipeptidinėje grandinėje. Žiedinės helikazės, kurioms priklauso SF3-SF6, pasižymi kitokia ketvirtine struktūra, jos dažniausiai sudaro heksamerinę žiedinę sistemą, ir kiekviename monomere turi po atskirą RecA domeną. Konservatyvūs helikazės motyvai, atsakingi už ATP hidrolizę, paprastai yra plyšyje tarp dviejų gretimų RecA domenų. ATP prisijungimas, hidrolizė bei ADP ir fosfato jono disociacija greta esantiems RecA domenams sukelia konformacinius pokyčius vienas kito atžvilgiu, kas lemia skirtingą RecA domenų afiniškumą nukleorūgščių substrato atžvilgiu. Pasikartojantys ATP hidrolizės ciklai tiesiogiai virsta translokacijos žingsniu per nukleorūgščių grandinę (Leitão ir kt., 2015).

Pats helikazių veikimo mechanizmas nėra iki galo ištirtas. Egzistuoja du dažniausiai naudojami bendrojo helikazių mechanizmo modeliai, vadinami „vikšro“ (angl. *inchworm*) ir „aktyviojo riedėjimo“ (angl. *active rolling*) modeliais (Becker ir Hub, 2023) (4 pav.). Pagal „vikšro“ modelį helikazė juda išilgai DNR ar RNR grandinės pirmyn vienu iš dviejų motorinių domenų, o kitas motorinis domenas lieka prisijungęs prie grandinės. Dėl šio judėjimo DNR išvyniojama, kai helikazė žingsnis po žingsnio juda išilgai grandinės. Įvairių helikazių žingsnio dydžio apskaičiavimai svyruoja nuo 4 ar 5 bazių porų UvrD helikazėje iki 2 bazių porų NS3 RNR helikazėje ir vos 1 bazių poros Rep helikazėje (Raney ir kt., 2013). Pagal „aktyvaus riedėjimo“ modelį helikazė juda išilgai nukleorūgščių grandinės nuolat besisukdama aplink grandinę, tačiau išlikdama prie jos prisitvirtinusi. Dėl šio rotacinio judesio, helikazei judant pirmyn, nukleorūgščių grandinė išsivynioja. Abu modeliai buvo patvirtinti eksperimentiniais įrodymais, o konkretus mechanizmas, kurį naudoja tam tikra helikazė, gali priklausyti nuo jos specifinių struktūrinių savybių ir konkretaus nukleorūgščių substrato (Lehmann ir kt., 2015).

#### Aktyvaus riedėjimo modelis



#### Vikšro modelis



**4 pav.** Helikazių mechanizmo modeliai. „Aktyvaus riedėjimo“ modelis: helikazė juda išilgai nukleorūgščių grandinės nuolat besisukdama aplink grandinę, dėl šio rotacinio judėjimo pirmyn, nukleorūgščių grandinė išsivynioja. „Vikšro“ modelis: helikazė juda išilgai DNR ar RNR grandinės pirmyn vienu iš dviejų motorinių domenų, o kitas motorinis domenas lieka prisijungęs prie grandinės, šie helikazės žingsniai sukelia DNR grandinės išvyniojimą (Tanner ir Linder, 2001).

Helikazės kaip fermentų klasės reikšmė visiems gyviems organizmams yra fundamentali, kadangi be jų negalima nukleorūgščių replikacija. Dėl savo konservatyvumo ir svarbos helikazių funkcijų slopinimas gali būti efektyvus būdas kovojant su įvairiomis virusinėmis ligomis.

## 1.4 Helikazės kaip antivirusinių vaistų taikynys

Virusinės infekcinės ligos kelia didelę grėsmę žmonių sveikatai. Tačiau vakcinų kūrimas ir higienos reikalavimų laikymosi pagerėjimas labai prisidėjo prie to, kad iš dalies pavyko sustabdyti naujų virusinių ligų plitimą. Nepaisant to, kontroliuoti virusinių ligų epidemijas pavyko ne itin sėkmingai, tai rodo SARS, Ebolos, MERS, Zikos bei COVID-19 protrūkiai (Trovato ir kt., 2020).

Antivirusiniai vaistai kuriami remiantis dvejomis pagrindinėmis strategijomis – taikantis į infekuotos ląstelės arba į viruso baltymus. Kadangi virusai replikuojasi naudodami savo paties koduojamus baltymus arba perimdami ląstelės ciklo kontrolę, virusų replikacijai nutraukti skirtos medžiagos iš esmės galėtų vienodai veiksmingai veikdamos tiek virusinius, tiek ląstelės metabolizmą reguliuojančius baltymus. Jeigu vaistinė medžiaga yra nukreipta prieš virusinį baltymą, kurio funkcija neturi atitikmens šeimininko ląstelėje, pavyzdžiui kapsidės formavimas, toksinio poveikio tikimybė šeimininko organizmui yra mažesnė. Toks taikynys, kaip virusinė helikazė, dažnu atveju, pasižymi mažesniu specifiskumu, nes viruso ir ląstelės fermentai katalizuoja panašią fermentinę reakciją. Tačiau, kadangi viruso ir ląstelės fermentai nėra identiški, išnaudojant šeimininko ir viruso fermentų struktūrinius skirtumus, galima sukurti didelio specifiskumo antivirusinius vaistus. Tam reikalingas detalus virusinių helikazių struktūros ir funkcijos supratimas (Kwong ir kt., 2005).

Virusinių helikazių struktūrą ir funkcija daugiausiai yra nulemta konkretaus viruso genomo savybių. Virusų genomai yra įvairūs, jie gali būti tiek viengrandžiai, tiek dvigrandžiai, sudaryti tiek iš RNR tiek iš DNR. Dvigrandžiuose virusuose, helikazės reikalingos atskirti dvigubą spiralę replikacijos metu, o viengrandžiuose – atskirti po replikacijos susidariusius DRR-RNR ar RNR-RNR duplexus. Be šių funkcijų helikazės dalyvauja virusų iRNR transkripcijoje, translacijoje, RNR-baltymų kompleksų suardyme ir nukleorūgščių supakavimui į virionus.

Beveik visos virusinės helikazės priklauso SF1, SF2 ir SF3 superšeimoms. SF1 ir SF2 priklausančios helikazės turi po septynis konservatyvius motyvus, o SF3 – tris. SF3 superšeimai priklauso dauguma virusinių helikazių. Be to, dalis virusinių helikazių nepriklauso šioms superšeimoms ir yra priskiriamos *E.coli* helikazės Dnab primenančių (angl. *Dnab-like*) helikazių šeimai (Cameron ir kt., 2009).

RNR genomą turintys virusai, kuriems priklauso ir SARS-CoV-2, yra prisitaikę infekuoti skirtingo tipo šeimininko ląsteles, jos skiriasi savo genomo sandara, aktyvumu bei konservatyviais pirminės struktūros motyvais (1 lentelė).

**1 Lentelė.** RNR genomą turinčių virusų helikazių įvairovė (Frick ir Lam, 2006).

Šeimininkas	Virusas šeima	Rūšis	Baltymas	Aktyvumas	Helikazės šeima
Bakterijos	<i>Cystoviridae</i>	Bakteriofagas φ6	P4	5'-3' RNR helikazinis	SF3
Augalai	<i>Closteroviridae</i>	Burokėlių geltonumo klosterovirusas	hel	RNR surišimas	SF1
Augalai	<i>Flexiviridae</i>	Bambuko mozaikos virusas	Orf1	RTPazinis	SF1
Augalai	<i>Flexiviridae</i>	Bulvių virusas X	TGNBp1	5'-3' ir 3'-5' RNR helikazinis	SF1
Augalai	<i>Potyviridae</i>	Slyvų rauų virusas	C1	RNR helikazinis	SF2
Augalai	<i>Potyviridae</i>	Tamarillo mozaikos virusas	C1	RNR helikazinis	SF2
Augalai	<i>Tymoviridae</i>	Ropės geltonosios mozaikos virusas	206 p	NTPazinis, RNR surišimas	SF1
Augalai	<i>Tobamo virusas</i>	Tabako mozaikos virusas	Rep	RNR helikazinis	SF1

Gyvūnai	<i>Reoviridae</i>	Mėlynojo liežuvio ligos virusas	VP6	5'-3' ir 3'-5' RNR helikazinis	SF2
Gyvūnai	<i>Arteriviridae</i>	Arklių arterito virusas	nsp10	5'-3' RNR/DNR helikazinis	SF1
Gyvūnai	<i>Caliciviridae</i>	Sautamptono virusas	41p	NTPazinis	SF3
Gyvūnai	<i>Coronaviridae</i>	Žmogaus koronavirusas 229E	nsp13	5'-3' RNR/DNR helikazinis NTPazinis	SF1
Gyvūnai	<i>Coronaviridae</i>	SARS koronavirusas	Nsp13	5'-3' RNR/DNR helikazinis NTPazinis	SF1
Gyvūnai	<i>Flaviviridae</i>	Geltonosios karštinės virusas	NS3	RNR stimuliuojamas NTPazinis	SF2
Gyvūnai	<i>Flaviviridae</i>	Vakarų Nilo virusas	NS3	RTPazinis, 3'-5' helikazinis	SF2
Gyvūnai	<i>Flaviviridae</i>	Dengės karštligės virusas	NS3	3'-5' RNR helikazinis, NTPazinis	SF2
Gyvūnai	<i>Flaviviridae</i>	Japonijos encefalito virusas	NS3	3'-5' RNR helikazinis	SF2
Gyvūnai	<i>Flaviviridae</i>	Pavasano virusas	NS3	RNR stimuliuojamas ATP azinis	SF2
Gyvūnai	<i>Pesti virusas</i>	Galvijų diarėjos virusas	NS3	3'-5' RNR helikazinis	SF2
Gyvūnai	<i>Hepacivirusas</i>	Hepatito C virusas	NS3	3'-5' RNR/DNR helikazinis	SF2
Gyvūnai	<i>Picornaviridae</i>	<i>Poliovirusas</i>	2C	NTPazinis	SF3
Gyvūnai	<i>Picornaviridae</i>	Echovirus 9 atmaina Barty	2C	NTPazinis	SF3
Gyvūnai	<i>Togaviridae</i>	Semliki miško virusas	nsP2	RNR helikazinis	SF1
Gyvūnai	<i>Rubivirusas</i>	Raudonukės virusas	P70	RNR stimuliuoja NTPazinis	SF1

Iš 1 lentelėje pateiktų duomenų, kad tarp RNR genomą turinčių virusų yra reikšmingų skirtumų. Augalus infekuojančių RNR virusų helikazės priklauso SF1 ir SF2 helikazių šeimoms ir jos aktyvios tik su RNR substratu. Tačiau gyvūnus infekuojančių RNR virusų helikazės priklauso SF1, SF2 ir SF3 helikazių šeimoms ir jos aktyvios tiek su RNR tiek su DNR substratu.

Pirmą kartą, kaip sėkmingas antivirusinių vaistų taikymas, helikazės buvo panaudotos slopinant herpes simplex (HSV) viruso helikazę, taip stabdant viruso replikaciją ir ligos progresiją gyvūnų modeliuose (Frick ir Lam, 2006). Nors helikazės yra labai svarbios virusų funkcijai, vaistų, kurių veikimas paremtas helikazės slopinimu, kūrimas atsilieka nuo kitų antivirusinių vaistų, kurie veikia kitus fermentus, pavyzdžiui., polimerazes. Tačiau vilčių teikia tai, kad jau yra sėkmingų helikazės veikiančių antivirusinių vaistų. Klinikiniai tyrimai rodo, kad Amenamevir (ASP2151) ir Pritelivir (AIC316), inhibitoriai, veikiantys HSV helikazes, yra perspektyvūs antivirusiniai vaistai. Šiuo metu vieni perspektyviausių yra Priteliviro klinikinių tyrimų rezultatai, kurie jau gavo JAV maisto ir vaistų administracijos patvirtinimą gydyti aciklovirui atsparias HSV infekcijas suaugusiems, kurių imunitetas susilpnėjęs. Tai patvirtina, kad helikazės gali būti svarbiu antivirusinių vaistų taikiniu (Spratt et al., 2021).

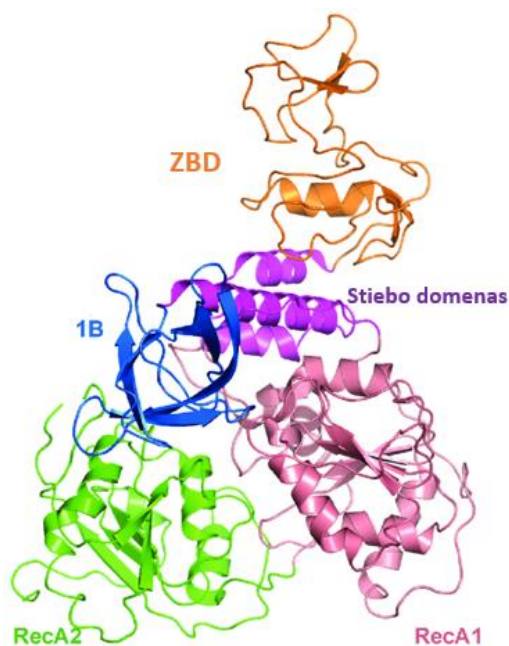
Apibendrinant, nors klinikiniai tyrimai yra vykdomi tam tikriems helikazės inhibitoriams, kurie veikia DNR virusus, vis dar nėra klinikinių įrodymų patvirtinančių antivirusinių vaistų, kurie būtų veiksmingi prieš RNR virusus.

## 1.5 Koronavirusų helikazės nsp13 struktūra ir funkcija

Nsp13 yra nestruktūrinis baltymas, koduojamas koronavirusų, pavyzdžiui, SARS-CoV-2, SARS-CoV ir MERS. Tai yra esminis viruso replikacijos mechanizmo komponentas, veikiantis kaip RNR helikazė, katalizuojantis dvigubos grandinės RNR išvyniojimą viruso replikacijos metu.

Nors nsp13 baltymas yra labai konservatyvus, skirtinguose koronavirusuose nsp13 baltymo homologai šiek tiek skiriasi. SARS-CoV ir SARS-CoV-2 nsp13 skiriasi viena amino rūgštimi (I570/V570), o SARS-CoV ir MERS-CoV helikazės tarpusavyje turi 70 % identiškų aminorūgščių (Yue et al., 2022). SARS-CoV-2 ir SARS-CoV nsp13 helikazės yra sudarytos iš 601, o MERS-CoV – iš 598 aminorūgščių (Zeng ir kt., 2021; Hao ir kt., 2017). Analizuojant nsp13 baltymų aminorūgščių sekas, taip pat pastebimi specifiniai funkcinį domenų skirtumai tarp skirtingų koronavirusų. Konservatyvus cinką jungiantis domenas, esantis koronavirusų nsp13 baltymo N-galinėje srityje, yra svarbus baltymo stabilumui ir funkcijai. Nors SARS-CoV-2, SARS-CoV ir MERS nsp13 baltymai yra homologai, jų struktūriniai skirtumai gali lemti skirtingą funkciją ir stabilumą. Konservatyvus cinką jungiantis domenas, esantis nsp13 baltymo N-galinėje srityje, yra svarbus baltymo stabilumui ir funkcijai, tačiau sudėtinės aminorūgščių liekanos šioje srityje yra specifiškai skirtingos tarp skirtingų koronavirusų. Šių struktūrinių skirtumų supratimas yra svarbus, kuriant tiek specifinius tiek nespecifinius nsp13 baltymą veikiančius antivirusinius vaistus (Cavasotto ir kt., 2020).

Nsp13 sudaro penki struktūriniai domenai: cinką surišantis domenas ZBD (angl. *zinc-binding domain*), 1B domenas, stiebo domenas (angl. *stalk domain*), ir du RecA tipo domenai 1A ir 2A. ZBD koordinuoja tris struktūrinius cinko jonų kompleksus, kurie yra būtini nsp13 struktūrai stabilizuoti ir sąveikai su RNR substratais palengvinti (5 pav.). Helikazinio aktyvumo iniciacijai atpažįstant ir surišant RNR substratą svarbus iš beta lakštų sudarytas domenas 1B. Už ATP hidrolizę ir nukleotidų grandinės translokaciją yra atsakingi RecA tipo domenai 1A ir 2A. RecA tipo domenai yra konservatyvūs tarp SF1 helikazių, juose yra konservatyvi ATP prisijungimo vieta. Po ATP hidrolizės į RecA tipo domenuose įvyksta konformaciniai pokyčiai, sukeliantys RNR išvyniojimą. Be to, helikaziniui aktyvumui yra svarbus iš alfa spiralių sudarytas stiebo domenas, jungiantis du RecA tipo domenus. Nsp13 domenų struktūros supratimas leidžia suprasti mechanizmus, kuriais grindžiamas fermentinis aktyvumas (El Hassab ir kt., 2022).



**5 pav.** NSP13 struktūra. ZBD – cinką surišantis domenas, stiebo domenas, 1B domenas, RecA1, RecA2 domenai (PDB: 6ZSL).

Nsp13 helikazė yra daugiafunkcinis fermentas, pasižymintis helikaziniu ir ATPaziniu aktyvumu. Nsp13 gali išvynioti RNR duplexus 5'→3' kryptimi ir judėti išilgai RNR grandinių. Nustatyta, kad Nsp13 pasižymi helikaziniu aktyvumu tiek su DNR tiek su RNR substratais, o tai rodo jo galimą dalyvavimą RNR ir DNR rekombinacijoje viruso replikacijos metu. Be to, nsp13 helikazė, sąveikauja su keliais baltymais, dalyvaujančiais RNR replikacijoje ir transkripcijoje. Nsp13 su nsp12, nuo RNR priklausoma RNR polimerazę, sudaro stabilų kompleksą ir galimai skatina polimerazinį nsp12 aktyvumą (Chen et al., 2020). Be to, nsp13 taip pat sąveikauja su pagalbiniais baltymais nsp7 ir nsp8, kurie sudaro vadinamąjį praimazės kompleksą, atsakingą už trumpų RNR pradmenų, reikalingų RNR sintezei pradėti, sintezę. Ši sąveika padidina RNR sintezės efektyvumą, nes palengvina nsp12 prisijungimą prie viruso RNR matricos. Be to, nustatyta, kad nsp13 sąveikauja su egzozukleazę nsp14, dalyvaujančia susintetintos RNR redagavime ir kepurėlės uždėjime (angl. *capping*) ant 5' galo (El Hassab et al., 2022). Sąveika tarp nsp13 ir nsp14 sustiprina nsp14 egzozukleazinį aktyvumą ir taip padidina RNR sintezės tikslumą (Perry et al., 2021). Nsp13 aktyvumą taip pat gali reguliuoti potransliacinės modifikacijos, pavyzdžiui, fosforilinimas ir ubikvitilinis. Nsp13 fosforilinimas specifinėse vietose reguliuoja jo ATPazinį ir helikazinį aktyvumą, bei gali turėti įtakos jo sąveikai su kitais virusiniais baltymais. Taip pat, nsp13 ubikvitilinis yra svarbus reguliuojant koronaviruso replikaciją, nors tikslus mechanizmas dar nėra iki galo išaiškintas (Sommers et al., 2023).

Apibendrinant, nsp13 yra daugiafunkcinis fermentas, pasižymintis nuo ATP hidrolizės priklausomu helikaziniu aktyvumu, kuris yra labai svarbus koronavirusų RNR replikacijai ir transkripcijai. Jo fermentiniam aktyvumui įtakos gali turėti įvairūs veiksniai, įskaitant potransliacines modifikacijas ir sąveika su kitais baltymais.

### **1.6 Junginių, nukreiptų prieš Sars-CoV-2 helikazę nsp13, terapinis potencialas**

Dėl COVID-19 pandemijos sukeltų padarinių visuomenei ir ekonomikai, pastaruoju metu daug dėmesio buvo skirta vaistų ir vakcinų nuo SARS-CoV-2 kūrimui. Deja, kol kas nėra jokių patvirtintų vaistų, kurie būtų specifiskai sukurti veikti SARS-CoV-2 helikazę nsp13. Mokslinių tyrimų duomenys rodo, šiuo metu naudojamos vakcinos, sukurančios imunitetą SARS-CoV-2 spyglio baltymui, tokios kaip AstraZeneca, Moderna ir Pfizer, yra patikimos ir veiksmingos. Deja, nerimą kelia vis naujai pasirodančios vakcinoms atsparios viruso atmainos, tokios kaip BA.4 ir BA.5, kurių mutacijos gali sumažinti vakcinos veiksmingumą ir padidinti užkrečiamumą. Taip pat reikia atsižvelgti į tai, kad vakcinų veiksmingumas gali skirtis priklausomai nuo asmens imuninės sistemos būklės ar alergijų ir galimus šalutinius vakcinos poveikius. Todėl reikalingos įvairios strategijos. Be to, reikalingos įvairios strategijos kovojant su SARS-CoV-2 infekcija (Tegally et al., 2022; Ugurel et al., 2020).

COVID-19 pandemijos pradžioje nebuvo patvirtintų antivirusinių vaistų SARS-CoV-2 virusui gydyti, tačiau padėtis pasikeitė 2020 m. spalio mėnesį, kai JAV maisto ir vaistų administracija (FDA) skubiai patvirtino remdesivirą hospitalizuotų pacientų gydymui. Remdesiviras slopina viruso nuo RNR priklausančią RNR polimerazę, tačiau jo veiksmingumas skirtinguose tyrimuose buvo vertinamas nevienareikšmiškai. Vėliau JAV maisto ir vaistų administracija suteikė skubų leidimą naudoti plataus veikimo antivirusinius vaistus, tokius kaip molnupiraviras, tačiau nerimą kelia jų galimas poveikis mutacijų dažniui viruso replikacijos metu (Hashemian ir kt., 2022).

Dėl savo konservatyvumo ir svarbos viruso vystymosi cikle nsp13 yra potencialus antivirusinių vaistų taikiny. Šis fermento katalizinis aktyvumas gali būti slopinamas keliais būdais – inhibuojant ATPazinį aktyvumą, trukdant RNR substrato prisijungimui prie helikazės ir blokuojant translokaciją. Pastarojo meto tyrimai rodo, kad tam tikri cheminiai junginiai, galėtų būti potencialūs nauji SARS-CoV-2 gydymo būdai slopinant nsp13 (Yazdi ir kt., 2022).

Šiuo metu žinomas potencialius nsp13 slopiklius pagal savo struktūra ir chemines savybes galima suskirstyti į keturias grupes – heterocikliniai junginiai, aromatiniai junginiai, maži peptidai ir fenoliai. Manoma, kad heterocikliniai junginiai, tokie kaip benzotriazolas, imidazolas, imidazodiazepinas ar pirolas slopina nsp13 ATPazinį aktyvumą. NSP13 ATPazinio aktyvumo slopinimu pasižymi ir aromatiniai žiedus turintys junginiai, tokie kaip fenotiazinas, trifenilmetanas ir akridono dariniai, tačiau jų slopinimo mechanizmas dar nėra iki galo aiškus. Nedidelės peptidinės molekulės taip pat buvo tyrinėtos kaip nsp13 inhibitoriai. Nustatyta, kad 12 aminorūgščių linijinis peptidas ir ciklinis peptidas, turintis septynias aminorūgštis, slopina nsp13 ATPazės aktyvumą. Siekiant visapusiškai ištirti mažų peptidų, kaip antivirusinių medžiagų, nukreiptų prieš nsp13, potencialą ir optimizuoti jų savybes terapiniam naudojimui, reikalingi tolesni tyrimai. Dar viena, potenciali nsp13 slopiklių klasė yra fenoliniai junginiai. Nustatyta, kad natūralus fenolinis junginys bananinas ir jo dariniai pasižymi antivirusinėmis savybėmis ir slopina kelių virusinių fermentų, įskaitant proteazes ir helikazes, aktyvumą. Jie gali sąveikauti su šių fermentų aktyviaisiais centrais, pakeisti jų konformaciją slopinant katalizinį aktyvumą. Tačiau reikalingi papildomi tyrimai, siekiant suprasti tikslius šių junginių veikimo mechanizmus ir galimą toksiškumą (Corona ir kt., 2022; Perez-Lemus ir kt., 2022; Seck ir Nguemo, 2021).

Nors aptarti junginiai duoda daug žadančių rezultatų slopinant nsp13 helikazės aktyvumą ir mažinant koronaviruso replikaciją, jie dar nėra patvirtinti kaip vaistai, skirti naudoti žmonėms. Reikia atlikti tolesnius tyrimus, kad būtų nustatytas jų saugumas, veiksmingumas ir optimali dozė. Be to, kuriant naujus vaistus atliekami ilgai trunkantys klinikiniai tyrimai. Todėl, nors šie junginiai ir turi antivirusinių vaistų potencialą, reikia atlikti daugiau tyrimų, kad būtų nustatytas jų saugumas ir veiksmingumas, kol juos bus galima naudoti kaip patvirtintus gydymo būdus.

## 2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODIKA

### 2.1 Medžiagos ir prietaisai

#### 2.1.1 Reagentai

2.1. Lentelė. Darbe naudoti reagentai bei jų gamintojai.

Gamintojas	Reagentai
ThermoFisher Scientific (Lietuva, JAV)	Proteazių inhibitorius (A32965), Pierce™ <i>Coomassie Plus (Bradford) Assay Reagent</i> , DTT, ATP, NTP rinkinys, <i>DEPC-treated Water</i> , H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
Fisher Bioreagents (JAV)	Glicerolis
Roth (Vokietija)	NaCl, KCl, Tris-HCl, Imidazolas, NaOH, LB terpė, Chloramfenikolis, kanamicinas, IPTG
Sigma-Aldrich (JAV)	BSA, EDTA, Fosfoenolpiruvatas
Cytiva(JAV)	Heparinas, IMAC sefarozė (Chelating Sepharose. Fast Flow)
Fermentas (Lietuva)	10 mM dNTP
Roche (Vokietija)	NADH
Merck (Vokietija)	Karbamidas

#### 2.1.2 Oligonukleotidai

2.2. Lentelė. Darbe naudoti oligonukleotidai.

Oligonukleotidas	Seka (nuo 5' link 3')	Papildoma informacija
<b>Nsp13 aktyviojo centro mutacijoms skirti pradmenys</b>		
LV1	GTAGTCTTTGCTGAAATCTCT ATGGCTAC	D410->A pET28a 6xHis PreScission SARS-CoV-2 plasmidei skirtas tiesioginis pradmuo
LV2	GAGATTTTCAGCAAAGACTACA ATGTCAG	D410->A pET28a 6xHis PreScission SARS-CoV-2 plasmidei skirtas netiesioginis pradmuo
LV3	GTCTTTGATGCAATCTCTATG GCTACTAATTATG	E411->A pET28a 6xHis PreScission SARS-CoV-2 8 plasmidei skirtas tiesioginis pradmuo
LV4	CATAGAGATTGCATCAAAGAC TACAATGTCAG	E411->A pET28a 6xHis PreScission SARS-CoV-2 8 plasmidei skirtas netiesioginis pradmuo
LV5	GTAGTCTTTGCTGCAATCTCT ATGGCTACTAATTATG	D410E411->AA pET28a 6xHis PreScission SARS- CoV-2 plasmidei skirtas tiesioginis pradmuo



LV6	CATAGAGATTGCAGCAAAGA CTACAATGTCAG	D410E411->AA pET28a 6xHis PreScission SARS- CoV-2 plasmidei skirtas tiesioginis pradmuo
<b>Šakoto DNR substrato sintezei naudoti oligonukleotidai</b>		
AT5	ACGGATATCACTCACGACAAT ATACCTATATCAATGGCCTCC CACGCATAAGCTGACAATCTG ATTCACAGTC	5' gale turi Cy5 fluoroforą
AT10	TTTTTTTTTTTTGTCGTGAGTG ATATCCGT	3' gale turi Cy3 fluoroforą
AT8	GACTGTGAATCAGATTGTCAG CTTATGCGTGGGAGGCCATTG ATATAGGTATATTGTCGTGAG TGATATCCGT	DNR „spąstai“ prisijungiantys prie AT5
<b>RNR substratas skirtas nsp12 polimerazei</b>		
N230314-170	UUUUCAUGCUACGCGUAGUU UUCUACGCG	5' gale turi 5-FAM fluoroforą

### 2.1.3 Fermentai

2.3. Lentelė. Darbe naudoti fermentai ir jų buferiniai buferiai.

<b>Fermentas</b>	<b>Gamintojas</b>
<i>FastDigest DpnI</i>	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
<i>Q5 DNA polimerase</i>	New England BioLabs, JAV
<i>5X Q5 reaction buffer</i>	New England BioLabs, JAV
<i>Pyruvate Kinase/Lactic Dehydrogenase</i>	Sigma-Aldrich, JAV
<i>RepX</i>	Plazmidės addgene katalogo numeris: 172199 (baltymas išgrynintas laboratorijos kolegu)

### 2.1.4 Rinkiniai

2.4. Lentelė. Darbe naudoti rinkiniai.

<b>Rinkinio pavadinimas</b>	<b>Funkcija</b>	<b>Gamintojas</b>
<i>GeneJET Plasmid Miniprep Kit</i>	Plazmidinės DNR gryninimas iš biomasės	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
<i>Malachite Green Phosphate Assay Kit</i>	Fosfato koncentracijos nustatymas	BioAssay Systems, JAV

### 2.1.5 Naudoti buferiniai tirpalai

2.5. Lentelė. Darbe naudoti buferiniai tirpalai.

<b>Buferio pavadinimas</b>	<b>Panaudojimas</b>	<b>Sudėtis</b>
----------------------------	---------------------	----------------

TBE buferis	Nukleotidų elektroforezei poliakrilamidiniame gelyje	0,13 M Tris, 45 mM boro rūgštis, 2,5 mM EDTA, pH=8,3
Apatinis skiriamasis gelis 12%	Baltymų elektroforezės poliakrilamidinis gelis	3,17 mL H <sub>2</sub> O, 2,5 mL, Tris-HCl (pH=8,8), 4,0 mL 30% AA/BAA, 100 µL 10 % SDS 5 µL TEMED, 50 µL 10% APS
Viršutinis koncentruojamasis gelis 4%	Baltymų elektroforezės poliakrilamidinis gelis	3,0 mL H <sub>2</sub> O, 1,25 mL, Tris-HCl (pH=6,8), 670 µL 30% AA/BAA, 50 µL 10 % SDS 5 µL TEMED, 25 µL 10% APS
Poliakrilamidinis 20% gelis	Nukleotidų elektroforezės gelis	8 ml 30% akrilamido. 1,2 ml 10x TBE, 200 µL 10% APS, 2,6 ml H <sub>2</sub> O, 10 µL TEMED
Baltymų elektroforezės buferis	Baltymų elektroforezei poliakrilamidiniame gelyje	Ruošiamas 1L 10X buferio, kurio sudėtis: 144 g glicino, 30 g Tris-OH, 10 g SDS, H <sub>2</sub> O iki 1L tūrio
Baltymų surišimo buferis	Baltymų gryninimui nikeline kolonėle	20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 50 mM imidazolo, 10 mM b-merkaptioetanolio, pH = 7,5
Eliucijos buferis	Baltymų gryninimui, sorbentas IMAC sefarozė	20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 0,5 M imidazolo, 10 mM b-merkaptioetanolio, pH = 7,5
A+0,15 buferis	Baltymų gryninimui, sorbentas heparinas	20 mM Tris, 0,15 M NaCl, 10 mM b-merkaptioetanolio, 1 mM EDTA, pH = 7,5
A+0,75 buferis	Baltymų gryninimui	20 mM Tris, 0,75 M NaCl, 10 mM b-merkaptioetanolio, 1 mM EDTA, pH = 7,5
Nsp13 dializės buferis	Ilgalaikiam nsp13 saugojimui	50 % glicerolio (v/v), 25 mM Tris, 250 mM KCl, 1mM MgCl <sub>2</sub> , 1mM DTT, pH = 7,5

3xStabdymo buferis	Helikazės katalizuojamos fermentinės reakcijos sustabdyamas	67,5 mM EDTA, 27% (v/v) glicerolio, 0,3% (v/v) SDS
2xStabdymo buferis	Polimerazės katalizuojamos fermentinės reakcijos sustabdymas	1x TBE buferio, 7M karbamido, 50 mM EDTA pH 8,0

#### 2.1.6 Dažai ir žymenys

#### 2.6. Lentelė. Darbe naudoti dažai ir žymenys.

Pavadinimas	Gamintojas
Baltymų dažas: <i>PageBlue Protein Staining Solution</i>	Thermo Fisher Scientific (Lietuva)
RNR dažas: <i>2x RNA loading dye</i>	Thermo Fisher Scientific (Lietuva)
Baltymų žymuo: <i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i>	Thermo Fisher Scientific (Lietuva)
Baltymų žymuo: <i>Prestained Protein Molecular Weight Marker</i>	Fermentas (Lietuva)

#### 2.1.7 Priemonės

#### 2.7. Lentelė. Darbe naudotos priemonės.

Pavadinimas	Funkcija	Gamintojas
Koncentruojantieji mėgintuvėliai <i>Pierce Protein Concentrators PES 10k</i>	Mėginio sukoncentravimui	Thermo Fisher Scientific (JAV)
Dializės žarnelė: <i>SnakeSkin</i>	Dializei atlikti	Thermo Fisher Scientific (JAV)
<i>Mini-PROTEAN TBE-Urea Precast Gels</i>	Paruošti geliai denatūruojančiai RNR elektroforezei	Bio-Rad (JAV)
Gravimetrinė chromatografijos kolonėle	Baltymų gryninimas	Thermo Fisher Scientific (JAV)

#### 2.1.8 Prietaisai

#### 2.8. Lentelė. Darbe naudotų prietaisų lentelė.

Gamintojas	Prietaisai
Merck (Vokietija)	Termostatas <i>Eppendorf ThermoStat Plus</i> Centrifūga <i>Eppendorf Centrifuge 5415 R</i>
Agilent Technologies (JAV)	Termocikleris <i>SureCycler 8800</i> Spektrofotometras <i>Cary 60 UV-Vis</i>

Biometra (Vokietija)	Elektroforezės indo maitinimo šaltinis <i>Biometra model 250</i>
Bio-Rad Laboratories (Jungtiniai arabų Emyratai)	Transiluminatorius <i>ChemiDoc MP Imaging System</i>
Thermo Fisher Scientific (JAV)	Spektrofotometras <i>Nanodrop ND-1000</i> Purtyklė <i>MaxQ</i>
Bandelin (Vokietija)	Ultragarsinis desintegratorius <i>SONOPULS</i>
KERN (Vokietija)	Svarstyklės KERN EMB
Sia Biosan (Latvija)	Centrifuga-vorteksas <i>FV-2400 mini</i> Centrifūga <i>LMC-4200R</i>
Herolab (Vokietija)	Centrifūga HiGen SR
Kecskemét (Vengrija)	Laminaras <i>Ezermester ISZ</i>

### 2.1.9 Plazmidės

**pGBW-m4046760** – raiškos vektorius su nsp13 genu ir chloramfenikolio atsparumo genu. Baltymo C-gale *His-tag* gryninimo inkaras (addgene katalogo numeris: 145600).

**pET28a 6xHis PreScission SARS-CoV-2 nsp13** – raiškos vektorius su nsp13 genu ir kanamicino atsparumo genu. Baltymo C-gale *His-tag* gryninimo inkaras (addgene katalogo numeris: 159390).

### 2.1.10 Bakterijų kamienai

***E.coli* BL21(DE3) - F - ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3).**

***E.coli* Rosetta(DE3) E.F - ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE (CamR).**

***E.coli* XL1-Blue - F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 Tetr recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac.**

## 2.2 Metodai

### 2.2.1 *E.coli* transformacija

*E.coli* kompetentinės ląstelės buvo inokuliuotos su 100 ng transformuojamos DNR ir inkubuotos 30 min. ledo vonelėje. Po inkubacijos ląstelės 30 sekundžių buvo veikiamos 42°C temperatūros karščio šokui. Po to į mėgintuvėlį įpilta 950 μL kambario temperatūros LB terpės (2.1 lentelė). Ląstelės inkubuotos 37°C 60 min. jas purtant 250 rpm greičiu. Tada ląstelės paskirstytos agarizuotos terpės paviršiuje, kartu su plazmidei specifiniu antibiotiku (100 μg/mL) (2.1 lentelė). Lėkštelės apverčiamos ir inkubuojamos per naktį termostate 37°C temperatūroje.

### 2.2.2 Baltymų raiška

200 ml LB terpės (2.1.1 lentelė) buvo inokuliuoti 4 ml transformantų naktinės kultūros ir toliau auginama kol optinis tankis (600 nm) pasiekia apytiksliai 0,6. Tuomet ląstelės indukuotos 1 mM IPTG ir inkubuotos per naktį 30°C temperatūroje. Po inkubacijos pašalinama augimo terpė, centrifuguojant ląsteles 20 min. 5000 RCF 20°C temperatūroje ir saugota tolesniam naudojimui - 20°C temperatūroje.

### 2.2.3 Baltymų gryninimas

Biomasė suspenduota baltymų surišimo buferyje (2.5 lentelė) ir ardyta ultragarsu ledo vonioje 2 min. su 30 % amplitude. Ląstelių nuolaužos ir netirpi baltymų frakcija nuo tirpios frakcijos atskirta centrifuguojant 1 val. 18000 rpm greičiu, 4°C temperatūroje. Baltymai gryninti per dvi gravimetrines kolonėles – su IMAC sefarozės ir su heparino substratais (2.1 lentelė), kurių kiekvieno tūris buvo 2

ml. Prieš atliekant tikslinio baltymo eliaciją, iš kiekvienos kolonėlės surinkta prie kolonėlės neprikibusių baltymų frakcija (angl. *Flow through*) ir kolonėlės praplovimo frakcija (angl. *Wash*). Kiekvienai kolonėlei atliekama eliacija, panaudojant jos sorbentui pritaikytus eliacijos buferius (IMAC sefarozė – buferis su 100 mM imidazolo, heparinas – buferis su 0,75 M NaCl). (2.5. lentelė).

#### 2.2.4 Baltymų elektroforezė

Baltymų elektroforezei skirti mėginiai denatūruoti juos sumaišius su *Protein loading dye* (6x) (2.6 lentelė) 5:1 santykiu ir pakaitinus 5 min. 95°C temperatūroje. Baltymų frakcionavimui naudoti 4 % koncentracijos koncentruojamasis gelis ir 12 % skiriamasis geliai (2.5. lentelė). Elektroforezė vykdyta 1 val., naudota 100 V įtampa. Atlikus elektroforezę, gelis nuplautas verdančiu vandeniu ir nudažytas PageBlue™ Protein Staining Solution dažais (2.6 lentelė).

#### 2.2.5. Bradford baltymų koncentracijos nustatymo metodas

Į mėgintuvėlį įpilame 50 µl nežinomos koncentracijos 50 kartų praskiesto baltymo ir 1,5 ml *Coomasie plus the better Bradford reagent* (2.6 lentelė). Inkubuojama 10 min. kambario temperatūroje. Mėginio sugertis matuojama ties 595 nm bangos ilgiu. Baltymų koncentracija apskaičiuojama pagal formulę (1):

$$\text{Baltymų koncentracija} \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{A_{595} - b}{tg\alpha} \times \text{Skiedimas} \quad (1)$$

kur:

$A_{595}$  – išmatuota absorbcija;

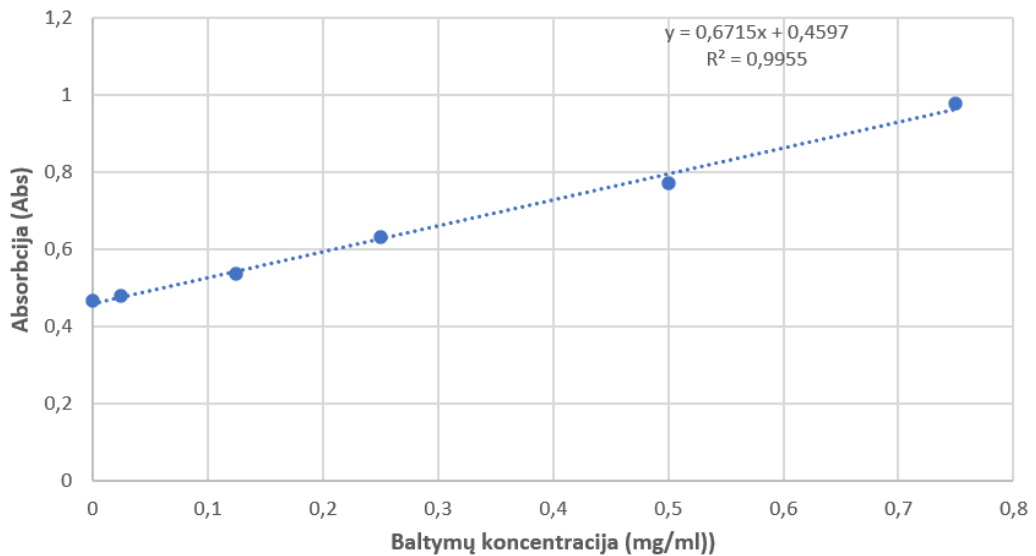
b – ordinačių ašies kreivės kirtimo taškas;

$tg\alpha$  – kalibracinės kreivės nuokrypio kampas;

Skiedimas – naudotas baltymų tirpalo skiedimas, kartais.

Baltymų koncentracijos nustatymui buvo panaudota kalibracinė kreivė, kuri sudaroma naudojantis 2 mg/ml JSA baltymo tirpalu. Ruošiami mėginiai, kurių JSA koncentracija yra 0, 25, 125, 250, 500, 750 µg/ml. Iš kiekvieno mėginio paima po 50 µl ir 1,5 ml *Coomasie plus the better Bradford reagent*, sumaišoma ir inkubuojama kambario temperatūroje 10 min. Po to spektrofotometru pamatuojama kiekvieno mėginio 595 nm ilgio bangos šviesos sugertis ir nubraižoma kalibracinė kreivė (6 pav.).

## Bradford kalibracinė kreivė



6 pav. Bradford kalibracinė kreivė, naudota baltymų tirpalų koncentracijoms nustatyti.

### 2.2.6 Mutacijų įvedimas į nsp13 aktyvųjį centrą

Aktyviojo centro mutacijos įvestos atliekant tikslią mutagenzę pasitelkiant PGR reakcija. 25  $\mu\text{L}$  PGR reakcijos mišinį sudarė 5  $\mu\text{L}$  5X Q5 reakcijos buferio, 0,25  $\mu\text{L}$  Q5 didelio tikslumo DNR polimerazės, 0,5  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{M}$  dNTP, 1,25  $\mu\text{L}$  0,5  $\mu\text{M}$  tiesioginio pradmens, 1,25  $\mu\text{L}$  0,5  $\mu\text{M}$  netiesioginio pradmens (2.2 lentelė), 14,75  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O ir 2  $\mu\text{L}$  plazmidinės DNR, kurios koncentracija 1 ng/ $\mu\text{L}$ . PGR reakcijos sąlygos: pradinis grandinių atskyrimas – 95 °C, 30 sek. Tuomet vykdyti 25 ciklai, kuriuos sudarė grandinių atskyrimas - 98 °C, 10 sek., pradmenų prilydymas – 55 °C, 20 sek., grandinių ilginimas – 72 °C, 3 min. 31 s, bei galutinė sintezės reakcija vykdyta 72 °C, 2 min. PGR produktai inkubuoti su 1 val. su 1  $\mu\text{l}$  DpnI restrikcijos endonukleazės, matricinės DNR hidrolizei.

### 2.2.7 Malachito žalumos ATPazinio aktyvumo tyrimas

Po ATP hidrolizės susidariusio laisvojo fosfato koncentracija nustatyta naudojant malachito žalumos fosfato koncentracijos nustatymo rinkiniu (*Bioassay systems*) (24 lentelė). Malachito žalumos fosfato analizės metodas yra pagrįstas kiekybiniu žaliojo komplekso, susidariusio tarp malachito žalumos, molibdeno ir laisvojo fosfato koncentracijos spektrofotometriniu (620 nm) nustatymu. Reakcijos mišinys sudarytas iš 30 mM KCl, 10 mM Tris pH = 7.5, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 0,5 uM M13 viengrandės DNR. Į reakcijos mišinį įpilta 95  $\mu\text{l}$  reakcijos mišinio ir 5  $\mu\text{l}$  helikazės nsp13, kurios baltymų koncentracija 0,78 mg/ml. Reakcija stabdyta po 20 min. su 10 mM galutine EDTA koncentracija. Prieš matavimą reakcijos mišinys praskiestas 10 k ir sumaišytas santykiu 4:1 su malachito žalumos rinkinio veikiančiu reagentu (*working reagent*). Veikiantis reagentas gaunamas sumaišant rinkinyje esančius reagentus A ir B santykiu 100:1. Matuojant išsiskyrusio fosfato priklausomybę nuo laiko, reakcija stabdyta su 40 mM EDTA tirpalu. Susidariusio fosfato koncentracija skaičiuota pagal formulę (2):

$$\text{Fosfato koncentracija} \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{A_{620} - b}{\text{tg}\alpha} \times \text{Skiedimas} \quad (2)$$

kur:

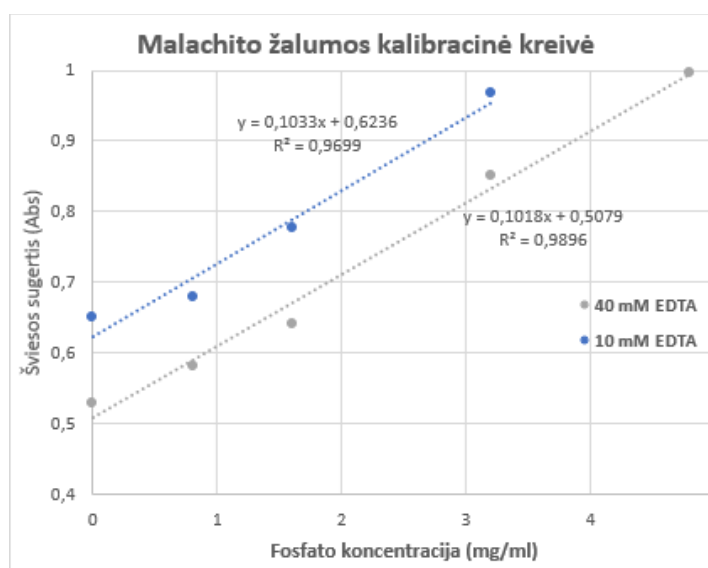
$A_{620}$  – išmatuota absorbcija;

$b$  – ordinačių ašies kreivės kirtimo taškas;

$\text{tg}\alpha$  – kalibracinės kreivės nuokrypio kampas;

Skiedimas – naudotas baltymų tirpalo skiedimas, kartais.

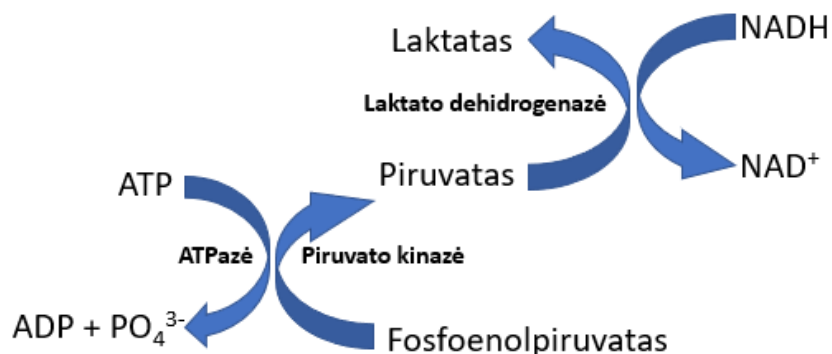
Fosfato koncentracija apskaičiuota iš gautų fosfato koncentracijos kalibracinių kreivių (7 pav.). Kalibracinei kreivei sudaryti 10 kartų praskiestame reakcijos buferyje paruošiami 0, 0,8, 1,6, 3,2, 4,8, 3,2, 4,8, 6,4 mg/ml fosfato koncentracijos tirpalai. Į vieną kalibracinių tirpalų seriją įdedama 10 mM EDTA, į kitą 40 mM EDTA. Tirpalai sumaišyt santykiu 4:1 su malachito žalumos rinkinio veikiančiu reagentu (*working reagent*). Matuojama šviesos sugertis ties 620 bangos ilgiu, iš gautų rezultatų sudaroma kalibracinės kreivės, kai reakcijų stabdymui naudojamas atitinkamas kiekis EDTA.



7 pav. Malachito žalumos kalibracinės kreivės, sudarytos su skirtinga EDTA koncentracija, naudotos susidariusio fosfato koncentracijoms nustatyti.

### 2.2.8 ATP/NADH jungtinis fermentinis ATPazinio aktyvumo tyrimas

Jungtinis ATP/NADH fermentinis ATPazinio aktyvumo tyrimas (angl. *ATP/NADH coupled assay*) pagrįstas reakcijomis, kurių metu ATP regeneracija yra susiejama su NADH oksidacija (8 pav.). Po kiekvieno ATP hidrolizės ciklo, regeneracinė sistema, sudaryta iš fosfoenolpiruvato (PEP) ir piruvato kinazės (PK), paverčia vieną PEP molekulę į piruvatą, o ADP paverčiamas atgal į ATP. Vėliau laktato dehidrogenazė (LDH) paverčia piruvatą laktatu, šios reakcijos metu oksiduojama viena NADH molekulė. Šiuo metodu matuojamas NADH šviesos sugerties (340 nm) mažėjimas, atitinkantis ATP hidrolizės greičiui. Pastovi ATP regeneracija leidžia nepertraukiamai stebėti ATP hidrolizės greitį.



**8 pav.** Jungtinio ATP/NADH fermentinio ATPazinio aktyvumo tyrimo veikimo schema.

Reakcijos mišinio tūris – 200  $\mu$ l, o sudėtis – 10% (w/v) glicerolio, 4,7 U LDH, 5,3 U PK, 0,2 mM NADH, 2 mM PEP, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 nM M13 DNR ir 100 nM helikazės nsp13. Mišinys inkubuotas 10 min. kambario temperatūroje. Nenutrūkstamai matuota 340 nm šviesos sugertis. Fermentinė reakcija pradėta į reakcijos mišinį įlašinus 1 mM ATP, 15 min. nenutrūkstamai matuojama šviesos sugertis.

Kiekvienam mėginyje skaičiuotas absorbcijos mokytis nuo pasirinktos pradinės reikšmės kiekviename taške pagal formulę (3):

$$NADH \text{ koncentracija}(\%) = \frac{A_{340}}{A(0)} \times 100\% \quad (3)$$

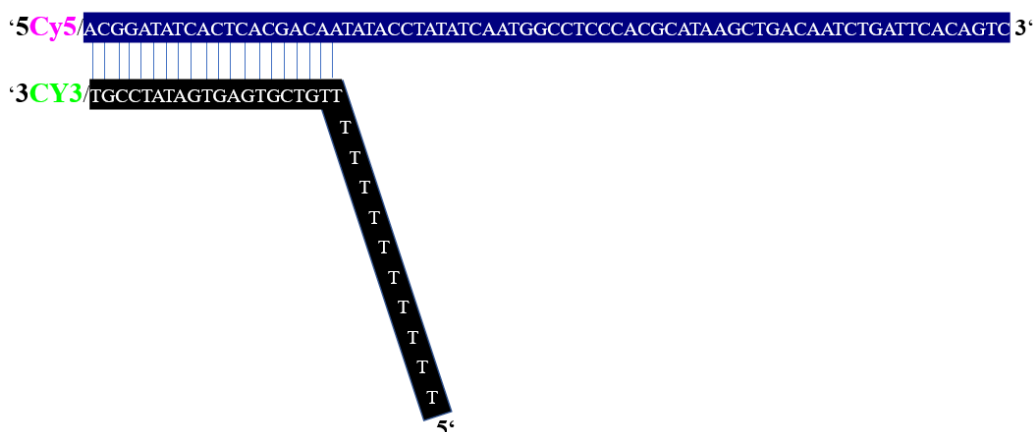
kur:

$A_{340}$  – išmatuota absorbcija;

$A(0)$  – absorbcija vertinamos reakcijos pradiniam taške.

### 2.2.9 Šakoto DNR substrato sintezė

Sukurtas šakotas DNR substratas, sudarytas iš centrinės duplekso srities, kurios galuose yra fluoroforai Cy5 ir Cy3 ir dviejų viengrandžių atšakų, kurių viena sudaryta iš poliT uodegėlės (9 pav.).



**9 pav.** Šakotas DNR substratas, turintis fluoroforus Cy3 ir Cy5 skirtas kokybiniam krypties helikazinio aktyvumui įvertinti.

Oligai AT5 ir AT10 (lentelė 2.1) prilydyti vienas per kito pakaitinus reakcijos mišinį 2 min. 95°C ir 45 min. tolygiai mažinant temperatūra iki 25°C. Reakcijos tūris – 100  $\mu$ l, mišinio sudėtis – 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 1mM EDTA, 1  $\mu$ M AT5, 1  $\mu$ M AT10. Šakotas DNR substratas vizualizuotas 20 % PAGE gelyje pasirenkant Cy3 ir Cy5 šviesos kanalus.



### 2.2.10 DNR elektroforezė

DNR elektroforezei skirti mėginiai sumaišyti su gliceroliu (2.1 lentelė) 10:1 santykiu. Baltymų frakcionavimui naudotas 20% skiriamasis geliai (2.5. lentelė). Elektroforezė vykdyta TBE buferyje (2.5 lentelė) 1 val., naudota 100 V įtampa.

### 2.2.11 Helikazinio aktyvumo kokybinis tyrimas

Kokybinis helikazinio aktyvumo tyrimas pagrįstas helikazės reakcija su šakotu (angl. *forked substrate*) DNR substratu, turinčiu Cy5 ir Cy3 fluoroforus, ir šios reakcijos produktų vizualizavimu poliakrilamidiniame 20 % gelyje (2.5 lentelė) atliekant PAGE-elektroforezę. Cy5 fluoroforas yra aptinkamas sužaditimui naudojant 647 nm ilgio bangas, o Cy3 fluoroforas – 570 nm. Kai helikazės yra aktyvi, ji prisijungia prie DNR substrato ir pradeda procesiškai išvynioti DNR dupleksus, kas leidžia atlikus kontrolinius bandymus kokybiškai įvertinti helikazės aktyvumą.

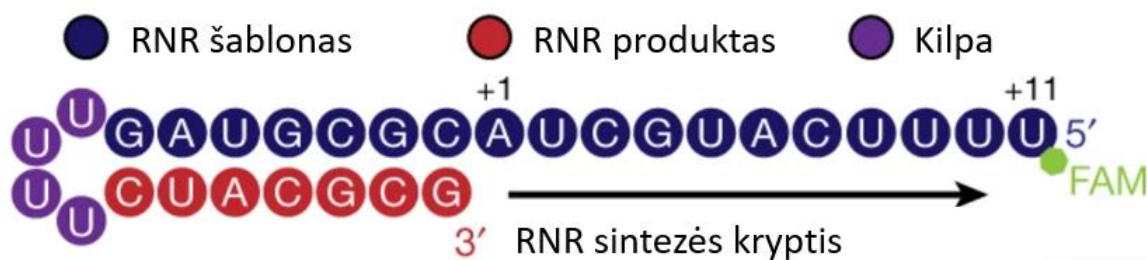
Helikazinio aktyvumo reakcija vykdyta 60 µl tūryje, o mišinio sudėtis, 2 µM šakoto substrato, 0,33 µM tiriamos helikazės, 10 mM Tris–HCl (pH 7.5), 60 mM KCl, 10% (v/v) glicerolio, 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Reakcija stabdyta su 20 ul 3X stabdymo buferiniu tirpalu, kurio sudėtis – 67,5 mM EDTA, 27% (v/v) glicerolio, 0,3% (w/v) SDS. Atlikus DNR elektroforezę (2.2.5), gelio vizualizacija atlikta pasitelkiant UV transiluminatorių (2.7 lentelė) pasirenkant Cy3 ir Cy5 šviesos kanalus.

### 2.2.12 Denatūruojanti RNR elektroforezė

Denatūruojančiai RNR elektroforezei skirti mėginiai sumaišyti su 2XRNR loading dye (2.1 lentelė) 1:1 santykiu. Į gautą mišinį įlašinama 30%(v/v) glicerolio. RNR frakcionavimui naudotas komercinis gelis *Mini-PROTEAN TBE-Urea Precast Gels* (2.7. lentelė). Elektroforezė vykdyta TBE buferyje papildytu 8 M karbamido (2.5 lentelė) 3 val., naudota 50 V įtampa.

### 2.2.13 Polimerazinio aktyvumo kokybinis tyrimas

Polimerazinio aktyvumo kokybinis tyrimas pagrįstas RNR polimerazės katalizuojamu dvigrandės RNR molekulės prailginimu ir reakcijos produktų analize, atliekant denatūruojančiąją karbamido PAGE elektroforezę. Polimerazės reakcijai panaudotas minimalus RNR substratas suformuojantis plaukų segtuko struktūra (angl. *hairpin*) su matricos ir „produkto“ sritimis. RNR substratas sudarytas iš 30 nukleotidų prie kurių 5' gale prijungtas fluorescencinis žymuo FAM (10 pav.)



**10 pav.** Substratas naudotas RNR polimerazės kokybiniam tyrimui turintis fluorescencinį žymenį FAM 5' gale (Hillen ir kt., 2020).

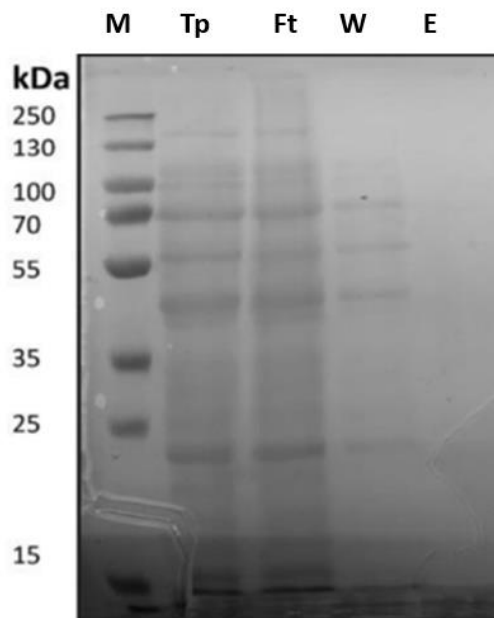
Pagaminamas 100 µl reakcijos mišinys, kurio sudėtis – 5 µM RNR substrato, – 5 µM tiriamos RNR polimerazės, 100 mM NaCl, 20 mM Na-HEPES pH 7,5, 5% (v/v) glicerolio, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, ir 5 mM β-merkaptioetanolio. Reakcijos mišinys inkubuotas 5 min. 37°C. RNR grandinės prailginimas inicijuojamas pridėdant į reakcijos mišinį 150 µM UTP, GTP, CTP ir 300 µM ATP. Reakcija inkubuota 15, 30, ir 45 min. 37°C. Reakcija sustabdyta pridėjus į reakcijos mišinį 2x stabdymo

buferio, sudaryto iš 1x TBE buferio papildyto 7 M karbamido, 50 mM EDTA pH 8,0. Baltymai suskaidyti į sustabdytą reakciją pridėjus 1 mg/ml proteazės K ir inkubuojant 60 min. 55°C temperatūroje. RNR produktai išskirstyti atliekant denatūruojančiąją karbamido PAGE elektroforezę 1 TBE buferyje papildytame 8 M karbamido. Reakcijos produktai vizualizuoti transiluminatoriumi pasirenkant FAM šviesos kanalą.

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1 Nsp13 ekspresija ir gryninimas

Moksliniame tiriamajame darbe nsp13 tikslinio baltymo gavimui iš pradžių buvo naudotas *pGBW-m4046760* raiškos vektorius, turintis atsparumą chloramfenikoliui. Atliktas plazmidinės DNR gryninimas su *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (2.4. lentelė) pagal gamintojo pateiktą protokolą ir transformacija į *E.coli* baltymų ekspresijos kamieną BL21(DE3) pagal 2.2.1 metodą. Prieš patikrinant baltymų raišką tikslinių genų seka patikrinta VU Biotechnologijos instituto sekoskaitos centre. Pagal 2.2.2 metodą atliktas biomasės auginimas. Gauta biomasė toliau ardyta ir gryninta naudojantis imobilizuotų metalų jonų chromatografijos (IMAC) metodu 2.2.3. Kolonėlės sorbente esantys Ni<sup>2+</sup> jonai sudaro kompleksą su rekombinantinio baltymo N gale esančiu histidino žymeniu (His-Tag). Dėl šių specifinių sąveikų susidarymo galima atskirti His-Tag turinčius rekombinantinius baltymus iš bendros biomasės (J. Porath, 1988). Per konkurencinę eliuciją su imidazolu baltymas atskiriamas nuo kolonėlės. Prie kolonėlės prikibę baltymai buvo atplauti su buferiu turinčiu 500 mM imidazolu. Perteklinis imidazolis nuo baltymo buvo dializuotas, naudojant pusiau laidžią membraną *SnakeSkin* (2.7 lentelė). Atlikta baltymų elektroforezė 12% SDS-poliakrilamidiniame gelyje (11 pav.).

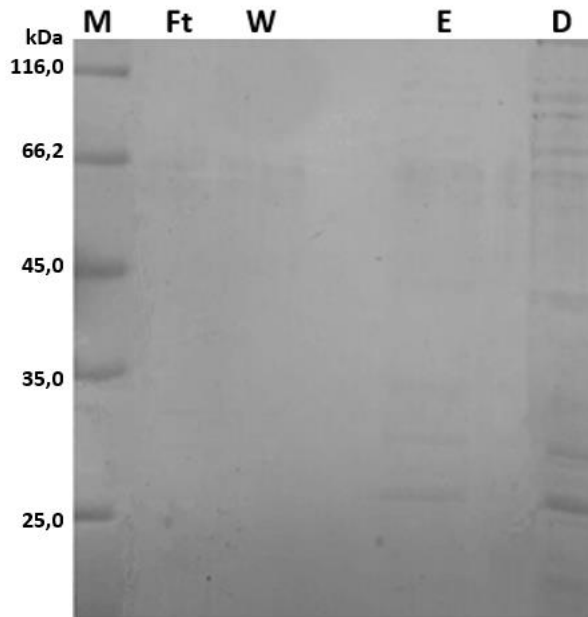


**11 pav.** Baltymų gryninimas iš *E.coli* BL21(DE3). Skirtingų afininės skysčių chromatografijos frakcijų analizė SDS-PAGE metodu. M – baltymų molekulinės masės standartas, TP – tirpi baltymų dalis prieš baltymų gryninimą, FT – prie kolonėlės neprikibusių baltymų dalis, W – baltymų dalis po praplovimo, E – eliucija.

Atlikus SDS-PAGE baltymų elektroforezę, tikslinis baltymas – nsp13, kurio dydis 67 kDa, nebuvo matomas, todėl buvo nuspręsta pakeisti *E.coli* baltymų ekspresijos kamieną į Rosetta(DE3). Kadangi kompetentinės ląstelės Rosetta(DE3) turi plazmidę, su chloramfenikolio atsparumo genu, *pGBW-m4046760* raiškos vektorius buvo netinkamas transformacijai. Ekspresijos optimizacijai buvo pasirinkta plazmidė *pET28a 6xHis PreScission SARS-CoV-2 nsp13*, kadangi ši plazmidė turi kanamicino atsparumo geną.

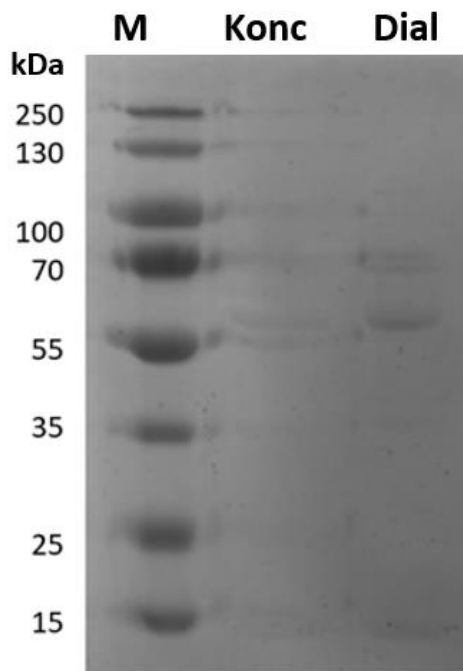
Iš *E.coli* DH5α klonavimo kamieno pagal buvo išgryninta nsp13 helikazę koduojanti plazmidė su *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (2.4. lentelė) pagal gamintojo pateiktą protokolą. Išgryninta plazmidė, buvo transformuota į *E.coli* Rosetta(DE3) raiškos kamieną pagal 2.2.1. 1,8 litre LB terpės, su chloramfenikoliu ir kanamicinu, buvo atlikta baltymų raiška pagal 2.2.2 metodą. Tirpi biomasės dalis buvo gryninta per dvi gravimetrines kolonėles atliekant imobilizuotų metalų jonų

chromatografiją (IMAC) ir heparino chromatografiją pagal 2.2.3 metodą. Pagal 2.2.4 metodą atlikta SDS-PAGE baltymų elektroforezė (12 pav.).



**12 Pav.** Baltymų gryninimas iš *E.coli* Rosetta(DE3). Skirtingų afininės skysčių chromatografijos frakcijų analizė SDS-PAGE metodu. Sorbentas heparinas. M – baltymų molekulinės masės standartas, TP – tirpi baltymų dalis. FT – prie kolonėlės neprikibusi baltymų dalis, W – praplovimo frakcija, E – eliucijos frakcija, D – dializuota eliucijos frakcija.

Kadangi tikslinis baltymas neprisijungė prie sorbento, buvo apjungtos neprisijungusių baltymų ir praplovimo frakcijos. Naudojantis 10 kDa koncentratoriumi apjungtoji frakcija buvo sukonzentruota iki 2 ml ir dializuoti naudojantis pusiau laidžia membrana. Sukonzentruotiems mėginiais vizualizuoti, pagal 2.2.4 metodą atlikta SDS-PAGE elektroforezė (13 pav.).



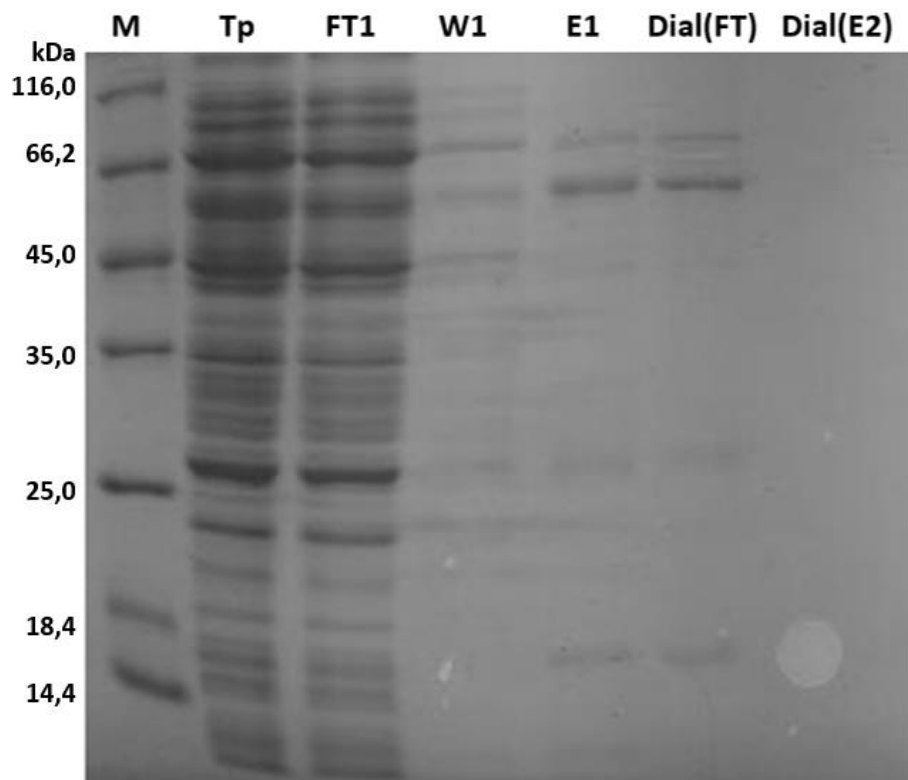
**13 pav.** Sukonzentruotos apjungtosios Nsp13 frakcijos tyrimas SDS-PAGE metodu. M – molekulinės masės markeris, Konc – sukonzentruotas mėginys, Dial – mėginys po dializės.

Pagal 2.2.5 metodą nustatyta baltymų koncentracija dializuotame mėginyje – 0,78 mg/ml. Gavus tikslinį baltymą buvo nuspręsta išgryninti nsp13 baltymus su pakeitimais aktyviajame centre.

### 3.2 Nsp13 neaktyvių mutantų kūrimas

Siekiant įsitikinti, kad iš tikrųjų gavome aktyvų tikslinį baltymą, prieš atliekant ATPazinio ir helikazinio aktyvumų matavimus, buvo nuspręsta sukurti nsp13 mutantus su pakeitimais nsp13 aktyviajame centre, aspartatą D374 ir glutamatą E375 pakeisti alaniniais. Plazmidėje *pET28a 6xHis PreScission SARS-CoV-2 nsp13* PGR reakcijos metu per tikslinę mutagenzę (2.2.6 metodas) buvo sukurtos trys plazmidės, turinčios mutacijas D374A, E375A, D374A/E375A. Gauti PGR produktai buvo transformuoti į *E.coli* kamieną XL1 blue (2.2.1 metodas) ir auginti ant agarizuotos LB terpės su tiksliniu antibiotiku, kanamicinu. Atliktas naktinių kultūrų auginimas ir plazmidžių gryninimas panaudojant *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* plazmidinės DNR gryninimo rinkinį (2.4 lentelė) pagal gamintojo pateiktą protokolą. Atlikus mėginių sekoskaitą, įsitikinta, kad mutacijos įvestos teisingai.

Gautos naujos plazmidės su įvestomis mutacijomis buvo transformuotos į *E.coli* baltymų ekspresijos kamieną Rosetta(DE3). Atlikta baltymų ekspresija D374A ir E375A transformantuose iš 400 ml, o D374A/E375A – iš 1,8 l skystos LB terpės. Po baltymų ekspresijos iš D374A transformantų gauta 0,75 g, iš E375A – 0,83 g, o iš D374A/E375A – 4,5 g biomasės. Atliktas biomasės ardymas ir baltymų gryninimas per dvi gravimetrines kolonėles, su IMAC sefaroze ir heparinu (2.1 lentelė) panaudojant pagal 2.2.3 metodą. Prie kolonėlės su heparino sorbentu neprikibusi FT frakcija sukonzentruota iki 2 ml, atlikta dializė. Dializė taip pat buvo atlikta ir heparininės kolonėlės eliuacijos frakcijai, siekiant įsitikinti, ar baltymas nesijungia prie kolonėlės. Baltymų ekspresijos rezultatai analizuoti SDS-PAGE 2.2.4 metodu (14 pav.).



**14 pav.** Nsp13 mutantų, su aktyviojo centro amino rūgštimis aspartatu (E) ir glutamatu (D), pakeistomis į alaninus(A) (D374A/E375A), baltymų gryninimo rezultatas. Skirtingų afininės skysčių chromatografijos frakcijų analizė SDS-PAGE metodu. M – baltymų molekulinės masės standartas, TP – tirpi baltymų dalis, FT – prie nikelinės kolonėlės neprikibusi baltymų dalis, W1 – nikelinės kolonėlės praplovimo frakcija,

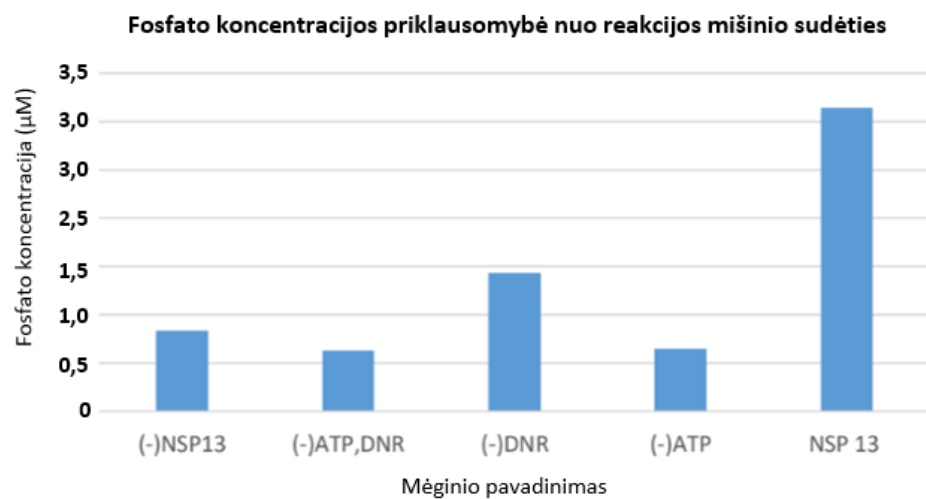
E1 – nikelinės kolonėlės eliucijos frakcija, Dial(FT2) – prie heparininės kolonėlės neprikibusių baltymų dalis po dializės, Dial(E2) – dializuota.

Iš baltymų gryninimo rezultatų matyti, kad 67 kDA nsp13 kaip ir tikėtasi, nesijungė prie heparino sorbento. Tolimesniems tyrimams naudoti nsp13 mutantai iš sukonzentruotos ir dializuotos, prie heparino sorbento neprikibusių baltymų frakcijos.

Baltymų koncentracija nustatyta naudojant Bradford reagentą pagal 2.2.5 metodą. Mutantų D374A/E375A baltymų koncentracija – 4,39 mg/ml, D374A – 1,95 mg/ml, D374A, E375A – 1,91 mg/ml.

### 3.3 Nsp13 ATPazinio aktyvumo matavimai

Norint įsitikinti, kad gautas tikslinis baltymas turi ATPazinį aktyvumą, pirmiausia buvo atlikti ATP hidrolizės metu išsiskiriančio  $\text{PO}_4^{3-}$  koncentracijos matavimai. Fosfato koncentracija buvo nustatyta naudojantis malachito žalumos fosfato koncentracijos nustatymo rinkiniu *The Malachite Green Phosphate Assay Kit* (2.4 lentelė), 2.2.7 metodas. Taip pat buvo atliktos skirtingos neigiamos kontrolės, be reakcijoje dalyvaujančių komponentų (15 pav.).

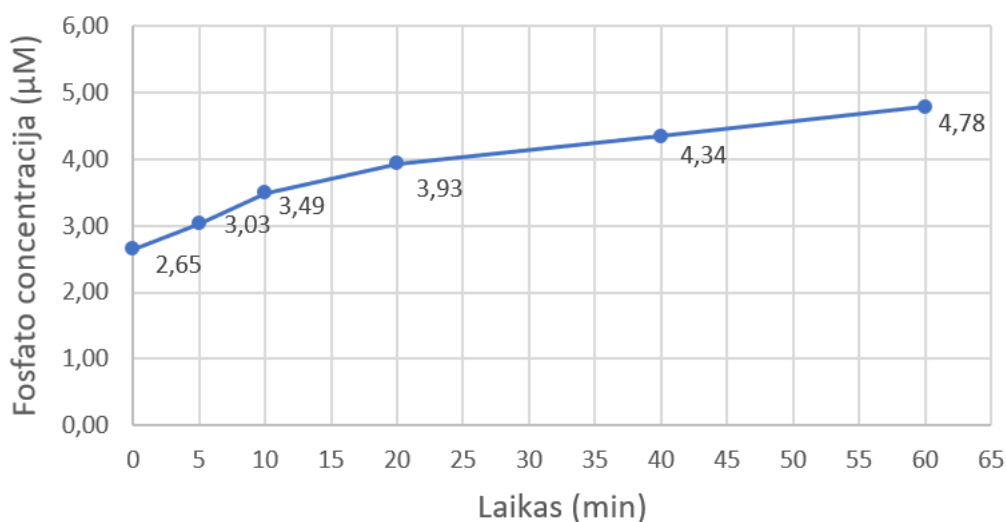


**15 pav.** Fosfato koncentracijos priklausomybė nuo mišinio sudėties. (-)Nsp13 – neigiama kontrolė be nsp13, (-)ATP,DNR – neigiama kontrolė be ATP ir DNR, (-)DNR – neigiama kontrolė be DNR, (-)ATP – neigiama kontrolė be ATP, NSP13 – mėginys kuriame įdėti visi reakcijos mišinio komponentai.

Iš gautų rezultatų matyti, kad fosfatų jonų koncentracija neigiamose kontrolėse yra žymiai mažesnė negu mėginyje, kuriame įdėti visi komponentai. Mėginyje, į kurį buvo įdėtas tikslinis baltymas nsp13 ir visi reakcijos komponentai, fosfato jonų koncentracija buvo 3,15 µM. Neigiamose kontrolėse fosfatų jonų koncentracija buvo ženkliai mažesnė, pavyzdžiui mėginyje, kuriame nebuvo nei ATP nei DNR, fosfato jonų koncentracija buvo mažiausia – 0,61 µM, nedaug skyrėsi ir mėginyje, kuriame nebuvo įdėta tik ATP – 0,63 µM. Iš neigiamų kontrolių didžiausia  $\text{PO}_4^{3-}$  koncentracija buvo mėginyje, kuriame buvo nsp13 bei ATP, tačiau nebuvo DNR, – 1,43 µM. Mėginyje, kuriame nebuvo įdėta nsp13, tačiau buvo įdėta tiek DNR tiek ATP fosfato jonų koncentracija buvo 0,83 µM.

Taip pat, pasitelkiant šį metodą buvo atlikti ATP hidrolizės metu išsiskiriančio fosfato jonų koncentracijos priklausomybės nuo laiko tyrimai. Fosfatų jonų koncentracija matuota po 0, 5, 20, 40 ir 60 min. (16 pav.).

## Fosfato koncentracijos priklausomybė nuo laiko

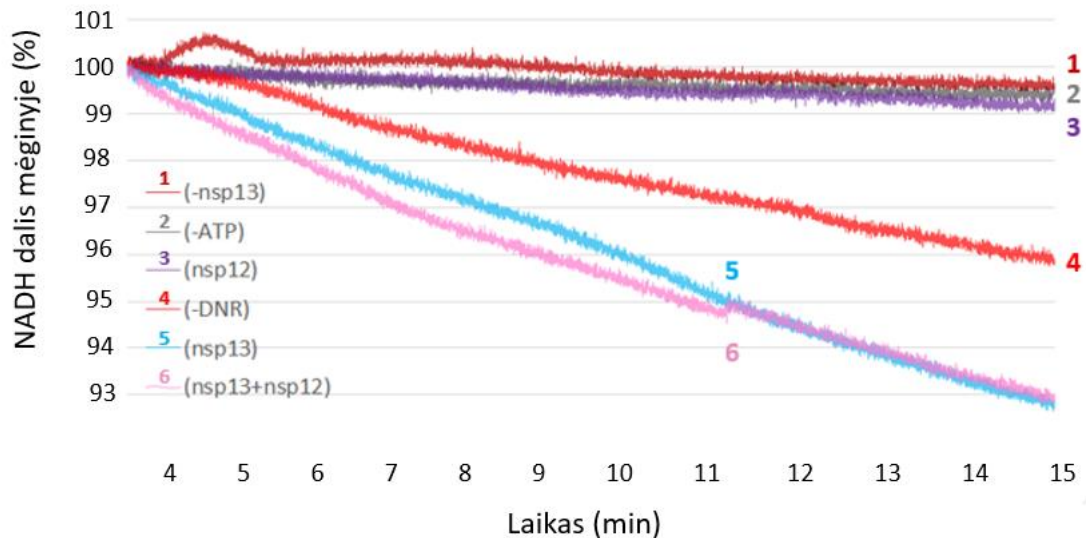


**16 pav.** Fosfato koncentracijos priklausomybė nuo laiko.

Iš gautų rezultatų matosi, kad fosfatų koncentracija mėginyje pirmas 10 min. stabiliai didėja, o jos koncentracijos didėjimas nuo 10 iki 60 min. šiek tiek sulėtėja. Panašu, kad gautas nsp13 turi ATPazinį aktyvumą, tačiau kad įsitikintume jog gavome aktyvų tikslinį baltymą buvo nuspręsta padaryti tolimesnius tyrimus su gautais nsp13 mutantais.

Norint įsitikinti, kad gautas nsp13 turi ATPazinį aktyvumą ir palyginti jį su gautais mutantais, buvo atliktas ATP/NADH jungtinis fermentinis ATPazinio aktyvumo tyrimas (angl. *ATP/NADH coupled ATPase assay*) pagal 2.2.8 metodą. Šis spektrofotometrinis metodas paremtas nepertraukiamu NADH koncentracijos pokyčio nustatymu. Siekdami įvertinti gauto nsp13 ATPazinį aktyvumą, atlikome matavimus su DNR ir ATP substratais, bei neigiamomis kontrolėmis, kai reakcija vykdoma be nsp13, be DNR arba be ATP. Kadangi neseniai atlikti tyrimai (Chen ir kt., 2020) parodė, kad nsp13 gali pagerinti SARS-CoV-2 polimerazės replikacinio komplekso, sudaryto iš polimerazės nsp12, ir papildomų baltymų nsp8 ir nsp7 procesyvumą, norėjome patikrinti, kokią įtaką turės sąveikos su šiais baltymais nsp13 aktyvumo matavimuose. Todėl atlikome ATPazinio aktyvumo matavimus ir nsp12-nsp8-nsp7 kompleksui atskirai ir sumaišius jį su mūsų gautu nsp13. Nsp12-nsp8-nsp7 kompleksas išgrynintas dr. Vaidos Juozapaitienės iš Biotermodynamikos ir Vaistų tyrimų skyriaus. Iš viso buvo atlikti 6 skirtingi matavimai su skirtingais reakcijoje dalyvaujančiais komponentais (17 pav.).

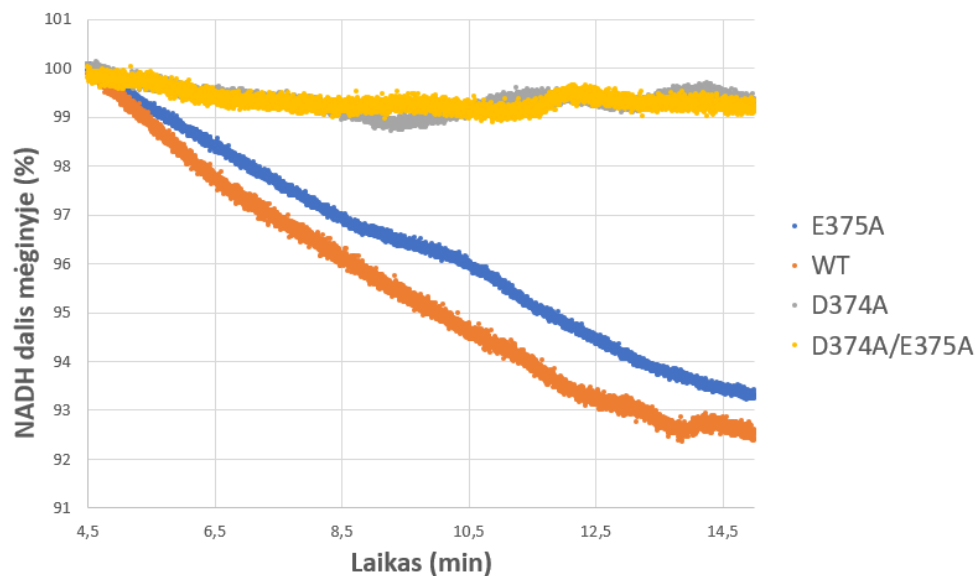
## NADH priklausomybė nuo laiko



**17 pav.** NADH koncentracijos priklausomybė nuo laiko tiesiogiai proporcinga sunaudoto ATP kiekiui. Neigiamos kontrolės: 1 – be nsp13 helikazės, 2 – be ATP, 4 – be DNR. Skirtingi aktyvumo matavimai: 3 polimerazės nsp12, 5 – nsp13, 6 – nsp13 kartu su polimerazę nsp12.

Iš gautų rezultatų matyti akivaizdus skirtumas tarp neigiamų kontrolių, kuriose nebuvo įdėta tikslinio baltymo nsp13 ir ATP, ir mėginių, kur nsp13 reakcijoje buvo kartu su DNR ir ATP substratais. Mėginyje be nsp13 ir mėginyje be ATP galutinė NADH koncentracija po 15 min. reakcijos vis dar buvo apie 100% nuo pradinės. Mėginyje, kuriame buvo įdėta tik ATP, DNR ir nsp12-nsp8-nsp7 kompleksas reakcija taip pat beveik visiškai nevyko. Geriausias aktyvumas buvo mėginyje, kur nsp13 buvo kartu su savo substratais, DNR ir ATP, bei mėginyje, kur kartu buvo ir nsp12-nsp8-nsp7 kompleksas – šiuose mėginiuose NADH koncentracija buvo apie 93 %. Mėginyje, kuriame nebuvo įdėta DNR, po 15 min. reakcijos, galutinė NADH koncentracija buvo apie 96 %. Taip pat atliktas atskiras aktyvumo matavimas su mutantais E357A, D374A, D374A/E375A, kaip teigiamą kontrolę naudojant išgrynintą nepakeistą nsp13 (18 pav.).

## Nsp13 mutantų aktyvumo matavimas



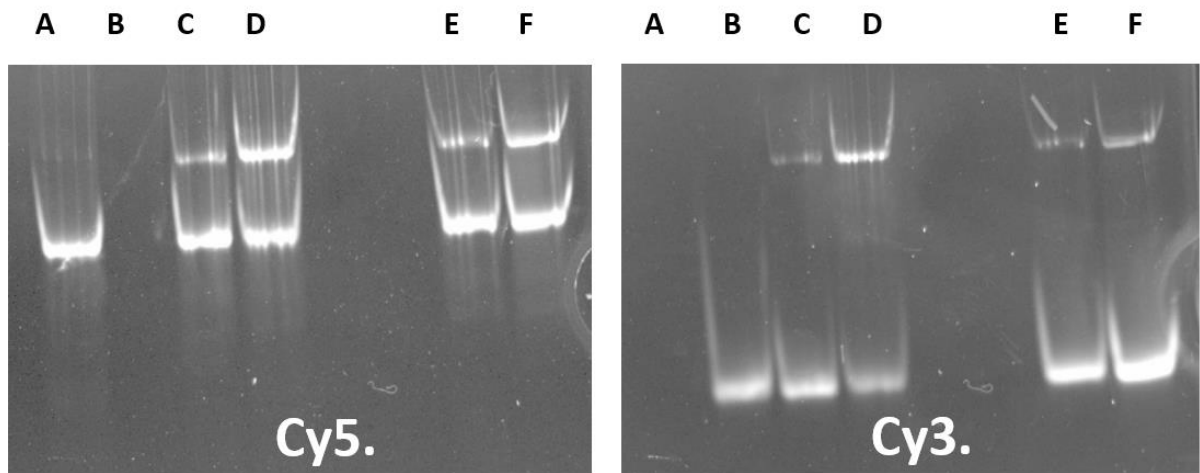
**18 pav.** Nsp13 mutantų aktyvumo matavimas. E375A – nsp13, su aktyviajame centre pakeistu glutamatu į alaniną, WT – pakitimų neturintis nsp13, D374A – nsp13, su aktyviajame centre pakeistu aspartatu į alaniną, D374A/E375A – nsp13, su aktyviajame centre pakeistais glutamatu ir aspartatu į alaninus



Iš gautų rezultatų matyti, kad mažiausią įtaką aktyvumui turėjo aktyviajame centre esančio glutamato pakeitimas į alaniną (E375A), NADH koncentracija mėginyje buvo panaši kaip ir su pakeitimų neturinčio fermento, apie 93 %. Su pakeistu aspartatu į alaniną (D374/A), kaip ir su pakeistomis abejoms aminorūgštimis (D374A/E375A), ATPazinis aktyvumas beveik išvis nebuvo matomas, po reakcijos likusi NADH koncentracija buvo apie 99 %.

### 3.4 Nsp13 helikazinio aktyvumo matavimai

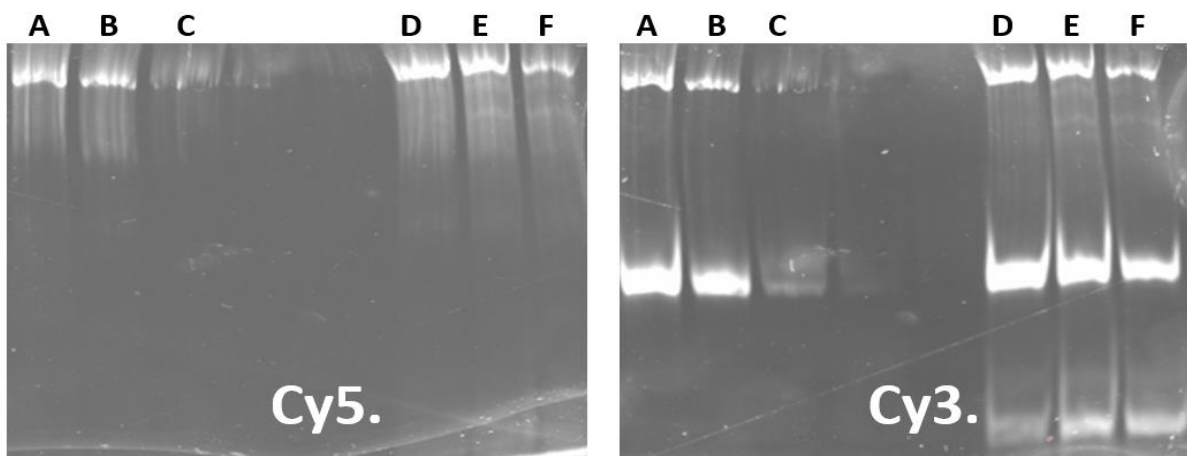
Siekiant įvertinti ar išgryninta SARS-CoV-2 helikazė nsp13 turi helikazinį aktyvumą, buvo nuspręsta atlikti helikazinio aktyvumo kokybinį tyrimą pagal 2.2.11. metodą. Šiam metodui reikalingas šakotas DNR substratas, su fluoroforais Cy5 ir Cy3, susintetintas iš poros oligonukleotidų: AT5, 5' gale turinčio Cy5 fluoroforą ir AT10, 3' gale turinčio Cy3 fluoroforą pagal 2.2.9 metodą. Substrato patikrinimui buvo atliktos kontrolės su atskirais oligonukleotidais AT5 ir AT10. Siekiant paruošti kokybišką substratą, buvo vykdytos substrato sintezės reakcijos su trimis skirtingais oligonukleotidų AT5 ir AT10 koncentracijų santykių deriniais – 1:1, 1:2 ir 1:4. Gautiems reakcijos produktams atlikta DNR elektroforezė pagal 2.2.10 metodą. Mėginiai vizualizuoti pasitelkiant UV transiluminatorių (2.7 lentelė) su Cy3 ir Cy5 šviesos kanalais (19 pav.).



**19 pav.** Šakoto DNR substrato sintezės rezultatų gelis per Cy5 ir Cy3 šviesos kanalus. Oligonukleotidai su fluoroforais: A – AT5, B – AT10. Šakotas DNR substratas susintetintas su su skirtingais AT5:AT10 oligonukleotidų santykiais: C – 1:1, D – 3x1:1 (į šulinėlį įdėta trigubai didesnė substrato 1:1 koncentracija), E – 1:2, F – 1:4.

Iš gautų rezultatų matyti, kad kaip ir tikėtasi, Cy5 šviesos kanale matyti tikrai AT5 oligonukleotidas, o Cy3 šviesos kanale – tikrai AT10. Visuose mėginiuose, kuriuose buvo atlikta šakoto DNR substrato sintezė, Cy5 ir Cy3 šviesos kanaluose matyti po dvi atskiras juosteles, indikuojančias laisvą oligonukleotidą ir susiformavusį lėčiau judantį DNR substratą, kuris toje pačioje vietoje matomas tiek Cy5 tiek Cy3 šviesos kanaluose. Palyginus DNR substratus, gautus naudojant skirtingus AT5 ir AT10 koncentracijų santykių derinius, tolimesniems matavimams pasirinktas substratas, gautas substrato sintezei naudojant 1:4 AT5:AT10 santykį.

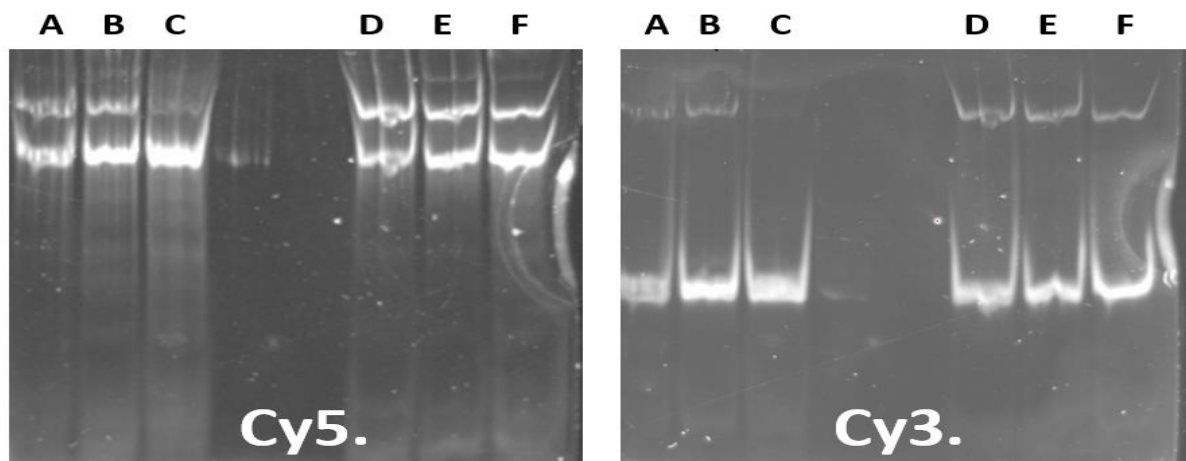
Su pasirinktu šakotu DNR substratu atliktas SARS-CoV-2 helikazės nsp13 kokybinis tyrimas, pagal 2.2.11. metodą. Nsp13 patalpinta su DNR ir ATP substratais ir gauti mėginiai, kuriuose fermentinė reakcija stabdyta po 15, 30, 60 min. Taip pat atlikta neigiama kontrolė su nepaveiktu šakotu DNR substratu ir dvi teigiamos kontrolės – šakotas DNR substratas 60 min. paveiktas aktyvia helikaze RepX ir aukšta temperatūra (99°C, 5 min.) denatūruotas DNR substratas. Reakcijų produktams atlikta DNR elektroforezė pagal 2.2.10 metodą, rezultatai vizualizuoti pasitelkiant UV transiluminatorių (2.7 lentelė) su Cy3 ir Cy5 šviesos kanalais (20 pav.).



**20 pav.** Nsp13 kokybinio tyrimo rezultatų gelis per Cy5 ir Cy3 šviesos kanalus. Kontrolės: A – teigiama kontrolė su aktyvia helikaze RepX, B – neigiama kontrolė su nepaveiktu DNR substratu, C – teigiama kontrolė šakotą DNR substratą denatūruojant 99°C temperatūra. Nsp13 reakcija su DNR substratu ir ATP stabdyta po: D – 15 min, E – 30 min, F – 60 min.

Iš gautų rezultatų matyti skirtumas, tarp dviejų teigiamų kontrolių, mėginyje paveiktame aukšta temperatūra beveik nebesimato viršutinės juostelės, kurioje matyti šakotas DNR substratas. Taip pat beveik visiškai nematyti atskirų AT5 ir AT10 oligonukleotidų nei Cy5 nei Cy3 šviesos kanaluose. Teigiamoje kontrolėje su aktyvia helikaze RepX (2.3 lentelė) Cy5 ir Cy3 šviesos kanaluose matyti šakotas DNR substratas, ir atskiras AT10 oligonukleotidas, su Cy3 fluoroforu, Cy3 kanale. Neigiamoje kontrolėje, kurioje buvo nepaveiktas DNR substratas Cy5 ir Cy3 šviesos kanaluose taip pat matosi DNR substratas, ir atskiras AT10 oligonukleotidas, su Cy3 fluoroforu, Cy3 kanale, tačiau AT10 juostelė yra santykinai šiek tiek mažesnė nei teigiamoje kontrolėje su RepX, kurioje AT10 juostelės padidėjimas galėtų būti siejamas su fermentiniu helikazės poveikiu šakotam DNR substratui. Iš rezultatų, kuriose fermentinė reakcija tarp nsp13 ir šakoto DNR substrato buvo stabdyta po 15, 30, 60 min. matyti šakoto DNR substrato koncentracijos mažėjimas, kas galėtų indikuoti, kad gautas nsp13 turi helikazinį aktyvumą. Taip pat PAGE gelio apačioje matoma trečia juostelė, kurios ryškumas per laiką didėja.

Atlikus bandymus buvo nuspręsta pakartoti helikazinio aktyvumo matavimą į reakcija pridedant aukštą koncentracija DNR „spąstų“ (angl. *DNA trap*) – prie AT5 prisijungiančio DNR oligonukleotido AT8 (2.2 lentelė), nepažymėtu fluoroforu. Tikėtasi, kad DNR „spąstai“ turėtų neleisti susidaryti komplementarioms sąveikoms tarp išvyniotų DNR oligonukleotidų, kas leistų geriau įvertinti kokybinį helikazės poveikį šakotam DNR substratui. Atlikti analogiški matavimai, kaip ir be matuojant be DNR „spąstų“. Reakcijų produktai vizualizuoti 20 % akrilamidiniame gelyje, pasitelkiant UV transiluminatorių su Cy3 ir Cy5 šviesos kanalais (21 pav.).



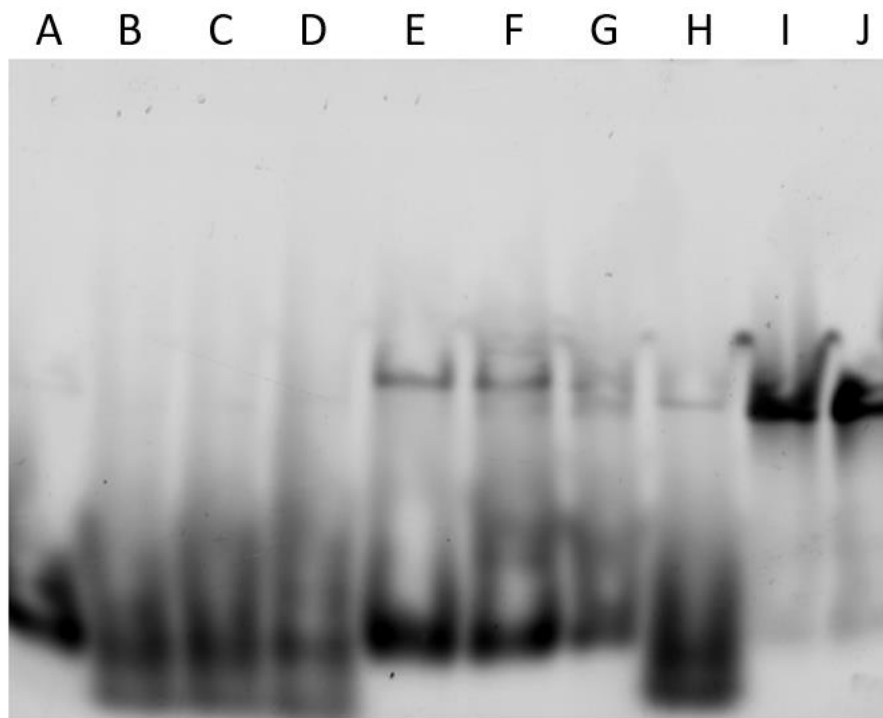
**21 pav.** Nsp13 kokybinio tyrimo su DNR „spąstais“ rezultatų vizualizacija 20% akrilamidiniame gelyje per Cy5 ir Cy3 šviesos kanalus. Kontrolės: A – neigiama kontrolė su nepaveiktu DNR substratu, B – teigiama kontrolė su aktyvia helikaze RepX, C – teigiama kontrolė šakotą DNR substratą denatūruojant 99°C temperatūra. Nsp13 reakcija su DNR substratu ir ATP stabdyta po: D – 15 min, E – 30 min, F – 60 min.

Analizuojant gautus rezultatus neigiamoje kontrolėje, kurioje buvo nepaveiktas substratas, aiškiai matyti viršutinė juostelė tiek Cy5 tiek Cy3 šviesos kanaluose, bei žemiau esantys atskiri oligonukleotidai su fluoroforais. Teigiamoje kontrolėje su helikaze RepX vis dar matosi dvigrandės DNR substratas, tačiau ryškiau matosi ir atskiri oligonukleotidai tiek Cy3 tiek Cy5 šviesos kanaluose. Teigiamoje kontrolėje, kurioje DNR substratas buvo denatūruotas aukšta temperatūra, dvigrandės DNR substrato beveik visiškai nesimato, matosi tik susidarę atskiri oligonukleotidai su žymenimis. Rezultatuose, kuriuose fermentinė reakcija tarp nsp13 ir šakoto DNR substrato buvo stabdyta po 15, 30, 60 min. taip matyti šakoto DNR substrato koncentracijos mažėjimas ir atskirų oligonukleotidų koncentracijų didėjimas. Skirtingai nuo tyrimo, kuriame nebuvo panaudoti DNR „spąstai“, šį kartą neaiškios kilmės trečios juostelės nėra matyti. Iš gautų rezultatų, galime daryti prielaidą, kad helikazė nsp13 turi helikazinį aktyvumą.

### 3.5 Nsp13 įtakos polimerazės nsp12 polimeraziniam aktyvumui matavimai

Pastarųjų metų tyrimai rodo, kad tarp SARS-CoV-2 viruso polimerazės nsp12 ir helikazės nsp13 susidarančios sąveikos skatina nsp13 helikazinį aktyvumą (Jia ir kt., 2019). Polimerazei nsp12 tinkamai funkcionuoti reikalingi kofaktoriai nsp8 ir nsp7, skatinantys polimerazinį aktyvumą ir procesyvumą (Hillen ir kt., 2020). Norėdami įvertinti kokia įtaką mūsų išgryninta helikazė nsp13 turi nsp8-nsp7-nsp12 komplekso polimeraziniam aktyvumui, buvo nuspręsta atlikti RNR polimerazės kokybinį tyrimą pagal 2.2.13. metodą, į dalį mėginių papildomai įdedant išgrynintos helikazės nsp13. Reakcijos mišinyje polimerazės komplekso koncentracija buvo 0,58 mg/ml, o išgrynintos nsp13 – 0,156 mg/ml.

Atlikti matavimai su šiais kontroliniais mėginiais: RNR substratas, nukleotidais neindukuota reakcija su polimerazės kompleksu, nsp13 be polimerazės komplekso. Taip pat atliktos dvi matavimų serijos trijuose laiko taškuose, kai reakcijos mišinyje buvo polimerazės kompleksas ir kai reakcijos mišinyje buvo polimerazės kompleksas kartu su helikaze nsp13. Reakcijos stabdytos po 15, 30, 45 min. Be to, atliktas matavimas su išgrynintu nsp13 mutantu su pakeistomis aktyviojo centro aminorūgštimis (D374A/E375A), reakciją stabdant po 45 minučių. Gauti reakcijų produktai išskirstyti atliekant denatūruojančiąją karbamido PAGE elektroforezę (2.2.12). Mėginiai vizualizuoti pasitelkiant UV transiluminatorių (2.7 lentelė) per FAM šviesos kanalą (22 pav.).



**22 pav.** Polimerazinio aktyvumo kokybinio tyrimo gelis. Kontroliniai mėginiai: A – RNR substratas, B – polimerazės kompleksas be NTP indukcijos, C – nsp13 be polimerazės komplekso. Nsp12-nsp8-nsp7 komplekso katalizuojama reakcija stabdyta po: D – 15 min, E – 30 min, F – 45 min. Nsp12-nsp8-nsp7 komplekso katalizuojama reakcija, kartu pridėjus nsp13, stabdyta po: G – 15, H – 30, I – 45 min. J – Nsp12-nsp8-nsp7 komplekso katalizuojama reakcija, kartu pridėjus nsp13 su pakeistomis aminorūgštimis (D374A/E375A), stabdyta po 45 min.

Iš rezultatų matyti akivaizdus skirtumas tarp kontrolinių mėginių ir mėginių, kuriuose bent vienas iš komponentų buvo su NTP indukuota polimerazė nsp12. Polimerazės nepaveikto DNR substrato padėtis buvo panaši kaip ir kontrolinių mėginių, kuriuose reakcija buvo neindukuota su NTP ir, kur buvo įdėta nsp13 helikazė be polimerazės komplekso. Matavimų serijoje, su indukuota polimeraze, vis dar matomas stambus oligonukleotidų fragmentas nepaveikto RNR substrato dalyje, tačiau per laiką stebimas ir sunkesnių oligonukleotidų atsiradimas, kas galėtų indikuoti sėkmingą polimerazinę reakciją ir dvigrandės RNR susidarymą. Matavimų serijoje, kurioje nsp12-nsp8-nsp7 kompleksas buvo patalpintas su helikaze nsp13 jau po 15 min. matomas gausus, elektriniame lauke lėčiau judančio, fragmento susidarymas. Tačiau po 45 min. matomas labai ryškus už RNR substratą sunkesnis oligonukleotidų darinys, tačiau nepaveikto RNR substrato srityje esantis fragmentas beveik visiškai nebesimato. Tai galėtų indikuoti labai sėkmingą polimerazinę reakciją, kuomet beveik visas viengrandės RNR substratui yra pratęsiama komplementari grandinė. Įdomu tai, kad į reakcijos mišinį įdėjus polimerazės komplekso ir neaktyvaus nsp13 su aktyviojo centro pakitimais (D374A/E375A), taip pat gaunamas beveik vien tik sunkesni oligonukleotidų fragmentai. Tai galėtų reikšti, kad nsp13 aktyvuoja nsp12 polimerazę ne dėl savo katalizinio aktyvumu, o dėl palankaus nsp12 išsilankstymo, atsirandančio dėl nsp13 ir nsp12-nsp8-nsp7 komplekso sąveikos.

## IŠVADOS

- 1) Tyrimo metu nustatyta, kad išgrynintos SARS-CoV-2 helikazės nsp13 ir polimerazės komplekso nsp12-nsp8-nsp7 sąveika reikšmingo skirtumo ATPaziam aktyvumui neturi.
- 2) Aktyviajame centre esantis aspartatas D374 ir glutamatas E375 lemia nsp13 ATPazinį aktyvumą, iš kurių reikšmingesnę įtaką nsp13 aktyvumo sumažėjimui turi aspartato pakeitimas.
- 3) Atlikus ATPazinio ir helikazinio nsp13 aktyvumų matavimus, ir įsitikinus, kad gautas aktyvus fermentas, atliktas nsp12-nsp8-nsp7 komplekso polimerazinio aktyvumo tyrimas ir nustatyta, kad sąveika su nsp13 ženkliai pagerina polimerazės aktyvumą.
- 4) Polimerazinis nsp12 aktyvumas pagerėja ir su pakeistas aktyviojo centro aminorūgštis (D374/ E375) turinčia helikaze nsp13

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Alexandersen, S.**, Chamings, A., & Bhatta, T. R. (2020). SARS-CoV-2 genomic and subgenomic RNAs in diagnostic samples are not an indicator of active replication. *Nature Communications*, 11(1).
- Astuti, I.**, & Ysrafil. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 14(4), 407–412.
- Awate, S.**, & Brosh, R. M. (2017). Interactive roles of DNA helicases and translocases with the single-stranded DNA binding protein RPA in nucleic acid metabolism. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 6). MDPI AG.
- Becker, R. A.**, & Hub, J. S. (2023). Continuous millisecond conformational cycle of a DEAH box helicase reveals control of domain motions by atomic-scale transitions. *Communications Biology*, 6(1).
- Burmer, G.**, & Pabuwal, V. (2020). *SARS-CoV-2 and COVID-19 Pathogenesis: A Review*.
- Byrd, A. K.**, & Raney, K. D. (2012). *Superfamily 2 helicases*.
- Cameron, C. E.**, Raney, K. D., & Götte, M. (2009). Viral genome replication. In *Viral Genome Replication*. Springer US.
- Cameron, C. E.**, Raney, K. D., & Götte, M. (2009). Viral genome replication. In *Viral Genome Replication*. Springer US.
- Cavasotto, C. N.**, Lamas, M. S., & Maggini, J. (2020). *Functional and druggability analysis of the SARS-CoV-2 proteome*.
- Chekol Abebe, E.**, & Dejenie, T. A. (2021). *Recent Advances on the Structure, Genomic Arrangement, Life Cycle, and Virus-Host Proteins Interactome of SARS CoV-2*.
- Chen, J.**, Malone, B., Llewellyn, E., Grasso, M., Shelton, P. M. M., Olinares, P. D. B., Maruthi, K., Eng, E. T., Vatandaslar, H., Chait, B. T., Kapoor, T. M., Darst, S. A., & Campbell, E. A. (2020). Structural Basis for Helicase-Polymerase Coupling in the SARS-CoV-2 Replication-Transcription Complex. *Cell*, 182(6).
- Corona, A.**, Wycisk, K., Talarico, C., Manelfi, C., Milia, J., Cannalire, R., Esposito, F., Gribbon, P., Zaliani, A., Iaconis, D., Beccari, A. R., Summa, V., Nowotny, M., & Tramontano, E. (2022). Natural Compounds Inhibit SARS-CoV-2 nsp13 Unwinding and ATPase Enzyme Activities. *ACS Pharmacology and Translational Science*, 5(4), 226–239.
- El Hassab, M. A.**, Eldehna, W. M., Al-Rashood, S. T., Alharbi, A., Eskandrani, R. O., Alkahtani, H. M., Elkaeed, E. B., & Abou-Seri, S. M. (2022). Multi-stage structure-based virtual screening approach towards identification of potential SARS-CoV-2 NSP13 helicase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37(1), 563–572.
- Focosi, D.**, & Maggi, F. (2022). Recombination in Coronaviruses, with a Focus on SARS-CoV-2. In *Viruses* (Vol. 14, Issue (6)).
- Frick, D. N.**, & Lam, A. M. I. (2006). Understanding Helicases as a Means of Virus Control. In *Current Pharmaceutical Design* (Vol. 12).

- Hao, W.**, Wojdyla, J. A., Zhao, R., Han, R., Das, R., Zlatev, I., Manoharan, M., Wang, M., & Cui, S. (2017). Crystal structure of Middle East respiratory syndrome coronavirus helicase. *PLoS Pathogens*, *13*(6).
- Hashemian, S. M. R.**, Pourhanifeh, M. H., Hamblin, M. R., Shahrzad, M. K., & Mirzaei, H. (2022). RdRp inhibitors and COVID-19: Is molnupiravir a good option? In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 146). Elsevier Masson s.r.l.
- Hillen, H. S.**, Kokic, G., Farnung, L., Dienemann, C., Tegunov, D., & Cramer, P. (2020). Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase. *Nature*, *584*(7819), 154–156.
- Jackson, C. B.**, Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 23, Issue 1, pp. 3–20). Nature Research.
- Jia, Z.**, Yan, L., Ren, Z., Wu, L., Wang, J., Guo, J., Zheng, L., Ming, Z., Zhang, L., Lou, Z., & Rao, Z. (2019). Delicate structural coordination of the Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus Nsp13 upon ATP hydrolysis. *Nucleic Acids Research*, *47*(12),
- Khan, M. M.**, Amin, Md. R., Mamun, A. Al, & Sajib, A. A. (2021). Development of Web Based Online Medicine Delivery System for COVID-19 Pandemic. *Journal of Software Engineering and Applications*, *14*(01), 26–43.
- Kwong, A. D.**, Rao, B. G., & Jeang, K. T. (2005). Viral and cellular RNA helicases as antiviral targets. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 4, Issue 10, pp. 845–853).
- Lehmann, K. C.**, Snijder, E. J., Posthuma, C. C., & Gorbalenya, A. E. (2015). What we know but do not understand about nidovirus helicases. *Virus Research*, *202*, 12–32.
- Leitão, A. L.**, Costa, M. C., & Enguita, F. J. (2015). Open access unzippers, resolvers and sensors: A structural and functional biochemistry tale of RNA helicases. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 16, Issue 2, pp. 2269–2293).
- Letko, M.**, Marzi, A., & Munster, V. (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nature Microbiology*, *5*(4), 562–569.
- Malik, Y. A.** (2020). *Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2*. Malaysian J Pathol 2020; *42*(1)
- Meir, A.**, & Greene, E. C. (2021). Srs2 and pif1 as model systems for understanding sf1a and sf1b helicase structure and function. In *Genes* (Vol. 12, Issue 9).
- Mishchenko, E. L.**, & Ivanisenko, V. A. (2022). Replication-transcription complex of coronaviruses: functions of individual viral non-structural subunits, properties and architecture of their complexes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*, *26*(2), 121–127.
- Nejat, R.**, Torshizi, M. F., & Najafi, D. J. (2023). S Protein, ACE2 and Host Cell Proteases in SARS-CoV-2 Cell Entry and Infectivity; Is Soluble ACE2 a Two Blade Sword? A Narrative Review. *Vaccines*, *11*(2), 204.
- Pal, M.**, Berhanu, G., Desalegn, C., & Kandi, V. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An Update. *Cureus*.

- Perez-Lemus, G. R.**, Menéndez, C. A., Alvarado, W., Byléhn, F., & de Pablo, J. J. (2022). Toward wide-spectrum antivirals against coronaviruses: Molecular characterization of SARS-CoV-2 NSP13 helicase inhibitors. In *Sci. Adv* (Vol. 8).
- Perry, J. K.**, Appleby, T. C., Bilello, J. P., Feng, J. Y., Schmitz, U., & Campbell, E. A. (2021). An atomistic model of the coronavirus replication/transcription complex as a hexamer assembled around nsp15. *Journal of Biological Chemistry*, 297(4).
- Porath, J.** (1988). High-performance immobilized-metal-ion affinity chromatography of peptides and proteins. *Journal of Chromatography A*, 443, 3–11.
- Raney, K. D.**, Byrd, A. K., & Aarattuthodiyil, S. (2013). Structure and mechanisms of SF1 DNA helicases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 767, 17–46.
- Raney, K. D.**, Byrd, A. K., & Aarattuthodiyil, S. (2013b). Structure and mechanisms of SF1 DNA helicases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 767, 17–46.
- Redondo, N.**, Zaldívar-López, S., Garrido, J. J., & Montoya, M. (2021). SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A.
- Romano, M.**, Ruggiero, A., Squeglia, F., Maga, G., & Berisio, R. (2020). A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. In *Cells* (Vol. 9, Issue 5). NLM (Medline).
- Seck, I.**, & Nguemo, F. (2021). Triazole, imidazole, and thiazole-based compounds as potential agents against coronavirus. In *Results in Chemistry* (Vol. 3). Elsevier B.V.
- Sommers, J. A.**, Loftus, L. N., Jones, M. P., Lee, R. A., Haren, C. E., Dumm, A. J., & Brosh, R. M. (2023). Biochemical analysis of SARS-CoV-2 Nsp13 helicase implicated in COVID-19 and factors that regulate its catalytic functions. *Journal of Biological Chemistry*, 299(3).
- Spratt, A. N.**, Gallazzi, F., Quinn, T. P., Lorson, C. L., Sönnnerborg, A., & Singh, K. (2021). Coronavirus helicases: attractive and unique targets of antiviral drug-development and therapeutic patents. In *Expert Opinion on Therapeutic Patents* (Vol. 31, Issue 4, pp. 339–350).
- Tanner, N. K.**, & Linder, P. (2001). Review DExD/H Box RNA Helicases: From Generic Motors to Specific Dissociation Functions. In *Molecular Cell* (Vol. 8).
- Tegally, H.**, Moir, M., Everatt, J., Giovanetti, M., Scheepers, C., Wilkinson, E., Subramoney, K., Makatini, Z., Moyo, S., Amoako, D. G., Baxter, C., Althaus, C. L., Anyaneji, U. J., Kekana, D., Viana, R., Giandhari, J., Lessells, R. J., Maponga, T., Maruapula, D., ... de Oliveira, T. (2022). Emergence of SARS-CoV-2 Omicron lineages BA.4 and BA.5 in South Africa. *Nature Medicine*, 28(9), 1785–1790.
- Trovato, M.**, Sartorius, R., D'Apice, L., Manco, R., & De Berardinis, P. (2020). Viral Emerging Diseases: Challenges in Developing Vaccination Strategies. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11).
- Ugurel, O. M.**, Mutlu, O., Sariyer, E., Kocer, S., Ugurel, E., Inci, T. G., Ata, O., & Turgut-Balik, D. (2020). Evaluation of the potency of FDA-approved drugs on wild type and mutant SARS-CoV-2 helicase (Nsp13). *International Journal of Biological Macromolecules*, 163.
- V'kovski, P.**, Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 19, Issue 3, pp. 155–170).



- Wong, N. A., & Saier, M. H.** (2021). The sars-coronavirus infection cycle: A survey of viral membrane proteins, their functional interactions and pathogenesis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 3, pp. 1–63).
- Yazdi, A. K., Pakarian, P., Perveen, S., Hajian, T., Santhakumar, V., Bolotokova, A., Li, F., & Vedadi, M.** (2022). Kinetic Characterization of SARS-CoV-2 nsp13 ATPase Activity and Discovery of Small-Molecule Inhibitors. *ACS Infectious Diseases*, 8(8), 1533–1542.
- Yue, K., Yao, B., Shi, Y., Yang, Y., Qian, Z., Ci, Y., & Shi, L.** (2022). The stalk domain of SARS-CoV-2 NSP13 is essential for its helicase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 601, 129–136.
- Zeng, J., Weissmann, F., Bertolin, A. P., Posse, V., Canal, B., Ulferts, R., Wu, M., Harvey, R., Hussain, S., Milligan, J. C., Roustan, C., Borg, A., McCoy, L., Drury, L. S., Kjaer, S., McCauley, J., Howell, M., Beale, R., & Diffley, J. F. X.** (2021). Identifying SARS-CoV-2 antiviral compounds by screening for small molecule inhibitors of nsp13 helicase. *Biochemical Journal*, 478(13), 2405–2423.

## SANTRAUKA

### VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

#### LAURYNAS VAITKUS

#### **SARS-COV-2 viruso helikazės nsp13 mechanistiniai tyrimai**

Milijonams žmonių visame pasaulyje vis dar diagnozuojama COVID-19 liga ir išliekantis mirtingumas rodo, kad itin svarbu kurti vaistus, galinčius veikti visas SARS-CoV-2 atmainas. Atsižvelgiant į nuolatinės viruso genomo mutacijas ir galimą pavojingesnių atmainų atsiradimą, konservatyvaus baltymo taikiny, nekintantis tarp skirtingų viruso atmainų, yra labai svarbus kovojant su tebesitęsiančia pasauline krize. Tokiu taikiniu galėtų būti vienas iš svarbiausių viruso replikacijoje dalyvaujančių fermentų – helikazė nsp13. Tyrinėdami SARS-CoV-2 viruso helikazės nsp13 mechanines savybes, siekėme įgyti gilesnį supratimą apie jos vaidmenį replikacijos komplekse. Atlikti SARS-CoV-2 helikazės nsp13 mechaninių savybių tyrimai suteikė vertingų įžvalgų apie šį svarbų virusinį fermentą ir jo vaidmenį replikacijos komplekse. Įgyvendinus užsibrėžtus tikslus, įskaitant sėkmingą nsp13 baltymo ekspresiją ir gryninimą, jo ATPazinio ir helikazini aktyvumo kokybinį įvertinimą ir jo poveikio polimerazės nsp12 aktyvumui tyrimą, gauta svarbių rezultatų. Mūsų tyrimas atskleidė, kad išgrynintos SARS-CoV-2 helikazės nsp13 ir polimerazės komplekso nsp12-nsp8-nsp7 sąveika neturi didelės įtakos ATPaziniam aktyvumui. Be to, pastebėta, kad nsp13 sąveika su nsp12-nsp8-nsp7 kompleksu gerokai padidina nsp12 polimerazinį aktyvumą. Įdomu, kad šis polimerazės aktyvumo pagerėjimas buvo pastebėtas net ir tada, kai nsp13 helikazės aktyviojo centro aminorūgštys (D374/E375) buvo pakeistos alaniniais.

## **SUMMARY SUMMARY**

**VILNIUS UNIVERSITY  
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES**

**LAURYNAS VAITKUS**

### **Mechanistic Studies of SARS-CoV-2 Virus Helicase Nsp13**

In the face of still ongoing COVID-19 diagnoses and mortality rates around the world, the development of drugs capable of targeting all SARS-CoV-2 strains is crucial, given the constant mutations and potential emergence of more dangerous virus variants. To address this, identifying a conserved protein target that remains unaffected by variation between different virus strains is essential. One such target is the helicase nsp13, a key enzyme involved in viral replication. By investigating the mechanical properties of SARS-CoV-2 helicase nsp13, our study aimed to deepen the understanding of its role within the replication complex. We successfully expressed and purified the nsp13 protein, qualitatively assessed its ATPase and helicase activity, and examined the impact of nsp13 on the polymerase nsp12 functionality. Notably, we observed that the interaction between purified nsp13 and the polymerase complex nsp12-nsp8-nsp7 did not significantly affect ATPase activity. However, this interaction significantly increased the polymerase activity of nsp12. Intriguingly, even when the active center amino acids of the nsp13 helicase (D374/E375) were replaced by alanines, the enhancement in polymerase activity was still observed.