

„Potencjalna strategia przeciw wirusowi SARS-CoV-2 oparta na zahamowaniu programowanej zmiany ramki odczytu podczas translacji genomu wirusa”

Projekt NCN finansowany z szybkiej ścieżki dostępu do funduszy na badania COVID-19, umowa nr UMO-2020/01/0/NZ1/00039, kierownik prof. dr hab. Joanna Kufel.

Głównym założeniem projektu było opracowanie systemu pozwalającego na badanie potencjalnych terapeutyków przeciw SARS-CoV-2, celujących w mechanizm zmiany ramki translacji wirusowego RNA oraz selekcja potencjalnych związków-kandydatów.

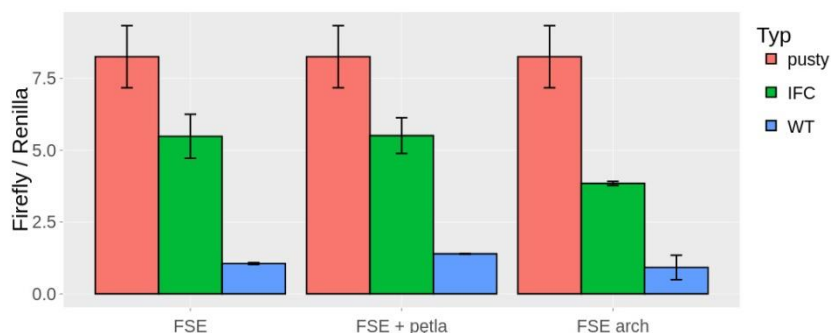
Najważniejsze osiągnięcia projektu.

- a. Opracowanie serii konstruktów genetycznych pozwalających na wyrażanie w dwóch różnych układach reporterowych RNA z różnymi wariantami elementu programowanej zmiany ramki odczytu translacji z wirusa SARS-CoV-2 (-1 PRF, ang. *-1 programmed ribosome frameshifting*). Pierwszy układ pozwala na integrowane z genomem konstruktów wyrażających sygnał -1 PRF wstawiony pomiędzy dwie sekwencje kodujące białka fluorescencji mRuby3 i mClover3. Drugi, dwulucyferazowy, pozwala na przejściową ekspresję konstruktów, w których element -1 PRF oflankowany jest sekwencjami kodującymi białka bioluminescencji Rluc i Fluc.
- b. Wyprowadzenie stabilnych linii komórkowych HELA i HEK-293 ze zintegrowanym z genomem fluorescencyjnym systemem dwureporterowym, niosącym dwa warianty sygnału -1 PRF: region minimalny niezbędny do programowanej zmiany ramki odczytu, tj. miejsce poślizgu i pseudowęzła (o dł. 118 nt), oraz region „FSE arch” – ok. 1500 nukleotydowy fragment genomu SARS-CoV-2 tworzący strukturę trzeciorzędową, w której zawarty jest region minimalny -1 PRF. Dodatkowo wyprowadzono linie zawierające konstrukty kontrolne zawierające identyczną strukturę pseudowęzła RNA ale ze zmutowanym tzw. miejscem poślizgu, co uniemożliwia zmianę ramki translacji, jak również pozbawione jakiegokolwiek wstawki, co pozwala na kontrolę zarówno względem teoretycznie 100% wydajności -1 PRF, jak i translacji przedwcześnie terminowanej (tj. bez udziału kodonu stop; ang. *abortive translation*), która jest zjawiskiem często pomijanym w badaniu -1 PRF. System ten umożliwia szybkie badanie wydajności -1 PRF na poziomie populacyjnym, bez potrzeby przeprowadzenia transfekcji przejściowej, czy długiego pasażowania komórek, co stanowi wygodną platformę do badania tego zjawiska.
- c. Uzyskano i przetestowano linie komórkowe wyrażające analogiczne konstrukty w systemie dwulucyferazowym, stanowiącym komplementarną metodę badania -1 PRF, co pozwoliło m. in. ustalić poziom translacji przedwcześnie terminowanej.
- d. Zaprojektowano i zsyntetyzowano szereg związków będącymi potencjalnymi inhibitorami -1 PRF. Cząsteczki chemiczne zaprojektowano na podstawie modelowania i dynamiki molekularnej pseudowęzła, przeprowadzonych z wykorzystaniem istniejących i publikowanych w czasie trwania projektu strukturach eksperymentalnych pseudowęzła.
- e. Otrzymano zaskakujący i znaczący wynik, że związek MTDB uważany dotychczas za potencjalny inhibitor -1 PRF, który był wykorzystany jako wyjściowy w naszych badaniach, wykazuje najprawdopodobniej jedynie właściwości cytotoksyczne i nie powinien być uważany za dobrego kandydata do dalszych badań.

Krótki opis uzyskanych wyników.

Testy lucyferazowe wykazały zbliżone wydajności -1 PRF pomiędzy minimalnym -1 PRF oraz fragmentem minimalnym z dodaną pętlą wzmacniającą (ang. *attenuator hairpin*; Ryc. 1). Zastosowanie pustego konstruktów (tj. bez struktury pseudowęzła pomiędzy reporterami) umożliwiło wskazanie poziomu translacji przedwcześnie terminowanej. Jest to o tyle istotne, że nie istnieje konsensus dotyczący kontroli, która powinna być używana w tego typu badaniach, najczęściej stosuje się dwa geny reporterowe kodowane bezpośrednio po sobie w tej samej ramce odczytu (Sun i wsp., 2021), lub geny reporterowe rozdzielone pseudowęzłem, ale z niefunkcjonalną sekwencją poślizgu, uniemożliwiającą przesunięcie ramki odczytu w czasie translacji (Bhatt i wsp., 2021). Dzięki zastosowaniu obu typów kontroli udało nam się ustalić poziom translacji przedwcześnie terminowanej, tj.

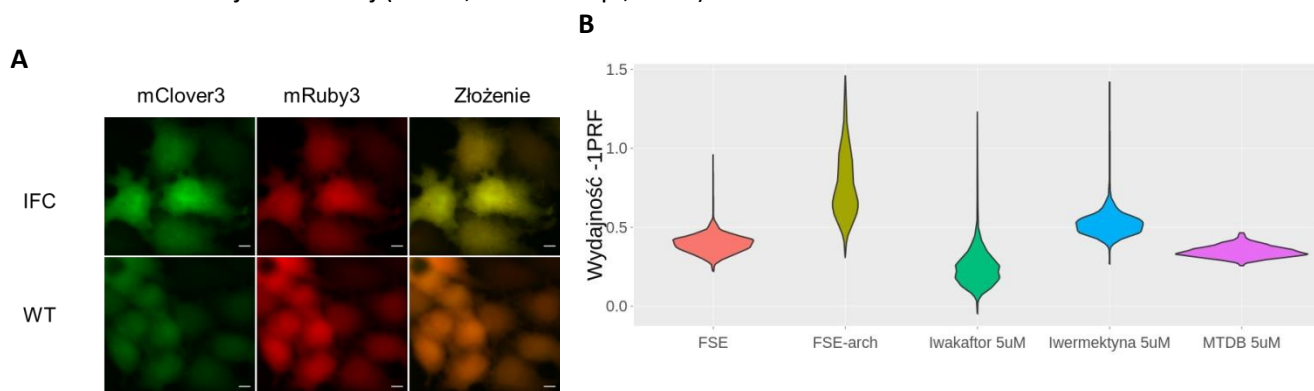
proporcję rybosomów dysocjujących od transkryptu na strukturze pseudowężła, i wynosi ona ok. 33% (Ryc. 1). Obserwacja ta może być istotna dla wyjaśnienia rozbieżności w różnych metodach badania wydajności -1 PRF lub inhibicji tego procesu.



Ryc. 1. Lucyferazowy, system dwureporterowy do badania zjawiska programowanej zmiany ramki translacji SARS-CoV-2. Zastosowanie dwóch kontroli (IFC i pustego plazmidu, niosącego wyłącznie geny reporterowe), umożliwia uchwycenie poziomu przedwczesnej terminacji translacji na strukturze pseudowężła.

Dodatkowo, po opublikowaniu interaktomu RNA-RNA przez grupę Erica Miski (Ziv i wsp., 2020), wskazującego na obecność pseudowężła indukującego -1 PRF wewnątrz rozległej struktury FSE-arch na którą składa się region ok. 1500 nt, zdecydowaliśmy się wprowadzić ten region do naszych systemów reporterowych, w celu zbadania wpływu struktury na wydajność -1 PRF i uwzględnieniu jej w testowaniu inhibitorów. Wydajność -1 PRF w konstrukcjach zawierających FSE-arch jest zbliżona do wydajności generowanej przez region minimalny, ale translacja przedwczesnie terminowana następuje znacznie częściej, wskazując na różnicę pomiędzy systemem reporterowym a translacją genomu wirusa *in vivo*, gdzie taki poziom translacji przedwczesnie terminowanej nie ma miejsca (Finkel i wsp., 2021).

Stabilne linie komórkowe wyrażające badane konstrukty -1 PRF w kontekście fluorescencyjnych białek reporterowych (Ryc. 2A) zostały najpierw przetestowane pod kątem zgodności wyników z systemem lucyferazowym. Wydajność -1 PRF w tym systemie jest wyższa niż w systemie dwulucyferazowym (~39 % w porównaniu do 25%; porównaj Ryc. 1 i Ryc. 2B), co w znacznie lepszym stopniu odzwierciedla zakres -1 PRF *in vivo* w trakcie infekcji wirusowej (~ 57%; Finkel i wsp., 2021).



Ryc. 2. Stabilny, fluorescencyjny system dwureporterowy do badania zjawiska programowanej zmiany ramki translacji SARS-CoV-2. **(A)** Komórki HeLa wyrażające konstrukty kontrolne (IFC) i minimalny region -1 PRF (WT). Obraz uzyskany na platformie mikroskopowej scanR po 24 godzinach od indukcji ekspresji. Komórki WT mają widocznie niższy udział zielonej fluorescencji, świadczącej o ekspresji drugiego genu reporterowego (mClover3). **(B)** Rozkład wydajności -1 PRF w konstrukcie zawierającym element minimalny FSE lub domenę FSE-Arch oraz wpływ potencjalnych inhibitorów -1 PRF na wyrażanie konstruktów z elementem FSE. Wydajność -1 PRF znormalizowano względem odpowiadającej kontroli IFC.

Co ciekawe, w systemie fluorescencyjnym konstrukty zawierające FSE-arch wykazują znacznie wyższy poziom -1 PRF (~70%, Ryc. 2B), niż wynika to z obserwacji na systemie lucyferazowym. Obserwacja ta jest zbliżona z poziomem -1 PRF *in vivo* i może wskazywać na istotny potencjał regulatorowy regionu FSE-arch, ale wyjaśnienie rozbieżności między dwoma systemami wymaga dalszych badań.

Zastosowanie stabilnych linii komórkowych wyrażających fluorescencyjne konstrukty reporterowe, zamiast komórek transfekowanych przejściowo wektorami niosącymi system dwulocyferazowy niesie za sobą szereg korzyści: a) umożliwienie obserwacji zjawiska na poziomie populacyjnym (tj. uzyskanie wyniku dla każdej komórki), a nie tylko w licząc z wielu komórek; b) zapewnienie obecności jednej kopii konstruktów w genomie, zamiast nieokreślonej liczby kopii plazmidu; c) uzyskanie platformy do szybkiego testowania potencjalnych inhibitorów, bez potrzeby każdorazowej transfekcji wektorem. Uzyskanie stabilnych linii komórkowych jest jednak procesem długotrwałym.

Uzyskane linie posłużyły do testowania potencjalnych inhibitorów zaprojektowanych w części *in silico* projektu. Część bioinformatyczna projektu realizowana była we współpracy z dr Dorotą Niedziałek z IBB PAN. Pierwszym etapem badań bioinformatycznych było zbudowanie wiarygodnego modelu pseudowężła w oparciu o dostępne eksperymentalne dane strukturalne. W miarę rozwoju projektu, publikowane były nowe dane na temat struktury pseudowężła, na podstawie których jego model był modyfikowany i uwierzytelniany. Kolejnym etapem było przeprowadzenie symulacji dynamiki molekularnej na otrzymanym modelu pseudowężła. Kilkuset nanosekundowa symulacja dynamiczna ewolucji pseudowężła pozwoliła wskazać jego fragmenty o potencjale terapeutycznym (tj. potencjalnie wiążącym inhibitor). Takie miejsca zidentyfikowano wewnątrz pętli pseudowężła oraz w miejscach oddziaływania ze sobą (styku) jego pętli. Te miejsca potencjalnego wiązania inhibitorów zostały więc wybrane do kolejnego etapu badań symulacyjnych, czyli projektowania cząsteczek inhibitorowych. W oparciu o strukturę związku MTDB (Ryc. 3), który według wcześniej opublikowanych danych (Park i wsp., 2011) miał destabilizować trójwymiarową strukturę pseudowężła, zaprojektowano serię jego kilkudziesięciu pochodnych. Związki te zostały następnie zadokowane *in silico* do zespołu struktur otrzymanych z symulacji dynamiki molekularnej pseudowężła (ang. *ensemble docking*). Związki, które na podstawie wyników dokowania wydawały się być najlepszymi destabilizatorami struktury pseudowężła, zostały następnie zsyntetyzowane w celu potwierdzenia ich wpływu na wydajność zmiany ramki odczytu w testach *in vitro*.

Część chemiczna projektu była realizowana we współpracy z dr hab. Adamem Mieczkowskim z IBB PAN. W ramach projektu został zsyntetyzowany wyjściowy, kontrolny związek MTDB, oraz jego nowe analogi, potencjalne inhibitory SARS-CoV-2. Analogi te różniły się od związku wyjściowego: a) centralnym pierścieniem heterocyklicznym b) sposobem przyłączenia grupy benzoesanowej do aminy (wiązanie mocznikowe lub tiomocznikowe); c) wiązaniem pierścienia heterocyklicznego do aminy (amina trzeciorzędowa lub wiązanie amidowe); d) terminalnym pierścieniem heterocyklicznym.

Uzyskane związki zostały następnie przetestowane przy użyciu stabilnych linii komórkowych (Ryc. 2B). Dla żadnego z nich, łącznie z wyjściowym MTDB, nie zaobserwowano istotnej zmiany wydajności -1 PRF, mierzonej względem kontroli IFC. Wynik ten jest niezgodny z danymi literaturowymi, które zostały opublikowane również dla SARS-CoV-2 (Kelly i wsp., 2020). W celu potwierdzenia tych wyników testy zostały powtórzone wielokrotnie, z tym samym rezultatem. Dzięki współpracy z grupami prof. Pavla Baranova i prof. Johna Atkinsa z University College Cork w Irlandii, którzy są ekspertami w tej dziedzinie, uzyskaliśmy informacje o bardzo zbliżonych obserwacjach dotyczących działania MTDB na wydajność -1 PRF. Wydaje się więc bardzo prawdopodobne, że związek MTDB nie hamuje -1 PRF, a za obserwowany efekt odpowiedzialna jest jego toksyczność, mylnie interpretowana przez autorów jako inhibicja -1 PRF na skutek braku zastosowania odpowiedniej kontroli IFC (tj. zawierającej pseudowężel). Potwierdzenie tych przypuszczeń wymagałoby dodatkowych badań, co może być zasadne, ponieważ związek MTDB wciąż bywa cytowany jako potencjalny środek terapeutyczny

W następnej części projektu skupiliśmy się na przetestowaniu innych potencjalnych inhibitorów, które mogą być punktem wyjścia do modyfikacji i zwiększenia ich potencjału zaburzającego wydajność -1 PRF. Wybraliśmy dwa związki: lek przeciwpasożytniczy iwermektynę (ang. *ivermectin*; Caly i wsp., 2020; Sun i wsp., 2021) oraz stosowany w leczeniu mukowiscydozy iwakaftor (ang. *ivacaftor*; Chen i wsp., 2020; Jan i wsp., 2021). Pierwszy z nich został scharakteryzowany jako wzmacniacz, a drugi inhibitor -1 PRF. Testy przy zastosowaniu naszego systemu potwierdziły te doniesienia (Ryc. 2B). Następnym krokiem będzie modelowanie i synteza związków pochodnych, które mogą charakteryzować się większym powinowactwem wobec pseudowężła SARS-CoV-2.

Podsumowanie

Opublikowanie uzyskanych już przez nas wyników dostarczy systemu przydatnego w badaniach nad biologią wirusa SARS-CoV-2. Jego ważną zaletą, odróżniającą ten system od analogicznych opracowanych do tej pory w innych laboratoriach, jest zastosowanie układu w którym konstrukty reporterowe zintegrowano trwale z genomem. Umożliwia to uniknięcie niestabilnych transfekcji przejściowych, co przyspieszy procedury laboratoryjne i pozwoli na przeprowadzanie powtarzalnych pomiarów, których wyniki będą porównywalne między różnymi seriami doświadczalnymi. Dodatkowo wykazaliśmy, że związek MTDB dotychczas traktowany jako potencjalny lek, najprawdopodobniej jest jedynie związkiem o ogólnie wysokiej cytotoksyczności. Informacja ta może pomóc zaoszczędzić czas i środki innych grup badawczych, stymulując badania w kierunku bardziej obiecujących związków chemicznych.

Literatura

- Bhatt PR, Scaiola A, Loughran G, Leibundgut M, Kratzel A, Meurs R, Dreos R, O'Connor KM, McMillan A, Bode JW, Thiel V, Gatfield D, Atkins JF, Ban N. Structural basis of ribosomal frameshifting during translation of the SARS-CoV-2 RNA genome. *Science*. 2021 Jun 18;372(6548):1306-1313. doi: 10.1126/science.abf3546.
- Caly L, Druce JD, Catton MG, Jans DA, Wagstaff KM. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Res*. 2020 Jun;178:104787. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104787.
- Chen Y, Tao H, Shen S, Miao Z, Li L, Jia Y, Zhang H, Bai X, Fu X. A drug screening toolkit based on the -1 ribosomal frameshifting of SARS-CoV-2. *Heliyon*. 2020 Aug;6(8):e04793. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04793.
- Finkel Y, Mizrahi O, Nachshon A, Weingarten-Gabbay S, Morgenstern D, Yahalom-Ronen Y, Tamir H, Achdout H, Stein D, Israeli O, Beth-Din A, Melamed S, Weiss S, Israely T, Paran N, Schwartz M, Stern-Ginossar N. The coding capacity of SARS-CoV-2. *Nature*. 2021 Jan;589(7840):125-130. doi: 10.1038/s41586-020-2739-1.
- Jan JT, Cheng TR, Juang YP, Ma HH, Wu YT, Yang WB, Cheng CW, Chen X, Chou TH, Shie JJ, Cheng WC, Chein RJ, Mao SS, Liang PH, Ma C, Hung SC, Wong CH. Identification of existing pharmaceuticals and herbal medicines as inhibitors of SARS-CoV-2 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Feb 2;118(5):e2021579118. doi: 10.1073/pnas.2021579118.
- Kelly JA, Olson AN, Neupane K, Munshi S, San Emeterio J, Pollack L, Woodside MT, Dinman JD. Structural and functional conservation of the programmed -1 ribosomal frameshift signal of SARS coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *J Biol Chem*. 2020 Jul 31;295(31):10741-10748. doi: 10.1074/jbc.AC120.013449.
- Park SJ, Kim YG, Park HJ. Identification of RNA pseudoknot-binding ligand that inhibits the -1 ribosomal frameshifting of SARS-coronavirus by structure-based virtual screening. *J Am Chem Soc*. 2011 Jul 6;133(26):10094-100. doi: 10.1021/ja1098325.
- Sun Y, Abriola L, Niederer RO, Pedersen SF, Alfajaro MM, Silva Monteiro V, Wilen CB, Ho YC, Gilbert WV, Surovtseva YV, Lindenbach BD, Guo JU. Restriction of SARS-CoV-2 replication by targeting programmed -1 ribosomal frameshifting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Jun 29;118(26):e2023051118. doi: 10.1073/pnas.2023051118.
- Ziv O, Price J, Shalamova L, Kamenova T, Goodfellow I, Weber F, Miska EA. The Short- and Long-Range RNA-RNA Interactome of SARS-CoV-2. *Mol Cell*. 2020 Dec 17;80(6):1067-1077.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2020.11.004.