

**Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования  
«Сколковский институт науки и технологий»**

На правах рукописи

Соколинская Елена Леонидовна

**Визуализация локализации и активности индивидуальных белков  
коронавируса SARS-CoV-2 в культурах клеток человека**

специальность 1.5.3 Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Лукьянов Константин Анатольевич

Москва – 2024

## Оглавление

Список сокращений .....	4
<b>1. Введение .....</b>	<b>6</b>
1.1 Цель исследования.....	6
1.2 Задачи исследования .....	6
1.3 Актуальность исследования .....	7
1.4 Научная новизна и практическая значимость исследования .....	7
1.5 Публикации и апробация работы .....	9
<b>2. Обзор литературы .....</b>	<b>10</b>
2.1 SARS-CoV-2: жизненный цикл вируса, значение протеаз .....	10
2.1.1 Пандемия COVID-19 .....	10
2.1.2 Жизненный цикл SARS-CoV-2.....	12
2.1.3 Структурные белки и протеазы SARS-CoV-2.....	18
2.1.3.1 S-белок.....	18
2.1.3.2 N-белок.....	21
2.1.3.3 E-белок .....	22
2.1.3.4 M-белок .....	25
2.1.3.5 Моделирование структуры вириона SARS-CoV-2 и олигомеризация M-белка .....	27
2.1.3.6 Главная протеаза Mpro.....	29
2.1.3.7 Папаин-подобная протеаза PLpro.....	30
2.1.4 Противовирусная терапия и ингибиторы SARS-CoV-2 .....	33
2.2 Генетически кодируемые сенсоры: принцип работы и преимущества .....	39
2.2.1 Транслокационные биосенсоры.....	42
2.2.2 FRET-сенсоры .....	44
2.2.3 Биосенсоры на основе одного флуоресцентного белка .....	46
2.2.4 Биосенсоры на основе флуоресцентной комплементации.....	48
2.2.5 Биосенсоры на основе димеризации .....	50
2.3 Генетически кодируемые сенсоры на протеазы .....	52
<b>3. Материалы и методы .....</b>	<b>60</b>
3.1 Молекулярно-генетические методы.....	60
3.1.1 Амплификация последовательностей ДНК.....	60
3.1.2 Сборка генно-инженерных конструкций по системе MoClo.....	60
3.1.3 Гель-электрофорез .....	63
3.1.4 Рестрикция.....	63
3.1.5 Лигирование .....	63

3.1.6	Очистка ДНК из агарозного геля и реакционных смесей .....	63
3.1.7	Трансформация компетентных клеток <i>E. Coli</i> .....	64
3.1.8	Выделение плазмидной ДНК из культуры клеток <i>E. coli</i> .....	64
3.1.9	Секвенирование ДНК .....	64
3.2	Методы работы с культурами эукариотических клеток.....	65
3.2.1	Приготовление сред .....	65
3.2.2	Ведение культуры эукариотических клеток .....	65
3.2.3	Трансфекция эукариотических клеток .....	65
3.2.4	Лентивирусная трансдукция эукариотических клеток .....	66
3.2.5	Иммуноцитохимическое окрашивание .....	66
3.2.6	Инфицирование SARS-CoV-2 .....	67
3.3	Флуоресцентная микроскопия .....	68
3.3.1	Широкопольная флуоресцентная микроскопия .....	68
3.3.2	Конфокальная микроскопия .....	68
3.3.3	Обработка изображений и статистический анализ.....	68
4.	Результаты и обсуждение .....	70
4.1	Изучение олигомеризационных свойств М-белка SARS-CoV-2.....	71
4.1.1	Экспрессия М-белка SARS-CoV-2 в клетках линии HEK293T .....	71
4.1.2	Экспрессия М-белка SARS-CoV-2 в клетках линии HeLa .....	75
4.2	Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры для изучения активности папаин-подобной протеазы PLpro SARS-CoV-2 в живых клетках .....	85
4.2.1	Генетически кодируемый красный FRET-сенсор для изучения активности растворимой PLpro .....	86
4.2.2	Генетически кодируемые транслокационные сенсоры для изучения активности мембран-ассоциированной PLpro.....	90
4.2.2.1	PLpro-sensor-TA.....	92
4.2.2.2	PLpro-sensor-Plus.....	94
4.2.2.3	PLpro-ERNuc.....	97
5.	Заключение .....	104
6.	Выводы .....	107
	Список литературы.....	108

## Список сокращений

- ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2
- BFP – синий флуоресцентный белок
- BSL – уровень биологической безопасности
- CFP – циановый флуоресцентный белок
- CMV – цитомегаловирус
- CTD – С-концевой домен
- DMEM – модифицированная среда Игла Дульбекко
- DMSO – диметилсульфоксид
- DMV – двумембранные везикулы
- EGFP – улучшенный зеленый флуоресцентный белок
- EMTB – связывающий микротрубочки домен белка энконсина
- ER – эндоплазматическая сеть/эндоплазматический ретикулум
- ERGIC – промежуточный компартмент эндоплазматической сети и комплекса Гольджи
- FRET – Ферстеровский резонансный перенос энергии
- GFP – зеленый флуоресцентный белок
- gRNA – геномная РНК
- iRFP – инфракрасный флуоресцентный белок
- LB – среда Лурия-Бертани
- MoClo – модульное клонирование
- mRNA – матричная РНК
- NES – сигнал ядерного экспорта
- NLS – сигнал ядерной локализации
- nsp – неструктурный белок
- NTD – N-концевой домен
- ORF – открытая рамка считывания
- PBS – фосфатно-солевой буфер
- RBD – рецептор-связывающий домен
- RBM – рецептор-связывающий мотив
- RdRp – РНК-зависимая РНК-полимераза
- RFP – красный флуоресцентный белок
- RTC – комплекс репликации и транскрипции
- sgRNA – субгеномная РНК
- SOB – супер-оптимальная среда

SV40 – полиомавирус SV40

ТАЕ – трис-ацетатный буфер

TRS – регуляторные последовательности транскрипции

YFP – желтый флуоресцентный белок

ГКС – генетически кодируемый сенсор

дцРНК – двухцепочечная РНК

мРНК – матричная РНК

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов

ФАД – флавинадениндинуклеотид

ЭПР – эндоплазматическая сеть/ эндоплазматический ретикулум

## 1. Введение

Синтез и созревание белков коронавируса внутри клетки хозяина является многостадийным процессом, сложно организованным в пространстве и времени. Этот процесс нуждается в детальном изучении, особенно для новых опасных для человека вирусов, таких как SARS-CoV-2. Высокая патогенность SARS-CoV-2 вынуждает большинство лабораторий отказаться от прямого изучения поведения функционального вируса. Следовательно, актуальными являются безопасные системы, позволяющие моделировать отдельные аспекты функционирования вируса. Флуоресцентная микроскопия позволяет получать данные в высоком разрешении (как в пространстве, так и во времени), поэтому является перспективным инструментом изучения молекулярных механизмов на уровне единичных живых клеток. Настоящая работа направлена на разработку методов для изучения отдельных белков SARS-CoV-2 в безопасных клеточных модельных системах с использованием флуоресцентной микроскопии. Разработанные подходы в дальнейшем могут быть использованы для высокопроизводительного скрининга потенциальных веществ-ингибиторов SARS-CoV-2. В качестве целевых вирусных белков были выбраны структурный белок SARS-CoV-2 – М-белок, являющийся наиболее представленным белком вирусной оболочки и принимающий участие в сборке вириона, а также папаин-подобная протеаза PLpro, выполняющая ключевые функции при репликации вируса и подавлении иммунитета клетки-хозяина.

### 1.1 Цель исследования

Целью данной работы является разработка методов изучения белков SARS-CoV-2 с использованием флуоресцентной микроскопии безопасных модельных клеточных систем, с перспективой применения разработанных подходов для высокопроизводительного скрининга противовирусных препаратов.

### 1.2 Задачи исследования

В рамках вышеуказанной цели исследования были сформулированы следующие задачи:

1. Исследование внутриклеточной локализации структурного белка М коронавируса SARS-CoV-2 с помощью методов флуоресцентной микроскопии клеток человека, экспрессирующих ген М-белка.
2. Создание генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров для детекции активности вирусной протеазы PLpro в живых культивируемых клетках человека в режиме реального времени на основе двух различных принципов детекции: Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET) и транслокации сигнала внутри клетки.

### **1.3 Актуальность исследования**

Вирус SARS-CoV-2, выявленный в китайском городе Ухань в декабре 2019 г., вызывал тяжелую острую респираторную инфекцию COVID-19, ставшую причиной глобальной пандемии в истории человечества. С момента начала пандемии в 2020 году, тяжесть коронавирусной инфекции и смертность от нее значительно снизились благодаря созданию эффективных вакцин, разработке новых протоколов лечения и развитию массового иммунитета. Однако в результате постоянно возникающих мутаций SARS-CoV-2 эффективность существующих вакцин снижается. В связи с этим, более актуальным становится применение препаратов, которые оказывают ингибирующее влияние на звенья патологического процесса инфекции, например, на взаимодействие вирусных частиц с рецепторами и размножение вируса в клетках. По этой причине высоко необходимым становится проведение исследований по созданию новых таргетных веществ, инактивирующих SARS-CoV-2, а также тестирование и перепрофилирование уже известных препаратов, способных подавлять транспорт вирусных частиц в клетки и нейтрализовать провоспалительное действие коронавируса на организм пациента. Несмотря на прогресс в понимании патогенеза COVID-19, факторы, определяющие предрасположенность к тяжелой форме заболевания, также остаются неясными. В связи с этим необходима дальнейшая работа по выявлению показателей терапии и генетических факторов, которые могут служить прогностическими признаками развития тяжелой формы COVID-19. Также стоит отметить, что после окончания пиковой фазы пандемии акцент в борьбе с COVID-19 сместился в сторону преодоления последствий этого заболевания, к которым относятся скелетно-мышечная, пищеварительная и неврологическая симптоматика, детский мультисистемный воспалительный синдром, а также нарушения систем свертывания и микроциркуляции крови.

Все вышеперечисленное говорит о том, что на данный момент высокую необходимость представляет разработка безопасных клеточных моделей для изучения свойств отдельных белков SARS-CoV-2, а также применение этих систем в качестве платформ для высокопроизводительного скрининга новых или уже существующих противовирусных препаратов.

### **1.4 Научная новизна и практическая значимость исследования**

Пандемия коронавируса COVID-19 в 2020–2021 годах значительно изменила практически все сферы человеческой деятельности, в связи с чем ключевая роль фундаментальных исследований вирусов животных и человека стала еще более очевидна. Детальное понимание всех этапов взаимодействия вируса с клеткой и его влияние на иммунную систему человека необходимы для создания прочной основы для разработки достоверно эффективных диагностических средств, вакцин и лекарств. Однако существующие возможности изучения

опасных для жизни зоонозных коронавирусных инфекций существенно ограничены. Одним из доступных методов для решения данной задачи является флуоресцентная микроскопия – относительно простая и надежная технология, которая широко используется практически во всех областях биологии, включая вирусологию. В числе преимуществ флуоресцентной микроскопии стоит отметить чрезвычайно высокую чувствительность метода (вплоть до детекции отдельных молекул), а также его специфичность, которая обеспечивается путем использования флуоресцентно меченных антител или генетически кодируемых меток. Еще одним ключевым преимуществом флуоресцентной микроскопии является возможность работы с живыми клетками, что позволяет изучать динамику клеточных структур и процессов в реальном времени. Флуоресцентная микроскопия не раз использовалась для исследования вирусов и их взаимодействия в клеточных системах [1–5], в том числе для описания важнейших закономерности жизненного цикла коронавирусов [6–9].

В данной работе при помощи методов флуоресцентной микроскопии при экспрессии нативного М-белка в клетках человека было обнаружено формирование необычных структур, вероятно, свидетельствующих о ранее неизвестной тенденции М-белка к образованию межмембранных олигомеров. В клетках линии HEK293T олигомеризация белка проявлялась в виде так называемых OSER-структур, в то время как в клетках линии HeLa олигомеризация белка приводила к появлению филаментоподобных структур. Полученная экспериментальная модель может быть использована для оценки влияния замен на олигомеризацию М-белка в клетках человека, а также служить основой для безопасного высокопроизводительного скрининга веществ, ингибирующих такую олигомеризацию.

Другая группа подходов с использованием флуоресцентной микроскопии в рамках борьбы с вирусом представляет из себя разработку репортерных систем, оптимизированных для детекции активности SARS-CoV-2, например, путем обнаружения специфических вирусных протеаз [10–12].

В данной работе был разработан первый генетически кодируемый FRET-сенсор активности протеазы PLpro вируса SARS-CoV-2. По сравнению с ранее опубликованным биосенсором на основе FlipGFP [11], данный биосенсор обладает рядом преимуществ, среди которых ратиометрический ответ и использование красной области спектра для снижения фототоксичности наблюдения.

Также в рамках текущего исследования был разработан первый транслокационный биосенсор для мониторинга активности протеазы PLpro в живых клетках. Среди преимуществ полученного биосенсора стоит отметить внутриклеточную локализацию и белковый контекст, имитирующие естественную мишень PLpro, высокий динамический диапазон и легкость использования конструктора в лабораторных условиях. На основе полученного биосенсоров была



разработана клеточная система для перспективного применения в качестве платформы для высокопроизводительного скрининга ингибиторов PLpro.

### 1.5 Публикации и апробация работы

#### Список публикаций

1. **E. L. Sokolinskaya**, L. V. Putlyayeva, V. S. Polinovskaya, K. A. Lukyanov. Genetically Encoded Fluorescent Sensors for SARS-CoV-2 Papain-like Protease PLpro. // International Journal of Molecular Sciences. 2022. V. 23. № 14. P. 7826.
2. **E. L. Sokolinskaya**, L. V. Putlyayeva, A. A. Gorshkova, K. A. Lukyanov. Intermembrane oligomerization of SARS-CoV-2 M-protein: possible role in viral budding. // Bulletin of Russian State Medical University. 2022. № 3. P. 38–41.
3. **E. L. Sokolinskaya**, O. N. Ivanova, I. T. Fedyakina, A. V. Ivanov, and K. A. Lukyanov. Natural-Target-Mimicking Translocation-Based Fluorescent Sensor for Detection of SARS-CoV-2 PLpro Protease Activity and Virus Infection in Living Cells. // International Journal of Molecular Sciences. 2024. V. 25. № 12. P. 6635.

#### Тезисы научных докладов

1. **E. L. Sokolinskaya**, L. V. Putlyayeva, A. A. Gorshkova, K. A. Lukyanov. Tracking SARS-CoV-2 membrane proteins and measuring papain-like protease activity using live cell fluorescence microscopy. Focus on Microscopy (2022).
2. **E. L. Sokolinskaya**, L. V. Putlyayeva and K. A. Lukyanov. Genetically encoded fluorescent probes for imaging of intra-cellular localization and activity of SARS- CoV-2 proteins. The 2nd International Electronic Conference on Biomolecules: Biomacromolecules and the Modern World Challenges (2022).

## 2. Обзор литературы

### 2.1 SARS-CoV-2: жизненный цикл вируса, значение протеаз

#### 2.1.1 Пандемия COVID-19

COVID-19 (COronaVIrus Disease 2019) – коронавирусная инфекция 2019 года – острая респираторная инфекция, вызываемая коронавирусом SARS-CoV-2, повлекшая колоссальные социально-экономические последствия для человечества и ставшая причиной пандемии, охватившей мир в 2020 году. Первая вспышка заболевания была зафиксирована в декабре 2019 года. Среди симптомов у инфицированных вирусной пневмонией пациентов наблюдались лихорадка, кашель и дискомфорт в груди, в тяжелых случаях - одышка и двусторонняя легочная инфильтрация. Высокая вирулентность SARS-CoV-2 и обилие международных перемещений людей, включая туризм, способствовали быстрому распространению COVID-19 по всему миру [13]. Ввиду стремительного распространения вируса 30 января 2020 года Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила чрезвычайную ситуацию в сфере здравоохранения, после чего 11 марта была официально объявлена пандемия.

Пандемия COVID-19 считается одной из самых смертоносных в истории человечества. По состоянию на 21 января 2024 года, согласно данным ВОЗ, число зарегистрированных случаев заболевания COVID-19 в мире составляет более 774 миллионов, в числе которых насчитывается более 7 миллионов смертельных исходов [14]. По состоянию на 26 ноября 2023 года было введено 13,59 миллиардов доз вакцины [14]. Наибольшее число случаев заболеваемости COVID-19 за все время пандемии было зарегистрировано в США и Китае (порядка 100 миллионов случаев) [14]. По состоянию на 26 ноября 2023 года число официально зарегистрированных случаев заражения в Российской Федерации составляет более 23,77 миллионов [14].

В связи со снижением смертности и числа госпитализаций пациентов с COVID-19, а также ввиду высокого иммунитета к SARS-CoV-2 в популяции, 5 мая 2023 года ВОЗ официально сняла с пандемии COVID-19 статус глобальной чрезвычайной ситуации, однако подчеркнула, что пандемия еще не закончилась. Вспышки заболевания до сих пор наблюдаются на Ближнем Востоке и в Юго-Восточной Азии.

В связи с тяжестью и опасностью последствий эпидемии, особый интерес для научного и светского общества представляют причины появления SARS-CoV-2 в человеческой популяции. На данный момент приоритет имеют две конкурирующие версии – распространение вируса в популяции в связи с утечкой из научных лабораторий и зоонозный путь передачи [15]. Версия лабораторной утечки вируса имеет слабую аргументацию – в настоящее время нет доказательств того, что какие-либо ранние случаи заражения SARS-CoV-2 имели связь с WIV (Wuhan Institute of Virology, Уханьский институт вирусологии), в отличие от четких эпидемиологических связей с

рынками животных в Ухане. Также нет и доказательств того, что WIV обладал и разрабатывал предшественник SARS-CoV-2 до пандемии [15].

На недавних слушаниях в Конгрессе США, прошедших 3 июня 2024 года, доктор Энтони Фаучи, ведущий американский эксперт по инфекционным заболеваниям и бывший советник правительства США по вопросам COVID-19, опроверг утверждения представителей Республиканской партии о своих попытках скрыть происхождение вируса [16]. Одной из причин обвинения послужили гранты, которые Национальный институт аллергии и инфекционных заболеваний (NIAID), возглавляемый Фаучи, в течение нескольких лет предоставлял американской некоммерческой организации EcoHealth Alliance, которая занималась исследованиями потенциально опасных коронавирусов еще до начала пандемии. В том числе часть исследовательской работы, подкрепленная финансированием США, была проделана в Уханьском институте вирусологии (WIV) в китайской лаборатории, изучающей переносимые летучими мышами коронавирусы [16]. Представители Республиканской партии провели большое расследование, но так и не смогли найти какие-либо доказательства, связывающие Фаучи с потенциально опасными исследованиями в Ухане.

В то же время, все ранее известные коронавирусные инфекции, поражавшие человека, имеют зоонозное происхождение, как и подавляющее большинство человеческих вирусов. В 2002 и 2012 годах были зафиксированы вспышки двух высоко патогенных коронавирусов зоонозного происхождения – SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome coronavirus) и MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome coronavirus), соответственно. Оба случая появления SARS-CoV были ассоциированы с торговлей животными, восприимчивыми к SARS-CoV-2. Ближайшими известными родственными SARS-CoV и SARS-CoV-2 вирусами являются вирусы летучих мышей провинции Юньнань (КНР) [17]. В течение 2019 года на рынках Уханя продавались многие тысячи живых диких животных, включая виды с высоким уровнем риска восприимчивости к SARS-CoV-2, такие как циветы и енотовидные собаки [18]. Таким образом, версия появления вируса в человеческой популяции в результате контакта с инфицированными дикими животными, подкрепленная значительным объемом научных данных, является превалирующей.

Поскольку вирус продолжает активно эволюционировать, с момента начала пандемии было идентифицировано несколько вариантов SARS-CoV-2, некоторые из которых классифицируются органами здравоохранения как VOC (variant of concern). Среди VOC выделяют такие варианты SARS-CoV-2, как Alpha, Beta, Gamma, Delta, Omicron [19]. Эти варианты демонстрируют выраженную генетическую вариабельность по сравнению с предковым штаммом SARS-CoV-2. Подобная вариабельность повышает вирулентность (то есть увеличивает скорость передачи вируса и/или повышает риск повторного заражения), а также помогает преодолевать защитные механизмы хозяина, такие как нейтрализующие моноклональные

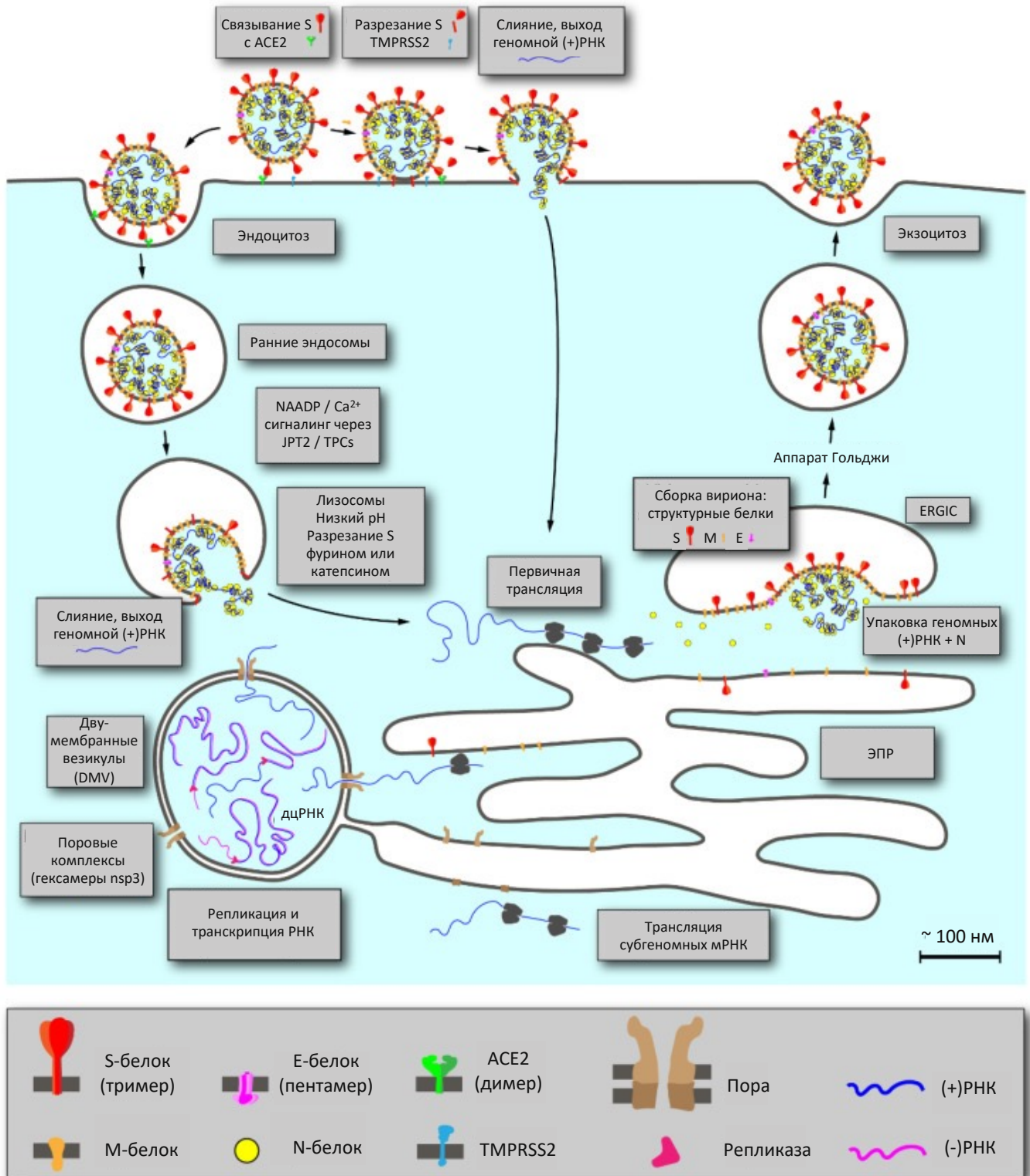
антитела и вакцинация [20]. Основная часть мутаций в VOC локализована в S-белке, который отвечает за распознавание и инфицирование клетки-хозяина. Однако в некоторых VOC точечные мутации были обнаружены и в других белках, например, в протеазах M<sub>pro</sub> и PL<sub>pro</sub> [21,22].

Патогенез инфекции SARS-CoV-2 у человека проявляется от легких симптомов до тяжелой дыхательной недостаточности. При связывании с эпителиальными клетками в дыхательных путях вирус начинает реплицироваться и мигрирует в дыхательные пути, проникая в альвеолярные эпителиальные клетки легких. Активная репликация SARS-CoV-2 в легких может вызвать сильный иммунный ответ. Возникающий при этом цитокиновый шторм (гиперцитокинемия) вызывает острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) и дыхательную недостаточность, которые считаются основными причинами смерти пациентов с COVID-19 [23]. Пациенты пожилого возраста (старше 60 лет), а также пациенты с существующими серьезными заболеваниями имеют больший риск развития ОРДС и летального исхода. В некоторых случаях COVID-19 у пациентов также была зафиксирована полиорганная недостаточность [24].

### 2.1.2 Жизненный цикл SARS-CoV-2

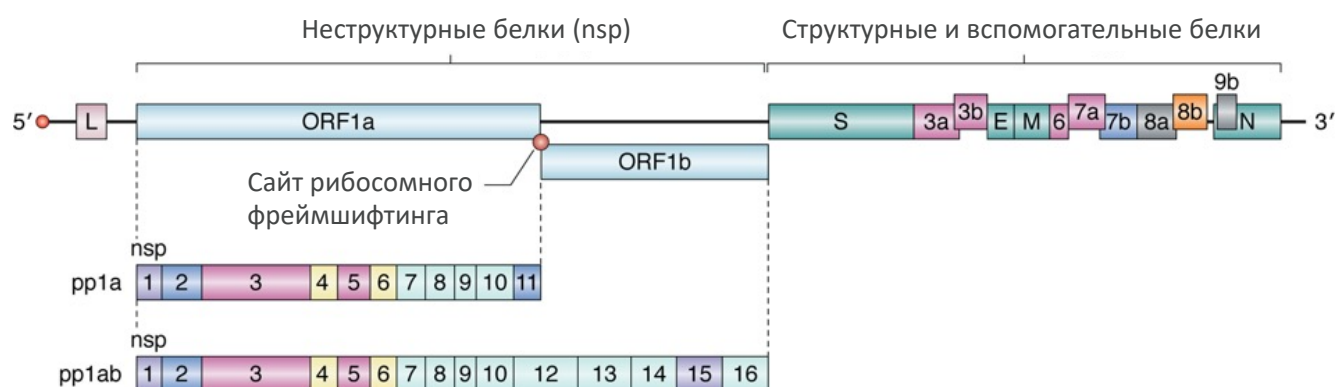
Схематическое описание жизненного цикла SARS-CoV-2 приведено на рисунке 1. Для попадания в клетку SARS-CoV-2, аналогично SARS-CoV, в качестве рецептора использует ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2, angiotensin-converting enzyme 2). ACE2 представляет собой пептидазу, расположенную на поверхности клетки, которая гидролизует ангиотензин II. ACE2 экспрессируется в большинстве органов; особенно высокая экспрессия фермента была отмечена в эпителии легких и тонкой кишки [25]. Помимо человеческого ACE2 (hACE2, human ACE2), вирус также узнает ACE2 свиней, хорьков, макак-резус, цивет, панголинов, кроликов, кошек и собак [26].

SARS-CoV-2 представляет собой оболочечный одноцепочечный (+)РНК-вирус, относящийся к роду *Betacoronavirus* (бетакоронавирусы). Геном вируса на 79% идентичен SARS-CoV и на 50% MERS-CoV [27]. Коронавирусы имеют один из самых больших геномов среди известных РНК-вирусов (его длина составляет от 27 до 32 т.п.н., что более чем в два раза превышает длину генома обычного РНК-вируса), который кодирует порядка 22–29 белков [28]. Эукариотическая трансляция, которую вынужден использовать вирус в своем жизненном цикле, создает определенные ограничения для синтеза такого большого количества белков с одной РНК-матрицы, так как эукариотические рибосомы обычно позволяют транслировать лишь один белок с молекулы мРНК. Эту проблему коронавирусы решают за счет использования больших мультибелковых молекул – полипротеинов, которые впоследствии процессируются в отдельные белки, а также за счет синтеза субгеномных мРНК с использованием необычного механизма транскрипции на основе регуляторных последовательностей [28].



**Рисунок 1.** Схематическое изображение жизненного цикла SARS-CoV-2. Белки и мембранные структуры показаны в масштабе. В графической легенде элементы увеличены в 4 раза. Адаптировано из [29].

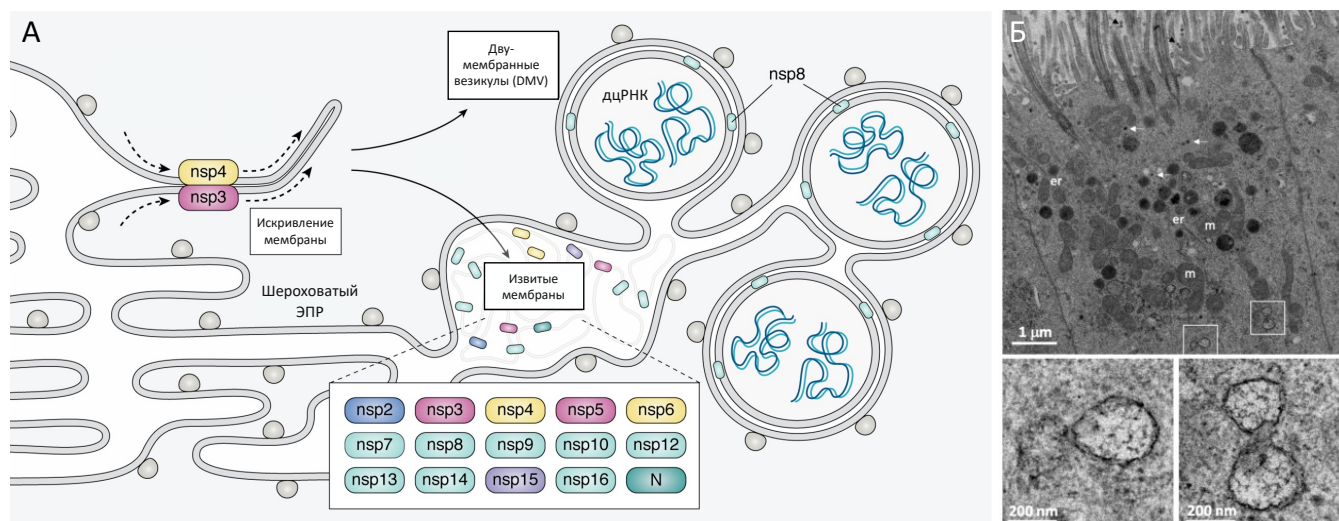
Строение генома SARS-CoV-2 аналогично другим представителям рода бетакоронавирусов. Геном вируса состоит из 14 открытых рамок считывания (ORF), включая две некодирующие области на 5'- и 3'-концах, и несколько областей, кодирующих неструктурные белки (nsp, non-structural proteins), вспомогательные белки и структурные белки [27] (Рисунок 2). Две основные открытые рамки считывания ORF1a и ORF1b охватывают первые две трети вирусного генома и кодируют 16 неструктурных белков (nsp1–nsp16), которые необходимы для синтеза вирусной РНК. ORF1a/b транслируется с 5'-кэпированного РНК-генома путем кэп-зависимой трансляции с образованием более короткого полипротеина pp1a (~440–500 кДа, включает nsp 1–11) или более длинного полипротеина pp1ab (~740–810 кДа, включает nsp 1–16). Результат трансляции определяется -1 рибосомальным фреймшифтингом в зависимости от того, распознается или пропускается стоп-кодон на конце ORF1a. Обход стоп-кодона ORF1a происходит с 20–50% эффективностью, в результате чего синтезируется более крупный полипротеин pp1ab [28]. Nsp1–11 синтезируются с ORF1a в составе pp1a и выполняют широкий спектр функций – от блокировки начального иммунного ответа до функционирования в качестве кофакторов белков репликации и транскрипции. Основные компоненты механизма репликации и транскрипции, такие как РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp), хеликаза и другие РНК-модифицирующие ферменты, синтезируются с ORF1b в составе pp1ab. Подобная стратегия трансляционного контроля на основе сдвига рамки помогает вирусу поддерживать стехиометрию белков pp1a и pp1ab, оптимальную для репликации и развития инфекции [28]. Для высвобождения отдельных nsp полипротеины pp1a и pp1ab протеолитически процессируются



**Рисунок 2. Геномная организация SARS-CoV-2.** РНК-геном коронавирусов кодирует несколько категорий белков: неструктурные белки (nsp), структурные белки и вспомогательные белки. Неструктурные белки кодируются ORF1a и ORF1b. Кэп-зависимая трансляция начинается с ORF1a и приводит к синтезу короткого полипептида pp1a, включающего nsp1–11, или длинного полипептида pp1ab, включающего nsp12–16; результат трансляции определяется рибосомальным фреймшифтингом. Структурные и вспомогательные белки синтезируются путем трансляции соответствующих субгеномных мРНК. Адаптировано из [28].

двумя вирусными протеазами: закодированной в *nsp3* папаин-подобной протеазой PLpro и закодированной в *nsp5* химотрипсин-подобной цистеиновой протеазой Mpro (будут описаны далее). Генерируемые в результате протеолиза *nsp* объединяются с образованием комплексов репликации и транскрипции (RTC, replication and transcription complexes), которые копируют и транскрибируют геном. RTC локализуются в извитых мембранных структурах (подробно обсуждаются ниже), происходящих из шероховатого эндоплазматического ретикулума (ЭПР), и закорены в мембране при помощи вирусных трансмембранных белков *nsp3*, *nsp4* и *nsp6*. Подобно другим (+)РНК-вирусам, репликация коронавирусов включает синтез комплементарной полноразмерной (-)РНК, которая служит матрицей для создания (+)РНК-геномов потомства, которые далее будут упакованы в вирионы [28]. Помимо геномной репликации, RTC также осуществляют синтез субгеномных мРНК (sg mRNA), которые содержат ORF, расположенные в 3'-проксимальной трети генома. Все субгеномные мРНК содержат общую 5'-лидерную последовательность, расположенную на 5'-конце вирусного генома. Во время синтеза (-)РНК комплекс RdRp останавливается в определенных участках, называемых регуляторными последовательностями транскрипции (TRS, transcription regulatory sequences), которые расположены вдоль «тела» вирусного генома, за исключением областей ORF1a и ORF1b. В результате на матрице субгеномных мРНК синтезируются четыре типа структурных белков, образующих вирион коронавируса: S-белок (S, spike), E-белок (E, envelope), M-белок (M, membrane) и N-белок (N, nucleocapsid), а также девять вспомогательных белков, обеспечивающих избирательное преимущество у инфицированной клетки-хозяина. Большинство белков SARS-CoV-2 аналогичны по размеру соответствующим белкам SARS-CoV. Аминокислотная последовательность четырех структурных белков (S, E, M, N) более чем на 90% идентична последовательности SARS-CoV; отличия наблюдаются только в строении шипа (S-белок) [30].

Отличительной особенностью многих (+)РНК-вирусов, включая коронавирусы, является их способность ремоделировать мембраны клетки-хозяина с образованием репликационных органелл, изолирующих репликацию вирусного генома от механизмов врожденного иммунитета [31]. Репликация (+)РНК-вирусов происходит в цитоплазме, что потенциально подвергает вирусную РНК и интермедиаты репликации опасности со стороны клеточных защитных механизмов. Ультраструктурный анализ клеток, инфицированных SARS-CoV, показал, что мембраны, на которых закорены RTC, сильно деформированы и состоят из двумембранных везикул (DMV, double membrane vesicles) среди других извитых мембранных структур (convoluted membranes), изолирующих вирусную РНК от остального клеточного окружения. Подобная стратегия позволяет коронавирусам защитить процессы репликации от факторов иммунного ответа клетки. DMV представляют собой везикулы, ограниченные двумя тесно связанными концентрическими мембранами [31] (Рисунок 3, А). DMV происходят из мембраны ЭПР клетки-



**Рисунок 3. Двумембранные везикулы (DMV) SARS-CoV-2.** (А) Схематическое изображение извитых мембран и двумембранных везикул (DMV), образующихся из мембраны шероховатого ЭПР клетки-хозяина в ходе коронавирусной инфекции. Белковые компоненты комплексов репликации и транскрипции локализуются преимущественно в извитых мембранах. DMV содержат дцРНК – интермедиат вирусной репликации. Адаптировано из [28]. (Б) Изображения DMV в первичной культуре клеток респираторного эпителия, инфицированных SARS-CoV-2 (штамм из Уханя), полученные при помощи метода электронной микроскопии. Области, выделенные белыми квадратами на верхнем рисунке, показаны в большем увеличении на нижней панели. Белые стрелки указывают на наличие вирусных частиц, образующихся в ERGIC; черными стрелками обозначены вирусные частицы, секретируемые на апикальном полюсе клеток эпителия. *m* – митохондрии; *er* – эндоплазматический ретикулум; *n* – ядро. Адаптировано из [31].

хозяина и располагаются по периферии ядра. В клетках, инфицированных SARS-CoV-2, DMV можно легко обнаружить с помощью электронной микроскопии (Рисунок 3, Б). При формировании DMV большая часть манипуляций с мембраной осуществляется тремя неструктурными белками с интегральными трансмембранными доменами: nsp3, nsp4 и nsp6. Несмотря на то что биохимическая характеристика этих белков затруднена вследствие их гидрофобной природы, исследования белок-белковых взаимодействий, проведенные на клетках, показали, что nsp3, nsp4 и nsp6 способны к олигомеризации и формированию комплексов при помощи люминальных петель [32].

Для сборки инфекционного вириона SARS-CoV-2 необходимо, чтобы его нуклеокапсид, состоящий из геномной (+)РНК, покрытой белком N, и вирусная оболочка, образованная с участием структурных белков M, E и S, слились в одно и то же внутриклеточное пространство. После трансляции с субгеномных мРНК в эндоплазматическом ретикулуме белки M, E и S встраиваются в промежуточный компартмент под названием ERGIC (ER–Golgi intermediate compartment), из которого далее формируется липидная оболочка вириона [28]. Нуклеокапсидное ядро будущего вириона, содержащее вирусный геном, также перемещается из



RTC к мембранам ERGIC, содержащим структурные белки SARS-CoV-2. Больше всего в оболочке вируса представлен М-белок, который играет центральную роль при почковании вирусных частиц. Находясь в пределах мембраны ERGIC, М взаимодействует с Е, S, N и геномной РНК вируса. После интеграции нуклеокапсидного ядра в М-, Е- и S-содержащие ERGIC-мембраны (на данный момент, механизм процесса не известен) новосинтезированные вирионы доставляются к плазматической мембране клетки и высвобождаются путем экзоцитоза [28]. Однако недавние исследования свидетельствуют о том, что бетакоронавирусы, включая MHV и SARS-CoV-2, с большей вероятностью покидают инфицированные клетки посредством лизосомального транспорта [33].

Молекулярные механизмы, согласно которым происходит почкование вирусных частиц SARS-CoV-2, на данный момент точно не известны. Почкование оболочечных вирусов представляет собой сложный многоэтапный процесс, в ходе которого вирусные белки вносят специфические изменения в кривизну клеточной мембраны. Многие вирусы могут деформировать мембрану при помощи собственных белков, образуя почкующийся вирион; однако далеко не все вирусы способны самостоятельно опосредовать разрыв клеточной мембраны для завершения процесса почкования [34]. Большинство оболочечных вирусов для этой цели использует клеточные белки системы ремоделирования мембран ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) [34]. Однако известно, что коронавирусы не используют комплекс ESCRT при почковании вирионов, руководствуясь на этом этапе лишь собственным набором белков. Предполагается, что ключевую роль в разрыве клеточной мембраны при выходе вирионов может играть Е-белок SARS-CoV-2, представляющий собой виропорин (будет описан далее). Представленность Е-белка в зрелом вирионе крайне мала, а большая часть молекул остается связанной с мембранами ERGIC и цис-Гольджи, что дает основания предположить ключевую роль Е на этапах сборки и выхода вирусных частиц [35].

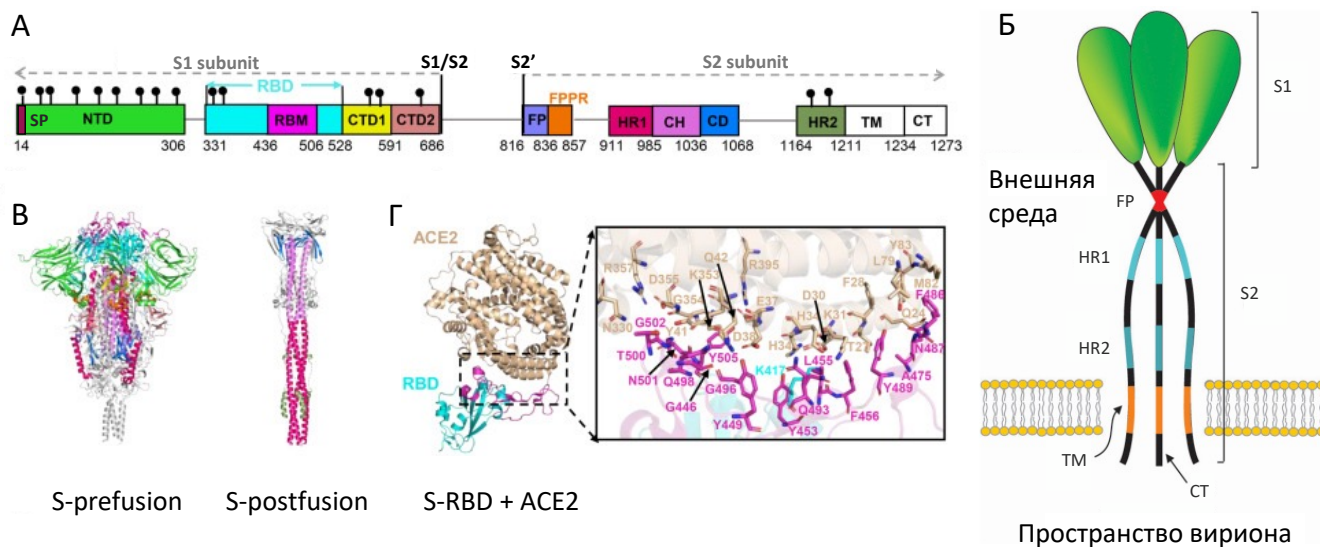
Далее будет подробно рассказано о строении и роли некоторых белков SARS-CoV-2, играющих важную роль в жизненном цикле вируса.

## 2.1.3 Структурные белки и протеазы SARS-CoV-2

### 2.1.3.1 S-белок

S-белок обеспечивает проникновение вирусных частиц в клетку, опосредуя прикрепление к мембране клетки-хозяина и слияние клеточной и вирусной мембран. S является гликопротеином и состоит из 1273 аминокислот. Белок функционирует в форме гомотримера и представлен в мембране вириона несколькими копиями, придавая ему очертания короны. S-белок встраивается в эндоплазматический ретикулум клетки-хозяина посредством N-концевого сигнального пептида (SP, signal peptide). Большую часть молекулы S составляет N-концевой эктодомен, который простирается во внешнее пространство относительно зрелого вириона. При этом лишь небольшой С-концевой участок из 62 аминокислот составляет трансмембранный домен и эндодомен (также называемый «цитоплазматическим хвостом»), направленный в пространство вириона [36] (Рисунок 4, Б).

Каждый мономер S-белка зрелого вириона состоит из двух нековалентно ассоциированных субъединиц, выполняющих различные функции – субъединицы S1, отвечающей за связывание с рецептором ACE2, и субъединицы S2, закоривающей белок на клеточной мембране и участвующей в слиянии мембран при заражении новой клетки.



**Рисунок 4. S-белок (spike) SARS-CoV-2. (А)** Схематическое изображение доменной структуры мономера S-белка. Пояснения даны в тексте. Адаптировано из [37]. **(Б)** Модель тримера S-белка SARS-CoV-2 и его топология на клеточной мембране. Адаптировано из [36]. **(В)** Пространственные структуры тримера S-белка в «prefusion» (PDB ID: 6XR8) и «postfusion» (PDB ID: 6XRA) конформациях, полученные при помощи метода криоэлектронной микроскопии. Домены отмечены цветами, соответствующими схеме на рисунке (А). Адаптировано из [37]. **(Г)** Пространственная структура рецептор-связывающего домена (RBD) S-белка (изображен голубым цветом) в комплексе с ACE2 (изображен розовым цветом) (PDB ID: 6M0J). Адаптировано из [37].

Субъединица S1 состоит из N-концевого домена (NTD, аминокислотные остатки 14–306), рецептор-связывающего домена (RBD, аминокислотные остатки 331–528), включая рецептор-связывающий мотив (RBM, аминокислотные остатки 436–506), и С-концевого домена (CTD), состоящего из CTD1 (аминокислотные остатки 528–591) и CTD2 (аминокислотные остатки 592–686) [37] (Рисунок 4, А). Ключевую роль при попадании вируса в клетку играет рецептор-связывающий домен (RBD, receptor-binding domain) – участок из 198 аминокислот, расположенный перед С-концевым доменом субъединицы S1. RBD также служит мишенью для нейтрализующих антител в ходе иммунного ответа организма на заражение SARS-CoV-2. Рецептор-связывающий мотив (RBM, receptor-binding motif), расположенный на конце RBD, обеспечивает контакт с рецептором ACE2 (Рисунок 4, Г) [13]. Структура RBD представляет из себя  $\beta$ -лист из 5 антипараллельных  $\beta$ -тяжей ( $\beta 1$ - $\beta 3$ - $\beta 5$ - $\beta 4$ - $\beta 2$ ), окруженный с обеих сторон короткой спиралью. RBM представлен в виде петли, которая выступает за пределы  $\beta$ -листа, присоединяясь к тяжам  $\beta 4$  и  $\beta 5$ , и образует структуру для связывания рецептора [38]. Анализ кристаллической структуры комплекса RBD-hACE2 показал, что структурные особенности RBD SARS-CoV-2 обеспечивают более высокую аффинность связывания рецептора, чем RBD SARS-CoV [39].

Субъединица S2 является высоко консервативной среди коронавирусов и содержит сегменты, которые играют решающую роль при слиянии вируса и клетки. Эти сегменты включают: так называемый «фьюжн пептид» (FP, fusion peptide, аминокислотные остатки 816–836) и его проксимальную область (FPPR, fusion-peptide proximal region, аминокислотные остатки 837–857), две области гептадного повтора (HR1, heptad repeat 1, аминокислотные остатки 911–985, и HR2, heptad repeat 2, аминокислотные остатки 1164–1211), расположенные между ними центральную спираль (CH, central helix, аминокислотные остатки 986–1036) и соединительный домен (CD, connector domain, аминокислотные остатки 1037–1068), а также упомянутые ранее высококонсервативный трансмембранный домен (TM, transmembrane segment, аминокислотные остатки 1212–1234) и цитоплазматический хвост (CT, cytoplasmic tail, аминокислотные остатки 1235–1273) [37] (Рисунок 4, А).

На первом этапе при входе SARS-CoV-2 в клетку происходит связывание S-белка вириона с рецептором на поверхности клетки-хозяина – ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2). Для активации эндоцитозного пути попадания в клетку, подобно другим коронавирусам, SARS-CoV-2 необходим протеолитический процессинг S-белка. Было показано, что протеолиз белка и следующая за ним активация проникновения вируса в клетку происходят при участии протеаз клетки-хозяина, среди которых мембран-ассоциированная сериновая протеаза TMPRSS2 (transmembrane protease serine protease 2), катепсин L (cathepsin L) и фурин [40]. При помощи данных РНК-секвенирования одиночных клеток было показано, что протеаза TMPRSS2, как и

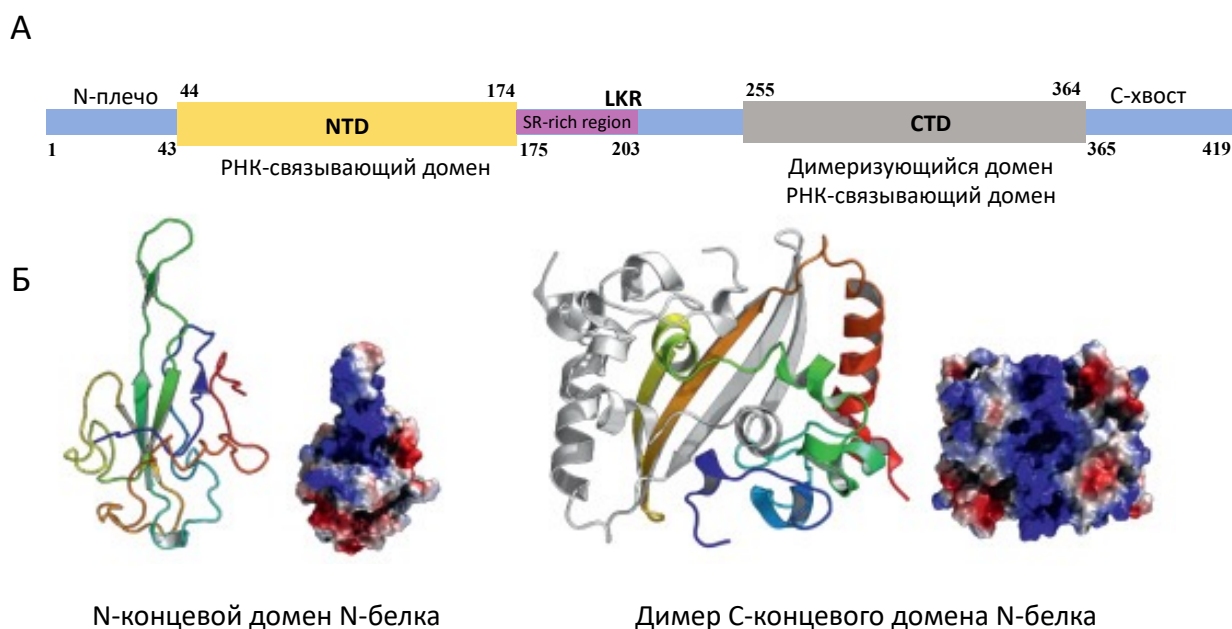
рецептор ACE2, в большой степени экспрессируются в клетках назального эпителия, легких и бронхах, что объясняет тропность вируса к этим тканям [41,42]. TMPRSS2 активирует проникновение вируса через плазматическую мембрану клетки, в то время как катепсин L и фурин обеспечивают процессинг S-белка в эндосомах, давая возможность вирусу проникать в клетки, не экспрессирующие TMPRSS2 на своей поверхности [43]. Связывание S-белка с рецептором ACE2 вызывает резкие конформационные изменения в субъединицах S1 и S2, которые приводят к сближению вирусной и клеточной мембран, образуя таким образом пору, через которую вирусный геном попадает в цитоплазму клетки [44].

Для слияния мембран необходимо расщепление S-белка протеазами клетки-хозяина по двум сайтам – S1/S2 и S2', которые расположены между рецептор-связывающим доменом (RBD) и «фьюжн пептидом» [45]. Первое протеолитическое расщепление S-белка происходит в клеточной мембране по сайту S1/S2 и называется «праймированием» (priming). В составе S-белка сайт S1/S2 формирует выдающуюся петлю, содержащую многоосновный фуриновый сайт (несколько остатков аргинина), который расщепляется клеточной сериновой протеазой TMPRSS2. Праймирование дает начало функциональным субъединицам S1 (располагается на поверхности) и S2 (является трансмембранной), которые остаются нековалентно связанными, формируя так называемую «prefusion» конформацию белка, которая далее претерпевает значительную структурную перестройку для слияния мембран вируса и клетки-хозяина (Рисунок 4, В). Для облегчения взаимодействия с рецептором на поверхности клетки RBD субъединицы S1 совершает конформационные движения, подобные шарниру, в результате чего S1 изменяет свою форму, образуя «открытую» и «закрытую» конформацию (можно образно сказать, что субъединица «дышит») [45].

Второе расщепление S-белка происходит на субъединице S2 по фурин-подобному сайту S2', расположенному чуть выше «фьюжн пептида», и носит название «активация» (activation). В отличие от праймирования, происходящего в клеточной мембране при участии TMPRSS2, активация происходит на поверхности клетки или в ранних эндосомах и может осуществляться различными клеточными протеазами в зависимости от клеточного компартмента, например, с участием фурина, трипсина, катепсинов, TMPRSS2/4 и трипсиноподобной протеазы дыхательных путей человека (НАТ). Разрезание сайта S2' вызывает обширные необратимые конформационные изменения, в результате которых из субъединицы S2 формируется зрелый гидрофобный «фьюжн пептид», способный встраиваться в мембрану клетки-мишени («postfusion» конформация белка) [45] (Рисунок 4, В). Считается, что рефолдинг S2 является источником свободной энергии, приводящей мембраны вируса и клетки-хозяина к непосредственной близости для слияния [46]. В результате после слияния мембран покрытый N-белком РНК-геном высвобождается в цитоплазму клетки-хозяина.

### 2.1.3.2 N-белок

N-белок, нуклеокапсидный РНК-связывающий белок SARS-CoV-2, представляет из себя структурный фосфопротеин с молекулярной массой 46 кДа, который является компонентом спирального нуклеокапсида. Основная функция N-белка заключается в формировании рибонуклеопротеинового комплекса для защиты геномной РНК вируса и ее включения в жизнеспособный вирион. Считается, что N-белок связывается с геномной РНК в форме конструкции, напоминающей «бусины на нитке» [36]. Помимо этого, N также взаимодействует с белком вирусной мембраны (M-белок) в процессе сборки вириона и играет важную роль в повышении эффективности транскрипции и сборке вируса. По окончании своего синтеза, N подвергается фосфорилированию. Роль фосфорилирования нуклеокапсидного белка пока неясна, но предполагается, что оно несет регуляторное значение [36]. N-белок SARS-CoV-2 состоит из 419 аминокислот и, подобно аналогичным белкам других коронавирусов, имеет два консервативных домена, а именно N-концевой домен (NTD) и С-концевой домен (CTD) (Рисунок 5, А). Домены разделены между собой внутренне неупорядоченным регионом (IDR, intrinsically disordered region) под названием «центральный связующий регион» (LKR, central linking region). LKR включает в себя Ser/Arg-богатую область (SR-rich region), которая содержит предполагаемые сайты фосфорилирования [47]. По обе стороны от NTD и CTD расположены еще два IDR, под названием «N-плечо» (N-arm) и «С-хвост» (C-tail). NTD отвечает за связывание РНК, CTD



**Рисунок 5. N-белок (nucleocapsid) SARS-CoV-2. (А) Схематическое изображение доменной структуры мономера N-белка. Пояснения даны в тексте. Адаптировано из [47]. (Б) Пространственные структуры мономера N-концевого домена (PDB ID: 7CDZ) и димера C-концевого домена (PDB ID: 7CE0) N-белка, полученные на основе данных рентгеноструктурного анализа. Адаптировано из [48].**

ответственен за связывание РНК и димеризацию, а IDR регулирует РНК-связывающую активность и олигомеризацию NTD и CTD [49] (Рисунок 5, Б). Помимо координации вирусного генома, N также играет роль в противодействии иммунному ответу хозяина. В частности, было показано, что благодаря своей РНК-связывающей активности, N связывает двухцепочечные РНК, участвующие в РНК-интерференционной противовирусной активности, действуя как вирусный ингибитор защитного механизма РНК-интерференции [50]. Подобная противоиммунная активность делает N-белок потенциальной мишенью для противовирусной терапии.

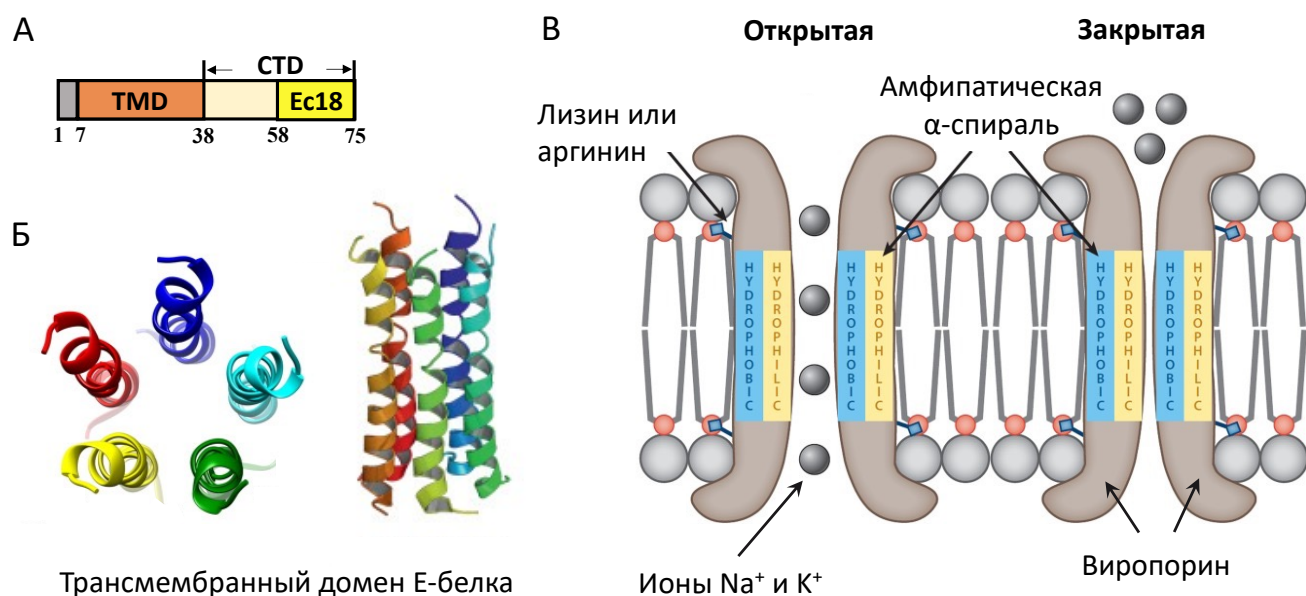
N-белок функционирует в виде стабильного димера; олигомеризация белка необходима для поддержания его стабильной конформации [51]. Аминокислотные остатки, ответственные за гомодимеризацию, находятся в CTD. В связывании нуклеиновой кислоты участвуют как домены NTD и CTD, так и линкерный регион LKR. Связывание РНК способствует формированию более упорядоченной конформации, активируя димер-димерные взаимодействия, которые, в свою очередь, координируют белок N с нуклеиновой кислотой, приводя к сборке полимеров [51].

Недавние исследования показали, что N-белки при связывании с вирусной РНК подвергаются фазовой сепарации жидкость-жидкость (LLPS, liquid-liquid phase separation) [52]. LLPS – механизм, основанный на многовалентных макромолекулярных взаимодействиях, в результате которых происходит переход белков из клеточной цитоплазмы в другую жидкую фазу, обладающую иными физико-химическими свойствами. Посредством LLPS в клетке образуются немембранные органеллы, такие как тельца Кахаля, ядерные спеклы, стресс-гранулы, комплексы белков группы Pоlусомb и другие биомолекулярные конденсаты [53]. Связывание нуклеиновой кислоты N-белком способствует процессу LLPS, что приводит к образованию конденсатов N с РНК и в результате к формированию рибонуклеопротеиновых частиц [52]. Белок N также взаимодействует с мембранным белком (M-белком) SARS-CoV-2, который, по-видимому, играет роль в продвижении агрегатов белка N, фиксации рибонуклеопротеиновых частиц на вирусной мембране и распознавании вирусной РНК [54].

### **2.1.3.3 E-белок**

E-белок является самым маленьким трансмембранным структурным белком SARS-CoV-2, состоящим из 75 аминокислот (8,4 кДа). Белок играет важную роль в процессах сборки, почкования, формирования оболочки вириона и патогенезе, однако полное понимание роли белка в жизненном цикле вируса пока не достигнуто. Несмотря на высокую экспрессию E внутри инфицированных клеток, лишь небольшое количество молекул белка включается в оболочку вируса [36]. Большая часть белка расположена в клеточных компартментах, участвующих в сборке и почковании вирионов, а именно в ЭПР, аппарате Гольджи и ERGIC [55].

Е-белок состоит из 75 аминокислот, включая короткий гидрофильный N-концевой эктодомен (аминокислотные остатки 1–7), трансмембранный домен (TMD, transmembrane domain), состоящий из 25 аминокислот (аминокислотные остатки 8–38), и C-концевой домен (CTD, C-terminal domain, аминокислотные остатки 39–75), последние 18 аминокислот которого называют Eс18 [37] (Рисунок 6, А). N-концевой эктодомен несет отрицательный заряд, а C-концевой домен содержит положительно заряженные аминокислоты; при этом общий заряд белка остается нейтральным [56]. Гидрофобный TMD содержит  $\alpha$ -спираль, которая участвует в олигомеризации Е-белка с образованием пентамерного ионного канала (Рисунок 6, Б). Этот канал формирует в мембране клетки-хозяина ион-проводящую пору, называемую виropоринoм. Большая часть TMD состоит из неполярных аминокислот двух типов, валина и лейцина, придающих белку сильные гидрофобные свойства [36]. Точная функция N-концевого домена Е-белка не определена. Домен расположен внутри мембраны Гольджи или ЭПР и, предположительно, участвует в перестройке мембран ЭПР в ходе жизненного цикла вируса, инициируя искривление мембран [56]. C-концевой домен поддерживает структурную топологию TMD и участвует в белок-белковых взаимодействиях [56]. Домен содержит примыкающие к TMD цистеиновые остатки, которые подвергаются пальмитоилрованию (присоединение пальмитиновой кислоты). Предполагается, что пальмитоилирование играет роль в субклеточном



**Рисунок 6. Е-белок (envelope) SARS-CoV-2. (А) Схематическое изображение доменной структуры мономера Е-белка. Пояснения даны в тексте. Адаптировано из [37]. (Б) Пентамер, образованный трансмембранными доменами (TMD) Е-белка SARS-CoV-2 (PDB ID: 7K3G). Пространственная структура получена при помощи метода ЯМР-спектроскопии. Адаптировано из [38,48]. (В) Схематическая иллюстрация типичной структуры виropорина. Адаптировано из [57].**

транспорте белков, модуляции белок-белковых взаимодействий, а также увеличивает гидрофобность белка, способствуя его заякориванию на вирусной мембране [36].

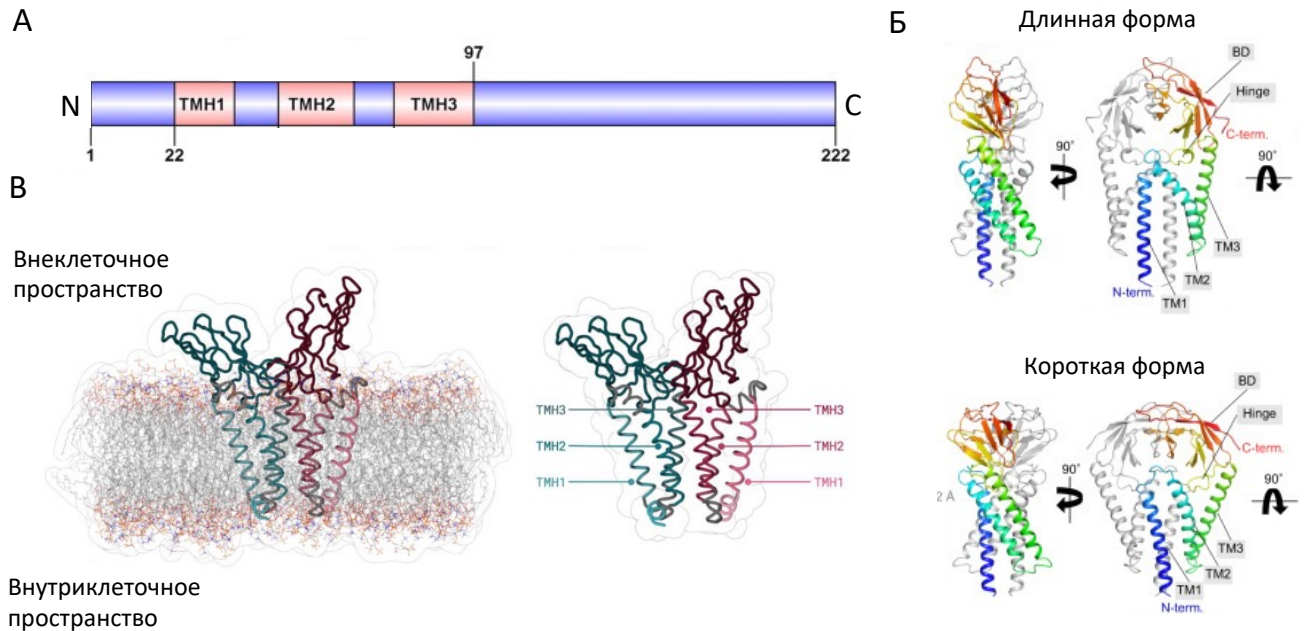
Е-белок SARS-CoV-2 обладает уникальной способностью к олигомеризации с образованием виropоринoв. Виropорины представляют собой интегральные вирусные белки, преимущественно гидрофобной природы, которые олигомеризуются в мембранах инфицированных клеток, образуя в них гидрофильные поры [57] (Рисунок 6, В). Виropорины воздействуют на клеточную систему везикулярного транспорта и перенос гликопротеинов, а также увеличивают проницаемость клеточных мембран для высвобождения новосинтезированных вирусных частиц [58]. Внешняя часть поры виropорина, контактирующая с фосфолипидами клеточной мембраны, выстлана гидрофобными аминокислотными остатками, в то время как внутренняя часть поры, образующая ионный канал, состоит из гидрофильных аминокислотных остатков. Большинство виropоринoв имеют общие структурные особенности, такие как амфипатическая  $\alpha$ -спираль в гидрофобном домене и кластер положительно заряженных основных аминокислот (таких как лизин или аргинин), который закрепляет пору в мембране посредством электростатических взаимодействий с отрицательно заряженными фосфолипидами [57]. При исследовании синтетических Е-белков SARS-CoV было продемонстрировано, что TMD обладает ионной проводимостью [59–60]. Компьютерное моделирование и спектроскопические исследования показали, что TMD Е-белка SARS-CoV подвергается олигомеризации, характерной для белков, образующих ионные каналы, с образованием стабильного пентамера [59–61]. Образование виropоринoв, предположительно, происходит при участии ионных взаимодействий. Виropорины Е-белка коронавирусов способны селективно пропускать моновалентные катионы  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . В результате конформационных перестроек пора виropорина открывается и закрывается, контролируя тем самым поток ионов [57].

Предполагается, что Е-белок может играть ключевую роль при почковании вирусных частиц. Недавно при помощи компьютерного моделирования было показано, что Е-белок способен искривлять клеточные мембраны, и эта функция может быть приписана амфифильному С-концевому домену. Подобное искривление, генерируемое виropоринoм, может стабилизировать почкующуюся вирусную частицу и способствовать ее отделению от клетки-хозяина [62]. Известно, что коронавирусы способны опосредовать разрыв клеточной мембраны без помощи клеточной системы ESCRT, используя только собственные белки. Высокая представленность Е-белка в составе ERGIC и цис-Гольджи наряду с малым количеством его молекул в оболочке зрелого вириона дает основания предположить роль Е в качестве медиатора на этапе почкования вирусных частиц [35].



### 2.1.3.4 М-белок

М-белок, мембранный гликопротеин SARS-CoV-2, является наиболее распространенным белком оболочки коронавируса и играет решающую роль в сборке вириона посредством белок-белковых взаимодействий. Последовательность М-белка SARS-CoV-2 на 90,5% идентична последовательности М у SARS-CoV [63]. Было показано, что для белка характерны как гомотипические (с другими копиями белка М), так и гетеротипические (с другими структурными белками: S, E и N) белок-белковые взаимодействия. Эти взаимодействия необходимы для индукции изгиба мембраны с последующим почкованием вирусных частиц и служат контрольной точкой для сборки новых вирионов [64]. М представляет собой трансмембранный гликопротеин типа III из 222 аминокислот, который включает три основных домена: короткий N-концевой эктодомен (аминокислотные остатки 1–19), за которым следуют три трансмембранные  $\alpha$ -спирали ТМН1-ТМН3 (аминокислотные остатки 22–97), и более длинный цитоплазматический С-концевой эндодомен (аминокислотные остатки 98–222) [37] (Рисунок 7, А). С-концевой эндодомен представляет из себя  $\beta$ -сэндвич, состоящий из внешнего  $\beta$ -листа ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 6$  и  $\beta 7$ ) и внутреннего  $\beta$ -листа ( $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$  и  $\beta 8$ ), который соединяется с трансмембранным доменом при помощи так называемой «шарнирной области» (hinge region) из 11 аминокислот [65]. Белок содержит несколько консервативных мотивов, которые не только отвечают за гомодимеризацию



**Рисунок 7. М-белок (membrane) SARS-CoV-2.** (А) Схематическое изображение доменной структуры мономера М-белка. Пояснения даны в тексте. Адаптировано из [38]. (Б) Пространственная структура димера М-белка SARS-CoV-2 в «длинной» и «короткой» форме, полученная при помощи метода криоэлектронной микроскопии. Один протомер белка М окрашен в радужный, другой – в серый цвет. Адаптировано из [65]. (В) Мембранная ориентация димера М-белка, предсказанная при помощи программы TMHMM. В качестве мономера использовалась 3D-модель М-белка SARS-CoV-2, полученная при помощи сервиса AlphaFold. Мономеры белка обозначены бирюзовым и темно-красным цветом. Адаптировано из [63].

и транслокацию, но и участвуют во взаимодействии между М и другими белками вируса. Аминокислотные остатки, необходимые для гомотипических взаимодействий, присутствуют по всей последовательности М-белка, включая трансмембранные области, в то время как взаимодействие с белками Е и N осуществляется посредством С-концевого эндодомена [66]. Было показано, что мотивы состава «ароматическая аминокислота-Х-Х-ароматическая аминокислота», где Х – переменная аминокислота (например, мотив WLLW в  $\alpha$ -спирали ТМ2), тесно связаны с димеризацией белка, а ди-лейциновый мотив L218-L219, расположенный на С-концевом эндодомене, отвечает за взаимодействие с N-белком и необходим для упаковки нуклеокапсида [66].

Недавно при помощи криоэлектронной микроскопии с использованием конформационно-специфичных антител была получена пространственная структура димера М-белка SARS-CoV-2 в двух различных конформационных состояниях [65] (Рисунок 7, Б). Размеры «длинной» формы димера составляли 86 Å в высоту и 50 Å в ширину, а «короткой» формы – 72 Å в высоту и 57 Å в ширину. При этом предполагается, что сам белок находится в конформационном равновесии между двумя формами. Ранее подобные «короткие» и «длинные» формы димеров М были обнаружены в составе вирионов MHV (вирус гепатита мышей, относящийся к роду бетакоронавирусов) при помощи методов криоэлектронной микроскопии и томографии [67]. Анализ полученных структур показал, что в димеризации М-белка SARS-CoV-2 принимают участие как трансмембранные спирали, так и С-концевой эндодомен [65]. В обеих формах димера М-белка спираль ТМ1 одного протомера образует трехспиральный пучок с ТМ2 и ТМ3 другого протомера. При этом взаимодействия внутри одного такого трехспирального пучка опосредуются обширным контактом гидрофобных остатков [65]. Шарнирная область имеет структуру мотива «спираль-поворот» (helix-turn) и находится внутри треугольной пирамидальной полости, образованной трехспиральным пучком. Параллельно с этим, С-концевой эндодомен димеризуется посредством внутреннего  $\beta$ -листа, образуя структуру, напоминающую зонт, которая закрывает интравирионную поверхность трансмембранной области [65].

Также недавно при помощи методов компьютерного моделирования была предсказана мембранная ориентация М-белка в липидном бислое [63] (Рисунок 7, В). Впервые полученная подробная ориентация димера М SARS-CoV-2 на мембране показала, что аминокислотные остатки 20–38 образуют трансмембранную спираль ТМН1, аминокислотные остатки 46–70 – ТМН2, а аминокислотные остатки 76–100 – ТМН3, что согласуется с полученными ранее экспериментальными данными для SARS-CoV [66].

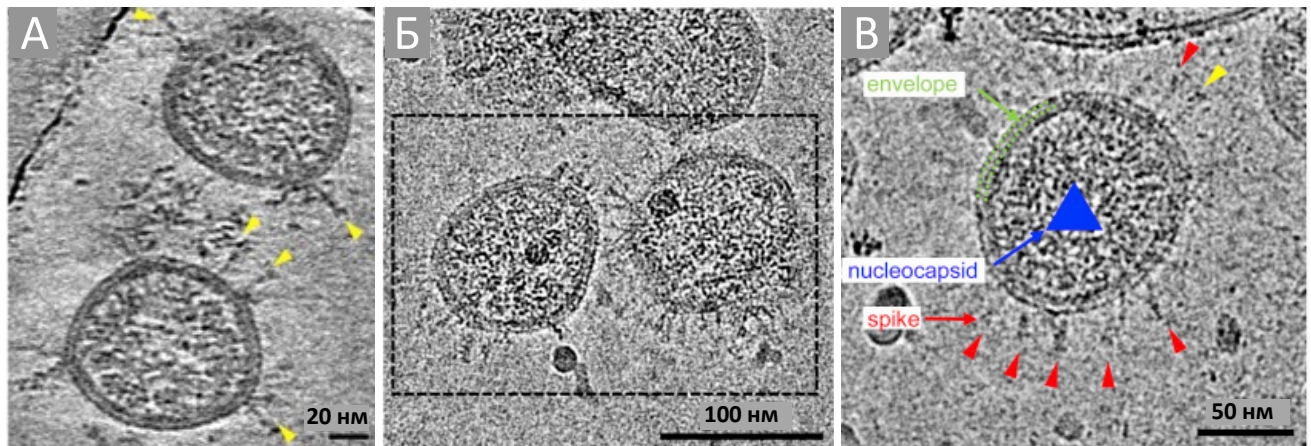
Белок М SARS-CoV-2 обладает сильной иммуногенностью и стимулирует гуморальный ответ клетки-хозяина к образованию нейтрализующих антител: антигенные эпитопы были

обнаружены в трансмембранных областях TM1 и TM2 [68]. Все это также делает М-белок потенциальной мишенью противовирусной терапии.

### 2.1.3.5 Моделирование структуры вириона SARS-CoV-2 и олигомеризация М-белка

Исследования на основе электронной микроскопии и электронной томографии нескольких бетакоронавирусов, включая SARS-CoV-2, показали, что морфология вирусной оболочки является достаточно консервативной [69–70] (Рисунок 8, А, Б). Эти недавние исследования также предполагают, что оболочка вириона представляет собой эллипсоид, средние диаметры которого для SARS-CoV-2 были оценены в диапазоне  $64,8 \pm 11,8$  нм для короткой оси,  $85,9 \pm 9,4$  нм для средней оси и  $96,6 \pm 11,8$  нм для длинной оси (среднее  $\pm$  SD, стандартное отклонение). Ранее сопоставимые параметры морфологии вириона были показаны для SARS-CoV [67]. В архитектуре оболочки SARS-CoV-2 было выявлено  $26 \pm 15$  тримеров белка S. Количество димеров М-белка в мембране SARS-CoV-2 в настоящее время неизвестно, но ожидается, что оно составляет порядка 1100 штук. Число рибонуклеопротеиновых комплексов в среднем составило  $26 \pm 11$  штук на вирион. [69]. Пентамеры Е присутствуют в оболочке SARS-CoV-2 в небольшом количестве [71] (Рисунок 8, В).

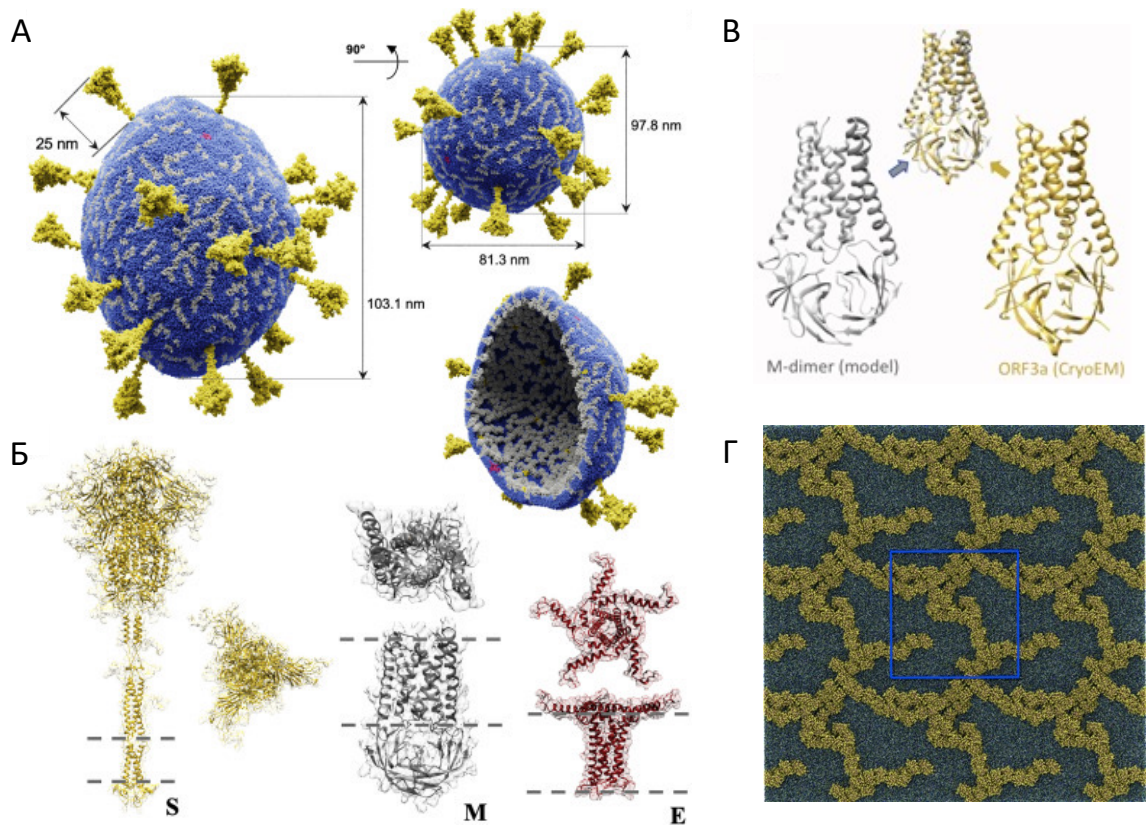
Будучи наиболее распространенным белком оболочки, М-белок интегрирован в липидный бислой вируса в виде гомодимера, играя при этом важную, но не до конца изученную структурную роль. Например, до сих пор неясно, достаточно ли белка М для формирования



**Рисунок 8.** Архитектура инактивированного SARS-CoV-2, выявленная с помощью криоэлектронной микроскопии и криоэлектронной томографии. (А) Томографический срез инактивированных вирусов SARS-CoV-2. Шипы, образованные на поверхности вириона молекулами S-белка (*spike*), обозначены желтыми стрелками. (Б) Репрезентативные изображения очищенных инактивированных частиц вируса SARS-CoV-2, полученные при помощи метода криоэлектронной микроскопии. (В) Увеличенное изображение вириона с рисунка (Б): молекулы E-белка (*envelope*) и нуклеокапсид (*nucleocapsid*) обозначены зелеными пунктирными линиями и синим треугольником, соответственно; молекулы S-белка (*spike*), обозначены красными стрелками. Адаптировано из [70].

стабильной структуры оболочки вириона коронавируса или для этого также необходимо участие структурных белков S и E.

Недавно было проведено компьютерное моделирование вириона SARS-CoV-2 путем объединения структурных экспериментальных данных для отдельных коронавирусных белков, сведений о составе липидного бислоя и глобальной геометрии оболочки вириона [72] (Рисунок 9, А, Б). Было показано, что смоделированные *de novo* гомодимерные модели М-белка имеют



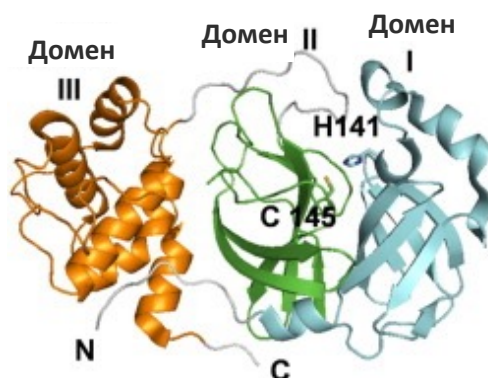
**Рисунок 9. Молекулярная архитектура оболочки вируса SARS-CoV-2 и ее компонентов, полученная при помощи компьютерного моделирования. (А)** Структурная модель оболочки вириона, состоящая из 2 пентамеров E-белка, 25 тримеров S-белка и 1003 димеров M-белка. Молекулы липидов изображены синим, пентамеры E - красным, димеры M – серым, тримеры S – желтым цветом. Средние диаметры вириона составили 81,3 нм, 97,8 нм и 103,1 нм. Высота внешней части белка S составляет 25 нм. На поверхности оболочки видны «филаменты», образованные трансмембранными доменами димеров M, в то время как на внутренней части оболочки – плотная упаковка эндодоменов димеров M. **(Б)** Структурные белки S, M и E, представляющие основные строительные блоки оболочки SARS-CoV-2. Белки представлены в их физиологическом олигомерном состоянии, показан вид сбоку и сверху: тример S-белка изображен желтым, димер M-белка – серым, пентамер E-белка – красным цветом. Серые пунктирные линии соответствуют границам клеточной мембраны. Структуры белков показаны в разных масштабах. **(В)** Наложение пространственных структур компьютерной модели димера M и структуры белка ORF3A, полученной при помощи метода криоэлектронной микроскопии (PDB ID: 6XDC). Выравнивание выполнено при помощи программы TM-align. **(Г)** Структурная модель 41 димера M-белка в плоской билипидной системе. Димеры образуют филаментоподобные структуры, напоминающие «филаменты» M, выявляемые при моделировании оболочки вириона. Адаптировано из [72].

поразительное структурное сходство с другим недавно разрешенным при помощи криоэлектронной микроскопии гомодимером SARS-CoV-2, белком ORF3a [73]. ORF3a представляет собой вирусный ионный канал, участвующий в ингибировании аутофагии, активации воспаления и апоптозе. Сходство включало в себя двухдоменную организацию молекулы белка и сходную комбинацию элементов вторичной структуры с небольшими отличиями в структуре в трансмембранного домена (Рисунок 9, В). Основанное на этих данных дальнейшее моделирование показало, что димеры М-белка способны укладываться в филаментоподобные структуры. Этот факт согласуется с результатами более ранних исследований, где при помощи криоэлектронной микроскопии оболочки SARS-CoV-2 была выявлена способность димеров М образовывать структуры, напоминающие решетку [67,74]. При этом важную роль в формировании этой решетчатой структуры играли эндодомен М и взаимодействие М с другими структурными белками, включая N. Компьютерное моделирование показало, что трансмембранные домены димеров М-белка предпочтительно формируют филаментоподобные структуры без контактов между соседними филаментами [72]. При этом эндодомены в составе димеров были, напротив, плотно упакованы и связаны друг с другом в двух направлениях, демонстрируя тенденцию к образованию высоко упорядоченной решетки. Эти данные также согласовались с полученными ранее результатами криоэлектронной микроскопии [74,75]. Чтобы подтвердить наблюдаемое свойство димеров М образовывать «филаменты», авторы провели дополнительное моделирование, рандомно разместив 41 димер М-белка в плоской бислойной системе с липидным составом, аналогичным тому, что использовался при моделировании оболочки вириона. В результате димеры М-белка в составе плоской билипидной мембраны образовывали филаменты аналогичные структурам, наблюдаемым при моделировании оболочки полноразмерного вириона (Рисунок 9, Г).

#### **2.1.3.6 Главная протеаза M<sub>pro</sub>**

Особую роль в жизненном цикле вируса играют протеазы. Им принадлежит самая ранняя ферментативная активность в жизненном цикле SARS-CoV-2. Посредством протеолиза протеазы высвобождают индивидуальные вирусные белки, синтезируемые в виде полипротеинов с протяженных открытых рамок считывания, в результате чего запускаются процессы репликации, завершающиеся высвобождением вирусных частиц из клетки. Геном SARS-CoV-2 кодирует две вирусные протеазы – главная протеаза M<sub>pro</sub> (main protease, также известная как 3CL<sub>pro</sub>) и папаин-подобная протеаза PL<sub>pro</sub> (papain-like protease).

Мрго является неструктурным белком nsp5 и представляет собой 33 кДа химотрипсин-подобную цистеиновую протеазу, играющую важную роль в обеспечении репликации вируса и созревании неструктурных белков [38]. Мрго разрезает полипротеины pp1a и pp1ab в 11 консервативных сайтах, в результате чего высвобождаются 12 функциональных белков, которые далее формируют комплекс, ответственный за репликацию вируса [76]. Кристаллическая структура Мрго SARS-CoV-2 показала, что протеаза функционирует в виде активного гомодимера [38]. Каждый протомер состоит из трех доменов – домены I, II и III (Рисунок 10). Домены I (аминокислотные остатки 10–99) и II (аминокислотные остатки 100–182) имеют химотрипсин-подобную укладку в виде антипараллельного  $\beta$ -бочонка и участвуют в связывании субстрата и катализе. Субстрат-связывающий карман является высококонсервативным среди коронавирусов и несет в себе каталитическую диаду Cys145-His41. С-концевой глобулярный домен III (аминокислотные остатки 198–303), состоящий из пяти антипараллельных  $\alpha$ -спиралей, обеспечивает димеризацию белка [38].



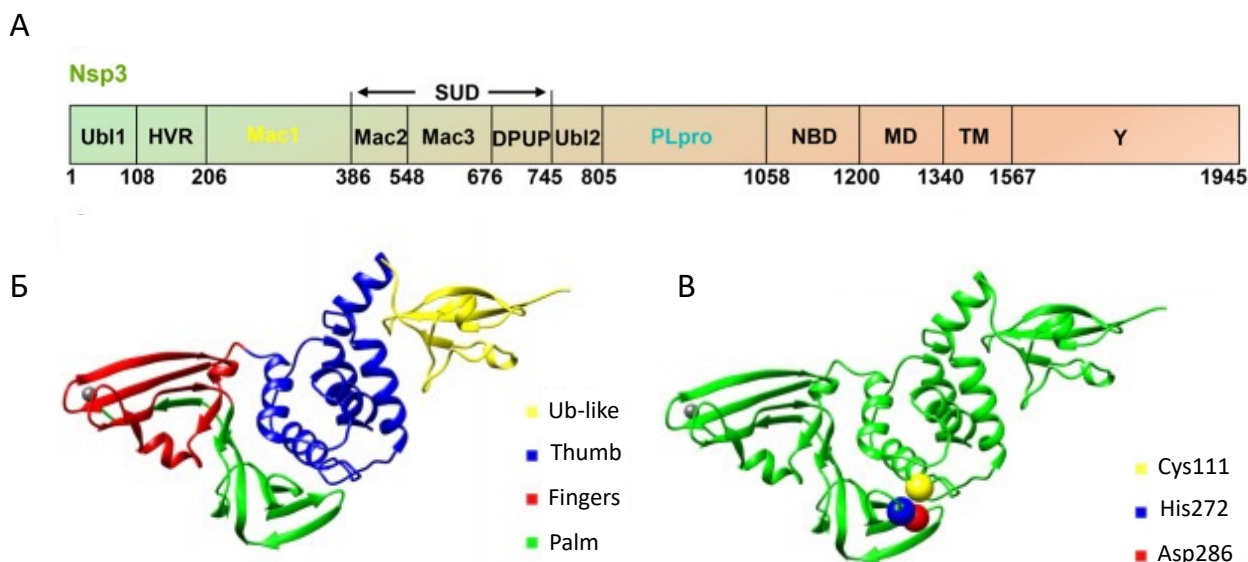
**Рисунок 10. Протеаза Мрго.** Изображение пространственной структуры белка Мрго SARS-CoV-2 (ID PDB: 6YB7). Домен I обозначен циановым, домен II – зеленым, домен III – оранжевым цветом. На рисунке обозначено положение каталитической диады Cys145-His41 (C15-H41). Адаптировано из [38].

### 2.1.3.7 Папаин-подобная протеаза PLpro

Папаин-подобная протеаза PLpro представляет собой высоко консервативную среди коронавирусов цистеиновую протеазу и является частью неструктурного белка nsp3. Nsp3 – мультидоменный мембран-ассоциированный белок, высвобождающийся при протеолитическом расщеплении полипротеинов pp1a и pp1ab. Это самый крупный неструктурный белок SARS-CoV-2 (молекулярная масса 212 кДа), чей ген является высоко консервативным - аминокислотная последовательность nsp3 SARS-CoV-2 имеет 75% гомологии с таковой у SARS-CoV [77]. Nsp3 SARS-CoV-2 состоит из 10 доменов, выполняющих разнообразные функции в цикле репликации коронавируса: убиквитин-подобный домен 1 (Ub11, аминокислотные остатки 1–108),

гипервариабельный регион (HVR, аминокислотные остатки 109–206), макродомен I (Mac1 или X, аминокислотные остатки 207–386), «SARS-уникальный домен» (SUD; состоит из трех субдоменов: макродомена II [Mac2, аминокислотные остатки 387–548], макродомена III [Mac3, аминокислотные остатки 549–676] и домена, предшествующего Ubl2 и PL2pro [DPUP, аминокислотные остатки 677–745]), убиквитин-подобный домен 2 (Ubl2, аминокислотные остатки 746–805), папаин-подобная протеаза (PLpro), домен, связывающий нуклеиновую кислоту (NBD, аминокислотные остатки 1059–1200), маркерный домен (MD, аминокислотные остатки 1201–1340), трансмембранные участки (TM, аминокислотные остатки 1341–1567) и Y-домен (аминокислотные остатки 1568–1945) [37] (Рисунок 11, А).

Наиболее значимым субдоменом в составе nsp3 является папаин-подобная протеаза (PLpro, papain-like protease), которая и осуществляет вырезание nsp3 из полипептидов-предшественника. PLpro состоит из 253 аминокислот (29 кДа) и является высококонсервативным белком среди коронавирусов: аминокислотная последовательность PLpro SARS-CoV-2 на 83% идентична таковой у SARS-CoV [77]. PLpro SARS-CoV-2 представляет собой цистеиновую протеазу, состоящую из четырех доменов, три из которых образуют каталитически значимую архитектуру, напоминающую кисть правой руки: большой палец – ладонь – пальцы правой руки (Рисунок 11, Б).



**Рисунок 11. Белок nsp3 и протеаза PLpro (А) Схематическое изображение доменной организации белка nsp3 [37]. (Б) Изображения пространственной структуры SARS-CoV-2 PLpro на основе данных рентгеноструктурного анализа. Убиквитин-подобный домен (Ub-like, 1–61) обозначен желтым, домен Thumb (62–178) синим, домен Fingers (179–240) красным, домен Palm (241–315) зеленым цветом. Ионы цинка обозначены в домене Fingers серыми сферами. (В) Расположение каталитической триады SARS-CoV-2 PLpro: Cys111 (желтый), His272 (синий), Asp286 (красный) [77].**

Каталитическая триада расположена между доменами большого пальца (Thumb, аминокислотные остатки 62–178) и ладони (Palm, аминокислотные остатки 241–315) и состоит из Cys111, His272 и Asp286 (Рисунок 11, В). Домен пальцев (Fingers, аминокислотные остатки 179–240) содержит сайт связывания цинка, состоящий из четырех остатков цистеина (Cys189, Cys192, Cys224, Cys226). Мутагенез этих цистеиновых остатков в PLpro SARS-CoV показал, что координация цинка необходима для каталитической активности протеазы [78]. Четвертый домен PLpro SARS-CoV-2 представляет собой убиквитин-подобный домен (Ub-like, аминокислотные остатки 1–61), точная функция которого еще полностью не изучена [77].

Одной из функций PLpro является высвобождение первых неструктурных белков, необходимых для репликации вируса: PLpro осуществляет протеолитическое расщепление по трем сайтам pp1a и pp1ab, в результате чего из полипротеинов высвобождаются неструктурные белки nsр1, nsр2, nsр3 и nsр4 [38]. Белок nsр1 ингибирует трансляцию клетки-хозяина, связываясь с эукариотическими рибосомами [79], а nsр2 вызывает нарушения клеточного цикла и апоптоз [80]. Белок nsр3 содержит 9 других доменов помимо PLpro, которые, как и nsр4, способствуют сборке комплексов репликации и транскрипции (RTC) [80]. Кроме того, аналогично Mpro, PLpro также осуществляет автокаталитическое вырезание своего домена из состава nsр3 [77]. Консенсусная последовательность, узнаваемая PLpro при протеолизе pp1a и pp1ab, имеет вид LXGG↓X, где L – Leu, лейцин, G – Gly, глицин, X – переменная аминокислота. Сайты расщепления PLpro в составе вирусных полипротеинов SARS-CoV-2 полностью идентичны таковым у известных родственных коронавирусов летучих мышей (RaTG13 и BANAL-52) и имеют высокую степень сходства с сайтами расщепления SARS-CoV-1 и MERS-CoV [77]. В геноме эукариотической клетки последовательность LXGG↓X встречается в составе регуляторного белка убиквитина (Ub, ubiquitin), а также в составе убиквитин-подобного белка ISG15 (interferon-stimulated gene product 15), играющего важную роль в защитном ответе клетки-хозяина в ответ на заражение вирусом [38, 81]. Известно, что посттрансляционные модификации сигнальных молекул в форме убиквитинирования и ISGилирования активируют врожденный иммунный ответ, и ферментативная активность PLpro, направленная на удаление этих модификаций, значительно подавляет противовирусный иммунный ответ [82]. Таким образом, PLpro является мультифункциональным белком, который играет существенную роль в процессинге вирусных полипротеинов, а также в созревании и сборке комплекса репликации и транскрипции. Кроме того, протеаза воздействует на белки клетки-хозяина, нарушая механизмы вирусного ответа, что способствует пролиферации и репликации вируса [83]. Все это делает PLpro привлекательной мишенью для противовирусной терапии.

Далее будут рассмотрены основные направления противовирусной терапии пациентов с COVID-19, а также основные группы веществ-ингибиторов SARS-CoV-2 и их эффективность.



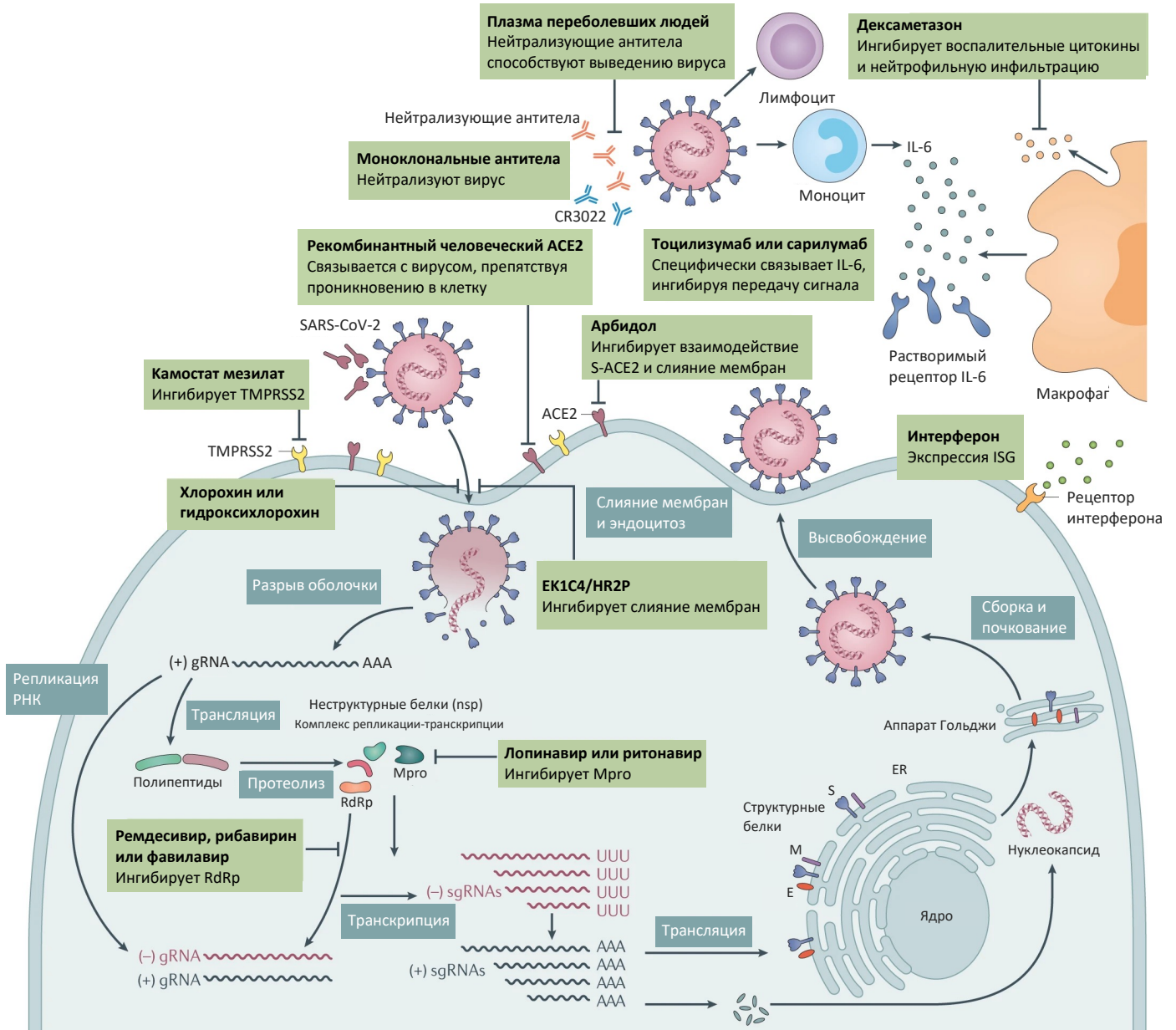
#### 2.1.4 Противовирусная терапия и ингибиторы SARS-CoV-2

Исследователи и производители лекарственных препаратов проводят крупномасштабные клинические испытания для оценки различных методов лечения COVID-19. Однако на сегодняшний день не существует эффективных методов лечения COVID-19 или противовирусных препаратов против SARS-CoV-2, хотя некоторые препараты демонстрировали преимущества в определенных подгруппах пациентов (будут рассмотрены далее).

По методу воздействия на вирус все препараты можно разделить на следующие подгруппы: ингибиторы проникновения вируса, ингибиторы вирусной репликации, иммуномодулирующие агенты, иммуноглобулиновая терапия [13] (Рисунок 12). К препаратам, которые могут препятствовать попаданию вируса в клетку, относятся камостат мезилат (camostat mesylate), хлорохин (chloroquine) и гидроксихлорохин (hydroxychloroquine).

Камостат мезилат является препаратом, одобренным в Японии для лечения панкреатита и послеоперационного рефлюкс-эзофагита. Вещество представляет собой ингибитор протеазы TMPRSS2, необходимой для проникновения SARS-CoV-2 в клетки, вследствие чего было предложено его использование в качестве ингибитора SARS-CoV-2 [84]. Ранее препарат показал эффективность в экспериментах на мышинной модели патологии (мыши дикого типа, инфицированные адаптированным для мышей штаммом SARS-CoV), где блокировка активности TMPRSS2 при помощи камостат мезилата предотвращала проникновение SARS-CoV в клетки и предотвратила летальный исход заболевания в 6 из 10 случаев [85]. В недавнем исследовании было показано, что камостат мезилат блокирует проникновение SARS-CoV-2 в клетки легких человека [86]. Таким образом, камостат мезилат потенциально может быть использован в качестве противовирусного препарата для борьбы с SARS-CoV-2, хотя клинических данных, подтверждающих его эффективность, пока недостаточно.

Хлорохин и гидроксихлорохин являются другими потенциальными препаратами, препятствующими проникновению SARS-CoV-2 в клетки, однако их эффективность также остается спорной. Данные вещества использовались для профилактики и лечения малярии и аутоиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка и ревматоидный артрит [87, 88]. Хлорохин и гидроксихлорохин способны ингибировать гликозилирование клеточных рецепторов и препятствовать связыванию вируса с рецептором хозяина, повышать pH эндосом и ингибировать слияние мембран [88]. В настоящее время не достигнуто научного консенсуса относительно их эффективности в лечении COVID-19. Согласно результатам нескольких крупных рандомизированных контролируемых исследований, использование хлорохина и гидроксихлорохина не несет клинической пользы и может принести вред пациенту [89].



**Рисунок 12. Репликация SARS-CoV-2 и потенциальные мишени для противовирусной терапии.** Потенциальные противовирусные препараты воздействуют на различные этапы репликации SARS-CoV-2, начиная от связывания вирусной частицы с рецептором ACE2 и проникновения вируса до репликации. Mpro – главная протеаза SARS-CoV-2; ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2; CR3022 – SARS-CoV-специфическое человеческое моноклональное антитело; E – E-белок SARS-CoV-2; EK1C4 – липопептид, полученный из EK1, ингибитора связывания коронавируса, воздействующего на HR1 домен S-белка SARS-CoV-2; ER – эндоплазматический ретикулум; gRNA – геномная РНК; HR2P – пептиды, полученные из гептадного повтора 2 S-белка SARS-CoV-2; IL-6 – интерлейкин-6; ISG – интерферон-стимулируемый ген; M – M-белок SARS-CoV-2; RdRp – РНК-зависимая РНК-полимераза; sgRNA – субгеномная РНК; S – S-белок SARS-CoV-2; TMPRSS2 – мембран-ассоциированная сериновая протеаза TMPRSS2. Адаптировано из [13].

Другой класс ингибиторов по механизму своего действия направлен на ингибирование репликации вируса. К таким препаратам относятся ремдесивир (remdesivir, GS-5734), фавилавир (favilavir, T-705), рибавирин (ribavirin), ингибирующие вирусную репликацию, а также лопинавир (lopinavir) и ритонавир (ritonavir), ингибирующие протеазу Mpro.

Ремдесивир представляет собой аналог аденозина, который включается в зарождающиеся цепи вирусной РНК и приводит к преждевременной терминации репликации [90]. Препарат успешно продемонстрировал себя в качестве ингибитора репликации широкого спектра РНК-вирусов (включая SARS/MERS-CoV) в первичной культуре эпителиальных клеток дыхательных путей человека, а также в мышцах и приматах [91–92]. Клинические исследования выявили меньшую потребность в кислородной поддержке при приеме ремдесивира у пациентов с COVID-19 [93–94]. Однако по результатам некоторых рандомизированных контролируемых исследований прием ремдесивира оказал незначительное или нейтральное влияние на смертность пациентов с умеренным и тяжелым течением COVID-19 [95].

Фавилавир (T-705) является противовирусным препаратом, разработанным в Японии для лечения вируса гриппа. Фавилавир был первым препаратом, одобренным в Китае для лечения коронавирусной инфекции [96]. Вещество представляет собой производное пирозинкарбоксамиды, механизм действия которого связан с селективным ингибированием вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы [97]. Фавилавир был одобрен в Китае, России и Индии для лечения COVID-19. Клиническое исследование пациентов с COVID-19 в Китае показало, что прием фавилавира приводит к более быстрому выведению вируса и в большей степени способствует улучшению результатов компьютерной томографии (КТ) органов грудной клетки, чем прием комбинации лопинавира и ритонавира [98]. Однако суммарный анализ рандомизированных контролируемых исследований приема фавилавира пациентами с COVID-19 говорит о том, что на данный момент однозначно оценить эффективность фавилавира для лечения людей с COVID-19 нельзя [99].

Комбинация препаратов лопинавир-ритонавир, используемая с начала 2000-х годов для лечения ВИЧ, также демонстрировала ингибирующую активность в отношении SARS-CoV и MERS-CoV в экспериментах *in vitro* [100–101]. Согласно последним клиническим испытаниям, прием комбинации препаратов не способствовал существенному снятию симптомов у пациентов с COVID-19 и не снизил количество госпитализаций [102].

Заражение SARS-CoV-2 вызывает сильный иммунный ответ организма, в ходе которого может развиваться цитокиновый шторм (гиперцитокинемия) [103–104]. Таким образом, иммуномодулирующие агенты, подавляющие чрезмерную воспалительную реакцию, могут быть потенциально использованы для терапии при COVID-19. К таким иммуномодулирующим

агентам относятся: дексаметазон (dexamethasone), тоцилизумаб (tocilizumab) и сарилумаб (sarilumab), бевацизумаб (bevacizumab), экулизумаб (eculizumab), интерфероновая терапия.

Дексаметазон – кортикостероид, часто используемый для снятия воспаления при широком спектре заболеваний благодаря своему противовоспалительному и иммунодепрессивному действию. Согласно рекомендациям Национального института здравоохранения, в настоящее время рекомендуется использовать системные кортикостероиды для терапии госпитализированных пациентов с COVID-19, нуждающихся в дополнительном кислороде [105]. В ходе клинических испытаний было показано, что раннее введение дексаметазона коррелировало со значительным снижением смертности среди госпитализированных пациентов с COVID-19 в США [106].

Тоцилизумаб и сарилумаб – два типа антител, специфичных к рецептору интерлейкина-6 (IL-6), ранее использовавшиеся для лечения различных типов артрита, включая ревматоидный артрит и синдром высвобождения цитокинов. Применение обоих препаратов продемонстрировало эффективность при лечении тяжелой формы COVID-19 путем ослабления цитокинового шторма [107]. Сравнительный анализ различных дозировок тоцилизумаба и сарилумаба при лечении пациентов, госпитализированных с COVID-19, был представлен в недавнем клиническом исследовании [108].

Бевацизумаб является препаратом на основе моноклональных антител, селективно связывающихся и ингибирующих биологическую активность фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), который эффективно применяется в онкотерапии различных новообразований [109]. Результаты недавних исследований предполагают потенциальную пользу бевацизумаба в качестве дополнительной терапии при лечении COVID-19 [110]. В исследовании сообщается об улучшении оксигенации у пациентов с тяжелой формой COVID-19, что, по мнению авторов, связано с уменьшением отека легких [110].

Экулизумаб – препарат на основе рекомбинантных гуманизированных моноклональных антител, ингибирующих белок комплемента C5. Экулизумаб применяется для лечения тяжелых патологий, вызванных неконтролируемой активацией системы комплемента [111]. Предварительные результаты показали, что прием экулизумаба вызывает снижение маркеров воспаления и уровня С-реактивного белка, что позволяет предположить его эффективность при лечении тяжелой формы COVID-19. В недавнем исследовании были описаны два случая COVID-19-ассоциированной тромботической микроангиопатии (ТМА), один из которых был успешно вылечен при помощи экулизумаба [112]. В другом исследовании описывался случай пациента, перенесшего трансплантацию сердца и госпитализированного с COVID-19 и атипичным гемолитико-уремическим синдромом, который был успешно вылечен при помощи экулизумабовой терапии [113]. Также был описан случай заражения COVID-19 пациента,

страдающего рефрактерной генерализованной миастенией, для лечения которой также применяется экулизумаб. Способствовал ли экулизумаб улучшению течения пневмонии, вызванной COVID-19, осталось неясным, однако было показано, что в данном случае применение экулизумаба не ухудшило исход COVID-19 и привело к благоприятному результату с точки зрения предотвращения миастенического криза у пациента [114].

Интерфероновый ответ является одним из основных механизмов защиты врожденного иммунитета от вирусной инвазии. Интерфероны индуцируют экспрессию различных стимулируемых интерфероном генов, которые могут препятствовать различным этапам репликации вируса. *In vitro* исследования показали, что SARS-CoV-2 является более чувствительным к интерферонам I типа, чем SARS-CoV, что позволяет предположить потенциальную эффективность последних при раннем лечении COVID-19 [115].

Иммуноглобулиновая терапия базируется на методах лечения на основе конвалесцентной плазмы и моноклональных антител. Конвалесцентная плазма (convalescent plasma, CP) представляет из себя плазму выздоровевших от заболевания людей и является одним из старейших методов лечения, который продолжает использоваться в наши дни при вспышках новых заболеваний. CP собирают у людей, которые ранее были инфицированы целевым вирусом и имеют высокий титр антител. Переливание CP обеспечивает пассивную иммунизацию реципиента антителами к целевому вирусу, подобно введению гипериммунного глобулина или моноклональных антител [116]. COVID-19 CP (CCP) – конвалесцентная плазма, собранная у пациентов, выздоровевших от COVID-19. Поскольку CP использовалась при лечении других коронавирусов, в начале пандемии COVID-19 была выдвинута гипотеза, что CCP может быть эффективна либо в качестве постконтактной профилактики, либо в качестве лечения COVID-19 [116]. В одном из первых исследований по эффективности CCP для лечения пациентов с тяжелой формой COVID-19, проведенном в Китае, статистически значимого улучшения у пациентов, получавших CCP, выявлено не было [117]. Результаты трех метаанализов показали неопределенные оценки эффективности CCP при лечении COVID-19 [118], при комбинированном лечении с сопутствующим применением противовирусных/противомикробных препаратов, стероидов и других видов поддерживающей терапии [119], а также при использовании CCP в качестве терапевтического агента у госпитализированных пациентов [120]. Также применение CCP осложняется возможными побочными эффектами переливания плазмы реципиентам [116].

Терапия с использованием моноклональных антител является эффективным видом иммунотерапии для лечения некоторых вирусных инфекций у отдельных пациентов. Моноклональные антитела, специфичные к S-белку, в особенности к RBD, остаются одним из наиболее многообещающих подходов к разработке эффективных моноклональных антител

против SARS-CoV-2 [121]. Несколько видов нейтрализующих моноклональных антител были разрешены для экстренного применения Европейским медицинским агентством (European Medicine Agency, EMA) в период с 2021 по 2022 год, среди которых сотровимаб, бемтеловимаб, комбинации касиримаб/имдевивамаб (REGN-COV2), бамланивимаб/этезевимб, тиксагевимаб/цилгавимаб (AZD7442) [122]. Применение данных моноклональных антител способствовало снижению количества госпитализаций и улучшению клинических исходов, однако все они были исключены из применения в связи со своей низкой эффективностью относительно новых штаммов SARS-CoV-2 [122]. Клиническая эффективность моноклональных антител по-прежнему ограничивается пациентами с ранними стадиями COVID-19 и легким течением заболевания [123]. Помимо этого, высокая стоимость производства моноклональных антител ограничивает их применение в странах с низким и средним уровнем дохода. Таким образом, в условиях пандемии использование альтернативных методов, таких как конвалесцентная плазма и химические противовирусные препараты, является более предпочтительным [123].

## 2.2 Генетически кодируемые сенсоры: принцип работы и преимущества

Генетически кодируемые сенсоры (ГКС) представляют собой синтетические молекулы, которые при экспрессии в живой системе (на уровне клеток, тканей или целого организма) позволяют визуализировать и количественно оценивать ферментативную активность и конформационное состояние белка интереса, изменение концентрации отдельных молекул, а также различные физиологические процессы, происходящие *in vivo* [124]. В отличие от синтетических красок ГКС не требуют инъекции извне и более пригодны для продолжительных экспериментов. Возможность экспрессии флуоресцентного белка в клетках, тканях или целом организме на генетическом уровне является главным преимуществом для подавляющего числа методов визуализации живых клеток, что выделяет ГКС относительно других методов регистрации и оценки сигнала [125].

В основе разработки большинства ГКС лежат флуоресцентные белки. По многим параметрам флуоресценция является идеальным инструментом для мониторинга внутриклеточных процессов. Методы анализа на основе флуоресценции позволяют с высокой точностью регистрировать чрезвычайно быстрые процессы как в рамках единичной клетки, так и в субклеточном пространственном разрешении [126]. Доступная на сегодняшний день широкая палитра флуоресцентных белков с различными физико-химическими свойствами позволяет сконструировать ГКС практически для любой научной задачи. В сочетании с развитием все более сложного и чувствительного оборудования для микроскопии ГКС на основе флуоресцентных белков представляют собой универсальный инструмент для неинвазивной визуализации процессов в живых клетках, который позволяет получить данные с пространственно-временным разрешением, недоступным при использовании традиционных биохимических методов [126].

ГКС на основе флуоресцентных белков (также, флуоресцентные биосенсоры) можно определить как экспрессирующиеся внутри клетки химерные белки, позволяющие исследователю зарегистрировать и количественно оценить интересующий параметр в живой системе. Основная функция любого сенсора состоит в преобразовании информации о физическом свойстве или состоянии системы в измеримые показания [126]. В случае флуоресцентных биосенсоров это означает преобразование различных биологических сигналов, таких как концентрация внутриклеточных мессенджеров, метаболитических соединений и других аналитов, или локализация, конформация и активность сигнальных белков в один из нескольких типов флуоресцентных сигналов. Таким образом, две основные компоненты любого флуоресцентного биосенсора можно определить как чувствительная компонента, детектирующая изменения интересующего параметра, и репортерная компонента, позволяющая исследователю количественно оценить эти изменения [126]. Чувствительная компонента чаще всего происходит из эндогенного клеточного белка, участвующего в изучаемом сигнальном пути и, таким образом,

по своей природе имеет чувствительность к целевому сигнальному событию (например, кальмодулин, чувствительный к изменениям концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ ). В других случаях изолированные белковые домены или последовательности пептидов также могут быть использованы для придания биосенсору желаемой чувствительности. В свою очередь, репортерная компонента обычно состоит из одного или нескольких вариантов флуоресцентных белков (или их фрагментов), связанных с сенсорной единицей таким образом, что вызванные сигналом изменения состояния сенсорной единицы изменяют поведение флуоресценции флуоресцентного белка [126]. Одним из наиболее важных преимуществ ГКС относительно других методов оценки и регистрации сигнала в живых системах является возможность использования природных сенсорных доменов, не нарушающих физиологию клетки, но при этом обеспечивающих максимальную чувствительность и специфичность практически для любого молекулярного или физиологического события или интересующего аналита [124].

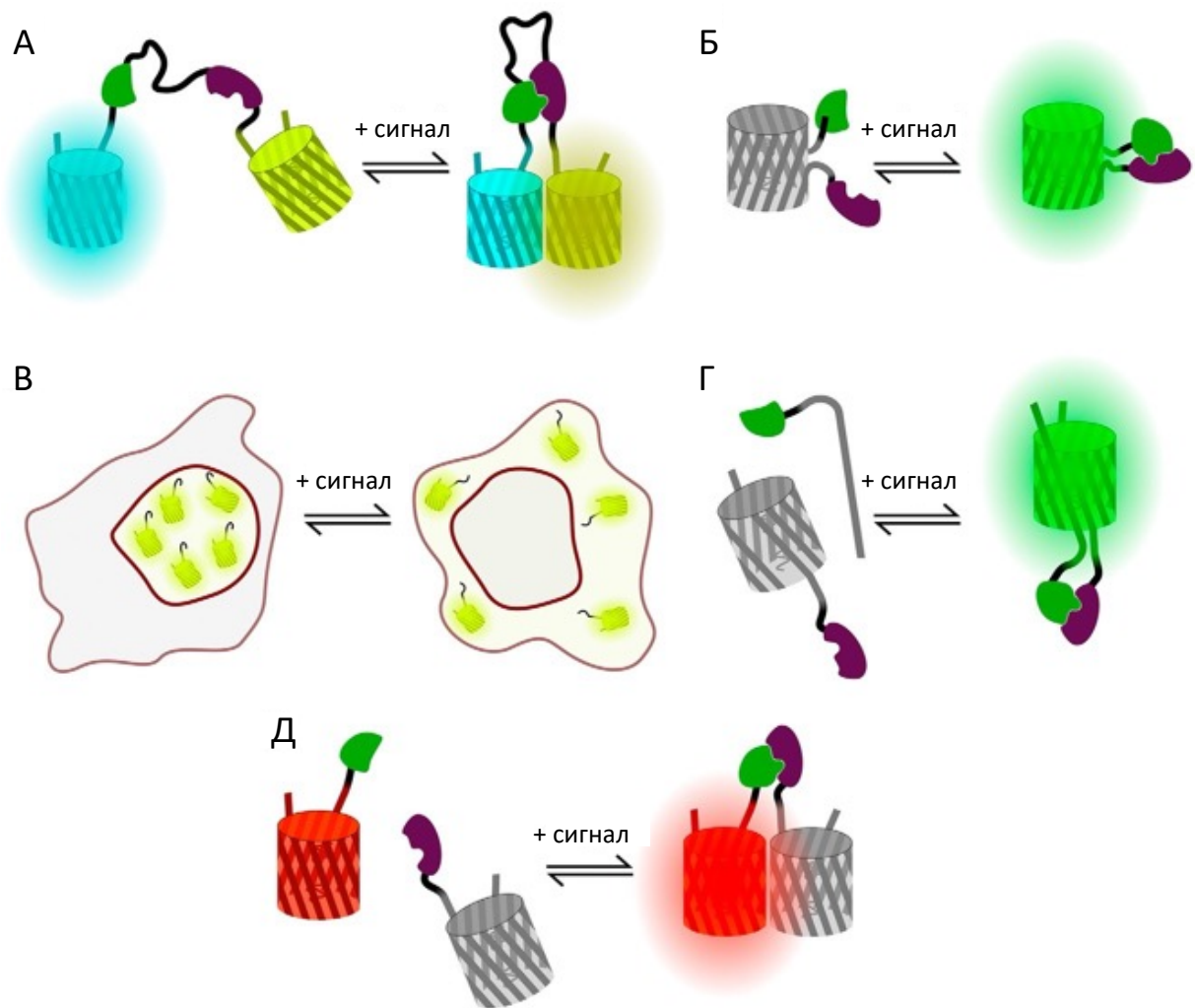
Различные свойства экспериментальных систем и молекулярных мишеней часто предполагают использование специфических компонент в составе биосенсора и оригинального дизайна. Тем не менее, существует несколько общих классов, на которые можно разделить все ГКС с точки зрения набора генетических элементов, требований к оборудованию и аналитическим подходам [127]. В разных классах ГКС существуют основные свойства, которые необходимо учитывать при дизайне, проверке или выборе биосенсора для конкретной научной задачи. Ключевое значение имеют селективность по отношению к интересующей мишени, а также чувствительность биосенсора к его субстрату. Селективность показывает, способен ли биосенсор избегать нецелевые сигналы, детектируя при этом только целевой аналит или взаимодействие, а чувствительность указывает на нижний порог концентрации аналита или степени взаимодействия, который возможно обнаружить с использованием данного биосенсора. Также важное значение имеет степень, в которой ГКС может нарушать функционирование системы, например, целиком изолируя пул своего субстрата или воздействуя на нецелевые компоненты, такие как перемещение или морфология клеточных органелл [127].

С биофизической точки зрения кинетика, сродство и обратимость работы биосенсора определяют, какие виды динамики можно детектировать при его использовании. Количественная оценка ответа биосенсора может быть ратиометрической, если регистрация ответа сенсора происходит в двух флуоресцентных каналах (как в случае с FRET-сенсорами), или интенсификационной, если изменение сигнала регистрируется в одном флуоресцентном канале (например, кальциевый сенсор GCaMP). Возможность использования ГКС для количественной оценки измеряемого параметра также сильно зависит от динамического диапазона сенсора и соотношения сигнал-шум. Соотношение сигнал-шум описывает диапазон сигнала, который можно детектировать при помощи сенсора, с учетом фонового шума от измерительного прибора



и автофлуоресценции. Термин «динамический диапазон» в применении к флуоресцентным биосенсорам понимается как максимальное изменение сигнала, которое может быть детектировано при «включении» и «выключении» сенсора [127].

По стратегиям детекции измеряемого параметра ГКС на основе флуоресцентных белков можно разделить на несколько основных классов: транслокационные биосенсоры; FRET-сенсоры; биосенсоры на основе одного флуоресцентного белка; биосенсоры на основе флуоресцентной комплементации; биосенсоры на основе димеризации [127] (Рисунок 13). Далее будет представлена краткая характеристика каждого класса ГКС.



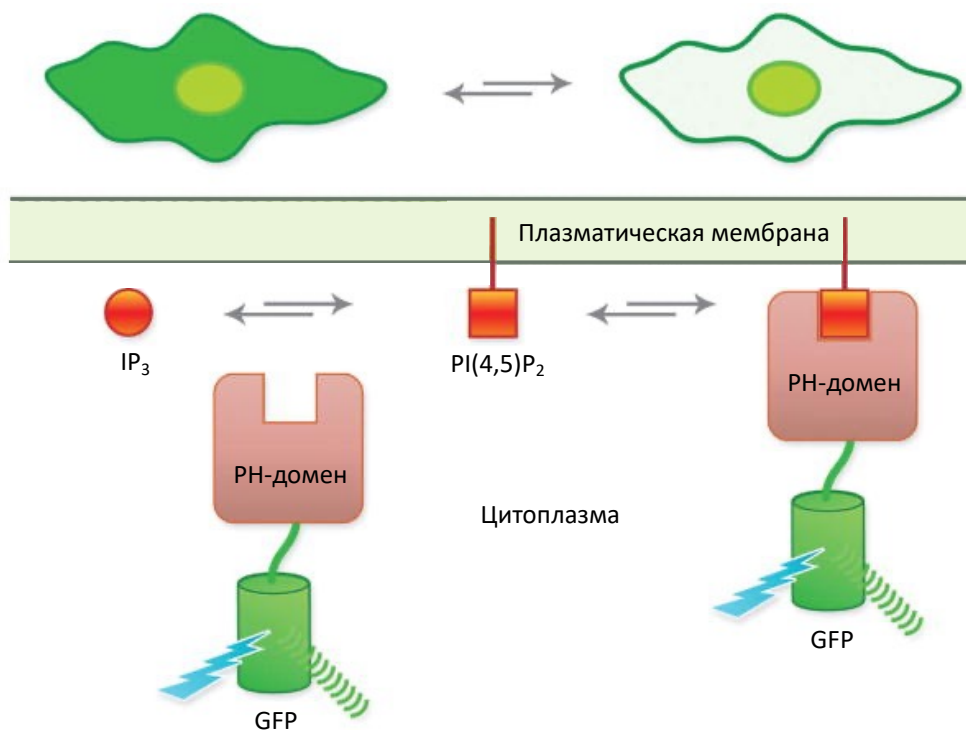
**Рисунок 13.** Основные классы генетически кодируемых сенсоров (ГКС) на основе флуоресцентных белков. (А) FRET-сенсоры; (Б) сенсоры на основе одного флуоресцентного белка; (В) транслокационные биосенсоры; (Г) биосенсоры на основе флуоресцентной комплементации; (Д) биосенсоры на основе димеризации. Термином «сигнал» в данном случае обозначен анализируемый аналит, процесс или взаимодействие. Адаптировано из [127].

### 2.2.1 Транслокационные биосенсоры

Транслокационные биосенсоры представляют собой класс генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров, в котором источником регистрируемого сигнала является клеточный компартмент, несущий флуоресцентную метку. В ходе эксперимента в качестве ответа сенсора оценивается перераспределение флуоресцентного белка или целевого белка, меченого флуоресцентным белком, между различными клеточными структурами (цитозолем, ядром, мембраной, эндосомами и т. д.) в ответ на различные внешние стимулы [124]. Транслокационные биосенсоры в основном разрабатываются с целью мониторинга различных сигнальных путей и других внутриклеточных процессов. Для этого флуоресцентный белок обычно присоединяют к различным киназам, фосфатазам, рецепторам и факторам транскрипции [124]. Основными преимуществами транслокационных биосенсоров являются легкость конструирования, широкий динамический диапазон (сравнимый или даже превышающий таковой у FRET-сенсоров), а также возможность использования любого флуоресцентного белка при дизайне биосенсора. Основным недостатком использования данного класса биосенсоров является сложный процесс количественного анализа сигнала: абсолютную эффективность транслокации оценить чаще всего не удаётся, и даже относительная её оценка зачастую предполагает трудоёмкую последующую обработку изображений [127]. При разработке транслокационного биосенсора важно убедиться в том, что слияние флуоресцентного белка с белком интереса, участвующего в каком-либо клеточном процессе, не нарушает естественную локализацию и функцию последнего [128]. Кроме того, для точного определения распределения белка интереса рекомендуется в составе сенсора использовать мономерный флуоресцентный белок. Использование димеризующегося или тетрамеризующегося флуоресцентного белка в составе транслокационного биосенсора может привести к нежелательной агрегации белка интереса или нарушить его естественную локализацию в клетке вследствие олигомеризации флуоресцентной метки [128].

В качестве примера транслокационных биосенсоров можно привести фосфоинозитид-чувствительные биосенсоры, способные обнаружить транслокацию или изменение распределения фосфоинозитидов в клетке [129]. Фосфоинозитиды (PIs, phosphoinositides) представляют собой универсальные сигнальные молекулы липидов, необходимые для выполнения разнообразных функций в клетке. Фосфоинозитиды принимают участие в таких процессах, как передача сигнала, транспорт через мембраны, регуляция цитоскелета, миграция и пролиферация клеток [129]. Фосфоинозитиды образуются в результате обратимого фосфорилирования фосфатидилинозитола по 3, 4 и 5 положению инозитольного кольца клеточными фосфатидилинозитолкиназами и фосфатазами. В результате этого процесса генерируются семь различных типов фосфоинозитидов – PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(3,5)P<sub>2</sub>, PI(4,5)P<sub>2</sub> и PI(3,4,5)P<sub>3</sub> – гетерогенное распределение которых формирует идентичность

клеточных мембран [129]. Каждая форма фосфоинозитидов взаимодействует с определенными молекулами соответствующего сигнального пути через фосфоинозитид-связывающие домены последних, например, домены PH (pleckstrin homology domain), PX (phox homology domain), FYVE и PDZ. Таким образом, конструкция фосфоинозитид-чувствительных биосенсоров основана на использовании фосфоинозитид-связывающего домена, меченного мономерным флуоресцентным белком. Например, транслокация слитого с GFP PH-домена фосфолипазы C  $\delta 1$  (PLC- $\delta 1$ ) млекопитающих позволяет оценить динамические изменения относительных концентраций  $PI(4,5)P_2$  и инозитолтрифосфата ( $IP_3$ ) [130].  $IP_3$  представляет собой сигнальную молекулу, образующуюся при гидролизе  $PI(4,5)P_2$  под действием PLC- $\delta 1$ . PH-домен фосфолипазы C  $\delta 1$  связывается как с мембран-ассоциированной формой  $PI(4,5)P_2$ , так и с полностью растворимой формой  $IP_3$ . При низкой концентрации  $IP_3$  биосенсор остается связанным с  $PI(4,5)P_2$ , в результате чего зеленый флуоресцентный сигнал детектируется на клеточной мембране. По мере повышения уровня  $IP_3$  молекулы  $PI(4,5)P_2$  вытесняются из сайта связывания PH-домена, и биосенсор высвобождается в цитоплазму клетки, в результате чего флуоресцентный сигнал распространяется в цитоплазме. Соответственно, динамику  $IP_3$  на мембране, возникающую в результате каталитической активности PLC- $\delta 1$  при реализации сигнальных путей, можно отследить в отдельных клетках в режиме реального времени. [125] (Рисунок 14).

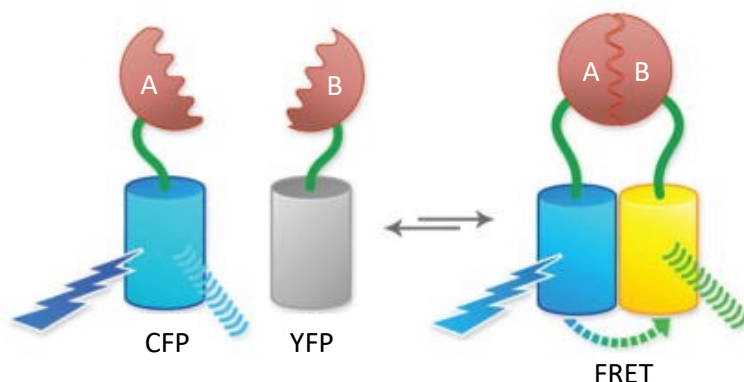


**Рисунок 14. Принцип работы фосфоинозитид-чувствительного транслокационного биосенсора.** Биосенсор, сконструированный на основе зеленого флуоресцентного белка GFP, слитого с PH-доменом фосфолипазы C  $\delta 1$ , позволяет оценить динамику  $PI(4,5)P_2$ – $IP_3$  в реальном времени. Адаптировано из [125].

### 2.2.2 FRET-сенсоры

FRET-сенсоры регистрируют изменение эффективности Ферстеровского переноса энергии между двумя спектрально различающимися флуоресцентными белками [124]. Ферстеровский перенос энергии (FRET, Förster resonance energy transfer) представляет собой физическое явление переноса энергии между двумя хромофорами, спектры которых перекрываются менее чем на 10 нм. Сигнальные пути, реализующиеся в ходе различных клеточных процессов, зависят от тесного взаимодействия сигнальных молекул, поэтому биосенсоры на основе FRET широко используются для мониторинга подобных молекулярных взаимодействий [128]. Для эффективного протекания FRET спектр эмиссии белка-донора должен перекрываться со спектром возбуждения белка-акцептора, при этом важное значение имеют ориентация белков относительно друг друга и расстояние между ними. Помимо этого, такие параметры как квантовый выход белка-донора (QY, quantum yield) и коэффициент экстинкции белка-акцептора (EC, extinction coefficient) также влияют на эффективность протекания FRET [131].

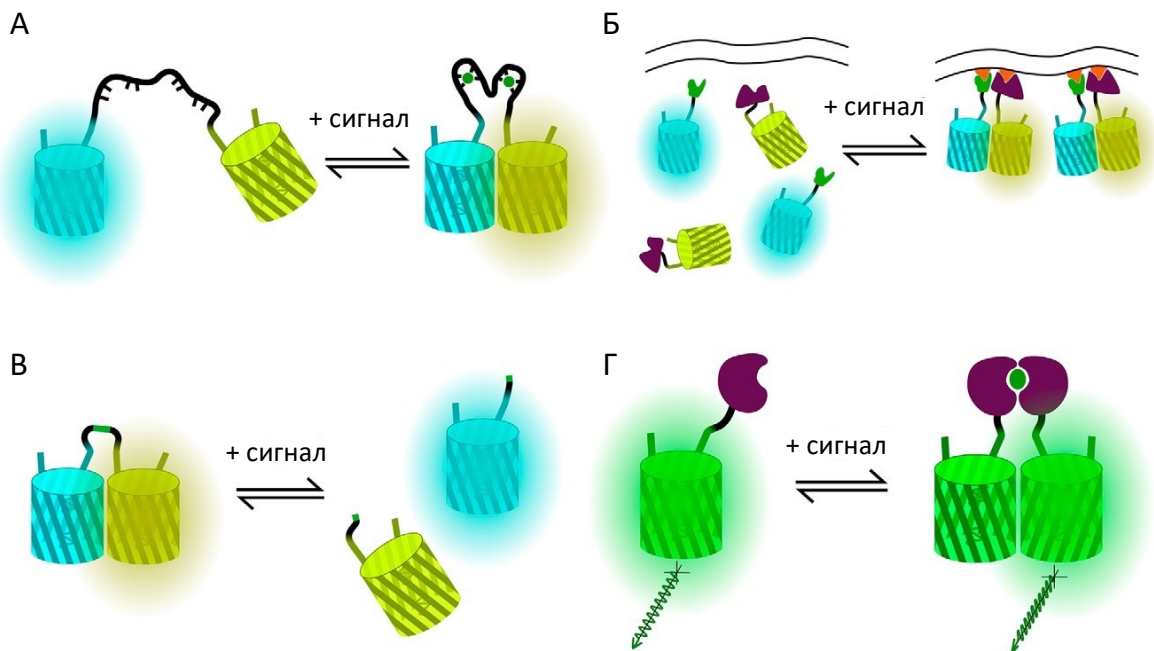
Наиболее известной FRET-парой, используемой при конструировании биосенсоров на основе FRET, является пара CFP-YFP (циановый и желтый флуоресцентный белок) [132] (Рисунок 15). Однако даже эта классическая пара белков несет ограничения, такие как побочные эффекты перекрывания спектров эмиссии и возбуждения, низкий квантовый выход CFP и относительно низкая фотостабильность и рН-стабильность YFP [133]. FRET-пары на основе зеленых и красных флуоресцентных белков преодолевают некоторые ограничения, характерные для пары CFP-YFP, демонстрируя большее разделение спектров и меньшую фототоксичность. Однако красные белки менее яркие и имеют склонность к формированию тетрамеров, что также снижает эффективность FRET. Поэтому при конструировании биосенсоров используются синтетически разработанные мономерные красные белки с повышенной яркостью и фотостабильностью [133].



**Рисунок 15. Схематическая иллюстрация FRET-сенсора на основе пары флуоресцентных белков CFP-YFP для детекции белок-белковых взаимодействий. В данном примере анализируемые белки обозначены буквами A и B. Адаптировано из [125].**

Говоря о FRET-сенсорах как о классе в целом, можно выделить два основных преимущества данных молекулярных инструментов: ратиометрический тип ответа и модульная композиция биосенсора. В качестве недостатка можно выделить низкий динамический диапазон в сравнении с интенсификационными сенсорами [127].

Генетически кодируемые FRET-сенсоры обычно состоят из двух компонент: (i) FRET-пара флуоресцентных белков, где спектр возбуждения акцептора значительно перекрывается со спектром эмиссии донора, и (ii) белки или пептиды, которые в ответ на сигнал или аналит изменяют ориентацию или расстояние между флуоресцентными белками во FRET-паре. Существует несколько вариантов архитектур FRET-сенсоров, включающих эти две компоненты (Рисунок 16). Унимолекулярные конформационные FRET-сенсоры представляют собой одну молекулу белка, в которой обычно FRET-пара фланкирует связывающий или взаимодействующий домен. Конформационные изменения, возникающие вследствие увеличения или уменьшения сигнала, изменяют расстояние между участниками FRET-пары, влияя тем самым на эффективность FRET. Бимолекулярные FRET-сенсоры содержат два отдельных взаимодействующих домена, присоединенных к FRET-паре. Наличие сигнала изменяет прямое взаимодействие между двумя доменами или их взаимодействие с другим набором молекул, изменяя тем самым расстояние между участниками FRET-пары. FRET-сенсоры на основе разрезания состоят из FRET-пары, соединенной линкером, содержащим сайт протеолитического

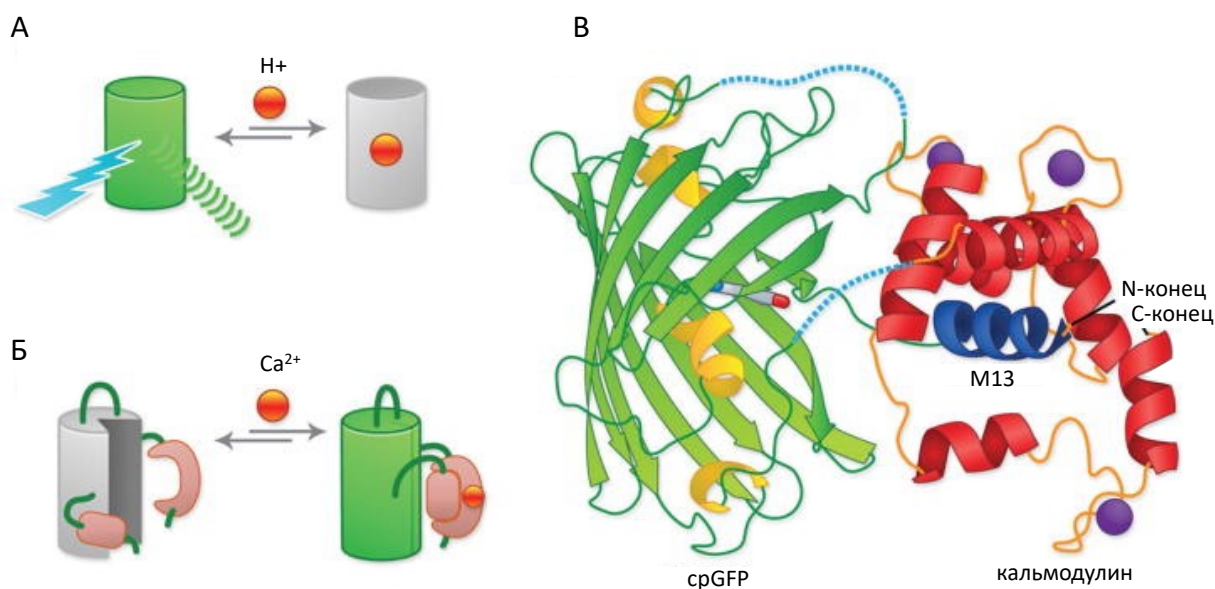


**Рисунок 16. Основные типы генетически кодируемых FRET-сенсоров. (А) Унимолекулярные конформационные FRET-сенсоры; (Б) бимолекулярные FRET-сенсоры; (В) FRET-сенсоры на основе разрезания; (Г) гомо-FRET-сенсоры. Термином «сигнал» в данном случае обозначен анализируемый аналит, процесс или взаимодействие. Адаптировано из [127].**

расщепления. При разрезании линкера FRET-пара разделяется на два отдельных флуоресцентных белка, вследствие чего FRET-сигнал снижается или полностью пропадает. Гомо-FRET-сенсоры димеризуются при детекции сигнала, и FRET между полученной парой идентичных флуоресцентных белков изменяет поляризацию излучаемого при флуоресценции света. В данном случае под «сигналом» подразумевается аналит, взаимодействие или процесс [127].

### 2.2.3 Биосенсоры на основе одного флуоресцентного белка

В ГКС на основе одного флуоресцентного белка в качестве измеряемого параметра выступает изменение интенсивности флуоресценции, профиля возбуждения или эмиссии одиночного флуоресцентного белка в ответ на интересующий биохимический стимул. Сенсор может состоять только из самого флуоресцентного белка (в этом случае используется естественная чувствительность флуоресцентного белка к аналитам), или также включать взаимодействующие домены, модулирующие флуоресценцию белка [127] (Рисунок 17). В последнем случае часто используются циркулярно пермутированные версии флуоресцентных белков, в которых концы молекулы перенесены в центр бочонка, что позволяет при слиянии концов эффективно модулировать доступность хромофора для растворителя. В сравнении с FRET-сенсорами, данный класс ГКС имеет ряд преимуществ, таких как малые размеры, более узкая полоса пропускания спектра, что позволяет комбинировать сенсор с другими флуоресцентными каналами, а также возможность использования большего разнообразия



**Рисунок 17. Генетически кодируемые сенсоры на основе одного флуоресцентного белка. (А)** Биосенсор с естественной чувствительностью флуоресцентного белка к аналиту (в данном случае, pH). **(Б)** Биосенсор, содержащий дополнительные белковые домены, чувствительные к лиганду (в данном случае,  $Ca^{2+}$ ). **(В)** Пространственная структура кальциевого сенсора GCaMP, полученная при помощи метода рентгеноструктурного анализа [134]. Адаптировано из [125].

флуоресцентных белков в составе сенсора. Основным недостатком ГКС на основе одного флуоресцентного белка является то, что большинство представителей этого класса сенсоров являются интенсиметрическими и поэтому могут улавливать только относительные изменения сигнала [127].

Одним из способов создания биосенсора на основе одного флуоресцентного белка является использование внутренней чувствительности определенных вариантов флуоресцентных белков (Рисунок 17, А). Часто в основе таких ГКС лежит зависимость флуоресценции от pH. Наибольший интерес в данном случае представляют варианты флуоресцентных белков, которые имеют видимые значения  $pK_a$ , близкие к физиологически значимым значениям pH [125]. Например, известно, что спектр возбуждения GFP дикого типа характеризуется двумя пиками на 395 и 475 нм, которые соответствуют протонированной и депротонированной форме Tyr66 в составе хромофора [135]. При этом контраст пиков в спектре возбуждения при изменении pH может быть дополнительно усилен мутациями остатков в окружении Tyr66. На основании этих фактов был создан рациометрический pH-чувствительный флуоресцентный белок под названием pHluorin, демонстрирующий обратимое изменение соотношения пиков возбуждения в физиологическом диапазоне pH от 5,5 до 7 [136].

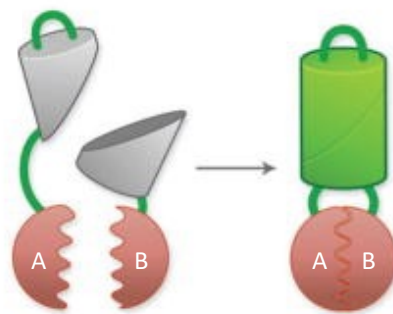
Также на основе белков mRFP и mStrawberry был создан красный флуоресцентный pH-чувствительный белок pHTomato. Биосенсор SynpHTomato, полученный путем слияния pHTomato с гликопротеином синаптических везикул – синаптофизин, был успешно использован для мониторинга активности нейронов [137].

Второй тип ГКС на основе одного флуоресцентного белка, характеризующийся более широким диапазоном целевых специфичностей, подразумевает наличие в составе биосенсора дополнительных белковых доменов, претерпевающих конформационные изменения в ответ на связывание мишени, например, лиганда (Рисунок 17, Б). При этом связывание лиганда провоцирует локальное искажение структуры флуоресцентного белка. Это искажение, в свою очередь, может погасить флуоресценцию из-за увеличения доступности хромофора для растворителя или изменить равновесие между протонированной и депротонированной формами хромофора [125]. Для обхода барьерной функции  $\beta$ -бочонка GFP-подобных флуоресцентных белков были созданы циркулярно пермутированные (cp, circularly permuted) флуоресцентные белки, в которых новые N- и C-концы молекул находятся в непосредственной близости от хромофора. Циркулярно пермутированные флуоресцентные белки нашли широкое применение в конструировании биосенсоров для мониторинга активности кальция. Одним из наиболее успешных биосенсоров для определения внутриклеточного уровня  $Ca^{2+}$  является GCaMP [138] (Рисунок 17, В). Дизайн сенсора основан на использовании циркулярно пермутированного зеленого белка cpGFP. N-конец cpGFP связан с пептидом M13 – фрагментом киназы легкой цепи

миозина, который представляет собой сайт связывания белка кальмодулина (CaM). При этом С-конец *cpGFP* в биосенсоре связан с самим кальмодулином. При связывании  $\text{Ca}^{2+}$  с CaM конформационные изменения, инициируемые взаимодействием  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-M13, вызывают последующее конформационное изменение *cpEGFP*, в результате чего интенсивность флуоресценции увеличивается [138]. Позже на основе других циркулярно пермутированных флуоресцентных белков были разработаны кальциевые биосенсоры различных цветов, что позволило осуществлять мониторинг нескольких сигналов одновременно. Например, красные сенсоры для мониторинга внутриклеточной активности кальция R-GECO [139] и RCaMP [140] были получены на основе циркулярно пермутированных красных флуоресцентных белков *cp-mApple* [141] и *cp-mRuby* [142], соответственно.

#### 2.2.4 Биосенсоры на основе флуоресцентной комплементации

ГКС на основе флуоресцентной комплементации преимущественно используются для изучения белок-белковых взаимодействий. В основе данного класса биосенсоров лежит использование флуоресцентных сплит-белков, в которых полипептидная цепь расщеплена на две части, при объединении которых формируется функциональный флуоресцентный белок [143]. При дизайне биосенсора каждый фрагмент сплит-белка соединяют с одним из целевых белков, чье взаимодействие предполагается изучить (Рисунок 18). При отсутствии взаимодействия между изучаемыми белками фрагменты сплит-белка находятся далеко друг от друга, и флуоресценция отсутствует. При взаимодействии изучаемых белков фрагменты сплит-белка сближаются, формируя функциональный хромофор, вследствие чего происходит генерация флуоресцентного сигнала. Представители данного класса биосенсоров обладают широким динамическим диапазоном, однако зачастую имеют низкую скорость «включения» вследствие необходимости созревания хромофора после формирования функционального флуоресцентного белка [127].



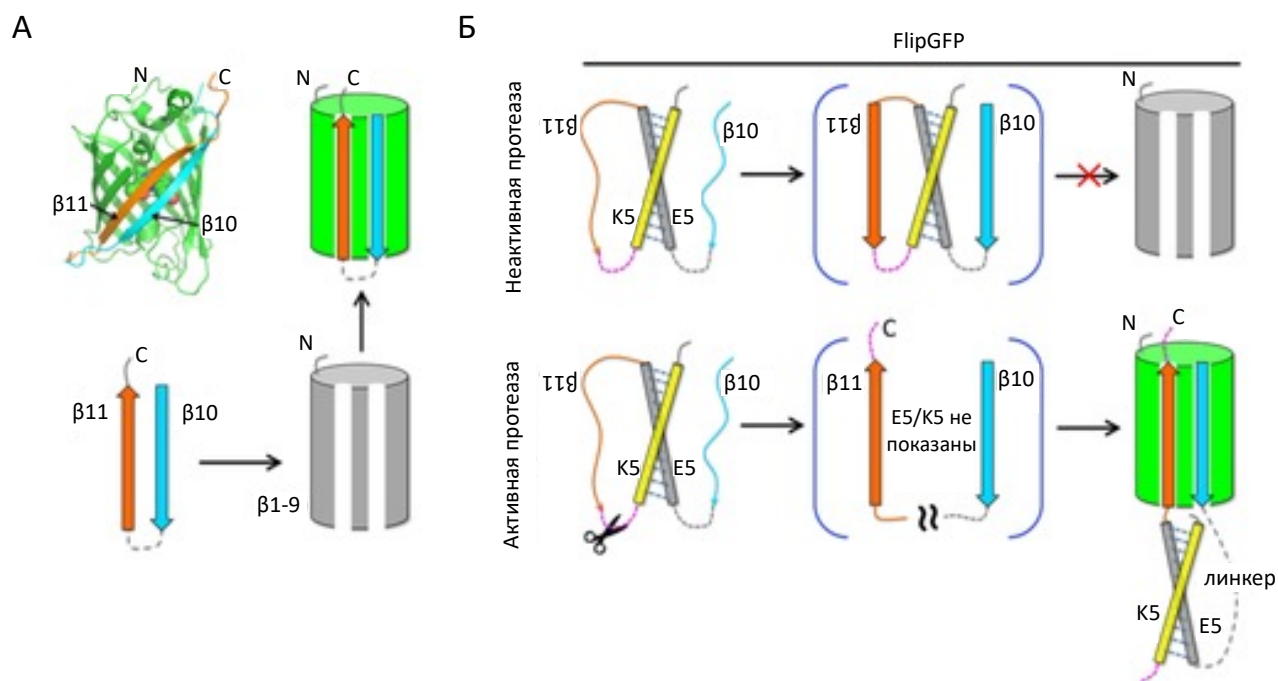
**Рисунок 18. Генетически кодируемые сенсоры на основе флуоресцентной комплементации.** Схематическая иллюстрация биосенсора на основе флуоресцентной комплементации для детекции белок-белковых взаимодействий. В данном примере анализируемые белки обозначены буквами A и B. Адаптировано из [125].



При изучении белок-белковых взаимодействий и агрегации белковых молекул белки интереса или их фрагменты присоединяют к разным концам сплит-белка. При наличии взаимодействия происходит восстановление функционального  $\beta$ -бочонка, в результате чего можно детектировать увеличение флуоресцентного сигнала. Биосенсор на основе флуоресцентной комплементации был впервые применен для обнаружения взаимодействия между bZIP-доменами транскрипционных факторов Fos и Jun в живых клетках [144]. Данный биосенсор был разработан на основе сплит-версии желтого белка YFP. Принцип флуоресцентной комплементации также применялся для обнаружения агрегации белков при нейродегенеративных заболеваниях. Например, N- и C-концевые фрагменты сплит-версии желтого флуоресцентного белка Venus были слиты с белком альфа-синуклеином, агрегация которого вызывает патологию Леви при болезни Паркинсона [145].

Цветовая палитра флуоресцентных сплит-белков была далее дополнена голубым (сплит-версия белка Cerulean [146]) и красными (сплит-версии белков mRFP, mCherry и mKate [147–149]) цветами.

В 2019 году для мониторинга активности протеаз был разработан способный к самосборке сплит-белок под названием FlipGFP [150] (Рисунок 19, А). Для разработки биосенсора на основе FlipGFP 10-й и 11-й  $\beta$ -тяж в составе молекулы GFP были отделены от остальной части  $\beta$ -бочонка



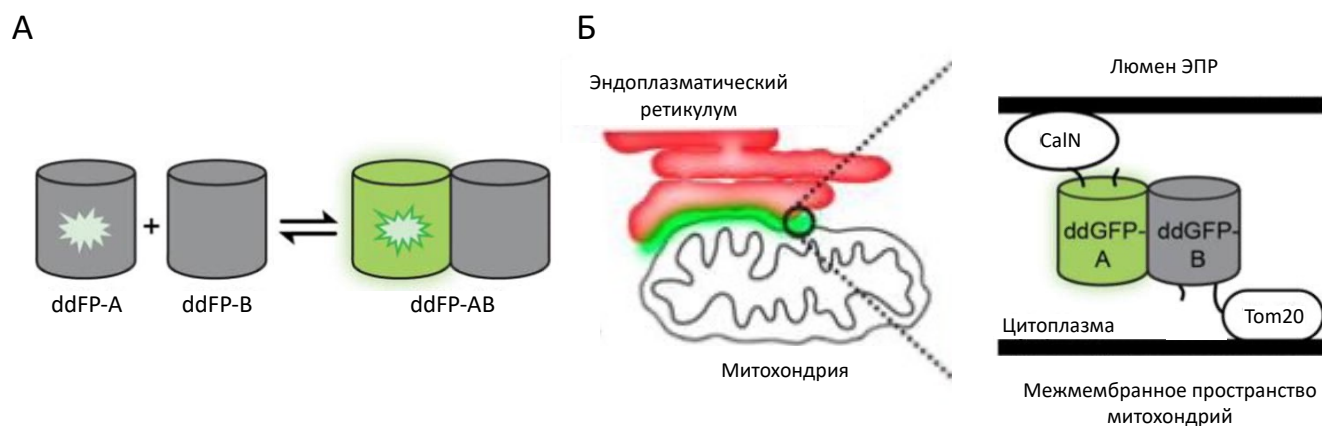
**Рисунок 19. Биосенсор на основе FlipGFP. (А)** Схематическое изображение конструкции FlipGFP. Перевернутые 10-й и 11-й  $\beta$ -тяжи обозначены голубым и красным цветом, соответственно. **(Б)** Механизм работы биосенсора на основе FlipGFP для мониторинга активности каспаз. Активация протеазы приводит к расщеплению линкера и переориентации 10-го и 11-го  $\beta$ -тяжей, в результате чего функция  $\beta$ -бочонка GFP восстанавливается, и в системе детектируется флуоресцентный сигнал. Адаптировано из [150].

GFP ( $\beta$ -тяжи 1–9) и соединены друг с другом при помощи сайта разрезания протеазы. В отсутствие активной протеазы формирования полноценного  $\beta$ -бочонка не происходило, и флуоресцентный сигнал в системе был очень слабым. При добавлении протеазы происходило протеолитическое расщепление сайта разрезания, в результате чего происходила переориентация  $\beta$ -тяжей с формированием функционального  $\beta$ -бочонка GFP, что приводило к увеличению зеленого флуоресцентного сигнала (Рисунок 19, Б). Полученный сенсор на основе FlipGFP был использован для мониторинга активности каспаз в ходе клеточного апоптоза и продемонстрировал широкий динамический диапазон и высокую яркость [150].

### 2.2.5 Биосенсоры на основе димеризации

ГКС на основе димеризации являются альтернативным методом для изучения белок-белковых взаимодействий. В данном случае биосенсор состоит из пары флуоресцентных белков, где одна копия белка содержит хромофор (копия-А), а вторая копия лишена хромофора (копия-В). В отсутствие взаимодействия копия-А флуоресцирует очень слабо, однако флуоресценция системы сильно возрастает при формировании гетеродимера копии-А и копии-В. Присоединение целевых белков к каждой копии позволяет детектировать их взаимодействие при увеличении флуоресценции системы вследствие гетеродимеризации [128]. Стратегия димеризации была успешно применена при строении биосенсоров для изучения динамики  $\text{Ca}^{2+}$  и каспазы-3 [151], а также для изучения области контакта мембран митохондрий и эндоплазматического ретикулума [152]. Динамический диапазон данного класса сенсоров сравним с таковым у FRET-сенсоров, хотя данный тип сенсоров является интенсификационным [127].

Для конструирования сенсоров на основе димеризации используются димеризационно-зависимые флуоресцентные белки (ddFP, dimerization-dependent fluorescent proteins). Технология на основе ddFP предполагает обратимое связывание двух темных мономеров флуоресцентных белков (ddFP-А и ddFP-В) с образованием флуоресцентного гетеродимерного комплекса (ddFP-АВ) [152] (Рисунок 20, А). При этом флуорогенный ответ является индикатором увеличения близости или эффективной концентрации мономеров. Впервые технология на основе ddFP была применена в красной флуоресцентной системе (ddRFP), полученной из флуоресцентного белка dTomato [153]. Вскоре палитра ddFP пополнилась желтыми (ddYFP) и зелеными (ddGFP) белками [152]. Биосенсор на основе ddGFP был успешно применен для мечения области контактов между мембранами митохондрий и эндоплазматического ретикулума, называемой митохондриально-ассоциированной мембраной (МАМ, mitochondria-associated membrane) [152,154]. В данном эксперименте мономер ddGFP-А был слит с С-концом митохондриального белка транслоказы внешней мембраны-20 (Tom20), а мономер ddGFP-В – с С-концом белка кальнексина (Caln) (Рисунок 20, Б). Tom20 представляет из себя белок внешней мембраны митохондрий,



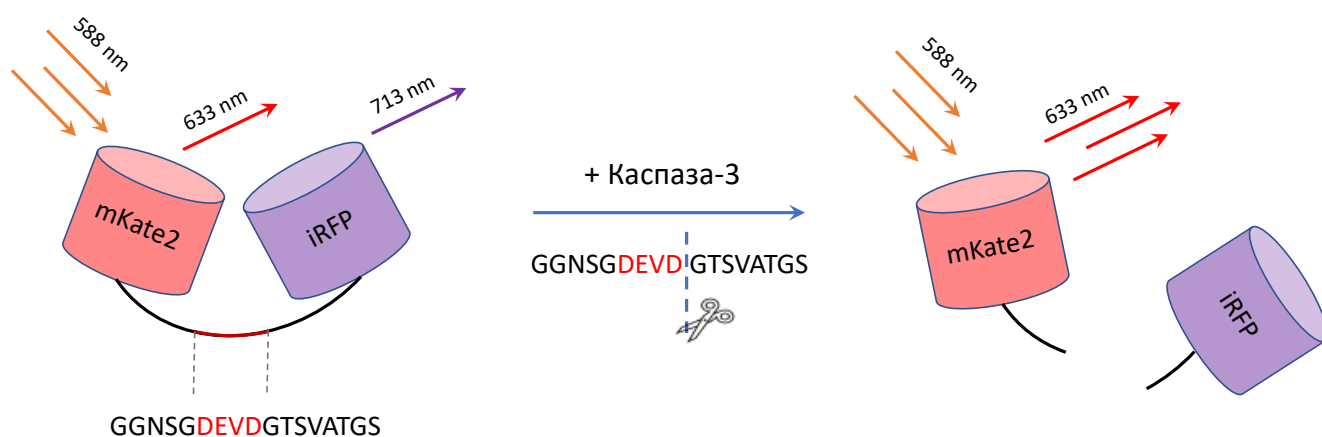
**Рисунок 20. Генетически кодируемые сенсоры на основе димеризации.** (А) Схематическая иллюстрация технологии на основе димеризационно-зависимых флуоресцентных белков (*ddFP*). Обратимое связывание нефлуоресцирующих мономеров *ddFP-A* (содержит хромофор, но не флуоресцирует) и *ddFP-B* (лишена хромофора) приводит к образованию флуоресцентного гетеродимера *ddFP-AB*. Хромофор изображен в виде вспышки. (Б) Схематическое изображение биосенсора на основе *ddGFP* для мечения митохондриально-ассоциированной мембраны (МАМ). Адаптировано из [152].

выступающий в роли рецептора в ходе белкового импорта [155]. Кальнексин является  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим шапероном, представленным в МАМ, где он отвечает за регуляцию гомеостаза  $\text{Ca}^{2+}$  [156]. При экспрессии в клетках млекопитающих каждой конструкции по отдельности флуоресцентный сигнал в районе МАМ не детектировался. При котрансфекции обеих конструкций в перинуклеарной области клеток наблюдалась заметная зеленая флуоресценция, локализованная в месте контактов митохондрий и ЭПР [152].

### 2.3 Генетически кодируемые сенсоры на протеазы

Одной из популярных областей применения ГКС является изучение активности клеточных протеаз. Протеазы представляют собой ферменты, катализирующие гидролиз пептидных связей в пептидных цепях. Протеазы классифицируют по аминокислотному составу их каталитических участков, выделяя аспарагиновые, глутаминовые, цистеиновые, сериновые и треониновые протеазы. Также выделяют матриксные металлопротеиназы, для каталитической активности которых необходимо наличие ионов металлов. У человека 1,7% генов кодируют протеазы, так как данные ферменты отвечают за основные жизнеобеспечивающие функции, такие как пищеварение, заживление ран и активация иммунной системы. Протеазы также являются важными биомаркерами многих заболеваний, таких как рак, сердечно-сосудистые заболевания, болезнь Альцгеймера, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), тромбоз и диабет. Ингибиторы протеаз, связанных с конкретным заболеванием, потенциально могут быть использованы в качестве препаратов для лечения этого заболевания. Важность протеаз привела к обширным усилиям по разработке скрининговых систем для изучения их ферментативной активности, а также для тестирования их ингибиторов в качестве потенциальных лекарственных средств [157].

В качестве инструмента для мониторинга активности протеаз в реальном времени часто используют FRET-сенсоры. В качестве примера можно привести генетически кодируемый дальнекрасный флуоресцентный сенсор для детекции активности каспазы-3 [158] (Рисунок 21). Каспаза-3 представляет собой цистеиновую протеазу, которая играет ключевую роль в процессах

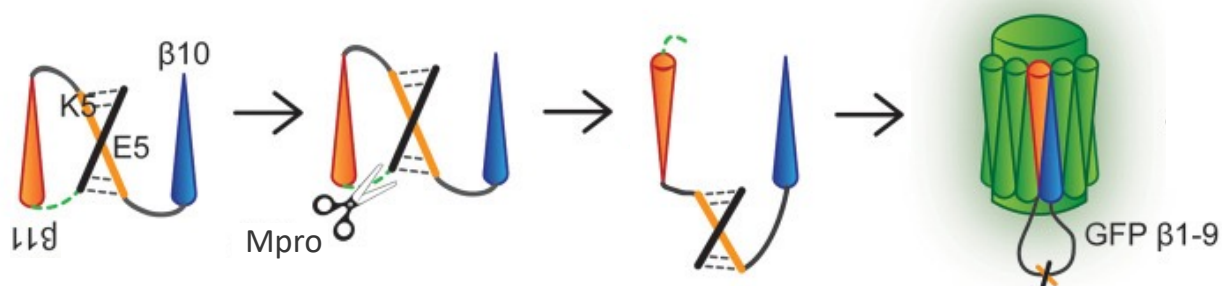


**Рисунок 21.** Схематическое изображение генетически кодируемого FRET-сенсора для мониторинга активности каспазы-3 на основе дальнекрасных флуоресцентных белков mKate2 и iRFP. FRET-пара белков mKate2 и iRFP разделена линкером, содержащим сайт узнавания каспазы-3 – DEVD. В отсутствие активной протеазы разрезания сайта не происходит, и в системе детектируется FRET-сигнал. При активации каспазы-3 во время клеточного апоптоза происходит протеолитическое расщепление сайта узнавания, в результате чего интенсивность флуоресценции донора (mKate2) увеличивается.

программируемой клеточной гибели – апоптозе [159]. В качестве FRET-пары в составе сенсора были использованы дальнекрасные белки mKate2 и iRFP, разделенные линкером с протеолитическим сайтом расщепления каспазы-3 (аминокислотный мотив DEVD).

При транзientной трансфекции биосенсора в культуре клеток млекопитающих наблюдалось равномерное распределение флуоресценции в дальнекрасном (mKate2) и инфракрасном (iRFP) каналах, возникающее в результате FRET-взаимодействия белков mKate2 и iRFP. Во время индуцированного стауроспорином клеточного апоптоза биосенсор mKate2-DEVD-iRFP демонстрировал воспроизводимый ответ, выражающийся в увеличении интенсивности флуоресценции донора (mKate2) в 1,6 раза, что соответствовало протеолитическому расщеплению сайта DEVD каспазой-3. Смещение флуоресценции в дальнекрасную область наделяет данный биосенсор определенными преимуществами, такими как возможность использования мультипараметрического мечения и потенциальная возможность использования биосенсора в тканях животных в ходе *in vivo* экспериментов [158].

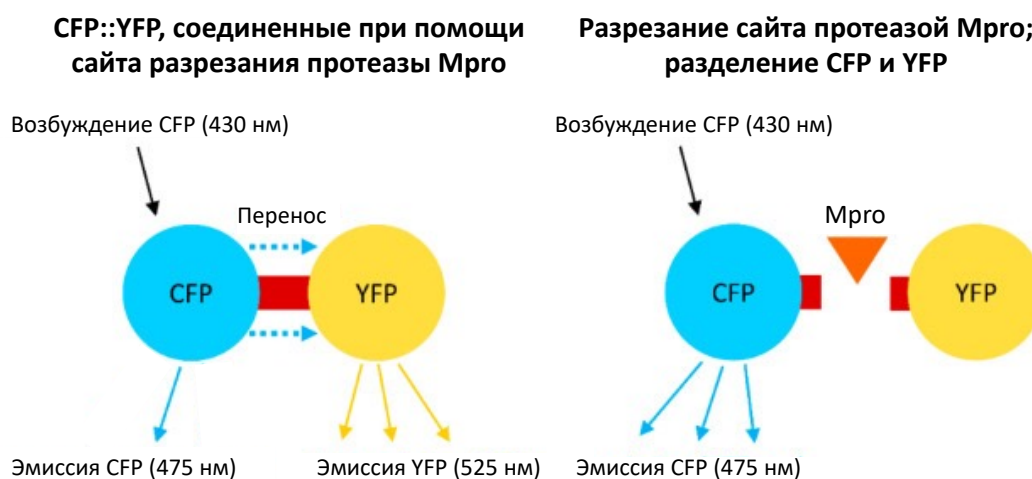
ГКС на основе белка FlipGFP также часто используются для изучения активности клеточных протеаз. Недавно на основе данного типа сенсоров были разработаны скрининговые системы для анализа ингибиторов коронавирусных протеаз – папаин-подобной протеазы PLpro [11] и главной протеазы Mpro [10] (Рисунок 22). Одной из проблем скрининга противовирусных веществ-кандидатов для борьбы с SARS-CoV-2 является высокая патогенность вируса. При работе с SARS-CoV-2 необходимо соблюдать уровень биобезопасности 3 (BSL-3, Biosafety level 3), что серьезно осложняет проведение эксперимента. В этом случае скрининговые системы на основе ГКС в клетках млекопитающих являются высоко эффективным, безопасным и почти



**Рисунок 22.** Схематическое изображение генетически кодируемого сенсора на основе FlipGFP для мониторинга активности главной протеазы Mpro SARS-CoV-2. В составе FlipGFP тяжи  $\beta 10$  и  $\beta 11$   $\beta$ -бечонка GFP удерживаются в параллельной ориентации при помощи гетеродимеризующихся пептидных спиралей E5/K5 и линкерной последовательности, содержащей сайт расщепления Mpro. При наличии активной протеазы расщепление сайта в составе линкера приводит к переориентации цепей с формированием функционального GFP и появлению зеленой флуоресценции. Адаптировано из [10].

единственным инструментом для выполнения данной задачи. Подобные скрининговые системы имеют два основных преимущества. Во-первых, использование клеточной системы позволяет исключить в ходе скрининга соединения, обладающие цитотоксическим эффектом, а также соединения, непроницаемые для клеточной мембраны. Во-вторых, расщепление субстрата в цитоплазме клетки физиологически сходно процессу расщепления вирусного полипротеина протеазой в инфицированной вирусом клетке [11]. В основе дизайна сенсора лежит использование белка FlipGFP [150]. Линкер, удерживающий 10-й и 11-й  $\beta$ -тяжи в составе молекулы FlipGFP в неактивной параллельной конформации, содержал сайт расщепления протеазы PLpro [11] или Mpro [10]. При экспрессии данного биосенсора в клетках млекопитающих в отсутствие активной протеазы видимой флуоресценции не наблюдалось. При экспрессии протеазы в клетках происходило разрезание сайта, что приводило к переориентации 10-й и 11-й  $\beta$ -тяжей в антипараллельную конформацию с образованием функционального  $\beta$ -бочонка GFP. В результате в системе наблюдался заметный зеленый флуоресцентный сигнал. При добавлении ингибиторов происходило дозозависимое снижение флуоресценции в результате ингибирования активности протеазы и невозможности формирования функционального  $\beta$ -бочонка GFP. Данная скрининговая система позволяет проводить тестирование веществ против SARS-CoV-2 на уровне биобезопасности 2 (BSL-2, Biosafety level 2).

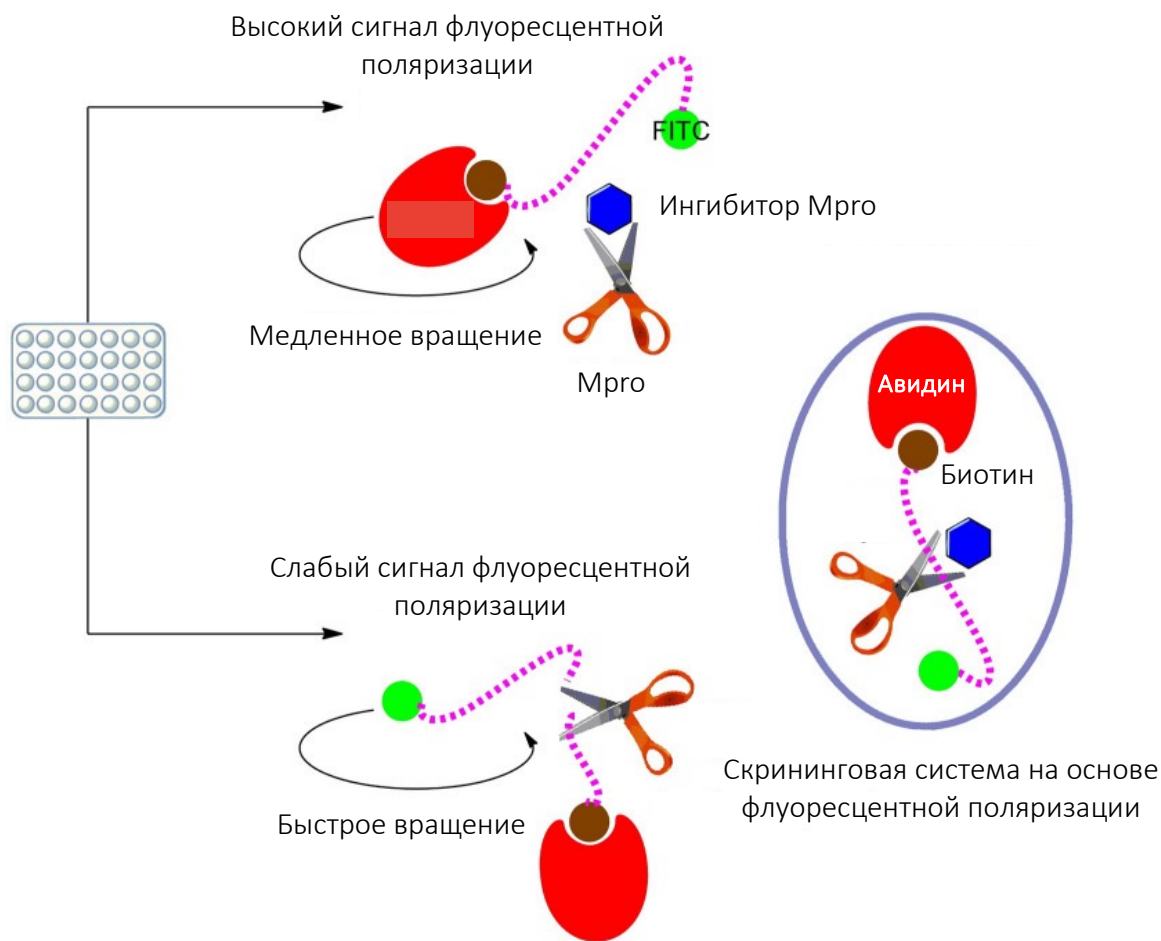
В другой скрининговой системе был использован комплексный подход для количественной и качественной оценки сразу нескольких параметров вирусной инфекции [12]. В первом подходе был использован FRET-сенсор на основе пары белков CFP-YFP (Рисунок 23),



**Рисунок 23.** Схематическое изображение генетически кодируемого FRET-сенсора на основе пары белков CFP-YFP для мониторинга активности главной протеазы Mpro SARS-CoV-2. Принцип работы системы анализа основан на Ферстеровском переносе энергии (FRET) от CFP к YFP. Флуоресцентные белки связаны между собой при помощи линкера, содержащего сайт разрезания протеазы Mpro. В присутствии активной протеазы происходит разрезание сайта, и FRET-сигнал системы снижается вследствие отделения CFP от фрагмента YFP. Адаптировано из [12].

разделенных сайтом узнавания протеазы Mpro. При экспрессии биосенсора в клетках млекопитающих в системе детектировался желтый флуоресцентный сигнал акцептора YFP, генерируемый в результате FRET от возбужденного донора CFP. В присутствии активной протеазы Mpro происходило разрезание линкера, и FRET-сигнал в системе не регистрировался. Добавление ингибитора Mpro (GC376) блокировало разрезание сайта узнавания протеазы, в результате чего в системе поддерживался устойчивый FRET-сигнал [12]. Таким образом, данный биосенсор на основе FRET адаптирован для специфического анализа потенциальных ингибиторов Mpro и может рассматриваться как новый вариант системы для тестирования соединений *in vitro* и первичного скрининга. В качестве второго подхода для оценки эффективности ингибитора использовался подход на основе FlipGFP, описанный выше [10]. Обе системы показали высокую эффективность и, по мнению авторов, могут быть использованы в качестве скрининговых систем для идентификации потенциальных ингибиторов SARS-CoV-2 [12].

Недавно была разработана система скрининга ингибиторов вирусных протеаз Mpro и PLpro на основе метода флуоресцентной поляризации (fluorescence polarization) [160–161] (Рисунок 24). Флуоресцентная поляризация широко используется для изучения молекулярных взаимодействий в растворе [162]. В основе метода лежит измерение вращения молекул. Флуоресцентная поляризация позволяет регистрировать связывание и диссоциацию малых молекул (например, небольшой пептид), несущих флуоресцентную метку, с более крупными молекулами, такими как белок. Небольшая флуоресцентно меченная молекула характеризуется быстрым вращением в растворе, поэтому при возбуждении поляризованным светом испускаемый свет остается деполаризованным и вызывает низкий сигнал флуоресцентной поляризации. Если малые флуоресцентные молекулы в растворе связаны с более крупными молекулами, то движение комплекса замедляется, вследствие чего при возбуждении поляризованным светом большая часть испускаемого света поляризуется. Таким образом, связывание флуоресцентно меченой небольшой молекулы с более крупной можно зарегистрировать и количественно измерить по увеличению сигнала флуоресцентной поляризации [162]. В данной скрининговой системе авторы использовали комбинацию метода флуоресцентной поляризации и авидин-биотиновой системы [160–161]. В качестве малой флуоресцирующей молекулы использовался пептид, состоящий из флуоресцеинизотиоцианата (FITC), соединенного с молекулой биотина при помощи линкера, содержащего сайт узнавания протеазы. В качестве крупной молекулы с медленным вращением использовался белок авидин. При наличии активной протеазы линкер подвергался протеолизу, в результате чего малый

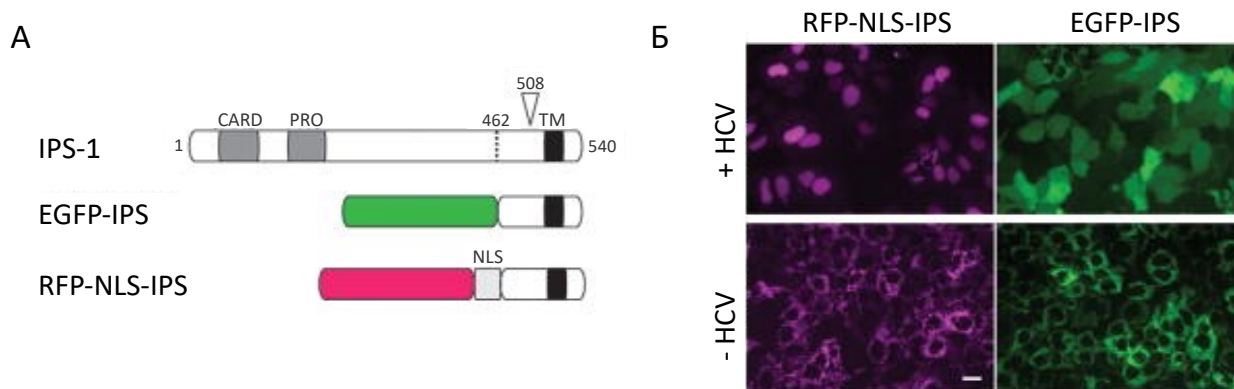


**Рисунок 24. Схематическое изображение системы скрининга ингибиторов протеазы Mpro SARS-CoV-2 на основе метода флуоресцентной поляризации.** Малая флуоресцирующая молекула представляет из себя пептид, состоящий из FITC, соединенного с биотином при помощи линкера, содержащего сайт узнавания Mpro. При наличии в системе авидина и активной протеазы разрезание сайта приводит к быстрому вращению малой молекулы и, следовательно, слабому сигналу флуоресцентной поляризации в системе. При добавлении ингибитора Mpro разрезания сайта не происходит, и флуоресцирующая молекула характеризуется медленным вращением, вследствие чего в системе наблюдается высокий сигнал флуоресцентной поляризации. Адаптировано из [160].

пептид, меченный FITC, испускал свет во всех направлениях вследствие быстрого вращения, и сигнал флуоресцентной поляризации оставался низким. При добавлении ингибиторов протеазы расщепления сайта не происходило, в результате чего малый пептид был связан с авидином, и комплекс имел низкую скорость вращения, что приводило к поляризации испускаемого света и увеличению сигнала флуоресцентной поляризации. Таким образом, метод позволяет быстро и эффективно проводить скрининг биологически активных соединений, потенциально способных ингибировать ферментативную активность Mpro или PLpro, при помощи оценки сигнала флуоресцентной поляризации [160–161].



Биосенсоры на основе внутриклеточной транслокации представляют еще один удобный инструмент для мониторинга активности протеаз в живых клетках. Многие из них основаны на использовании флуоресцентного белка, содержащего сигнал ядерной локализации (NLS, nuclear localization signal): в отсутствие протеазы флуоресцентный сигнал локализован в цитоплазме, однако при активном протеолизе начинает накапливаться в ядре клетки. В данном случае сайты разрезания соответствуют полипептидным последовательностям в полипротеине соответствующего вируса или белкам-мишеням вирусной протеазы. В одном из первых исследований в этой области был разработан биосенсор на основе противовирусного белка IPS-1 (также известного как MAVS, Cardif или VISA) [163]. IPS-1 локализуется на внешней мембране митохондрий и взаимодействует с цитозольной РНК-хеликазой RIG-I, чувствительной к двухцепочечной вирусной РНК [164]. Авторы разработали клеточную флуоресцентную репортерную систему для распознавания индивидуальных клеток, инфицированных вирусом гепатита С, в живых или фиксированных образцах. При конструировании биосенсора был использован С-концевой участок белка IPS-1, содержащий сайт узнавания протеазы вируса гепатита С (NS3-4A) и сигнал митохондриальной локализации. Участок белка был соединен с зеленым флуоресцентным белком (EGFP-IPS) или с красным флуоресцентным белком, содержащим сигнал ядерной локализации (RFP-NLS-IPS) (Рисунок 25, А). В стабильной линии клеток гепатомы человека (Huh-7.5), экспрессирующей первый или второй вариант биосенсора, наблюдались очаги точечной флуоресценции, соответствующие митохондриальной локализации

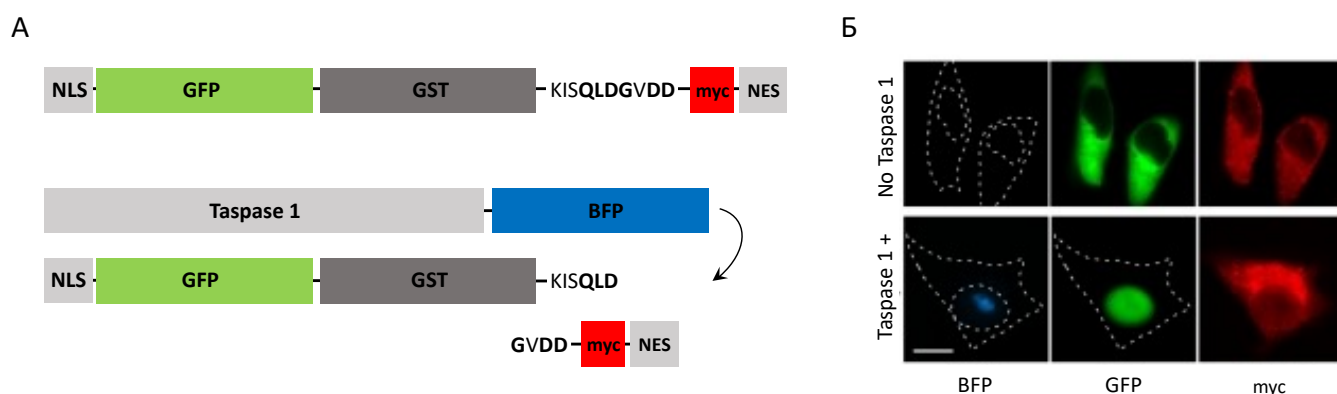


**Рисунок 25. Генетически кодируемый сенсор для обнаружения инфекции вируса гепатита С в индивидуальных клетках.** (А) Схематическое изображение строения белка IPS-1 и генетических конструкций репортерной системы с зеленым (EGFP-IPS) и красным (RFP-NLS-IPS) флуоресцентными белками. CARD – домен рекрутирования каспазы; PRO – пролин-богатый домен; TM – С-концевой трансмембранный домен, направляющий IPS-1 на внешнюю мембрану митохондрий. Сайт разрезания IPS-1 протеазой NS3-4A вируса гепатита С указан прямоугольной стрелкой. (Б) Механизм работы репортерной системы для обнаружения инфекции вируса гепатита С (HCV). В отсутствие инфекции обе конструкции локализуются в митохондриях (нижняя панель). При инфицировании клеток RFP-NLS-IPS накапливается в ядре, а EGFP-IPS диффузно распределяется в цитоплазме клетки (верхняя панель). Масштабная линейка 20 мкм. Адаптировано из [163].

ГКС. При инфицировании клеток вирусом гепатита С, EGFP-IPS демонстрировал перераспределение зеленой флуоресценции из точечного сигнала в митохондриях в диффузное окрашивание цитоплазмы, в то время как RFP-NLS-IPS позволял отслеживать транслокацию RFP в ядро в течение 10–16 часов после заражения [163] (Рисунок 25, Б).

Недавно аналогичный биосенсор был разработан для чувствительного обнаружения инфекции в индивидуальных клетках, зараженных энтеровирусом 71 (EV71), протеаза 2А которого также расщепляет IPS-1 [165]. Биосенсор данной конструкции потенциально может быть использован для обнаружения инфекции различных вирусов, поскольку было показано, что IPS-1 подвергается расщеплению протеазами цитомегаловируса [166], MERS [167], вируса гепатита А [168–169] и других инфекций [170]. Примечательно, что аналогичные биосенсоры описаны и для других белков противовирусного ответа клетки-хозяина [171].

В 2011 году группой немецких ученых был разработан транслокационный биосенсор для изучения активности таспазы 1 (Taspase1) [172]. Таспаза 1 (треониновая аспартаза 1) представляет собой протеазу, осуществляющую расщепление белка смешанной линии лейкоза (MLL, mixed lineage leukemia) [173]. Помимо сайта разрезания таспазы 1 из MLL-белка в состав биосенсора также входили GST-таг, репортерный флуоресцентный белок GFP, а также два сигнала локализации – NLS (nuclear localisation signal) и NES (nuclear export signal) (Рисунок 26, А). Так как сигнал ядерного экспорта (NES) является более сильным сигналом, чем NLS, то в



**Рисунок 26. Генетически кодируемый транслокационный биосенсор для изучения активности таспазы 1 в живых клетках. (А) Схематическое изображение доменной организации и принципа работы биосенсора на активность таспазы 1. Дизайн биосенсора основан на использовании GST, GFP, комбинации сигналов NLS и NES (снабжен Мус-тагом), а также сайта разрезания таспазы 1 из MLL-белка (KISQLDGVDD). В отсутствие протеазы биосенсор циркулировал между ядром и цитоплазмой, преимущественно локализуясь в цитоплазме. При котрансфекции биосенсора с плазмидой Taspase1-BFP, экспрессия протеазы вызывает протеолитическое расщепление биосенсора, инициируя накопление зеленого флуоресцентного индикаторного белка в ядре. (Б) Репрезентативные изображения клеток HeLa, экспрессирующих биосенсор для изучения активности таспазы 1 в отсутствие (верхняя панель) и в присутствии протеазы (нижняя панель). Масштабная линейка 10 мкм. Адаптировано из [172].**

отсутствие таспазы 1 биосенсор локализовался преимущественно в цитоплазме клетки. Экспрессия протеазы приводила к разрезанию сайта узнавания в составе сенсора и накоплению флуоресцентного индикаторного белка в ядре (Рисунок 26, Б). Полученный биосенсор был успешно использован авторами для изучения протеолитической активности таспазы 1 и для скрининга библиотеки ее потенциальных ингибиторов [172].

### 3. Материалы и методы

#### 3.1 Молекулярно-генетические методы

##### 3.1.1 Амплификация последовательностей ДНК

Амплификацию ДНК осуществляли при помощи полимеразной цепной реакции. Амплификацию проводили в ПЦР-амплификаторе MiniAmp Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems). В качестве матрицы использовали 50–100 нг плазмидной ДНК. Реакцию проводили в 50 мкл с использованием 50X смеси полимераз Encyclo (Евроген), 10X Encyclo буфера (Евроген), 50X смеси dNTP (Евроген), 10 мкМ прямого и обратного праймеров и деионизированной, свободной от нуклеаз воды (далее – mQ). Для амплификации были установлены следующие параметры: число циклов – 30; предварительная денатурация – 95 С, 1 мин; денатурация – 95 С, 15 сек; отжиг – 60 С, 20 сек; элонгация – 72 С, 1–2 мин.

ПЦР-анализ колоний *E. coli* проводили при помощи полимеразной цепной реакции с использованием реакционной смеси ScreenMix-HS (Евроген) согласно протоколу производителя. Для проведения ПЦР-анализа использовались следующие параметры: число циклов – 30; предварительная денатурация – 95 С, 5 мин; денатурация – 95 С, 15 сек; отжиг – 60 С, 20 сек; элонгация – 72 С, 1–2 мин.

##### 3.1.2 Сборка генно-инженерных конструкций по системе MoClo

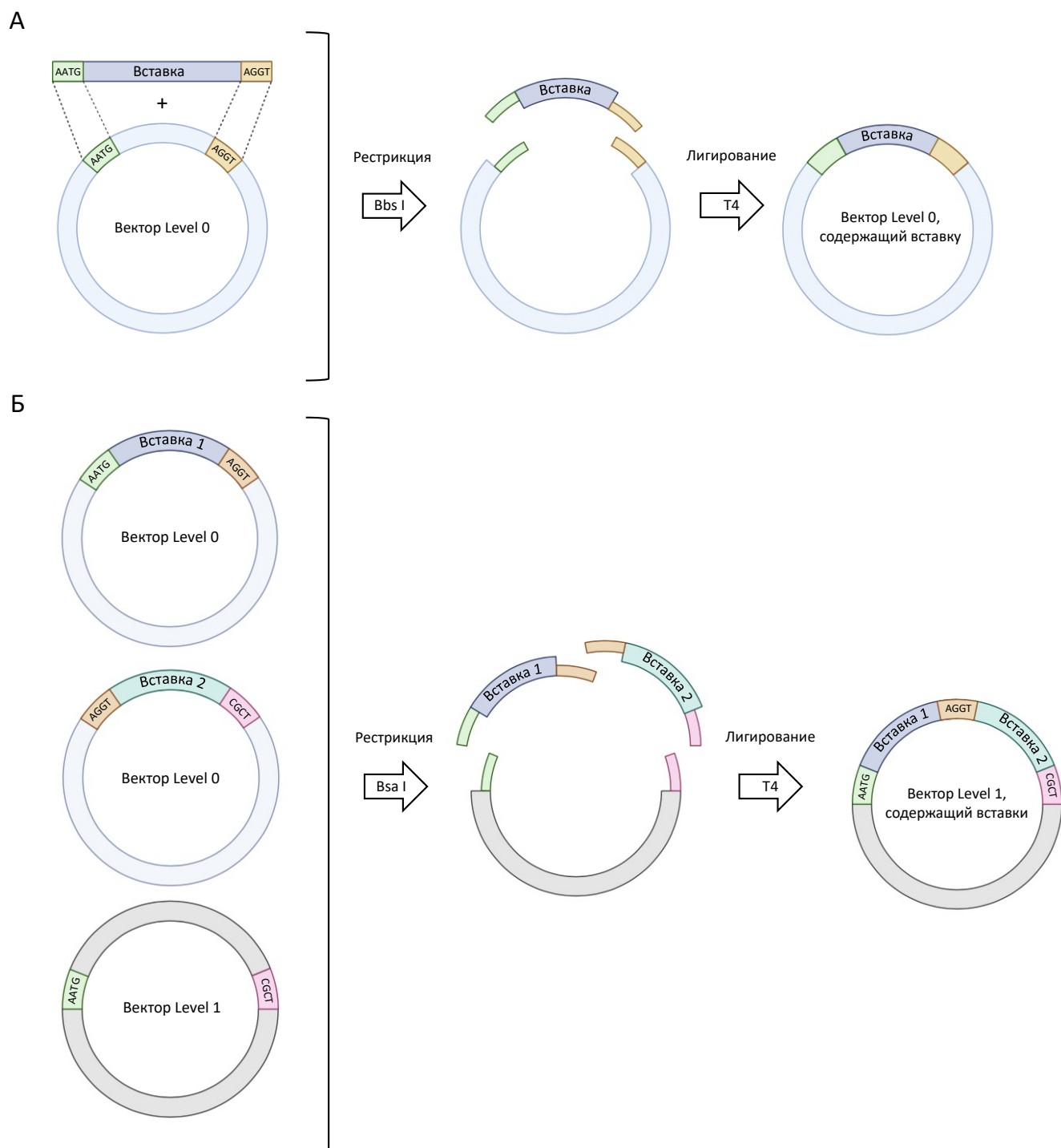
Сборка всех генно-инженерных конструкций, использованных в данной работе, проводилась с использованием метода «Golden Gate», позволяющего осуществлять сборку нескольких фрагментов ДНК в одной пробирке с использованием рестриктаз IIS типа. Принцип метода, разработанного в 2008 году [174], основан на специфической способности эндонуклеаз рестрикции IIS типа производить разрезание молекулы ДНК за пределами своего сайта узнавания [175]. При размещении сайтов узнавания на 5'- и 3'-концах ДНК-фрагмента в противоположной ориентации, они будут удалены в ходе процесса рестрикции. Это позволяет беспрепятственно соединять путем лигирования два фрагмента ДНК, фланкированные совместимыми выступающими «липкими» концами. Поскольку в ходе клонирования сайты рестрикции IIS типа могут быть спроектированы для создания различных липких концов, это дает возможность осуществлять направленную сборку нескольких ДНК-фрагментов с формированием полноценной транскрипционной единицы. Сборка генно-инженерных конструкций по методу «Golden Gate», состоит из двух этапов, которые происходят в рамках одной и той же реакции: рестрикция фрагмента ДНК, фланкированного липкими концами, содержащими сайты узнавания рестриктазы IIS типа, и последующее лигирование образованных на предыдущем этапе

фрагментов по совместимым липким концам. При этом цикл рестрикция-лигирование в ходе одной реакции повторяется несколько раз.

Позже, на основе метода «Golden Gate» авторы разработали стратегию модульного клонирования под названием «MoClo», позволяющую систематически собирать полноценные эукариотические транскрипционные единицы (level 1) и мультигенные конструкции (level 2) из базовых стандартизированных модулей (level 0) [174]. На первом этапе клонирования происходит сборка модулей level 0, которые обычно представляют из себя промотор, 5'- и 3'-нетранслируемые регионы, кодирующую последовательность, сигнальные пептиды, маркерный флуоресцентный белок, терминатор. При этом положение каждого модуля в составе будущей транскрипционной единицы определяется составом его липких концов. На втором этапе происходит сборка модулей level 0 в вектор level 1, который обычно представляет из себя готовую транскрипционную единицу. При необходимости получения мультигенного конструкта, несколько модулей level 1 собираются в вектор level 2, в котором положение элементов также определяется составом липких концов. Отбор положительных клонов производится по методу бело-голубой селекции, гены которой несут все базовые векторы level 0, level 1 и level 2. Принцип сборки плазмид по методу MoClo схематично представлен на рисунке 27.

В данной работе клонирование MoClo проводили согласно протоколу, описанному авторами статьи [174]. Для реакции использовали рестриктазы BpiI (BbsI) и Eco31I (BsaI) (Thermo Scientific) и T4 ДНК-лигазу (Евроген). Для сборки плазмид уровня level 0 использовали 50–100 нг вектора и 100–200 нг очищенного ПЦР-продукта для вставки. Для сборки транскрипционных единиц (плазмид уровня level 1) использовали 50–100 нг вектора и 50–100 нг плазмид level 0 со вставкой (промотор, кодирующая последовательность, клеточные локализации, маркерный флуоресцентный белок, терминатор). Реакцию проводили в 10 мкл с использованием 1 мкл (10 ед.) рестриктазы, 1 мкл (100 ед.) лигазы, 10X Overnight ligation буфера (Евроген) и mQ в ПЦР-амплификаторе MiniAmp Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems) при следующих параметрах: число циклов – 25; инкубация при 37 С – 1:30 мин; инкубация при 16 С – 3 мин.

В некоторых конструкциях при сборке плазмид уровня level 0 вместо очищенного ПЦР-продукта использовались олигонуклеотиды, содержащие соответствующие липкие концы. В этом случае отжиг олигонуклеотидов проводили в ПЦР-амплификаторе при постепенном уменьшении температуры с 95 С до 21,5 С с интервалом в 0,5 градуса; время инкубации при каждом значении температуры составляло 15 секунд. Реакцию проводили в 10 мкл с использованием 4 мкл (10 мкМ) прямого и 4 мкл (10 мкМ) обратного олигонуклеотидов и 2 мкл 10X Overnight ligation буфера. Далее 1 мкл смеси, полученной в ходе реакции, использовали в качестве вставки для сборки плазмиды level 0.



**Рисунок 27. Схематическая иллюстрация принципа сборки плазмид по методу MoClo. (А)** Сборка базового модуля Level 0. Вектор и вставка несут совместимые липкие концы, содержащие сайт узнавания рестриктазы IIS типа *BbsI*. После этапа рестрикции T4 ДНК-лигаза бесшовно соединяет между собой комплементарные липкие концы вектора и вставки. Полученный в результате цикла рестрикция-лигирование вектор не содержит сайтов узнавания *BbsI*. **(Б)** Сборка плазмиды Level 1 из двух базовых модулей Level 0. Обработка рестриктазой IIS типа *BsaI* и последующее лигирование по совместимым липким концам позволяет осуществлять бесшовную сборку плазмиды Level 1 из двух и более базовых элементов в ходе одной реакции в одной пробирке. В качестве примера на рисунке показаны векторы Level 0, несущие липкие концы AATG-AGGT, AGGT-CGCT, и вектор Level 1, несущий липкие концы AATG-CGCT.

### 3.1.3 Гель-электрофорез

Электрофорез ДНК проводили в 1,2% агарозном геле (Агароза LE 2, Хеликон). В качестве буфера для электрофореза использовали 1% TAE-буфер (40 мМ трис-ацетат pH 7,6, 1 мМ EDTA) с добавлением 0,006% бромистого этидия (Хеликон). Пробы ДНК смешивали с буфером для нанесения 4x Gel Loading Dye, Blue (Евроген). Для определения длины молекул ДНК использовали маркер 1 kb DNA Ladder (Евроген). Гель-электрофорез проводили в камерах для горизонтального электрофореза Sub Cell GT (Bio-Rad) при электрическом напряжении 150 В в течение 15 минут. Результаты электрофореза визуализировали при помощи G:BOX F3 gel doc system (Syngene).

Препаративный электрофорез проводили при электрическом напряжении 100 В в течение 30 минут. Результаты электрофореза визуализировали при помощи Spectroline CC-80 (Spectronics Corporation). Образец нужной длины вырезали из геля при помощи скальпеля и далее проводили экстракцию ДНК из агарозного геля при помощи набора Cleanup Mini (Евроген) (см. главу 3.1.6).

### 3.1.4 Рестрикция

Рестрикцию проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции FastDigest Restriction Enzymes (Thermo Fisher Scientific). Для реакции использовали 1 мкг плазмидной ДНК. Реакцию проводили в 20 мкл с использованием 10X FastDigest Green Buffer (Thermo Fisher Scientific), 1 мкл соответствующей рестриктазы FastDigest и mQ. Реакционную смесь инкубировали в термостате TDB-120 (Biosan) при 37 С в течение 30 мин. Для выделения ДНК и удаления продуктов неполной рестрикции проводили препаративный гель-электрофорез реакционной смеси и экстракцию ДНК из агарозного геля.

### 3.1.5 Лигирование

Лигирование проводили с использованием T4 ДНК-лигазы (Евроген). Реакцию проводили в 10 мкл с использованием 10X Overnight ligation буфер (Евроген), 1 мкл T4 ДНК-лигазы (100 ед.), 50 нг линейаризованного вектора, вставки (соотношение вектор:вставка = 1:5) и mQ. Лигазную смесь инкубировали в охладителе проб SC-2D (Bioson) при 14 С в течение ночи.

### 3.1.6 Очистка ДНК из агарозного геля и реакционных смесей

Для очистки ДНК использовали набор Cleanup Mini (Евроген). Экстракцию ДНК из агарозного геля (препаративный гель-электрофорез) и реакционных смесей (ПЦР, лигирование) проводили согласно протоколу производителя с использованием спин-колонок с уменьшенным фильтром и растворов из набора Cleanup Mini. Элюцию проводили в 12 мкл mQ. Концентрацию

очищенной ДНК определяли при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

### **3.1.7 Трансформация компетентных клеток *E. coli***

Для химической трансформации использовали замороженные компетентные клетки *E. coli* штамма Top10. К 50 мкл компетентных клеток добавляли 1 мкл смеси MoClo или 5 мкл очищенной лигазной смеси. Клетки инкубировали на льду в течение 20 минут, далее переносили в водяной термостат TW-2 (Elmi), где инкубировали при температуре 42 С в течение 45 сек, после чего возвращали в лед на 5 мин. Далее к суспензии клеток добавляли 300 мкл нагретой до 37 С среды SOB, после чего пробирки переносили в шейкер-инкубатор Excella E25 (New Brunswick) и инкубировали в течение 40 мин при температуре 37 С (200 об/мин). Далее 150 мкл содержимого пробирки при помощи стерильного шпателя высевали на чашки Петри с LB-агаром, содержащим соответствующий антибиотик. Чашки инкубировали в термостате при 37 С в течение ночи.

### **3.1.8 Выделение плазмидной ДНК из культуры клеток *E. coli***

Для выделения плазмидной ДНК в малом объеме (40 мкл) использовали набор Plasmid Miniprep (Евроген). Выделение проводили из 5 мл бактериальной культуры, полученной при инкубации 1 колонии *E. coli* в 5 мл среды LB с соответствующим антибиотиком в течение 16 часов с использованием спин-колонок и растворов из набора Plasmid Miniprep согласно протоколу производителя. Элюцию проводили в 40 мкл элюирующего раствора. Концентрацию очищенной ДНК определяли при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

Для выделения плазмидной ДНК в большом объеме (2 мл) использовали набор Plasmid Midiprep 2.0 (Евроген). Выделение проводили из 100 мл бактериальной культуры, полученной при инкубации 1 колонии *E. coli* в 100 мл среды LB с соответствующим антибиотиком в течение 16 часов с использованием спин-колонок и растворов из набора Plasmid Midiprep 2.0 согласно протоколу производителя. Элюцию проводили в 2 мл mQ. Концентрацию очищенной ДНК определяли при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

### **3.1.9 Секвенирование ДНК**

Секвенирование плазмид и ПЦР-фрагментов по методу Сэнгера проводили с использованием услуг компании Евроген.



### **3.2 Методы работы с культурами эукариотических клеток**

#### **3.2.1 Приготовление сред**

Для ведения клеточных культур НЕК293Т, HeLa и Huh-7.5 использовали среду Complete DMEM: DMEM с глутамином (2 мМ) и глюкозой (4,5 г/л) (ПанЭко) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Biosera) и 100 мкг/мл смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (ПанЭко).

Для ведения клеточной культуры A549 использовали среду Complete DMEM F-12: DMEM F-12 (ПанЭко) с добавлением 2 мМ глутамин (Gibco), 10% фетальной бычьей сыворотки (Biosera) и 100 мкг/мл смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (ПанЭко).

Для отделения клеток от субстрата при пересеве использовали 0,25% раствор Трипсин-Версена (ПанЭко).

Для заморозки клеток готовили среду Freezing Media: DMEM с глутамином (2 мМ) и глюкозой (4,5 г/л) (ПанЭко) с добавлением 45% фетальной бычьей сыворотки (Biosera), 100 мкг/мл смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (ПанЭко) и 10% DMSO (ПанЭко).

#### **3.2.2 Ведение культуры эукариотических клеток**

Клетки культивировали в пластиковых культуральных флаконах с крышками-фильтрами (SPL Life Sciences) с поверхностью роста клеток 25 см<sup>2</sup> при температуре 37 С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе Series 8000 WJ (Thermo Fisher Scientific). Объем среды Complete DMEM во флаконе составлял 6 мл. При достижении 70% конфлюентности во флаконе проводили пассирование клеточной культуры. Для этого клетки инкубировали с 1 мл Трипсин-Версена при 37 С и далее ресуспендировали с 2 мл среды Complete DMEM, оставляя часть клеточной суспензии во флаконе для продолжения культивирования.

Для заморозки клеток использовали стерильные криопробирки объемом 2 мл (SPL Life Sciences) и среду Freezing Media. Замену среды осуществляли при помощи центрифугирования в низкоскоростной центрифуге 5702 R (Eppendorf) при 4 С (5 мин 0,5 g). Клетки хранили в криохранилище с жидким азотом.

#### **3.2.3 Трансфекция эукариотических клеток**

Для транзientной (временной) трансфекции эукариотические клетки культивировали на 35 мм культуральных чашках для конфокальной микроскопии со стеклянным дном (SPL Life Sciences), содержащих 2 мл питательной среды Complete DMEM. Транзientную трансфекцию проводили в среде Opti-MEM (Gibco) с использованием реагента GenJect-39 (Молекта) в пропорции 1 мкл реагента на 1 мкг ДНК согласно протоколу производителя (соотношение ДНК:GenJect-39 = 1:1).

### 3.2.4 Лентивирусная трансдукция эукариотических клеток

Для получения стабильной линии клеток использовали метод лентивирусной трансдукции. Для этого клетки линии HEK293T трансфицировали смесью плазмид, состоящей из целевой плазмиды, содержащей трансген (10 мкг, MidiPrep) и вспомогательных плазмид (1,7 мкг pMDG и 5,5 мкг pR8.91, MidiPrep), необходимых для сборки лентивирусных частиц. Трансфекцию проводили в двух 10 см культуральных чашках (SPL Life Sciences) в 5 мл среды Opti-MEM (Gibco) при помощи полиэтиленимина PEI 25K (Polysciences) в соотношении ДНК:PEI = 1:3. Спустя 4 часа среду заменяли на 6 мл Complete DMEM. Через 48 часов после трансфекции среду с двух чашек, содержащую вирус, собирали в 15 мл фалькон и центрифугировали в течение 5 минут при 4 С в низкоскоростной центрифуге 5702 R (Eppendorf) для осаждения мертвых клеток. Далее среду пропускали через стерильный 0,45 мкм фильтр (Fcombio) и концентрировали при помощи ультрацентрифугирования. Ультрацентрифугирование проводили при 10–15 С в течение 3 часов при 100000 g с использованием ультрацентрифуги Beckman. После ультрацентрифугирования супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 1 мл Complete DMEM и инкубировали в пластиковой пробирке для при 4 С на ротаторе (110 rpm) в течение ночи. Для лентивирусной трансдукции использовали клеточные линии HeLa и Huh7.5. Клетки высаживали на 35 мм культуральную чашку и инкубировали с 1 мл полученной лентивирусной суспензии в течение суток. Далее среду заменяли на 2 мл Complete DMEM. Для отбора трансдуцированных клеток по флуоресценции использовали клеточный сортер BD FACSAria III (BD Biosciences, США). Полученную стабильную линию далее культивировали по стандартному протоколу.

### 3.2.5 Иммуноцитохимическое окрашивание

Для визуализации целевых белков при помощи антител клетки фиксировали с использованием 4% раствора параформальдегида (4% PFA). Для этого клеточную среду отбирали и инкубировали клетки с 4% PFA (Диаэм) в течение 10 минут. Далее клетки трижды промывали раствором фосфатно-солевого буфера (PBS) (VWR Life Science) и инкубировали с 0,5% Triton X-100 (Хеликон) в течение 15 минут для пермеабиллизации клеточной мембраны, после чего снова промывали PBS и инкубировали с 3% раствором бычьего сывороточного альбумина (3% BSA) (Sigma) в течение часа для блокирования неспецифических сайтов связывания антител. Далее раствор 3% BSA отбирали и приступали к окрашиванию антителами. В качестве первичных антител к М-белку SARS-CoV-2 использовали кроличьи поликлональные IgG антитела (Antibodies-online) в разведении 1:600. В качестве вторичных антител использовали козы поликлональные IgG антитела (Invitrogen) с эмиссией в красном (Alexa Fluor 594, разведение 1:1000) и зеленом (Alexa Fluor 488, разведение 1:500) канале. Время инкубации клеток с

первичными антителами составляло 2 часа при комнатной температуре, после чего раствор антител отбирали и трижды промывали клетки раствором PBS. В растворе вторичных антител клетки инкубировали в темноте в течение 30 минут при комнатной температуре, после чего трижды промывали раствором PBS и приступали к микроскопии полученного образца.

### 3.2.6 Инфицирование SARS-CoV-2

Клетки Huh7.5 высевали на чашки диаметром 10 см (SPL Life Sciences) с плотностью  $1 \times 10^6$  в среде Complete DMEM. При достижении клетками 40% конфлюентности, среду отбирали и добавляли вирус SARS-CoV-2 (штамм hCoV-19/Russia/Moscow-PMVL-12/2020 (EPI\_ISL\_572398) GISAD: PMVL-12) в среде DMEM с добавлением 2,5% фетальной бычьей сыворотки при множественности заражения (MOI) 0,1. Спустя два часа после инфицирования среду отбирали, клетки дважды промывали раствором PBS и добавляли свежую среду Complete DMEM в чашку.

Флуоресцентную микроскопию зараженных клеток проводили спустя 24 часа после инфицирования (h.p.i.). Для этого клетки фиксировали при помощи смеси метанол:ацетон (1:1) и инкубировали при температуре  $-20\text{ C}$  в течение ночи. Далее среду отбирали и переносили клетки в раствор PBS.

При проведении эксперимента с обработкой молнупиравиром клетки заражали вирусом SARS-CoV-2 при множественности заражения (MOI) 0,1. Спустя четыре часа после инфицирования (h.p.i.) среду отбирали, клетки дважды промывали раствором PBS и добавляли свежую среду Complete DMEM, содержащую  $5\text{ }\mu\text{M}$  молнупиравир (Sigma-Aldrich). Флуоресцентную микроскопию фиксированных клеток проводили спустя 24 часа после инфицирования (h.p.i.).

### **3.3 Флуоресцентная микроскопия**

#### **3.3.1 Широкопольная флуоресцентная микроскопия**

Широкопольную флуоресцентную микроскопию проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа BioRevoBZ-9000 (Keyence), оборудованного галогеновой лампой, с использованием иммерсионного объектива 60x PlanApo 1.40 NA (Nikon). Микроскопию проводили с использованием светофильтров TexasRed OP79302 SB filter (Keyence) (возбуждение 562/40, эмиссия 624/40), GFP-BP OP66836 BZ filter (Keyence) (возбуждение 470/40, эмиссия 535/50), 49022-ET-Cy5.5 (Chroma Technology) (возбуждение 620/60, эмиссия 700/75), 49021-ET-EBFP2/Coumarin/Attenuated DAPI (Chroma Technology) (возбуждение 405/10, эмиссия 460/25). Микроскопию проводили при термостатировании клеток на 37 С в водяной бане спустя 24 часа после трансфекции.

Для изучения динамики филаментов М-белка съемку клеток в реальном времени проводили на протяжении 4 часов. Интервал между кадрами составлял 30 минут.

Для тестирования FRET-сенсора активности протеазы PLpro съемку клеток в реальном времени проводили на протяжении 7–10 часов. Интервал между кадрами составлял 15 минут. Перед съемкой индукция экспрессии протеазы проводилась при помощи 10 мкг/мл доксицилина (Sigma).

#### **3.3.2 Конфокальная микроскопия**

Конфокальную микроскопию проводили с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica SP2 confocal (Leica), оснащенного иммерсионным объективом HCX PL APO Lbd.BL 63x1.40 oil (Leica), аргоновым (488 нм) и гелий-неоновым (543 нм) лазерами и источником LED-излучения Hyper E640 (YODN).

#### **3.3.3 Обработка изображений и статистический анализ**

Анализ изображений проводили с помощью пакета для обработки изображений Fiji (Fiji Is Just ImageJ) [176].

Для количественной оценки уровня колокализации в некоторых экспериментах проводилось вычисление коэффициента корреляции Пирсона. Коэффициент вычисляли при помощи пакета программ Fiji, для установления порога выбирали метод Costes.

Для расчета соотношений флуоресценции ядра и цитоплазмы в экспериментах с генетически кодируемыми транслокационными биосенсорами для изучения активности PLpro в каждой клетке при помощи пакета программ Fiji измеряли среднее значение флуоресценции в ядре и в цитоплазме в красном и зеленом каналах. Для измерения флуоресценции в ядре область ядра выделялась целиком; для измерения флуоресценции в цитоплазме выделялась область ЭПР.

Далее из каждого значения вычиталось среднее значение флуоресценции фона (область, свободная от клеток в данном поле). Далее с использованием полученных значений для каждой клетки в программе Excel вычислялось отношение флуоресцентного сигнала в ядре к флуоресцентному сигналу в цитоплазме в зеленом (Green Nuc/Cyto) и красном (Red Nuc/Cyto) каналах. После этого для каждой клетки вычислялось отношение полученных величин в зеленом и красном канале  $(\text{Green Nuc/Cyto}) / (\text{Red Nuc/Cyto})$ . Далее значения, полученные для всех клеток, представляли в виде диаграммы «ящички с усами». Эффективность работы биосенсора оценивалась по степени увеличения значения параметра  $(\text{Green Nuc/Cyto}) / (\text{Red Nuc/Cyto})$  в системе без протеазы и в системе с активной протеазой.

Примечание – для биосенсора PLpro-TA отношение флуоресцентного сигнала в ядре к флуоресцентному сигналу в цитоплазме вычислялось по формуле  $(\text{Red Nuc/Cyto}) / (\text{Green Nuc/Cyto})$ , так как в данном случае в результате протеолиза происходила транслокация красного (mScarlet I), а не зеленого (mNeonGreen) флуоресцентного белка.

#### 4. Результаты и обсуждение

В качестве модельной системы для изучения свойств белков SARS-CoV-2 в данной работе была использована флуоресцентная микроскопия клеток человека, экспрессирующих целевой белок. В контексте данной научной задачи в совокупности с условиями проведения экспериментов данная модель получила преимущество по ряду причин. Во-первых, она позволяет изучать поведение целевого белка без учета влияния остальных вирусных белков. Это позволяет значительно упростить экспериментальную систему и сосредоточить внимание на выявлении свойств индивидуальных белков. Во-вторых, отсутствие функционального вируса делает исследование безопасным, позволяя проводить описанные эксперименты в обычной лаборатории. Работа с SARS-CoV-2 предполагает уровень биологической безопасности 3 (BSL-3, biosafety level-3), что значительно осложняет проведение экспериментов с заражением клеток нативным вирусом [177]. В-третьих, подобная экспериментальная система может служить прототипом для разработки скрининговых платформ, направленных на безопасный и легко масштабируемый поиск ингибиторов функционирования целевых вирусных белков. Все это наделяет выбранную нами модельную систему преимуществами по сравнению с заражением клеток нативным вирусом.

В качестве целевых белков SARS-CoV-2 для разработки модельных систем были выбраны структурный белок оболочки M, участвующий в сборке вириона, а также папаин-подобная протеаза PLpro, выполняющая мажорные функции на первичных этапах заражения и участвующая в подавлении клеточного иммунитета.

В главе 4.1 данной работы описано проведение экспрессии M-белка в клетках человека с использованием методов прижизненной флуоресцентной микроскопии. В результате работы была обнаружена склонность M-белка к межмембранной олигомеризации с формированием OSER-структур при экспрессии в клетках линии HEK293T, а также способность белка к формированию филаментоподобных структур в клетках линии HeLa. Визуализация подобных структур в клетках, экспрессирующих M-белок, потенциально может быть использована для безопасного высокопроизводительного скрининга веществ, ингибирующих такую олигомеризацию.

Глава 4.2 посвящена разработке генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров для изучения активности протеазы PLpro SARS-CoV-2 в клетках человека. В результате работы было получено и успешно протестировано два типа биосенсоров для мониторинга активности PLpro – дальнекрасный FRET-сенсор и три транслокационных биосенсора. Наиболее успешный вариант дизайна биосенсора на основе транслокации, PLpro-ERNuc, был дополнительно проверен на модели инфекции клеток с живым вирусом SARS-CoV-2. Каждый вариант биосенсора имеет свои

особенности и преимущества и потенциально может быть использован для высокопроизводительного скрининга потенциальных ингибиторов PLpro.

Таким образом, в результате данной работы были созданы безопасные клеточные модели для изучения свойств белков М и PLpro, которые потенциально могут быть применены для скрининга противовирусных препаратов в лабораторных условиях.

#### **4.1 Изучение олигомеризационных свойств М-белка SARS-CoV-2**

М-белок является наиболее представленным белком оболочки SARS-CoV-2, принимающий непосредственное участие в сборке вириона. М-белок обладает относительно небольшими размерами, что позволяет беспрепятственно экспрессировать его в гетерологичных клеточных системах. Кроме того, пространственные структуры белка уже разрешены, что создает удобства для первичного подбора потенциальных ингибиторов *in silico* методами.

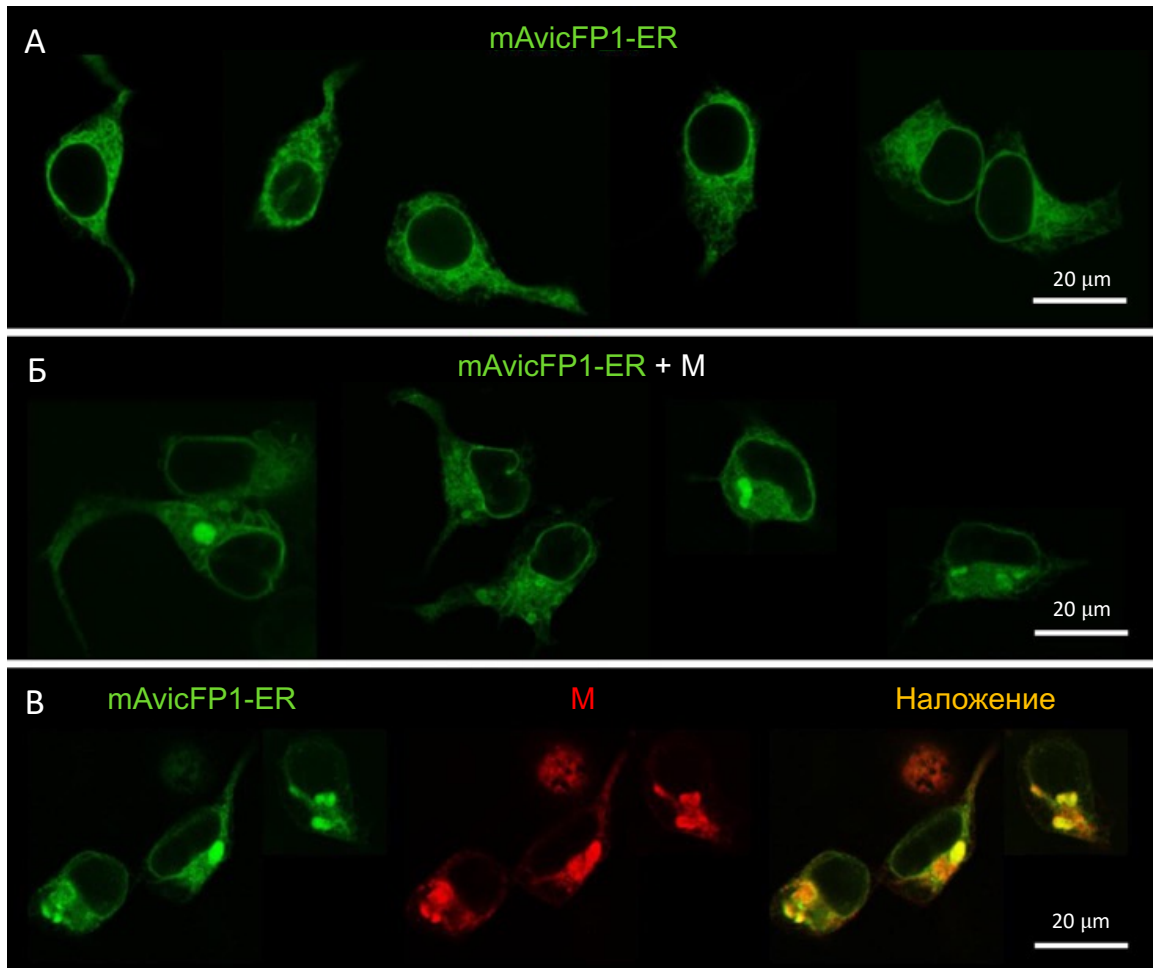
Экспрессию М-белка SARS-CoV-2 проводили в двух клеточных линиях: HEK293Т и HeLa. HEK293Т представляют из себя иммортализованные клетки эмбриональной почки человека. Линия обладает морфологией эпителиальных клеток, однако точный тип оригинальных изолированных клеток не известен. Кроме того, на основании наличия определенных мРНК и генных продуктов существует предположение, что на HEK293Т близки к нейрональным клеткам. Клетки линии HeLa представляют из себя клетки саркомы шейки матки, также обладающие морфологией эпителиальных клеток. Обе линии активно применяются в биотехнологических и токсикологических исследованиях в качестве модели клеток человека.

##### **4.1.1 Экспрессия М-белка SARS-CoV-2 в клетках линии HEK293Т**

При экспрессии нативного М-белка в клетках HEK293Т, обеспечивающих повышенный уровень наработки белка, мы обнаружили формирование необычных структур, вероятно, свидетельствующих о ранее неизвестной тенденции М-белка к образованию межмембранных олигомеров. Визуализация нативного М-белка проводилась с помощью иммуоцитохимической окраски. Экспрессионный вектор, кодирующий М-белок (pGBW-m4134547, AddGene plasmid #152583), был трансфицирован в культуру клеток человека HEK293Т. Для одновременной визуализации эндоплазматического ретикулума (ЭПР) была использована котрансфекция с плазмидой, кодирующей зеленый флуоресцентный белок mAvicFP1, несущий сигнал локализации на ЭПР (mAvicFP1-ER). В качестве контроля использовались клетки, экспрессирующие только mAvicFP1-ER.

Конфокальная микроскопия контрольных и экспериментальных клеток дала следующие результаты: при экспрессии mAvicFP1-ER в клетках HEK293Т наблюдалась ожидаемая локализация генетического конструктора в виде ажурной сети в цитоплазме, соответствующей ЭПР

(Рисунок 28, А). Однако при коэкспрессии с М-белком сигнал mAvicFP1-ER претерпевал существенные изменения. Помимо сети ЭПР, в большинстве клеток можно было наблюдать яркие округлые структуры размером 1–5 мкм (Рисунок 28, Б). Далее для визуализации локализации М-белка SARS-CoV-2 было проведено иммуноокрашивание клеток первичными антителами, специфичными к М-белку, и вторичными антителами с красным красителем. Конфокальная микроскопия продемонстрировала колокализацию М-белка и mAvicFP1-ER (Рисунок 28, В). При программной обработке изображений с помощью плагина Coloc 2 FIJI ImageJ коэффициент корреляции Пирсона при статистической оценке колокализации составил 0,86. Данные результаты позволили нам сделать вывод о том, что М-белок локализуется на мембранах ЭПР. Кроме того, белок способен формировать из этих мембран крупные внутриклеточные скопления, которые вызывают большой интерес.



**Рисунок 28. Конфокальная микроскопия клеток HEK293T, экспрессирующих М-белок SARS-CoV-2. (А) Результат трансфекции плазмидой, кодирующей маркер ЭПР mAvicFP1-ER (зеленый канал). (Б) Результат котрансфекции плазмидами, кодирующими mAvicFP1-ER (зеленый канал) и М-белок (не окрашен). (В) Котрансфекция плазмидами, кодирующими mAvicFP1-ER (зеленый канал) и М-белок, с последующей окраской антителами против М-белка (красный канал). Справа представлено наложение двух каналов (области колокализации окрашены оранжевым цветом). На рисунке представлены коллажи из четырех (А), четырех (Б) и двух (В) полей зрения, показывающие типичные для каждого образца клетки. Масштабная линейка 20 мкм.**

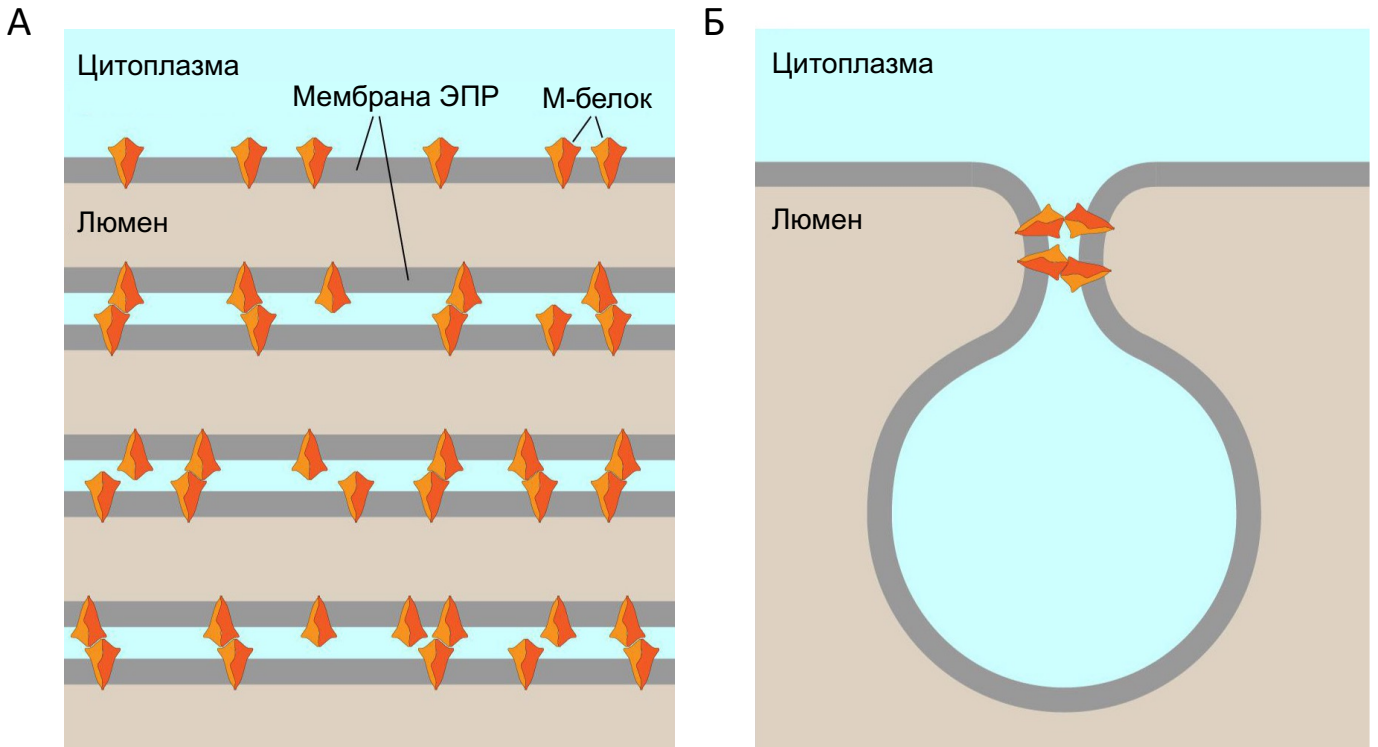


Ранее появление таких необычных структур ЭПР было описано при экспрессии олигомеризующихся флуоресцентных белков, локализованных в мембране ЭПР [178–179]. Формирование так называемых OSER-структур (OSER structures) было использовано авторами статьи в качестве инструмента для оценки олигомерного статуса флуоресцентных белков в физиологических условиях [179]. Авторы показали, что при закоривании флуоресцентных белков, склонных к формированию слабых димеров (например, EGFP), на цитоплазматической поверхности мембраны ЭПР, происходит реорганизация эндоплазматической сети, которая приводит к образованию ярких, отчетливо заметных округлых структур. Данный феномен объясняется взаимодействием димеризующихся белков, связанных с параллельными мембранами ЭПР, и их последующим «слипанием» в многослойные образования различной формы – так называемые OSER-структуры (organized smooth endoplasmic reticulum). Выявленная при котрансфекции и дальнейшем иммуноокрашивании колоколизация М-белка с маркером ЭПР, а также результаты контрольных экспериментов на клетках, не экспрессирующих М, дают основания предположить, что наблюдаемые в сети ЭПР яркие округлые образования представляют из себя OSER-структуры, в образовании которых участвуют молекулы М-белка.

Известно, что М-белок формирует внутримембранные димеры [180]. Наши результаты позволяют заключить, что М-белок проявляет также тенденцию к олигомеризации между димерами, локализованными в соседних мембранах. Вероятно, в этом принимают участие С-концевые домены, экспонированные в цитозоль [66] (Рисунок 29, А).

Далее нами была выдвинута гипотеза, объясняющая роль наблюдаемой в модельной системе олигомеризации М-белка в жизненном цикле вируса. Согласно литературным данным, для эффективного отделения мембранного пузырька необходимо сближение мембран в перешеечной области на расстояние 1–5 нм [181]. Размер С-концевого домена М-белка составляет около 3 нм (от поверхности мембраны) [180]. Таким образом, взаимодействия между ними сводят противоположные мембраны на дистанцию 3–6 нм. По нашему мнению, межмембранная олигомеризация М-белка может служить движущей силой для сближения и слияния мембран при отшнуровывании вирусных частиц SARS-CoV-2 (Рисунок 29, Б).

В дальнейшем эта гипотеза может быть проверена с помощью мутагенеза аминокислотных остатков М-белка в областях возможного интерфейса межмембранного взаимодействия (наружные аминокислотные положения С-концевого домена, не вовлеченные в димеризацию). Анализ образования OSER-структур может служить способом простой оценки влияния замен на олигомеризацию. Далее, в случае подтверждения функциональной важности межмембранной олигомеризации М-белка для формирования вирусов, визуализация OSER-структур в клетках, экспрессирующих М-белок, может быть использована для безопасного высокопроизводительного скрининга веществ, ингибирующих такую олигомеризацию.



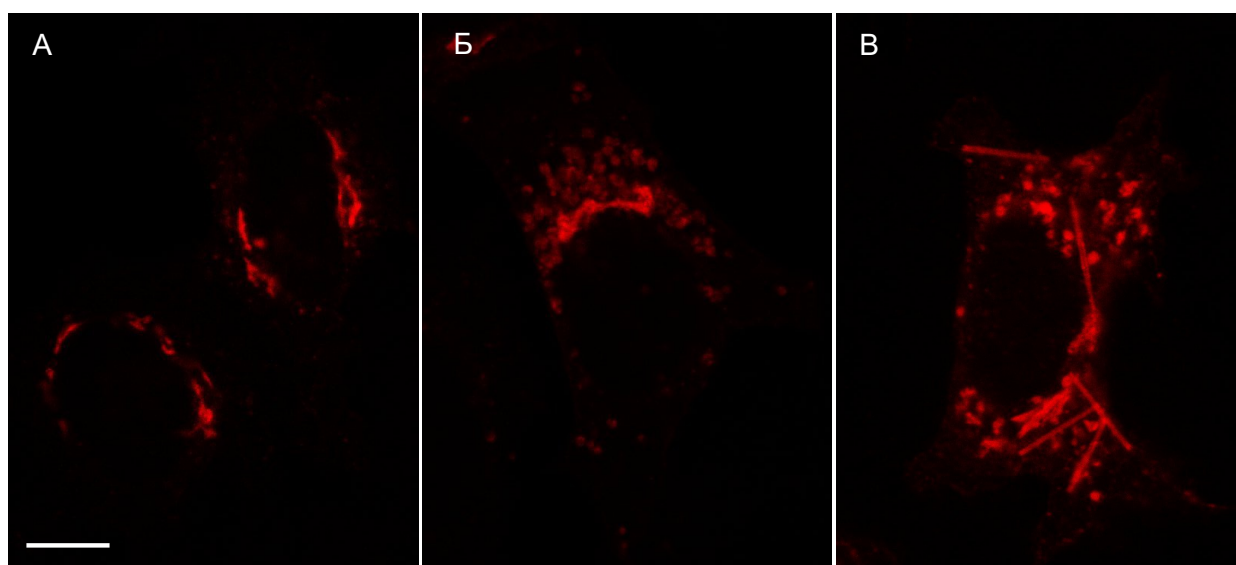
**Рисунок 29. Схема образования межмембранных олигомеров M-белка. (А) Образование стопки мембран ЭПР (OSER-структур) за счет взаимодействия M-белков на соседних мембранах. (Б) Предполагаемое участие межмембранных олигомеров M-белка в формировании перешеечной области при отшнуровывании вирусной частицы (молекулы M-белка в других областях не показаны для ясности).**

Вместе с тем стоит отметить, что редуционистская модель экспрессии отдельных вирусных генов, безусловно, имеет существенные ограничения, и полученные результаты нуждаются в дальнейшей верификации на полных вирусных системах.

#### 4.1.2 Экспрессия М-белка SARS-CoV-2 в клетках линии HeLa

Для визуализации нативного М-белка также был использован метод иммуоцитохимической окраски. Экспрессионный вектор, кодирующий М-белок (pGBW-m4134547, AddGene plasmid #152583), был трансфицирован в культуру клеток человека HeLa. Для визуализации локализации М-белка SARS-CoV-2 было проведено иммуоокрашивание клеток первичными антителами, специфичными к М-белку, и вторичными антителами с красным красителем. В большинстве клеток белок располагался в цистернах в области клеточного ядра, напоминающих цистерны аппарата Гольджи (Рисунок 30, А). Помимо этого, также были распространены клетки, в которых М-белок образовывал скопления везикул, предположительно, лизосомальной природы (Рисунок 30, Б). Для проверки этой гипотезы мы провели котрансфекцию клеток линии HeLa плазмидой для экспрессии М-белка и флуоресцентными маркерами компартментов экзоцитарного пути с последующим иммуоокрашиванием.

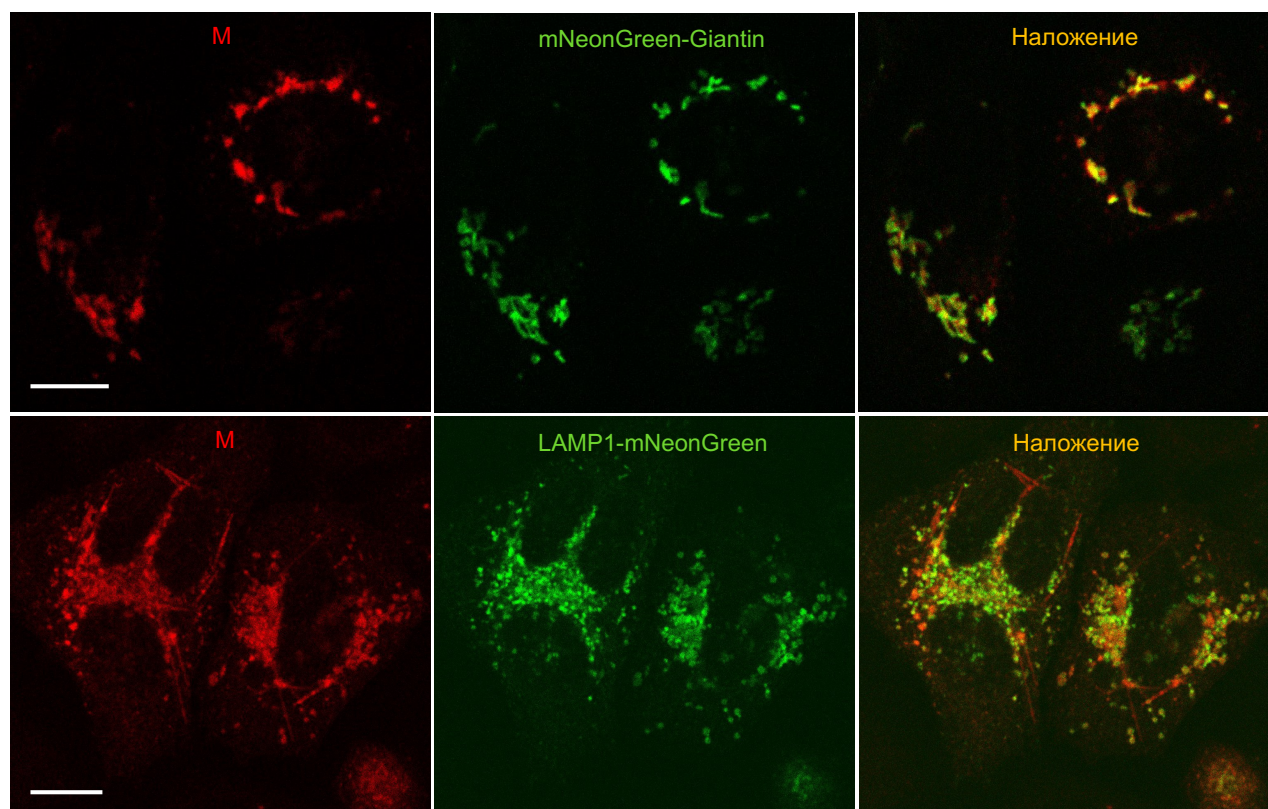
В качестве маркера комплекса Гольджи была использована собранная нами плазида, кодирующая зеленый флуоресцентный белок mNeonGreen, слитый с последовательностью резидентного белка аппарата Гольджи – гиантина (аминокислотные остатки 3131–3259) [182]. Для флуоресцентного мечения лизосом нами была собрана плазида, кодирующая зеленый флуоресцентный белок mNeonGreen, слитый с последовательностью гликопротеина лизосомальной мембраны LAMP1 (lysosomal associated membrane protein 1) [183]. Результаты съемки маркеров компартментов экзоцитарного пути (зеленый канал) и М-белка, маркированного с помощью антител, несущих флуоресцентную метку (красный канал), представлены на



**Рисунок 30.** Репрезентативные конфокальные изображения клеток линии HeLa, экспрессирующих М-белок. Наблюдается три типа распределения белка внутри клетки: цистерны в области клеточного ядра (А), скопление везикул (Б) и филаментоподобные структуры (В). Масштабная линейка 10 мкм.

рисунке 31. На изображениях, полученных для оценки колокализации маркера комплекса Гольджи с М-белком, практически во всех клетках М-белок формировал паттерн в форме комплекса Гольджи. На рисунке 31 при совмещении изображений можно наблюдать практически полное совпадение паттерна, образуемого М-белком, с маркером комплекса Гольджи. При программной обработке изображений с помощью плагина Coloc 2 FIJI ImageJ коэффициент корреляции Пирсона при статистической оценке колокализации на поздних этапах экспрессии составил 0,66. Данные результаты согласуются с литературными данными, согласно которым частицы  $\beta$ -коронавирусов следуют в аппарат Гольджи и транс-Гольджи сеть для гликозилирования и других пост-трансляционных модификаций [184–185].

Однако, как видно из рисунка 31, в ходе эксперимента также встречались клетки, в которых М-белок образовывал скопления везикул и колокализовался с маркером лизосом. При программной обработке изображений с помощью плагина Coloc 2 FIJI ImageJ коэффициент корреляции Пирсона при статистической оценке колокализации на поздних этапах экспрессии составил 0,62. Данные результаты демонстрируют гипотетическую возможность использования

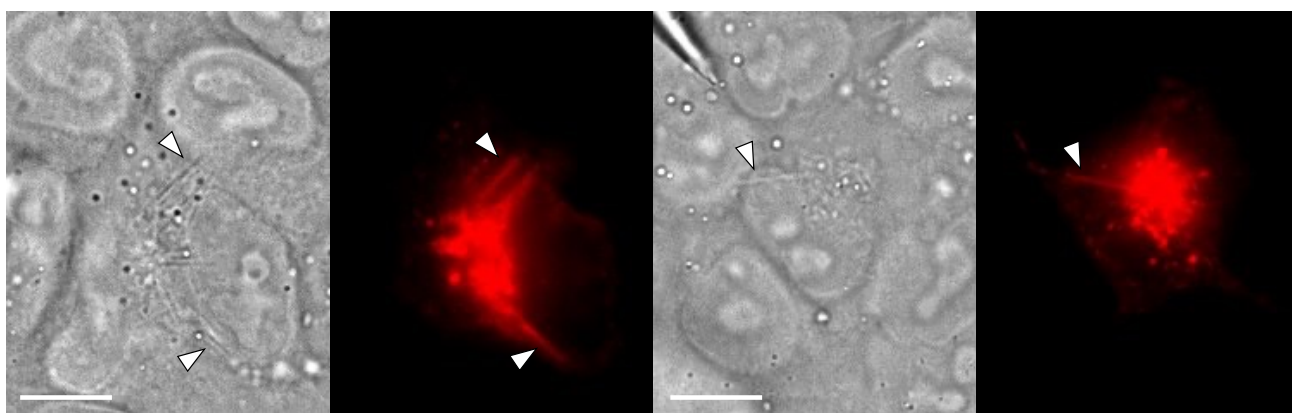


**Рисунок 31. Козэкспрессия маркера комплекса Гольджи (верхняя панель) и маркера лизосом (нижняя панель) с нативным М-белком, окрашенным после фиксации клеток антителами с флуоресцентной меткой (поздние этапы). Показаны репрезентативные изображения клеток HeLa через 24 часа после трансфекции, полученные при помощи метода конфокальной микроскопии. Слева направо: красный канал, зеленый канал, наложение красного и зеленого каналов. Масштабная линейка 10 мкм.**

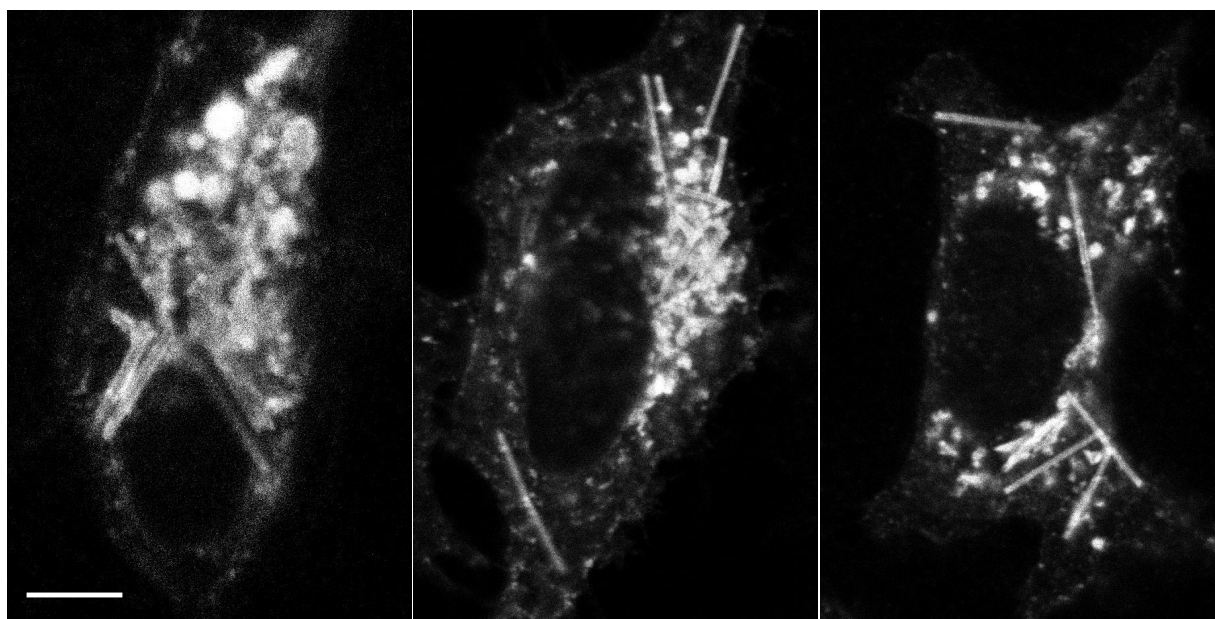
лизосом для траффикинга М-белка SARS-CoV-2 и согласуются с недавней работой, где была описана способность некоторых  $\beta$ -коронавирусов использовать лизосомы для внутриклеточного транспорта вирусных частиц [33]. При помощи методов флуоресцентной и электронной микроскопии авторы исследовали механизм выхода частиц  $\beta$ -коронавирусов из клетки и обнаружили, что вместо биосинтетического секреторного пути эти вирусы используют лизосомальный, Ar18b-зависимый экзоцитарный путь для выхода во внеклеточную среду. При этом происходит деацидификация лизосом, сопровождающаяся снижением активности лизосомальных протеаз. По мнению авторов, это приводит к нарушению презентации антигена и нарушению пути иммунного ответа [183].

Однако, помимо локализаций М-белка, проиллюстрированных в научных статьях, в части клеток мы обнаружили формирование структур, не описанных ранее в литературе. В некоторых клетках (приблизительно, в 30% от общего числа трансфицированных клеток линии HeLa) экспрессия М-белка приводила к формированию филаментоподобных структур (далее: «филаменты») неизвестной природы (Рисунок 30, В). Мы исследовали данный феномен при помощи метода флуоресцентной микроскопии.

Анализ микрофотографий позволил сделать начальное описание филаментов. Структуры представляют из себя макромолекулярные образования, лишенные изгибов, которые можно выявить при иммуноокрашивании клеток человека с последующей флуоресцентной микроскопией. Кроме того, филаменты М-белка также обнаруживаются при помощи метода фазово-контрастной микроскопии (Рисунок 32). Репрезентативные изображения филаментоподобных структур, обнаруженных в клетках линии HeLa при гиперэкспрессии М-белка SARS-CoV-2, полученные при помощи метода флуоресцентной конфокальной микроскопии, представлены на рисунке 33.

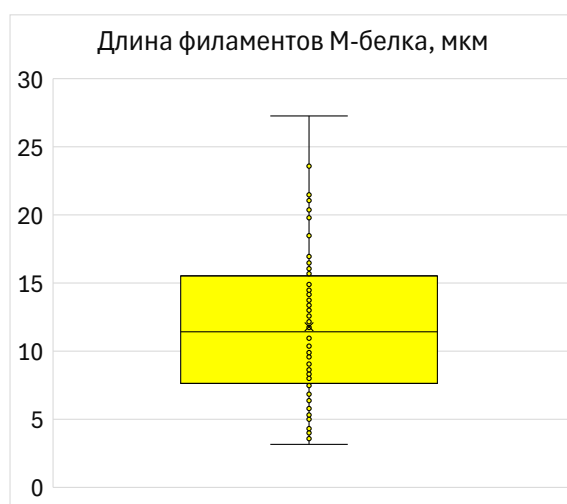


**Рисунок 32. Репрезентативные изображения клеток линии HeLa, содержащих филаменты М-белка, полученные при помощи фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии. Филаменты М-белка обозначены белыми стрелками. Масштабная линейка 10 мкм.**



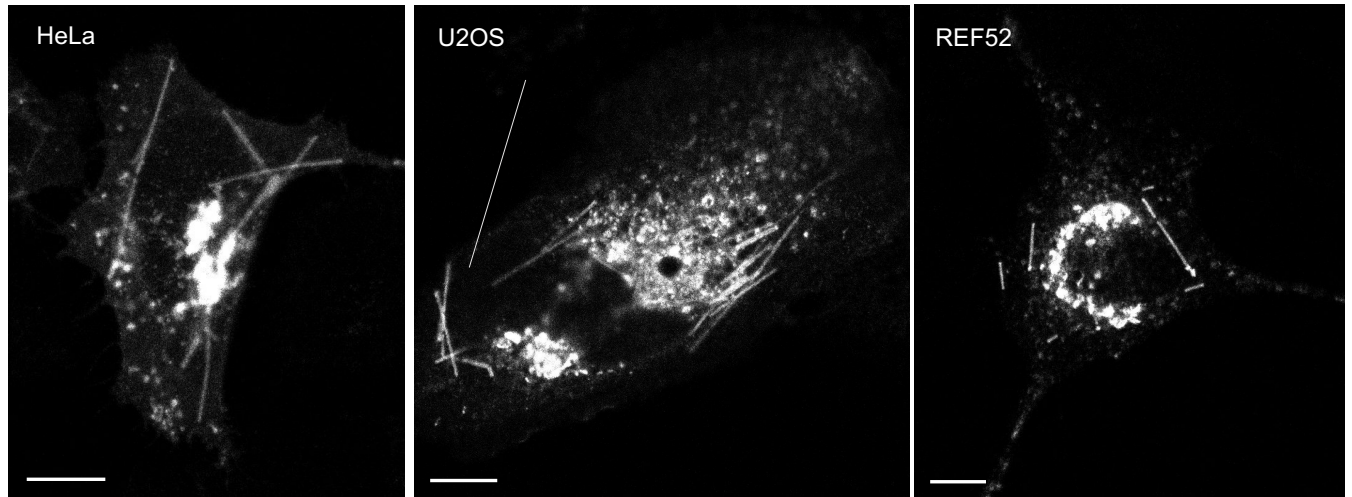
**Рисунок 33.** Репрезентативные изображения клеток линии HeLa, экспрессирующих М-белок SARS-CoV-2 с образованием филаментоподобных структур, полученные при помощи флуоресцентной конфокальной микроскопии. Флуоресцентное мечение структур в эксперименте проведено при помощи метода иммунохимической окраски с использованием антител, специфичных к М-белку. Масштабная линейка 10 мкм.

На основе полученных микрофотографий мы провели оценку распределения длин филаментов М-белка, результаты которой показаны на рисунке 34. Анализируя представленную диаграмму, можно заключить, что длина описываемых структур лежит в диапазоне 7,5–15,7 мкм. При этом максимальная длина филаментов составила 27,3 мкм, а минимальная – 3,2 мкм.



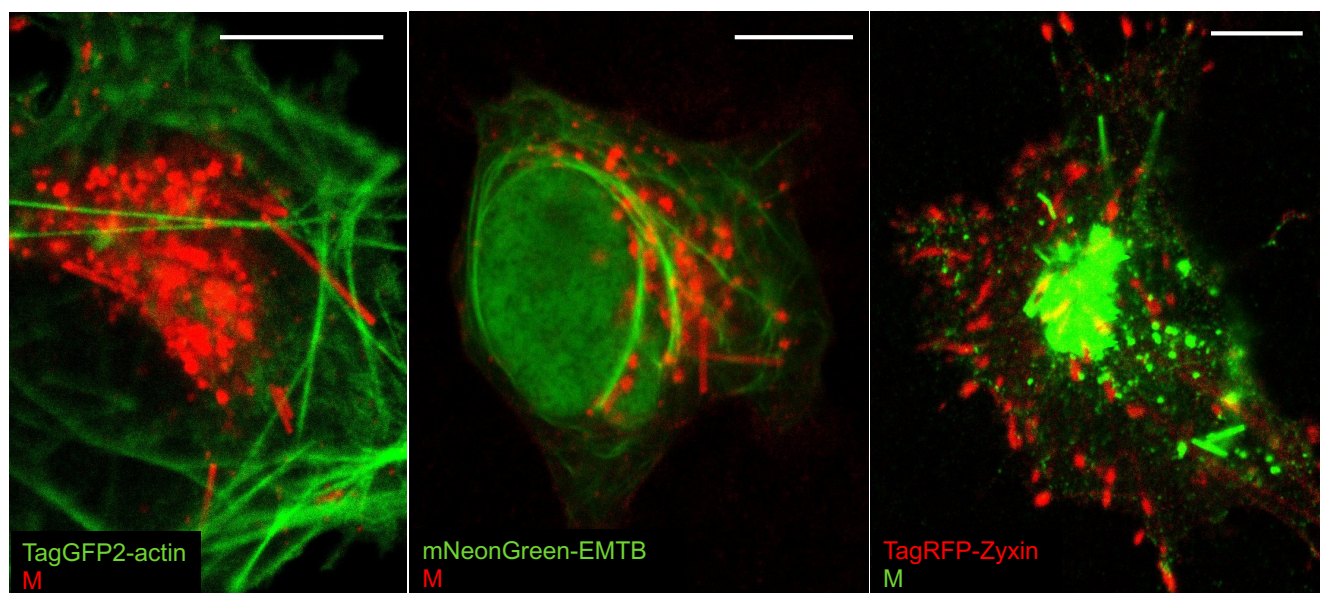
**Рисунок 34.** Распределение длин (в микрометрах) филаментов М-белка в клетках линии HeLa, гиперэкспрессирующих М-белок SARS-CoV-2. В ходе эксперимента было проанализировано 29 клеток, число филаментов М-белка в которых составило 100 штук. Результаты измерений представлены в виде диаграммы «ящик с усами», для которой показаны медиана, среднее значение, 1-й и 3-й квартили, а также минимальное и максимальное значения.

Для репрезентативности эксперимента мы повторили метод иммуноцитохимической окраски антителами, специфичными к М-белку, на других клеточных линиях (Рисунок 35). В ходе экспериментов было показано, что аналогичные структуры также наблюдаются при экспрессии М-белка в клетках линии U2OS и REF52. Линия U2OS представляет собой клетки остеосаркомы человека, имеющие эпителиальную морфологию. Клетки линии REF52 представляют собой эмбриональные фибробласты крысы. Результаты данного эксперимента снижают вероятность артефактного происхождения исследуемых нами структур. Дальнейшие эксперименты проводились на клеточной линии HeLa.



**Рисунок 35.** Репрезентативные изображения клеток линий HeLa, U2OS и REF52 содержащих филаменты М-белка, полученные при помощи конфокальной микроскопии. Масштабная линейка 10 мкм.

С целью установить субклеточную локализацию и возможное происхождение филаментов М-белка мы провели серию экспериментов по котрансфекции с маркерами различных клеточных структур. Вначале мы предположили ассоциацию структур с цитоскелетом. При проведении экспериментов в качестве маркера актиновых филаментов была использована плаزمида TagGFP2-actin (Евроген), в которой зеленый флуоресцентный белок TagGFP2 слит с цитоплазматическим  $\beta$ -актином человека. В качестве маркера микротрубочек была использована созданная нами плаزمида mNeonGreen-EMTB, в которой зеленый флуоресцентный белок mNeonGreen слит со связывающим доменом ассоциированного с микротрубочками белка EMTB (Enscosin microtubule binding domain). При котрансфекции экспрессионного вектора М-белка с вышеуказанными маркерами во всех трех случаях колокализация не наблюдалась (Рисунок 36). При программной обработке изображений коэффициент корреляции Пирсона при котрансфекции с маркером  $\beta$ -актина составил -0,16, а при котрансфекции с маркером микротрубочек 0,04. Далее мы проверили возможную ассоциацию филаментов с белками фокальных контактов при помощи котрансфекции экспрессионного вектора М-белка с



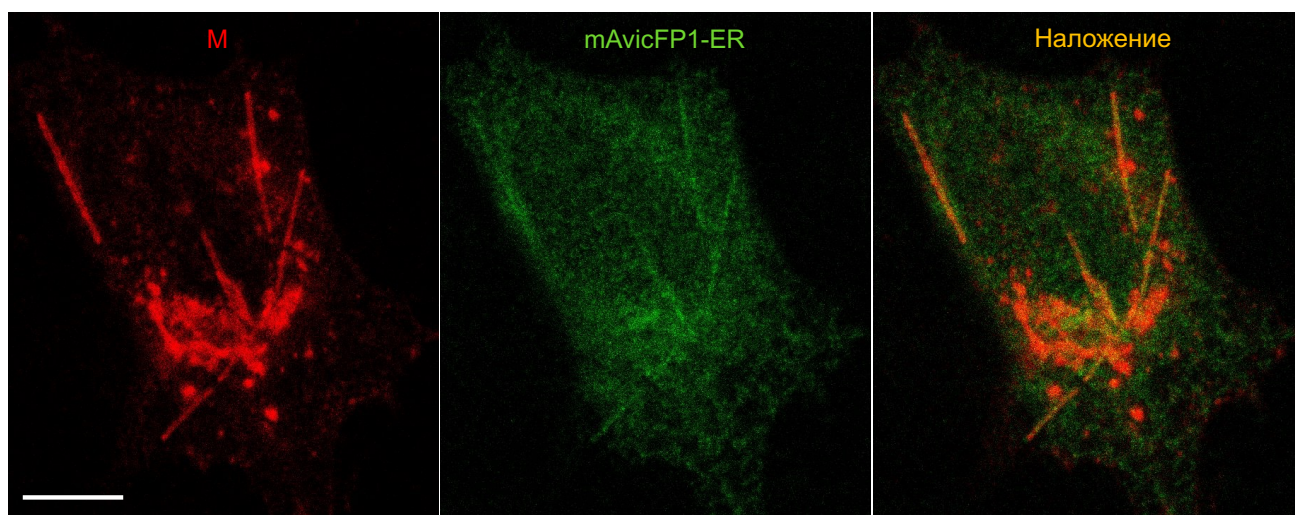
**Рисунок 36.** Коэкспрессия маркеров актиновых филаментов (*TagGFP2-actin*, зеленая флуоресценция), микротрубочек (*mNeonGreen-EMTB*, зеленая флуоресценция) и фокальных контактов (*TagRFP-Zyxin*, красная флуоресценция) с нативным М-белком, окрашенным после фиксации клеток антителами с флуоресцентной меткой (поздние этапы). Показаны репрезентативные изображения клеток HeLa через 24 часов после трансфекции, полученные при помощи метода конфокальной микроскопии. Масштабная линейка 10 мкм.

плазмидой *TagRFP-Zyxin*, содержащей красный флуоресцентный белок *TagRFP*, слитый с белком фокальных контактов зиксином (в данном случае для окраски М-белка использовались вторичные антитела с зеленым красителем) (Рисунок 36). В данном случае колокализация также не наблюдалась: коэффициент корреляции Пирсона составил 0,16. На основании полученных данных гипотеза об ассоциации филаментов М-белка с элементами цитоскелета была отвергнута.

Далее мы предположили, что исследуемые структуры могут иметь мембранное происхождение. Для проверки этой гипотезы мы провели котрансфекцию экспрессионного вектора М-белка с маркером ЭПР *mAvicFP1-ER* (описан в главе 4.1.1). В некоторых клетках, содержащих обе плазмиды, помимо ажурной сети ЭПР выявлялись филаментподобные структуры, которые колокализовались с М-белком после иммуноцитохимической окраски: коэффициент корреляции Пирсона при статистической оценке колокализации на составил 0,53 (Рисунок 37). На основании этих данных можно предположить, что наблюдаемые нами филаменты имеют мембранное происхождение и возникают вследствие частичной реорганизации ЭПР из-за экспрессии М-белка.

Известно, что репликация SARS-CoV-2 сопровождается сильным видоизменением мембраны шероховатого ЭПР клетки-хозяина с формированием извитых мембран и двумембранных везикул (DMV), изолирующих вирусную РНК от факторов врожденного иммунитета [28]. На начальном этапе своего траффинга в ходе жизненного цикла SARS-CoV-2 М-белок локализуется на мембранах ЭПР [28]. Возможно, М-белок также принимает участие в





**Рисунок 37.** Коэкспрессия маркера ЭПР (*mAvicFP1-ER*) с нативным М-белком, окрашенным после фиксации клеток антителами с флуоресцентной меткой (поздние этапы). Показаны репрезентативные изображения клеток *HeLa* через 24 часов после трансфекции, полученные при помощи метода конфокальной микроскопии. Слева направо: красный канал, зеленый канал, наложение красного и зеленого каналов. Масштабная линейка 10 мкм.

ремоделировании мембраны ЭПР в ходе коронавирусной инфекции, что выражается в формировании фибрилл в сети ЭПР некоторых клеток, экспрессирующих М. Однако на основании разрешения оптической микроскопии достоверно заключить о наличии колокализации нельзя – в данном случае может наблюдаться лишь ассоциация филаментов с ретикулярной сетью, что не подразумевает их обязательное происхождение из мембраны ЭПР.

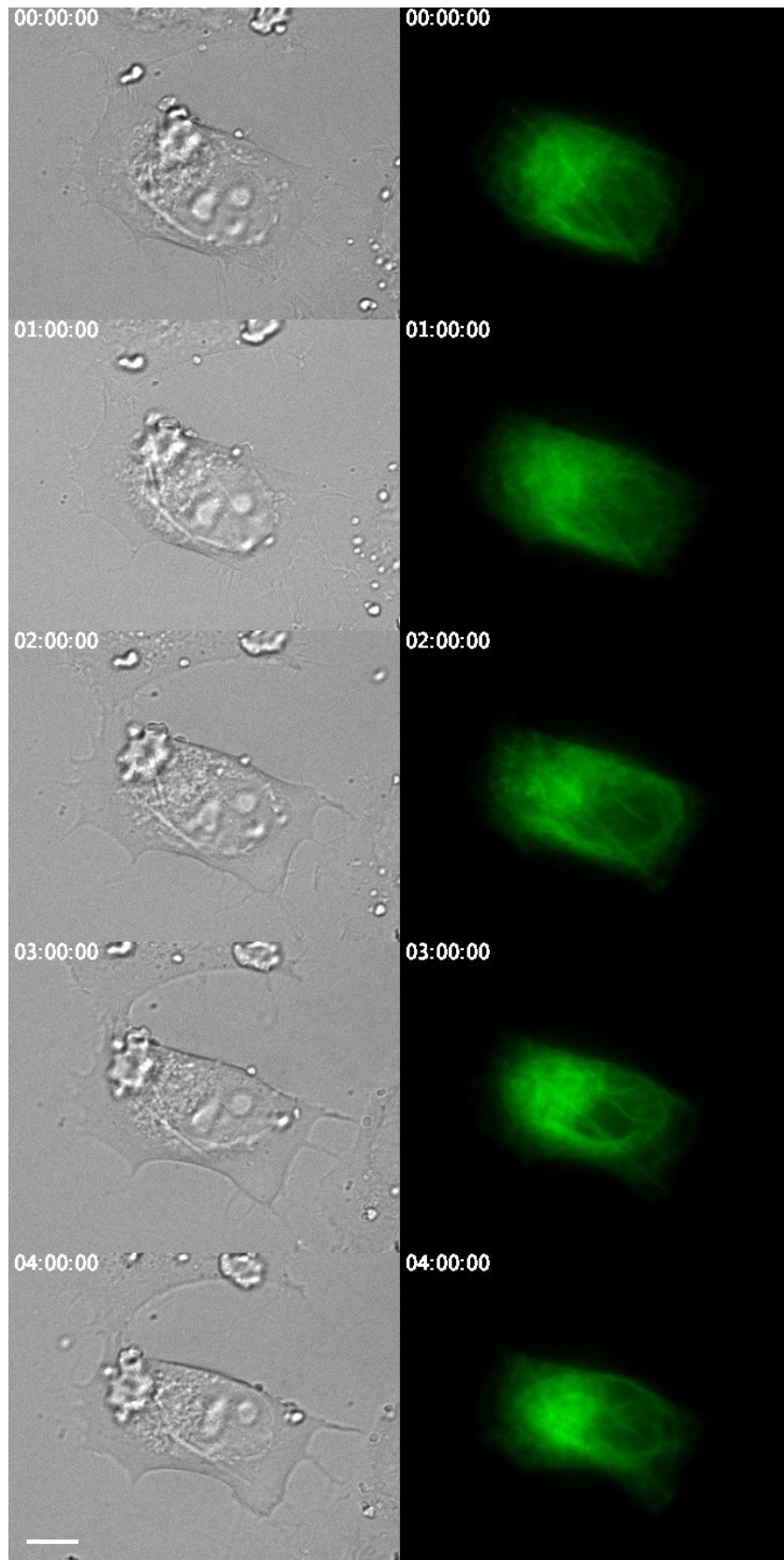
Потенциальной движущей силой к формированию подобных структур также может служить олигомеризация М-белка. Из литературных данных известно, что М-белок функционирует в виде димера [36–37,66]. Также известно, что коронавирусные гликопротеины, включенные в оболочку вириона (белки М, Е и S), транслируются в ЭПР и сохраняются в сайте отпочковывания в ERGIC [28]. Недавно проведенное компьютерное моделирование вириона SARS-CoV-2 показало, что димеры М-белка способны укладываться в филаментоподобные структуры без контактов между соседними филаментами. При этом участие в формировании данных филаментов принимают трансмембранные домены димеров [72] (см. главу 2.1.3.5). Мы предполагаем, что олигомеризация М-белка может служить движущей силой для видоизменения мембраны ЭПР, вследствие чего в некоторых клетках это приводит к вытяжению мембраны в виде филаментоподобных структур.

Мы проследили динамику фибрилл в реальном времени при помощи флуоресцентной микроскопии. Так как данная работа направлена на исследование нативного М-белка, лишенного каких-либо тагов или маркеров, М-белок может быть визуализирован только методом иммуноцитохимической окраски со специфичными первичными антителами. В основе данного метода лежит использование фиксированных клеток, что не позволяет проводить мониторинг в

реальном времени. Поэтому мы исследовали динамику филаментов М-белка на клетках с маркером ЭПР (mAvicFP1-ER, см. рисунок 37), так как филаментоподобные структуры выделяются на общем фоне флуоресцентно меченной ретикулярной сети. Результаты флуоресцентной микроскопии живых клеток показали, что филаменты не изменяют своей формы и длины с течением времени (Рисунок 38). На основании полученных данных мы можем предположить, что изучаемые структуры представляют из себя жесткие фибриллы. Однако для подтверждения данной гипотезы также необходимы эксперименты с более высоким оптическим разрешением.

В недавней работе по изучению внутриклеточной кристаллизации белков похожие структуры были описаны при кристаллизации мышинового белка NEU1 [186]. При гиперэкспрессии в клетках линии HEK293 NEU1 образовывал прямоугольные стержнеобразные структуры, которые можно было легко обнаружить с помощью флуоресцентной микроскопии при иммуноокрашивании антителами anti-NEU1, а также при фазово-контрастной микроскопии. Котрансфекция с маркерами клеточных органелл показала, что данные стержнеобразные структуры окружены мембранами эндоплазматического ретикулума. Также в работе было показано, что N-гликозилирование необходимо для внутриклеточной кристаллизации NEU1: удаление всех трех N-гликановых сайтов оказывает серьезное влияние на биосинтез NEU1 и приводит к обширной агрегации белка или нарушению фолдинга в ЭПР. Этот факт также позволил автору предположить, что кристаллы внутри ЭПР состоят из правильно свернутых молекул NEU1, сохраняющих свою функциональность, и потенциально могут быть использованы для биохимических или структурных экспериментов [186]. На основе полученных данных в данной работе также высказывается предположение о том, что внутриклеточная кристаллизация белков происходит легко, в случае если концентрация белка достигает некоторой пороговой концентрации; при этом высокая чистота белка в переполненной клеточной среде не является необходимой. Предполагается, что выступающий кристалл оказывает внешнее давление на мембрану ЭПР и/или плазматическую мембрану в зависимости от его расположения и формы. Подобный тип деформации клеток неизбежно порождает напряжение растяжения мембраны (membrane tension stress), что потенциально активировать клеточные факторы, участвующие в биосинтезе и расширении мембран. Однако сигнальные пути и механизмы, участвующие в расширении органелл и плазматических мембран, пока еще не изучены [186].

В приложении к результатам настоящей работы можно отметить некоторые сходства, касаемые внутриклеточной кристаллизации белка NEU1 и экспрессии М-белка SARS-CoV-2 в клетках человека. Филаментоподобные структуры, образующиеся в некоторых клетках HeLa при



**Рисунок 38. Визуализация динамики филаментов М-белка в реальном времени при помощи широкопольной флуоресцентной микроскопии.** Показаны репрезентативные изображения клеток HeLa через 24 часов после котрансфекции плазмидой для экспрессии М-белка и флуоресцентным маркером ЭПР (mAvicFP1-ER). Числа на панелях указывают время в часах с момента начала съемки. Изображения показаны в проходящем свете (левая панель) и в зеленом флуоресцентном канале (правая панель). Масштабная линейка 10 мкм.

гиперэкспрессии М-белка, также хорошо различимы как при помощи флуоресцентной микроскопии с использованием иммунохимического окрашивания антителами anti-M, так и с применением фазово-контрастной микроскопии (см. рисунок 32). При котрансфекции с маркером ЭПР филаментоподобные структуры также оказываются окружены ретикулярной мембраной. Акцентируя внимание на важности N-гликозилирования для внутриклеточной кристаллизации NEU1, стоит отметить тот факт, что М-белок SARS-CoV-2 также представляет из себя гликопротеин, что потенциально может способствовать процессу внутриклеточной кристаллизации. На настоящий момент при помощи *in silico* методов было предсказано 8 сайтов N-гликозилирования в составе М-белка (N5, N21, N41, N43, N117, N121, N203 и N216) [187], однако экспериментальное подтверждение наличия предсказанных сайтов до сих пор отсутствует [188]. Этот факт потенциально может способствовать процессу внутриклеточной кристаллизации М. Все вышесказанное дает возможность предположить, что движущей силой к формированию подобных филаментоподобных структур при гиперэкспрессии М-белка SARS-CoV-2 в клетках линии HeLa может служить механизм внутриклеточной кристаллизации. Однако подтверждение данной гипотезы требует проведения дальнейших экспериментов, включая более детальное изучение структурных особенностей М.

## 4.2 Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры для изучения активности папаин-подобной протеазы PLpro SARS-CoV-2 в живых клетках

Папаин-подобная протеаза PLpro, входящая в состав мультидоменного белка nsp3, является одним из ключевых белков в жизненном цикле SARS-CoV-2 – PLpro осуществляет расщепление полипротеина на отдельные белки (nsp1-4) на первых стадиях инфекции. Говоря о протеазе PLpro, стоит отметить, что помимо своей основной функции – процессинга вирусного полипротеина, она также выполняет дополнительную функцию, заключающуюся в удалении убиквитина и ISG15 из белков клетки-хозяина, тем самым помогая коронавирусу уклоняться от защитных механизмов врожденного иммунитета хозяина. Поэтому выбор PLpro в качестве мишени при подборе противовирусных препаратов имеет дополнительное преимущество: ингибиторы PLpro не только подавляют репликацию вируса, но также восстанавливают регуляцию нарушенных сигнальных каскадов в инфицированных клетках, предотвращая гибель окружающих клеток.

В данной работе мы разработали несколько вариантов генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров для детекции активности PLpro в реальном времени в живых клетках, которые потенциально могут служить основой для безопасных скрининговых систем для тестирования ингибиторов протеазы. При разработке биосенсоров мы стремились удовлетворить следующим критериям:

- возможность регистрации активности PLpro в единичных живых клетках без добавления внешних красителей;
- мониторинг протеолитической активности в реальном времени;
- смещение спектра флуоресценции в красную область для снижения фототоксичности при проведении экспериментов с живыми клетками;
- построение гибкой генетической системы с возможностью замены всех модулей в условиях конкретной задачи.

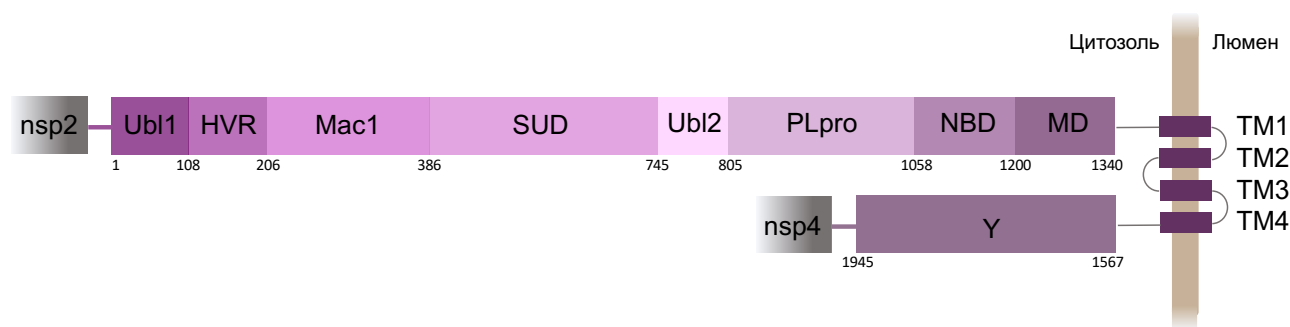
В рамках данной задачи мы разработали два типа биосенсоров для детекции активности PLpro в живых клетках. Первый тип относится к группе FRET-сенсоров и представлен генетически кодируемым красным FRET-сенсором для детекции активности растворимой PLpro (mScarlet-LKGG-miRFP670). Второй тип относится к группе транслокационных биосенсоров и представлен тремя вариантами генетически кодируемых транслокационных биосенсоров на основе флуоресцентных белков для мембран-ассоциированной PLpro (PLpro-sensor-TA, PLpro-sensor-Plus, PLpro-ERNuc). Далее будет представлено подробное описание каждой генетической конструкции, а также результаты экспериментов с полученными биосенсорами.

#### 4.2.1 Генетически кодируемый красный FRET-сенсор для изучения активности растворимой PLpro

Первая стратегия обнаружения PLpro включает экспрессию растворимой протеазы и растворимого FRET-сенсора в цитоплазме клеток млекопитающих. Для этой задачи мы разработали генетически кодируемый сенсор, основанный на FRET между GFP-подобным красным флуоресцентным белком mScarlet в качестве донора и биливердин-связывающим ближним инфракрасным флуоресцентным белком miRFP670 в качестве акцептора. FRET-пара разделена линкером, содержащим сайт узнавания PLpro (LKGG). После разрезания линкера протеазой перенос энергии между флуоресцентными белками исчезает, что можно детектировать по увеличению интенсивности и времени жизни флуоресценции донора и уменьшению FRET-сигнала.

Ранее в нашей лаборатории был разработан биосенсор для изучения активности каспазы-3, состоящий из FRET-пары белков mKate2 и iRFP, разделенных сайтом расщепления протеазы – DEVD [158] (см. рисунок 21). Дизайн данного биосенсора послужил основой для разработки FRET-сенсора для детекции активности PLpro. Однако для данной задачи были использованы флуоресцентные белки дальнекрасного спектра, что наделяет наш новый молекулярный инструмент несколькими преимуществами. Во-первых, использование дальнекрасных волн существенно снижает фототоксичность эксперимента по сравнению с использованием более коротковолновых вариантов флуоресцентных белков. Во-вторых, такой биосенсор позволяет осуществлять одновременную детекцию других клеточных процессов по флуоресценции в синем, зеленом и желтом каналах, что оставляет простор для дальнейшего усовершенствования скрининговой системы. Например, модель может быть дополнена биосенсорами для мониторинга метаболического статуса клеток по характеристикам флуоресценции эндогенных кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД.

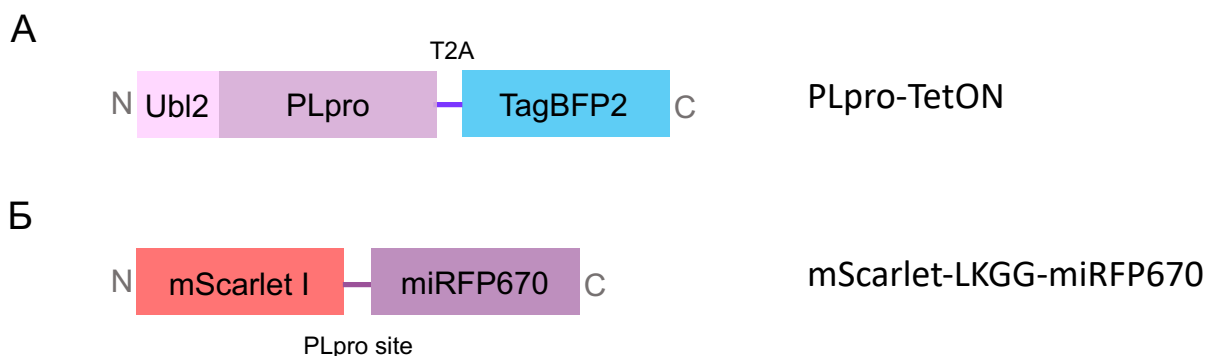
Для тестирования полученного биосенсора, названного mScarlet-LKGG-miRFP670, мы разработали генетическую конструкцию для экспрессии растворимой PLpro в клетках человека – PLpro-TetON. Для лучшего представления дизайна конструкции для начала предлагается ознакомиться с доменной организацией белка nsp3 SARS-CoV-2, представленной на рисунке 39. Подробное описание структуры белка nsp3 также приводится в главе 2.1.3.7.



**Рисунок 39.** Схематическое изображение доменной организации белка *nsp3 SARS-CoV-2*. Цифрами обозначено положение аминокислот.

В составе генетической конструкции для экспрессии растворимой PLpro были использованы убиквитин-подобный домен 2 (Ubl2) и папаин-подобная протеаза (PLpro), помещенные под контроль индуцируемого промотора TRE3G (Рисунок 40, А). В качестве маркера эффективности трансфекции в состав конструкции был добавлен синий флуоресцентный белок mTagBFP2 [189], отделенный от протеазы T2A-пептидом, использующимся для синтеза двух индивидуальных белков с одной открытой рамки считывания [190].

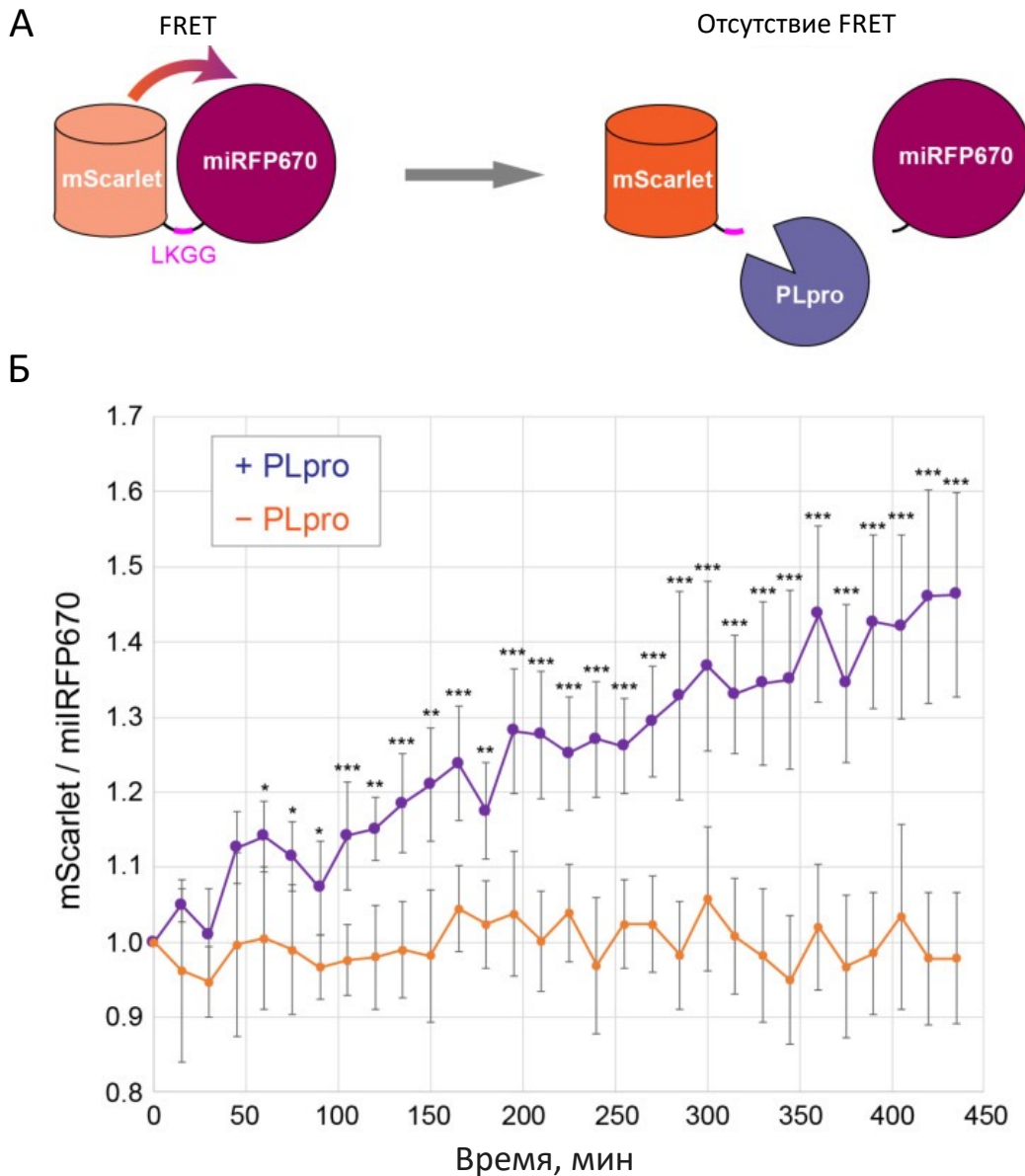
Для проверки работы сенсора был проведен следующий эксперимент. Клетки линии HeLa были котрансфицированы генетическими конструкциями mScarlet-LKGG-miRFP670 и PLpro-TetON. На следующий день, после накопления молекул mScarlet-LKGG-miRFP670 в клетке, экспрессия PLpro-TetON была индуцирована при помощи доксициклина. Детекция флуоресценции проводилась спустя несколько часов в двух каналах: красном (mScarlet) и дальнекрасном (miRFP670). Детекция сигнала в синем канале (mTagBFP2) для подтверждения экспрессии PLpro проводилась в конце наблюдения во избежание фототоксических эффектов, вызываемых синим светом.



**Рисунок 40.** Схематическое изображение генетически кодируемого FRET-сенсора *mScarlet-LKGG-miRFP670* (А) и конструкции для экспрессии растворимой протеазы *PLpro-TetON* (Б). FRET-пара белков в составе биосенсора разделена линкером, содержащим сайт узнавания протеазы LKGG.

Для оценки эффективности FRET в данной системе мы использовали соотношение флуоресцентных сигналов mScarlet/miRFP670. Данный подход был выбран нами по нескольким причинам. Во-первых, использование соотношения сигналов позволяет избежать влияния артефактов, возникающих вследствие накопления молекул сенсора в клетке. Во-вторых, при данном подходе из обсчета исключается влияние движения клеток и изменения их формы в ходе многочасовой съемки. Покадровая микроскопия клеток показала, что соотношение сигналов mScarlet/miRFP670 постепенно увеличивалось в 1,3–1,6 раза в течение нескольких часов после индукции экспрессии PLpro (фиолетовая кривая на рисунке 41, Б). В то же время, в контрольном эксперименте, где клетки не содержали плазмиды для экспрессии PLpro, а нарабатывали лишь сенсор mScarlet-LKGG-miRFP670, значимого увеличения соотношения mScarlet/miRFP670 не наблюдалось (оранжевая кривая на рисунке 41, Б). Таким образом, мы заключили, что разработанный нами биосенсор mScarlet-LKGG-miRFP670 может быть использован для специфической оценки активности PLpro на основе FRET-взаимодействия флуоресцентных белков в составе конструкции.





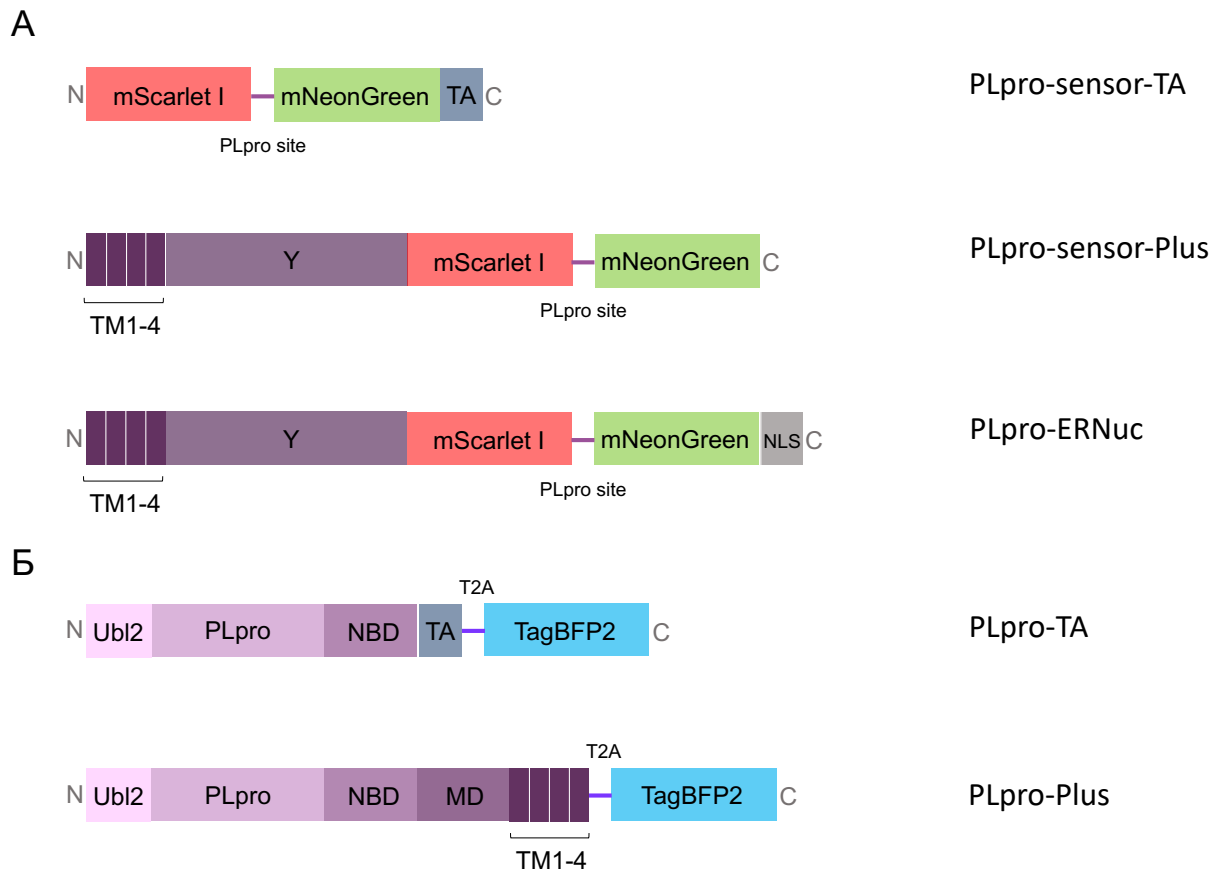
**Рисунок 41. FRET-сенсор для изучения активности PLpro. (А)** Схематическое изображение сенсора, состоящего из FRET-пары флуоресцентных белков mScarlet (донор) и miRFP670 (акцептор), соединенных линкером, содержащим сайт узнавания PLpro – LKGG. Протеолиз линкера в присутствии PLpro приводит к исчезновению FRET, сопровождающемуся увеличением интенсивности флуоресценции донора (mScarlet). **(Б)** Изменение соотношения флуоресцентного сигнала mScarlet/miRFP670 в клетках при покадровой микроскопии при индукции экспрессии PLpro (фиолетовый) или в отсутствие PLpro (оранжевый). Для каждой кривой показаны среднее значение и стандартное отклонение для 15 клеток в 3 независимых экспериментах. \*, \*\*, \*\*\*: p-значения менее 0.05, 0.01, и 0.001, соответственно (t-критерий).

#### 4.2.2 Генетически кодируемые транслокационные сенсоры для изучения активности мембран-ассоциированной PLpro

Несмотря на то что каталитически активная протеаза PLpro представляет собой растворимый белок, на этапе синтеза полипротеинов в жизненном цикле SARS-CoV-2 каталитический домен PLpro и сайты узнавания протеазы являются частью мультидоменного мембранного белка nsp3. Хотя большая часть молекулы nsp3, включая каталитический домен PLpro, находится в цитоплазме клетки-хозяина, белок локализуется на мембране эндоплазматического ретикулума посредством четырех трансмембранных сегментов (TM1–4 на рисунке 39). Таким образом, будучи растворимыми, как сам домен PLpro, так и сайты-мишени его расщепления являются частями мембранного белка. Мы предположили, что ассоциация с мембраной может иметь важное значение для протеолитической активности PLpro. Например, ассоциация с мембраной ЭПР на начальных этапах заражения может быть важна для правильного позиционирования белка и/или увеличения эффективной концентрации белка в среде двумерной мембраны. Чтобы создать условия, максимально приближенные к реальному заражению клетки вирусом SARS-CoV-2, мы разработали систему для экспрессии мембран-ассоциированной протеазы и нескольких вариаций транслокационных биосенсоров, заякоренных на мембране ЭПР.

При разработке транслокационных биосенсоров мы использовали зеленый (mNeonGreen) и красный (mScarlet I) флуоресцентные белки, характеризующиеся высокой яркостью сигнала, эффективной экспрессией и быстрым созреванием в клетках млекопитающих [191–192]. Использование зеленых и красных флуорофоров при проведении экспериментов на живых клетках имеет ряд преимуществ, таких как снижение цитотоксичности источника возбуждения и более высокая проницаемость тканей для длин волн возбуждения и излучения. В качестве зеленого белка мы выбрали mNeonGreen – один из самых ярких зеленых флуоресцентных белков, который характеризуется высокой фотостабильностью и быстрым созреванием [193]. Высокий квантовый выход и коэффициент экстинкции белка позволяют легко детектировать зеленую флуоресценцию в ходе эксперимента [191]. В качестве красного белка мы использовали mScarlet I – представитель серии mScarlet, характеризующийся быстрым созреванием и одним из самых высоких коэффициентов экстинкции среди красных флуоресцентных белков [192–193]. Дополнительным преимуществом выбора данной флуоресцентной пары является потенциальная возможность использования биосенсора в режиме FRET: пара mNeonGreen-mScarlet I продемонстрировала наибольшую эффективность FRET в экспериментах на клетках млекопитающих [193].

В рамках данной работы было сконструировано три типа транслокационных биосенсоров для детекции активности протеазы PLpro (Рисунок 42, А). В основе дизайна всех вариантов



**Рисунок 42. Генетически кодируемые транслокационные сенсоры для изучения активности мембран-ассоциированной PLpro. (А) Транслокационные сенсоры, ассоциированные с мембраной ЭПР. Зеленый (mNeonGreen) и красный (mScarlet I) флуоресцентные белки в составе конструкции разделены линкером, содержащим сайт узнавания протеазы PLpro. (Б) Генетические конструкции для экспрессии рекомбинантной PLpro в клетках млекопитающих. Каждая конструкция содержит синий флуоресцентный белок (mTagBFP2), который соединен с протеазным доменом при помощи «саморасщепляющегося» T2A-пептида и служит маркером эффективности трансфекции.**

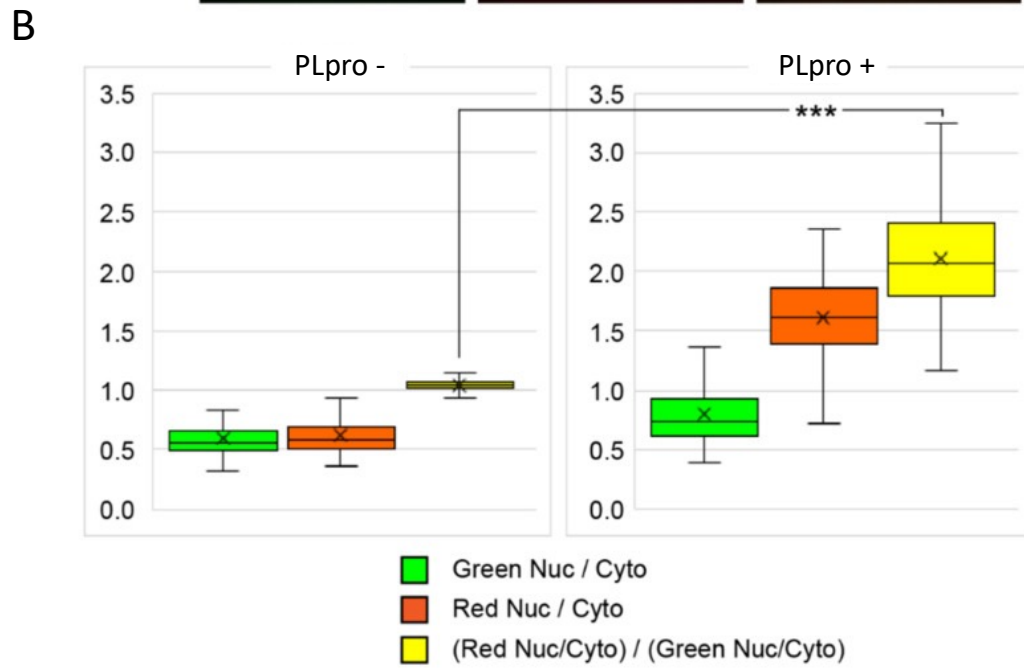
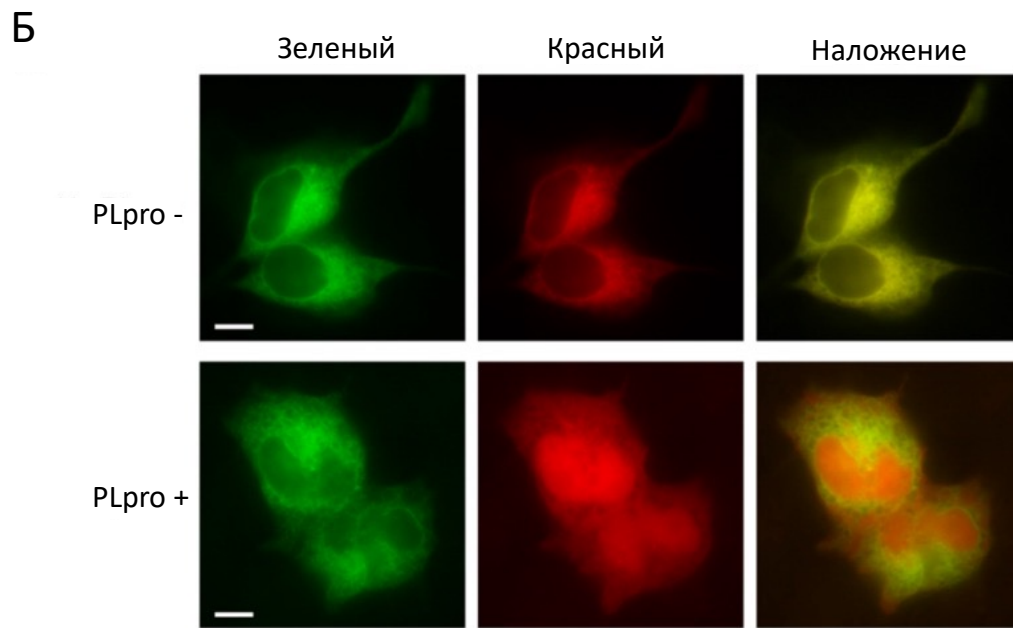
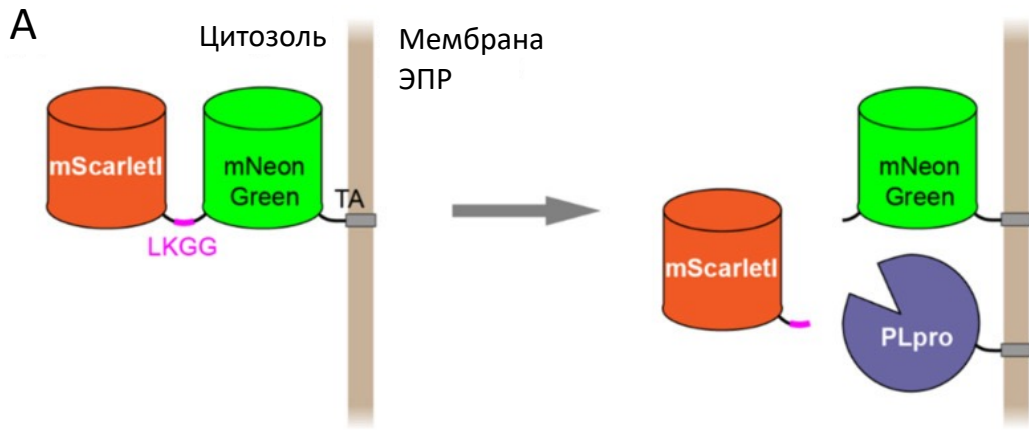
конструкции лежит использование пары красного (mScarlet I) и зеленого (mNeonGreen) флуоресцентных белков, разделенных линкером, содержащим сайт узнавания PLpro – аминокислотную последовательность TLKGGARTKV, соответствующую участку соединения nsp2 и nsp3. Далее каждый тип транслокационного биосенсора и результаты его работы будут рассмотрены отдельно.

#### 4.2.2.1 PLpro-sensor-TA

В первом варианте транслокационного сенсора (PLpro-sensor-TA) на С-конец конструкции был добавлен короткий мембранный «хвостовой якорь» (TA, tail anchor) из тирозинфосфатазы РТР1В, который обеспечивает локализацию биосенсора на цитозольной стороне мембраны ЭПР [194–195] (Рисунок 42, А). В составе генетической конструкции для экспрессии мембран-ассоциированной PLpro (PLpro-TA) были использованы домен Ubl2, папаин-подобная протеаза PLpro и домен NBD, помещенные под контроль индуцируемого промотора TRE3G. В качестве маркера эффективности трансфекции в состав конструкции был добавлен синий флуоресцентный белок mTagBFP2, отделенный от остальной конструкции T2A-пептидом. Тот же сигнал локализации TA использовался для направления PLpro на поверхность ЭПР (Рисунок 42, Б). Ожидалось, что при экспрессии в клетках млекопитающих PLpro-sensor-TA будет локализоваться на мембране ЭПР, а в присутствии активной протеазы линкер, связывающий флуоресцентные белки, будет расщепляться, что приведет к изменению внутриклеточной локализации красного белка и его равномерному распределению в цитоплазме клетки (Рисунок 43, А).

Для тестирования полученного биосенсора был проведен следующий эксперимент. Клетки линии HeLa были котрансфицированы генетическими конструкциями PLpro-sensor-TA и PLpro-TA. Через 24 часа экспрессия PLpro-TA была индуцирована при помощи доксициклина. Флуоресценцию детектировали спустя несколько часов в красном (mScarlet I) и зеленом (mNeonGreen) каналах. В конце наблюдения экспрессию PLpro подтверждали наличием сигнала в синем канале (mTagBFP2).

PLpro-sensor-TA показал ожидаемую внутриклеточную локализацию в ER в виде тонкой сети в цитоплазме как в зеленом, так и в красном каналах (Рисунок 43, Б). При индукции экспрессии PLpro-TA красная флуоресценция претерпевала постепенное изменение внутриклеточной локализации: сеть ЭПР исчезала, а красный сигнал становился равномерно распределенным по всей клетке (Рисунок 43, Б). В то же время зеленый сигнал сохранил свое распределение без изменений. На основании этих данных мы пришли к выводу, что наблюдаемые процессы полностью соответствуют ожидаемому расщеплению сенсора на растворимую часть mScarlet I и ассоциированную с ЭПР часть mNeonGreen-TA, которое происходит вследствие протеолиза. Красный сигнал в области клеточного ядра в рамках данного эксперимента был наиболее наглядным параметром, отражающим работу биосенсора: в отсутствие PLpro он оставался низким, а после активации экспрессии протеазы увеличивался. Поэтому для проведения количественной оценки работы сенсора мы рассчитали соотношение ядро/цитоплазма в красном канале и нормировали его на соотношение ядро/цитоплазма в зеленом канале для одних и тех же областей интереса (ROI). Полученное значение параметра при активации PLpro в клетках увеличивалось примерно в 2 раза: среднее соотношение до



*Описание к рисунку дано на следующей странице.*

**Рисунок 43. Генетически кодируемый транслокационный сенсор PLpro-sensor-TA.** (А) Схематическое изображение биосенсора, состоящего из флуоресцентных белков mScarlet I и mNeonGreen, соединенных линкером, содержащим сайт узнавания PLpro (LKGG). Расположенный на С-конце конструкции «хвостовой якорь» (ТА) обеспечивает локализацию биосенсора на мембране ЭПР. Рекомбинантная протеаза PLpro-TA (также ассоциированная с ЭПР при помощи ТА-сигнала локализации) расщепляет линкер, в результате чего mScarlet I высвобождается в цитоплазму. (Б) Репрезентативные изображения клеток линии HeLa, экспрессирующих PLpro-sensor-TA в отсутствие (верхняя панель) или в присутствии (нижняя панель) PLpro-TA. На рисунке показаны изображения в зеленом и красном каналах, а также их наложение. Масштабная линейка 10 мкм. (В) Диаграмма «ящички с усами» для соотношения ядро/цитоплазма (nucleus/cytosol) для клеток, экспрессирующих PLpro-sensor-TA в отсутствие PLpro (слева, 190 клеток) и в присутствии PLpro (справа, 150 клеток). Для каждого графика показаны медиана, среднее значение, 1-й и 3-й квартили, а также минимальное и максимальное значения. Красный и зеленый «ящички с усами» показывают соотношение флуоресценции ядра и цитоплазмы в соответствующих каналах, желтый «ящик с усами» — отношение полученных значений друг к другу. \*, \*\*, \*\*\*: р-значения менее 0.05, 0.01, и 0.001, соответственно (t-критерий).

транслокации составляло 1,04, а после транслокации – 2,11 (Рисунок 43, В). Полученные значения позволяют оценить динамический диапазон работы биосенсора как пригодный для решения некоторых биологических задач, а результат работы сенсора – положительным. Также в качестве преимущества данного дизайна можно считать сравнительно небольшие размеры биосенсора – последовательность ТА, обеспечивающая ЭПР-локализацию, состоит всего лишь из 24 аминокислот, в то время как часть белка nsр3 с трансмембранным участком, которая будет использована в последующих конструкциях, имеет длину в 740 аминокислот, что значительно осложняет ее экспрессию в клетках человека.

#### 4.2.2.2 PLpro-sensor-Plus

Второй вариант дизайна транслокационного биосенсора, PLpro-sensor-Plus, основан на использовании части молекулы nsр3, содержащей трансмембранный домен (ТМ1–4), для заякоривания белка на мембране ЭПР (Рисунок 42, А). Таким образом, ассоциация с ЭПР достигается не с помощью искусственно добавленного сигнала локализации ТА, а путем использования части молекулы вируса, что позволяет создать условия эксперимента, максимально приближенные к нативным: в ходе инфекции домен ТМ1–4 в составе nsр3 обеспечивает ассоциацию вирусного полипротеина на эндоплазматическом ретикулуме клетки-хозяина.

В составе генетической конструкции для экспрессии мембран-ассоциированной PLpro (PLpro-Plus) сигнал ЭПР-локализации ТА также был заменен на мембран-ассоциированную часть последовательности белка nsр3, имитируя реальное расположение каталитического домена PLpro во внутриклеточном пространстве при инфекции. В состав PLpro-Plus вошли домен Ubl2, папаин-подобная протеаза PLpro, домен NBD, домен MD и 4 трансмембранных участка (ТМ1–4),

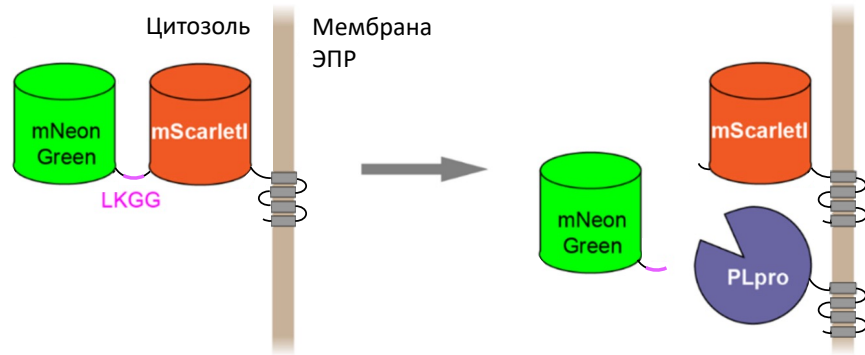
помещенные под контроль конститутивного промотора CMV. В качестве маркера эффективности трансфекции в составе конструкции также использовался mTagBFP2, отделенный T2A-пептидом (Рисунок 42, Б).

Для тестирования PLpro-sensor-Plus мы создали стабильную линию клеток HeLa, экспрессирующих биосенсор, при помощи метода лентивирусной трансдукции. Далее клетки стабильной линии были трансфицированы генетической конструкцией для экспрессии мембран-ассоциированной протеазы (PLpro-Plus). В качестве контроля были использованы клетки стабильной линии, не подвергавшиеся трансфекции. Флуоресценцию детектировали спустя 24 часа в красном (mScarlet I) и зеленом (mNeonGreen) каналах. В конце наблюдения экспрессию PLpro в экспериментальной чашке подтверждали наличием сигнала в синем канале (mTagBFP2) (Рисунок 44, А).

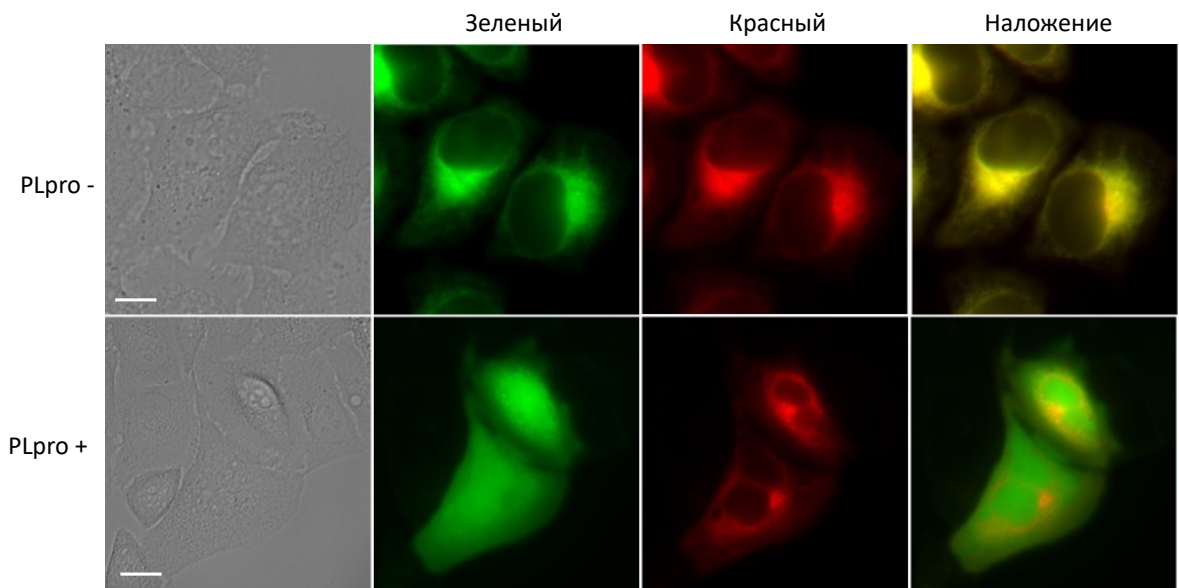
В отсутствие протеазы PLpro-sensor-Plus показал ожидаемую внутриклеточную локализацию в виде ретикулярной сети как в зеленом, так и в красном каналах (Рисунок 44, Б). В экспериментальных клетках с протеазой наблюдалась транслокация зеленого флуоресцентного сигнала в цитоплазму, вызванная протеолизом (Рисунок 44, Б). В то же время красный сигнал сохранил свое распределение без изменений.

Рассчитанное соотношение сигналов для PLpro-sensor-Plus увеличилось примерно в 2,25 раз в клетках с экспрессией PLpro по сравнению с контрольными клетками (среднее соотношение до транслокации составляло 1,19, а после транслокации – 2,68) (Рисунок 44, В). Полученный динамический диапазон можно считать сравнимым с результатом, полученным для предыдущей версии биосенсора PLpro-sensor-TA, где соотношение увеличилось в 2 раза. Несмотря на то что данная версия сенсора не показала большой разницы в ширине динамического диапазона, ее главным преимуществом остается обеспечение нативных условий для работы протеазы благодаря использованию части белка nsp3 для ассоциации с мембраной ЭПР. Данная особенность важна при использовании полученной системы в контексте скрининговой платформы для тестирования ингибиторов PLpro. Кроме того, подобная конструкция биосенсора открывает новую нишу для его применения – использование в культуре клеток для обнаружения инфекции. В данном случае максимально приближенный белковый контекст в работе биосенсора имеет особую важность.

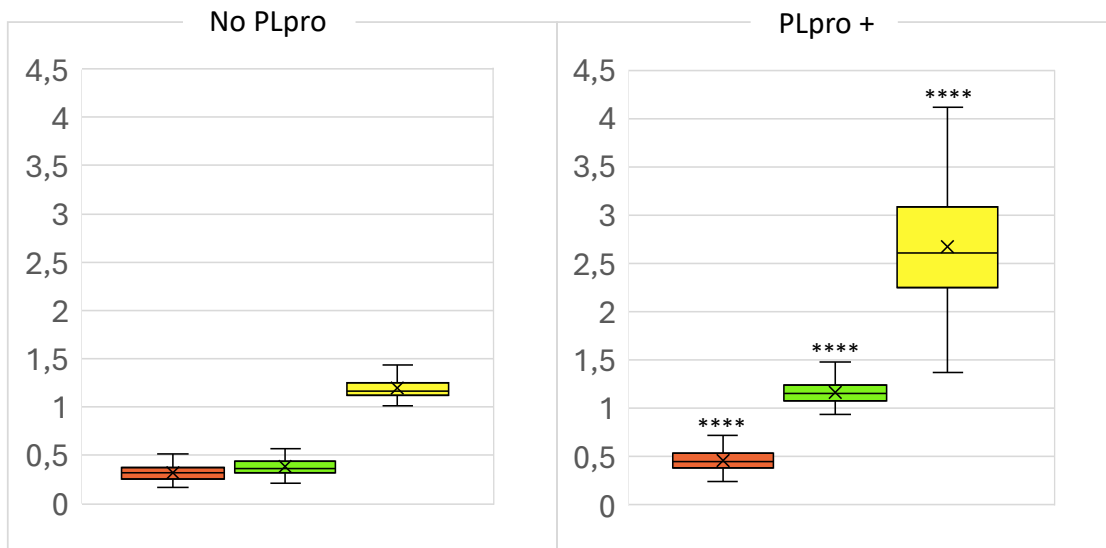
A



Б



B



■ Red Nuc/Cyto  
■ Green Nuc/Cyto  
■ (Green Nuc/Cyto) / (Red Nuc/Cyto)

*Описание к рисунку дано на следующей странице.*



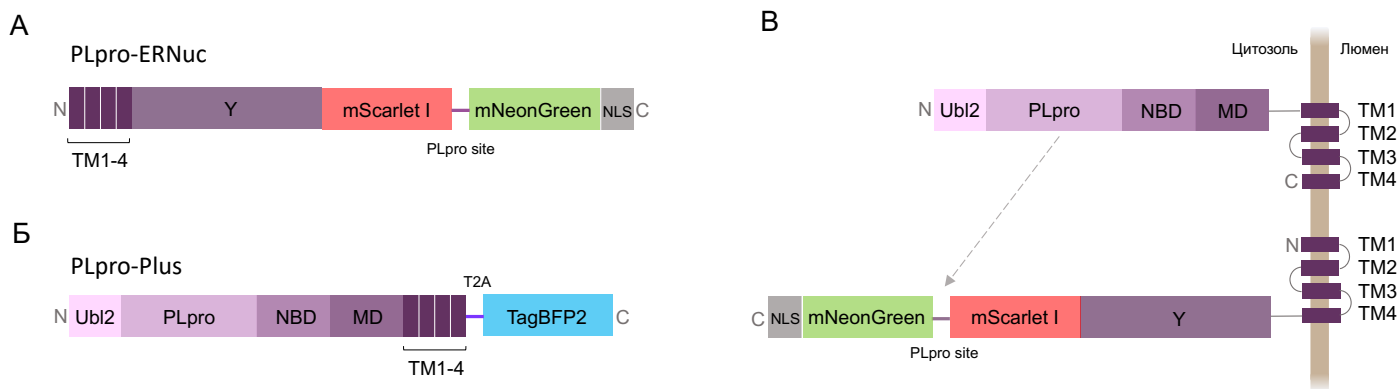
**Рисунок 44. Генетически кодируемый транслокационный сенсор PLpro-sensor-Plus. (А)** Схематическое изображение биосенсора, состоящего из флуоресцентных белков mNeonGreen и mScarlet I, соединенных линкером, содержащим сайт узнавания PLpro (LKGG). Расположенный на С-конце конструкции мембран-ассоциированный участок белка nsp3 обеспечивает локализацию биосенсора на мембране ЭПР. Рекомбинантная протеаза PLpro-Plus (также ассоциированная с ЭПР при помощи трансмембранного участка nsp3) расщепляет линкер, в результате чего mNeonGreen высвобождается в цитоплазму. **(Б)** Репрезентативные изображения клеток стабильной линии HeLa, экспрессирующих PLpro-sensor-Plus в отсутствие (верхняя панель) или в присутствии (нижняя панель) PLpro-Plus. На рисунке показаны изображения в зеленом и красном каналах, а также их наложение. Масштабная линейка 10 мкм. **(В)** Диаграмма «ящички с усами» для соотношения ядро/цитоплазма (nucleus/cytosol) для клеток, экспрессирующих PLpro-sensor-Plus в отсутствие PLpro (слева, 101 клетка) и в присутствии PLpro (справа, 102 клетки). Для каждого графика показаны медиана, среднее значение, 1-й и 3-й квартили, а также минимальное и максимальное значения. Зеленый и красный «ящички с усами» показывают соотношение флуоресценции ядра и цитоплазмы в соответствующих каналах, желтый «ящик с усами» — отношение полученных значений друг к другу. \*\*\*: *p*-значение менее 0.0001 (*t*-критерий).

#### 4.2.2.3 PLpro-ERNuc

Далее мы сосредоточились на модернизации конструкции PLpro-sensor-Plus с целью увеличения его динамического диапазона. При этом важно было сохранить особенности дизайна, которые обеспечивают условия, максимально приближенные к реальной инфекции. В результате мы разработали третью версию транслокационного биосенсора для детекции активности PLpro – PLpro-ERNuc, которая показала себя как наиболее успешная. В связи с этим с ней было проведено наибольшее количество экспериментов.

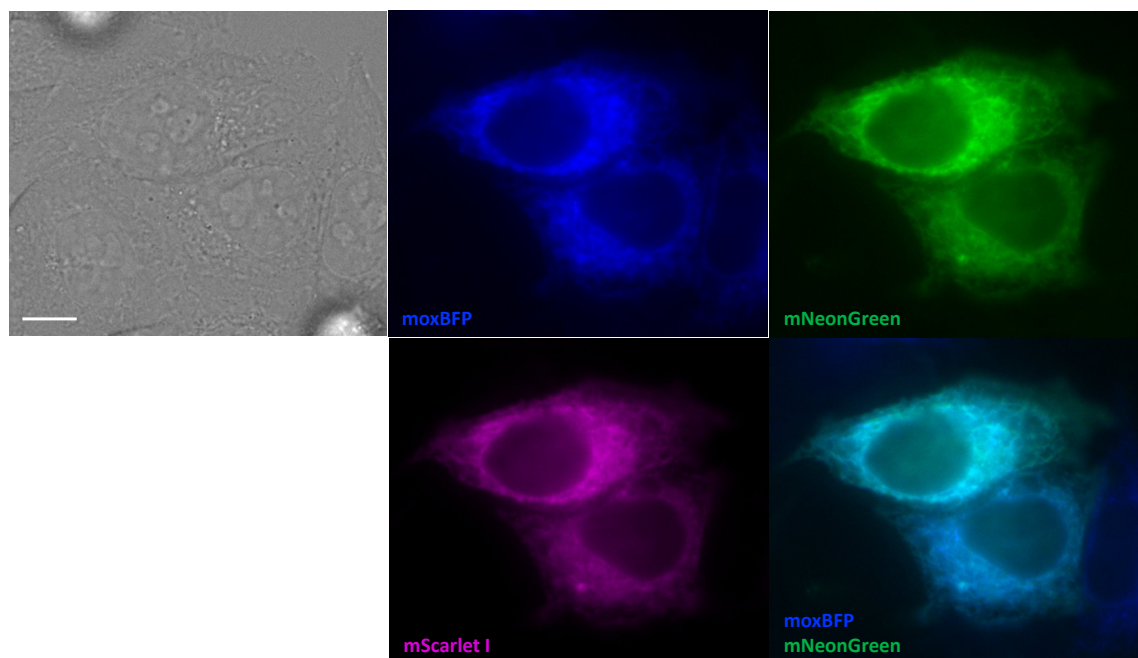
Как и в случае предыдущей версии, для направления PLpro-ERNuc на цитоплазматическую поверхность мембраны эндоплазматического ретикула также использовался фрагмент белка nsp3 (Рисунок 42, А). Данная особенность позволяет точно имитировать естественное положение сайтов-мишеней PLpro относительно мембраны ЭПР, что имеет особую важность при использовании сенсора в системах с живым вирусом SARS-CoV-2, где расщепление обеспечивается нативной вирусной протеазой. Ключевой особенностью в конструкции PLpro-ERNuc является добавление сигнала ядерной локализации (NLS) на С-конец молекулы, что обеспечивает накопление mNeonGreen в ядре после расщепления линкера протеазой (Рисунок 45, А). Именно это позволило увеличить динамический диапазон работы биосенсора в 7 раз – использование PLpro-ERNuc в экспериментах обеспечивало более четкую транслокацию зеленого сигнала из цитоплазмы в ядро.

Новая вариация сенсора была протестирована нами в двух типах модельных систем – в клетках, экспрессирующих рекомбинантную PLpro, и в клетках, зараженных вирусом SARS-CoV-2.



**Рисунок 45.** Схематическое изображение генетических конструкций *PLpro-ERNuc* (А) и *PLpro-Plus* (Б), а также их предполагаемая внутриклеточная локализация (В). Индикация доменов *nsp3* представлена на рисунке 39. *mScarlet I*, *mNeonGreen*, *mTagBFP2* – красный, зеленый и синий флуоресцентные белки, соответственно. *T2A* – «саморасщепляющийся» пептид *T2A*, *NLS* – сигнал ядерной локализации. Серая стрелка указывает ориентацию протеазы на сайт расщепления *PLpro*.

Вначале мы подтвердили локализацию *PLpro-ERNuc* на мембране эндоплазматической сети при помощи котрансфекции биосенсора с маркером *mChBFP* [196]. *mChBFP* представляет из себя мономерный синий флуоресцентный белок, оптимизированный для окислительных условий. Известно, что эндоцитарные и секреторные компартменты эукариот поддерживают кислые значения pH – значительно более низкие, чем значения pH цитоплазмы, что может провоцировать формирование дисульфидных связей в молекулах флуоресцентных белков и негативно сказываться на фолдинге и стабильности белка [197]. *mChBFP* оптимизирован для окислительных условий ЭПР и локализуется на его мембране за счет сигнальной последовательности пролактина на N-конце и мотива *KDEL* на C-конце [196]. Как и ожидалось, *PLpro-ERNuc* (зеленый и красный каналы) показал высокую степень колокализации с *mChBFP* (синий канал) (Рисунок 46). При программной обработке изображений с помощью плагина *Coloc 2 FIJI ImageJ* коэффициент корреляции Пирсона при статистической оценке колокализации на поздних этапах экспрессии составил 0,93.

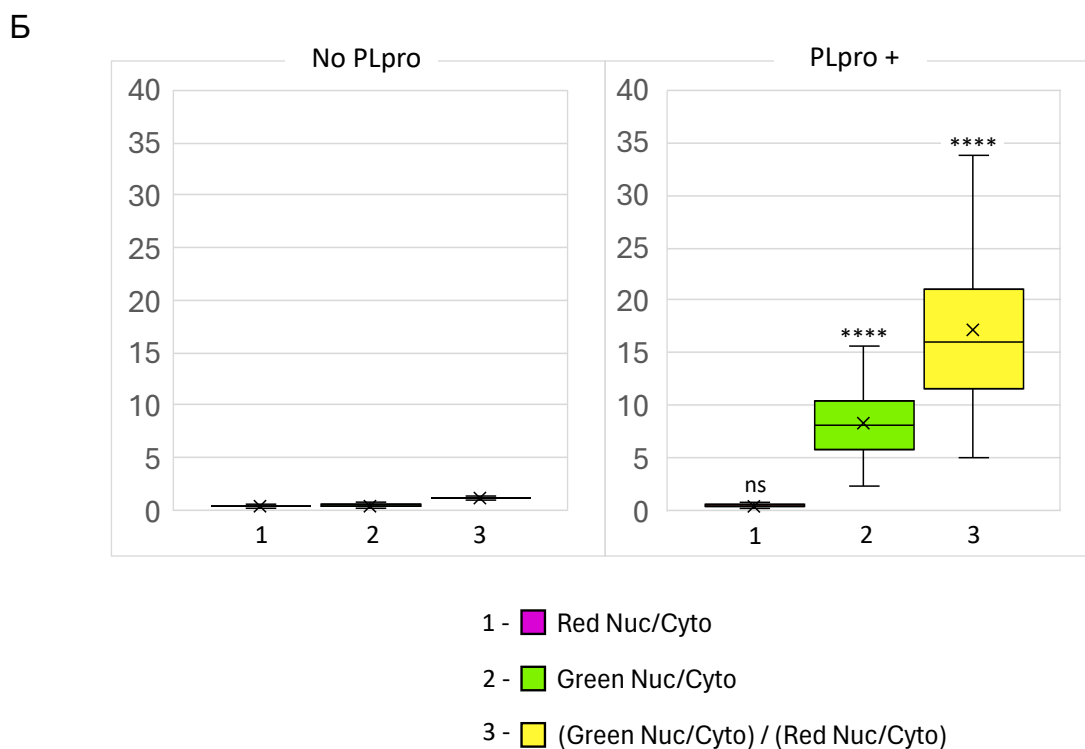
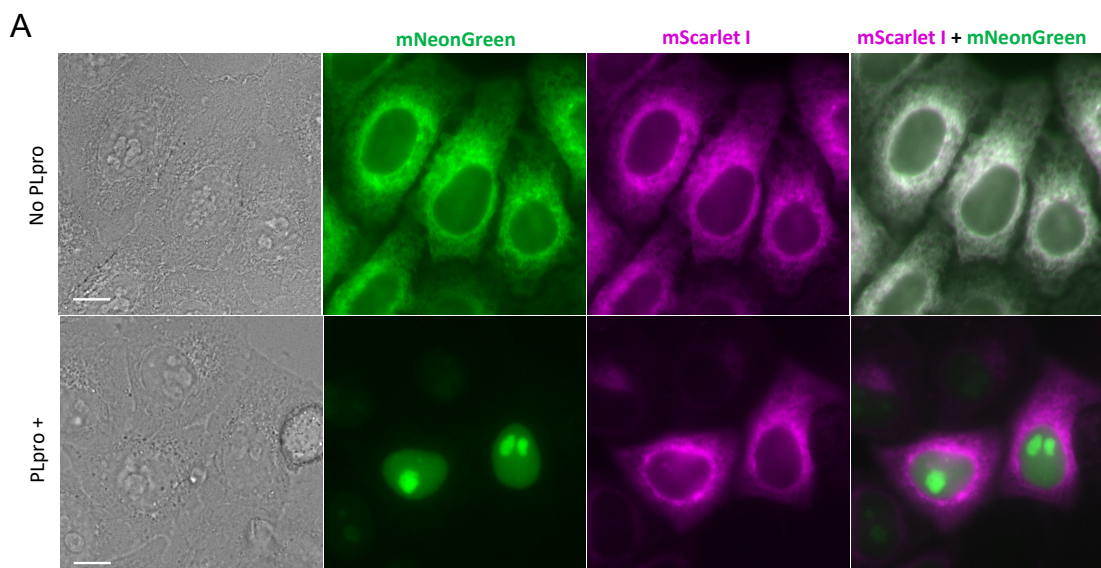


**Рисунок 46. Колокализация PLpro-ERNuc с маркером ЭПР – mChBFP.** Клетки линии HeLa были котрансфицированы плазмидами PLpro-ERNuc и mChBFP. Флуоресцентные изображения в синем, зеленом и красном (использован псевдоцвет magenta) каналах показаны вместе с наложением синего и зеленого каналов. Масштабная линейка 10 мкм.

Для первой серии экспериментов в модельной системе с рекомбинантной протеазой клетки стабильной линии HeLa, экспрессирующие PLpro-ERNuc, были трансфицированы генетической конструкцией для экспрессии мембран-ассоциированной протеазы PLpro-Plus (Рисунок 45, Б). Мы предполагали, что совместная экспрессия PLpro-Plus и PLpro-ERNuc приведет к близости протеазного домена к целевому сайту расщепления и осуществлению протеолиза (Рисунок 45, В). В качестве контроля были использованы клетки стабильной линии, не подвергавшиеся трансфекции. Флуоресценцию детектировали спустя 24 часа в красном (mScarlet I) и зеленом (mNeonGreen) каналах, а экспрессию PLpro в экспериментальной чашке подтверждали наличием сигнала в синем канале (mTagBFP2).

В контрольных клетках без протеазы PLpro-ERNuc показал ожидаемую внутриклеточную локализацию в виде сети ЭПР в зеленом и красном каналах (Рисунок 47, А). При наличии протеазы наблюдалась транслокация зеленого флуоресцентного сигнала в ядро, вызванная протеолизом, в то время как красный сигнал продолжал детектироваться в ЭПР (Рисунок 47, А).

Для количественной оценки наблюдаемой транслокации мы рассчитали соотношение сигнала ядро/цитозоль в зеленом канале и нормализовали его на соотношение сигнала ядро/цитозоль в красном канале для тех же областей интереса (ROI), как было описано ранее [198] (Рисунок 47, Б). Рассчитанное соотношение сигналов для PLpro-ERNuc увеличилось

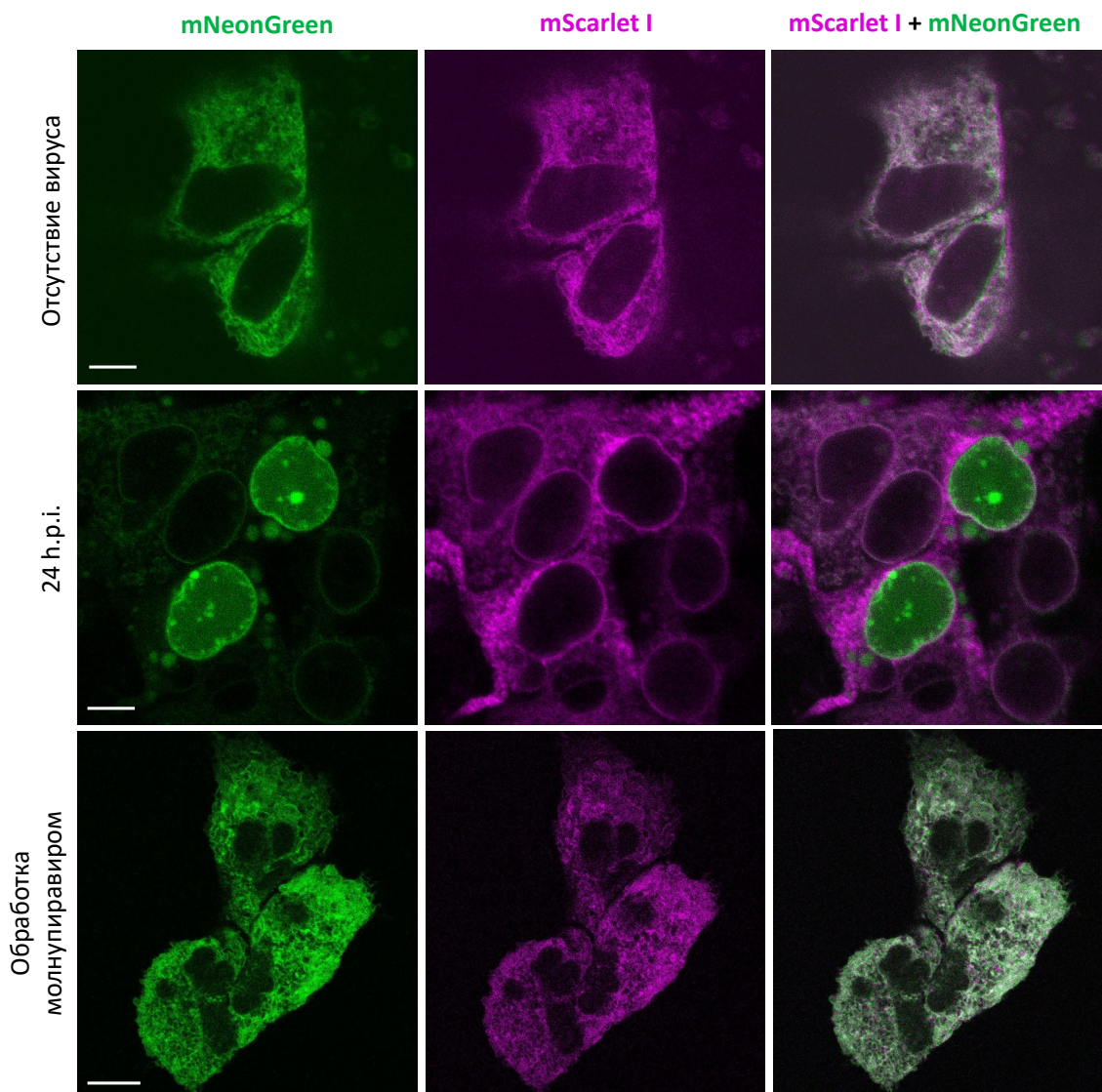


**Рисунок 47. Генетически кодируемый транслокационный сенсор PLpro-ERNuc для оценки активности протеазы PLpro SARS-CoV-2. (А)** Репрезентативные изображения клеток стабильной линии HeLa, экспрессирующих PLpro-ERNuc в отсутствие (верхняя панель) или в присутствии (нижняя панель) PLpro-Plus. На рисунке показаны изображения в зеленом и красном (использован псевдоцвет magenta) каналах, а также их наложение. Масштабная линейка 10 мкм. **(Б)** Диаграмма «ящики с усами» для соотношения ядро/цитоплазма (nucleus/cytosol) для клеток, экспрессирующих PLpro-sensor-Plus в отсутствие PLpro (слева, 107 клеток) и в присутствии PLpro (справа, 103 клетки). Для каждого графика показаны медиана, среднее значение, 1-й и 3-й квартили, а также минимальное и максимальное значения. Зеленый и красный (использован псевдоцвет magenta) «ящики с усами» показывают соотношение флуоресценции ядра и цитоплазмы в соответствующих каналах, желтый «ящик с усами» – отношение полученных значений друг к другу. \*\*\*\*:  $p$ -значение менее 0.0001 ( $t$ -критерий), ns - not significant, не является статистически значимым.

примерно в 14,3 раза в клетках с экспрессией PLpro по сравнению с контрольными клетками (среднее соотношение до транслокации составляло 1,20, а после транслокации – 17,17). На основании полученных данных мы заключили, что наблюдаемые изменения полностью соответствуют ожидаемому катализируемому PLpro расщеплению сенсора на локализованный в ядре белок mNeonGreen и связанную с ЭПР часть nsp3-mScarlet I. Рассчитанное соотношение сигналов для PLpro-ERNuc подтвердило надежность и контрастность полученного биосенсора. Динамический диапазон для PLpro-sensor-TA составил 2, для PLpro-sensor-Plus – 2,25, а для PLpro-ERNuc – 14,3, что почти в 7 раз превышает значения, полученные ранее для предыдущих вариаций биосенсора. Таким образом, дизайн PLpro-ERNuc был признан наиболее успешным.

В ходе эксперимента отдельные клетки демонстрировали различную степень транслокации mNeonGreen из ЭПР в ядро – эту особенность можно проследить на рисунке 47, Б, где желтый график в системе с протеазой демонстрирует большой разброс значений соотношения сигналов. Подобную гетерогенность можно объяснить как результат транзientной трансфекции плазмидой для экспрессии PLpro-Plus. Известно, что экспрессия генов с плазмидной ДНК начинается только после клеточного деления, когда плазида попадает в ядро. Таким образом, клетки, демонстрирующие самые низкие значения соотношения сигналов, могли инициировать экспрессию PLpro-Plus лишь незадолго до микроскопии.

Далее мы оценили работу полученного биосенсора в экспериментальной модели культуры клеток млекопитающих, зараженных SARS-CoV-2. Для повышения воспроизводимости экспериментов мы создали стабильную линию клеток Huh7.5, экспрессирующую PLpro-ERNuc. Линия Huh7.5 была выбрана для инфекции не случайно – в недавнем исследовании было продемонстрировано, что SARS-CoV-2 способен эффективно заражать линии опухолевых клеток печени (линии Huh7.5 и HepG2) [199]. Далее клетки были инфицированы вирусом SARS-CoV-2, который удалялся из системы спустя два часа после заражения (h.p.i., hours post-infection). В отличие от предыдущей экспериментальной системы, где протеолитическую активность обеспечивала генетически кодируемая протеаза (конструкция PLpro-Plus), здесь расщепление линкера в биосенсоре происходило за счет работы вирусной протеазы, которая экспрессировалась во время репликации SARS-CoV-2 в культуре клеток. Конфокальная флуоресцентная микроскопия экспериментальных образцов показала, что в клетках, не подвергавшихся обработке вирусом (Рисунок 48), а также в инфицированных SARS-CoV-2 клетках на ранних стадиях инфекции (4–8 hpi, изображения не представлены) как красный, так и зеленый флуоресцентные сигналы были локализованы в сети ЭПР. Спустя 24 часа после заражения в некоторых клетках зеленая ретикулярная сеть исчезла, а зеленый флуоресцентный сигнал накапливался в ядре (Рисунок 48).



**Рисунок 48.** *Заражение клеток линии Huh7.5, экспрессирующих PLpro-ERNuc, вирусом SARS-CoV-2. Конфокальная микроскопия фиксированных клеток в зеленом и красном (использован псевдоцвет magenta) каналах в отсутствие инфекции SARS-CoV-2 (верхняя панель), инфицированных SARS-CoV-2, 24 h.p.i. (средняя панель), инфицированных SARS-CoV-2 и обработанных молниупиравиром, 24 h.p.i. (нижняя панель). Масштабная линейка 10 мкм.*

Чтобы подтвердить гипотезу о том, что изменение внутриклеточной локализации зеленого сигнала происходит в результате работы вирусной протеазы, мы провели дополнительный эксперимент, обработав зараженные вирусом клетки РНК-ингибитором SARS-CoV-2 – молниупировиром [200]. Результаты флуоресцентной микроскопии показали, что при обработке инфицированных SARS-CoV-2 клеток противовирусным агентом транслокации сенсора не происходит (Рисунок 48). Это подтверждает тот факт, что PLpro-ERNuc демонстрирует эффективную работу в системе с нативной вирусной протеазой.

Поскольку конструкция PLpro-ERNuc предполагает локализацию, ассоциированную с мембраной ЭПР, мы не проводили эксперименты по наработке биосенсора в клетках бактерий,

его выделению и очитке с последующей характеристикой белка. Также стоит отметить, что мы не наблюдали расщепления и транслокации биосенсора в отсутствие PLpro, на основании чего можно заключить, что мотив LKGGAPTKV в линкере не распознается эндогенными клеточными протеазами, обеспечивая селективность PLpro-ERNuc.

На рисунках 47 и 48 можно заметить значительное накопление сигнала mNeonGreen-NLS в ядрышках. Подобное явление было описано для некоторых флуоресцентных белков, слитых с NLS или с ядерным белком вследствие их динамических электростатических взаимодействий с РНК [201,202]. С целью упрощения анализа для оценки флуоресцентного сигнала в ядре выделялась вся область ядра целиком, включая как относительно тусклую нуклеоплазму, так и яркие ядрышки. Выделение только участка нуклеоплазмы в качестве области для оценки сигнала в ядре, исключая ядрышки, не показало различий в результатах обчета.

## 5. Заключение

В рамках данной работы была проведена разработка клеточных систем для безопасного изучения отдельных белков SARS-CoV-2 при помощи методов флуоресцентной микроскопии. Первая часть исследования посвящена созданию модели на основе клеток человека, экспрессирующих М-белок SARS-CoV-2. В ходе экспериментов с данной модельной системой нами была обнаружена не описанная ранее тенденция М-белка к олигомеризации. При экспрессии белка в клетках линии HEK293T наблюдалось появление так называемых OSER-структур, что указывает на наличие белок-белковых взаимодействий между молекулами М-белка, расположенными на соседних параллельных мембранах. Мы предполагаем, что подобные межмембранные взаимодействия М-белков могут играть важную роль при отшнуровывании вирусных частиц. При экспрессии в линии HeLa в некоторых клетках молекулы М-белка формировали жесткие филаментоподобные структуры, предположительно происходящие из мембраны ЭПР. Так как М-белок может служить выгодной мишенью для противовирусной терапии, данные модельные системы потенциально могут быть использованы для безопасного высокопроизводительного скрининга ингибиторов олигомеризации М-белка.

Вторая часть данной работы посвящена созданию генетически кодируемых биосенсоров для детекции активности протеазы PLpro SARS-CoV-2. Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры представляют собой мощный инструмент, позволяющий напрямую детектировать различные процессы в живых клетках без использования каких-либо дополнительных химических веществ или антител. Подобные биосенсоры, направленные на изучение активности вирусных протеаз, могут быть применены в двух основных областях: (i) высокопроизводительный скрининг ингибиторов протеаз (противовирусных препаратов) и (ii) мониторинг распространения вирусной инфекции на уровне отдельных клеток (в основном на уровне моделей клеточных культур).

Работа генетически кодируемых сенсоров для изучения активности протеаз обычно основана на одном из трех основных принципов, связанных с изменением показателей флуоресценции: исчезновение FRET между двумя флуоресцентными белками, изменение внутриклеточной локализации (транслокация) флуоресцентного белка или появление флуоресценции вследствие переориентации полипептидной цепи флуоресцентного белка и созревания хромофора (FlipGFP). Каждый из трех подходов имеет свои преимущества и недостатки. На молекулярном уровне только FRET-сенсоры обеспечивают мгновенный ответ на расщепление линкера протеазой, тогда как внутриклеточная транслокация происходит в течение нескольких минут, а созревание FlipGFP требует десятков минут. В то же время, FRET-сенсоры обладают наименьшим динамическим диапазоном (изменение сигнала в 1,5–1,8 раза), а для



транслокационных биосенсоров и FlipGFP характерны гораздо более контрастные и устойчиво детектируемые изменения. Основным преимуществом сенсоров на основе FlipGFP является сильное (~70-кратное) увеличение флуоресценции при расщеплении протеазой, что делает их пригодными для высокопроизводительного скрининга с использованием планшетных флуориметров и метода FACS (многоцветная проточная цитометрия). Биосенсоры на основе транслокации обладают наибольшей гибкостью в выборе цвета, поскольку позволяют использовать флуоресцентные белки любых цветов в различных комбинациях.

В данной работе мы разработали дальнекрасный FRET-сенсор, а также три варианта транслокационных флуоресцентных биосенсоров для детекции активности протеазы PLpro SARS-CoV-2. Все они продемонстрировали эффективную работу в *in vitro* экспериментах и могут быть использованы в лабораторной практике. Наиболее успешно показала себя последняя версия дизайна транслокационного биосенсора – PLpro-ERNuc. По сравнению с ранее опубликованными биосенсорами на PLpro, PLpro-ERNuc имеет ряд преимуществ. Во-первых, дизайн нашего биосенсора предполагает внутриклеточную локализацию и белковый контекст, максимально приближенные к естественной мишени PLpro во время инфекции SARS-CoV-2. Во-вторых, PLpro-ERNuc характеризуется гораздо более широким динамическим диапазоном, чем наши две предыдущие версии транслокационного биосенсора (увеличение диапазона с 2-кратного до 14-кратного).

PLpro-ERNuc продемонстрировал надежный результат как на модели с рекомбинантной протеазой, так и на модели инфекции SARS-CoV-2. Поскольку скрининг на основе PLpro-ERNuc можно проводить в живых клетках, данная система потенциально пригодна для одновременной оценки цитотоксичности тестируемых соединений и их проницаемости для клеточной мембраны. Биосенсоры, позволяющие визуально определить инфицированные клетки, представляют большой интерес для вирусологов, поскольку дают возможность отслеживать распространение вируса в культуре. Во-первых, они позволяют измерять активность протеазы в контексте экспрессии с другими вирусными белками, а также с учетом изменяемой вирусом внутриклеточной мембранной среды, что может влиять на локализацию протеазы и ее активность. Во-вторых, использование подобных биосенсоров дает возможность оценить кинетику распространения вируса в клеточной культуре. Также стоит отметить, что данный тип биосенсора можно использовать для обнаружения передачи вируса от клетки к клетке через межклеточные контакты, что характерно для некоторых типов инфекций [203], позволяя лучше изучить данный механизм передачи и его роль в устойчивости к противовирусным препаратам.

Кроме того, скрининговые платформы противовирусных препаратов, основанные на использовании живого вируса, обладают рядом преимуществ. В процессе коронавирусной инфекции протеаза PLpro экспрессируется в клетке вместе со многими другими вирусными

белками. Это означает, что межмолекулярные взаимодействия вирусных белков могут оказывать влияние на потенциальный ингибитор протеазы. Помимо этого, стоит учитывать, что коронавирусная инфекция вызывает значительные перестройки клеточных мембран, которые не происходят при транзientной трансфекции клеток плазмидой для экспрессии протеазы. Реорганизация клеточных мембран в ходе инфекции также может оказывать влияние на взаимодействие протеазы и ингибитора.

## 6. ВЫВОДЫ

1. При экспрессии в клетках линии HEK293T М-белок SARS-CoV-2 локализуется в сети ЭПР. При этом в некоторых клетках М-белок вызывает перестройку структуры ЭПР с образованием “стопок” мембран микрометрового размера.

2. При экспрессии в клетках линии HeLa М-белок преимущественно локализуется в цистернах аппарата Гольджи и лизосомах. При этом в некоторых клетках также наблюдается образование жестких филаментоподобных структур длиной около 10 мкм, не связанных с цитоскелетом.

3. Впервые создан генетически кодируемый флуоресцентный сенсор дальнекрасного спектра на основе резонансного переноса энергии (FRET) для растворимой формы протеазы PLpro вируса SARS-CoV-2.

4. Впервые созданы 3 варианта генетически кодируемых флуоресцентных сенсора на основе транслокации для детекции активности мембран-ассоциированной формы протеазы PLpro в живых клетках в режиме реального времени.

5. На основе транслокационного биосенсора PLpro-ERNuc была создана модельная система для детекции активности PLpro в клеточной культуре, эффективность которой была показана как с применением рекомбинантной протеазы, так и в случае инфекции SARS-CoV-2.

**Список литературы**

1. Beilstein F., Cohen G.H., Eisenberg R.J., Nicolas V., Esclatine A., Padeloup D. Dynamic organization of Herpesvirus glycoproteins on the viral envelope revealed by super-resolution microscopy // *PLoS Pathog.* 2019. V. 15. № 12.
2. Dáder B., Burckbuchler M., Macia J.L., Alcon C., Curie C., Gargani D. Split green fluorescent protein as a tool to study infection with a plant pathogen, Cauliflower mosaic virus // *PLoS One.* 2019. P. 14. № 3.
3. Kumar A., Kim J.H., Ranjan P., Metcalfe M.G., Cao W., Mishina M. Influenza virus exploits tunneling nanotubes for cell-to-cell spread // *Sci. Rep.* 2017 V. 7.
4. Mazumder N., Lyn R.K., Singaravelu R., Ridsdale A., Moffatt D.J., Hu C.W. Fluorescence lifetime imaging of alterations to cellular metabolism by domain 2 of the hepatitis C virus core protein // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 6.
5. Zgheib S., Lysova I., Réal E., Dukhno O., Vauchelles R., Pires M. Quantitative monitoring of the cytoplasmic release of NCp7 proteins from individual HIV-1 viral cores during the early steps of infection // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 945.
6. Siu Y.L., Teoh K.T., Lo J., Chan C.M., Kien F., Escriou N. The M, E, and N structural proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus are required for efficient assembly, trafficking, and release of virus-like particles // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 22. P. 11318–11330.
7. Boson B., Legros V., Zhou B., Siret E., Mathieu C., Cosset F.L. The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles // *J. Biol. Chem.* 2021. V. 296.
8. Wang H., Yang P., Liu K., Guo F., Zhang Y., Zhang G. SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway // *Cell. Res.* 2008. V. 18. № 2. P. 290–301.
9. Li X., Zhu W., Fan M., Zhang J., Peng Y., Huang F. Dependence of SARS-CoV-2 infection on cholesterol-rich lipid raft and endosomal acidification // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2021. V. 19. P. 1933–1943.
10. Froggatt H.M., Heaton B.E., Heaton N.S. Development of a Fluorescence-Based, High-Throughput SARS-CoV-2 3CL pro Reporter Assay // *J. Virol.* 2020. V. 94. № 22.
11. Ma C., Sacco M.D., Xia Z., Lambrinidis G., Townsend J.A., Hu Y. Discovery of SARS-CoV-2 Papain-like Protease Inhibitors through a Combination of High-Throughput Screening and a FlipGFP-Based Reporter Assay // *ACS Cent. Sci.* 2021. V. 7. № 7. P. 1245–1260.

12. Hahn F., Häge S., Herrmann A., Wangen C., Kicuntod J., Jungnickl D. Methodological development of a multi-readout assay for the assessment of antiviral drugs against sars-cov-2 // *Pathogens*. 2021. V. 10. № 9. P. 1076.
13. Hu B., Guo H., Zhou P., Shi Z.L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19 // *Nat. Rev. Microbiol.* 2021. V. 19. № 3. P. 141–154.
14. World Health Organization: [Электронный ресурс]. URL: <http://data.who.int>. (Дата обращения: 6.02.2024).
15. Holmes E.C., Goldstein S.A., Rasmussen A.L., Robertson D.L., Crits-Christoph A., Wertheim J.O. The origins of SARS-CoV-2: A critical review // *Cell*. 2021. V. 184. № 19. P. 4848–4856.
16. Dyer O. Fauci is defiant as congressional hearing into covid origins fails to produce smoking gun // *BMJ*. 2024. V. 385.
17. Wang N., Li S.Y., Yang X., Lou, Huang H.M., Zhang Y.J., Guo H. Serological Evidence of Bat SARS-Related Coronavirus Infection in Humans, China // *Virology*. 2018. V. 33. № 1. P. 104–107.
18. Xiao X., Newman C., Buesching C.D., Macdonald D.W., Zhou Z.M. Animal sales from Wuhan wet markets immediately prior to the COVID-19 pandemic // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1.
19. World Health Organization: [Электронный ресурс]. URL: <http://www.who.int>. (Дата обращения: 6.02.2024).
20. Tao K., Tzou P.L., Nouhin J., Gupta R.K., de Oliveira T., Kosakovsky Pond S.L. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants // *Nat. Rev. Genet.* 2021. V. 22. № 12. P. 757–773.
21. Greasley S.E., Noell S., Plotnikova O., Ferre R.A., Liu W., Bolanos B. Structural basis for the in vitro efficacy of nirmatrelvir against SARS-CoV-2 variants // *Journal of Biological Chemistry*. 2022. V. 298. № 6.
22. Gangavarapu K., Latif A.A., Mullen J.L., Alkuzweny M., Hufbauer E., Tsueng G. Outbreak.info genomic reports: scalable and dynamic surveillance of SARS-CoV-2 variants and mutations // *Nat. Methods*. 2023. V. 20. № 4. P. 512–522.
23. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China // *The Lancet*. 2020. V. 395. № 10223. P. 497–506.
24. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study // *The Lancet*. 2020. V. 395. № 10223. P. 507–513.
25. Hamming I., Timens W., Bulthuis M.L.C., Lely A.T., Navis G.J., van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis // *Journal of Pathology*. 2004. V. 203. № 2. P. 631–637.

26. Zhou P., Yang X. Lou, Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin // *Nature*. 2020. V. 579. № 7798. P. 270–273.
27. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding // *The Lancet*. 2020. V. 395. № 10224. P. 565–574.
28. Hartenian E., Nandakumar D., Lari A., Ly M., Tucker J.M., Glaunsinger B.A. The molecular virology of coronaviruses // *Journal of Biological Chemistry*. 2020. V. 295. № 37. P. 12910–12934.
29. Putlyaeva L.V., Lukyanov K.A. Studying SARS-CoV-2 with fluorescence microscopy // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. V. 22. № 12.
30. Chan J.F.W., Kok K.H., Zhu Z., Chu H., To K.K.W., Yuan S. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan // *Emerg. Microbes Infect.* 2020. V. 9. № 1. P. 221–236.
31. Roingard P., Eymieux S., Burlaud-Gaillard J., Hourieux C., Patient R., Blanchard E. The double-membrane vesicle (DMV): a virus-induced organelle dedicated to the replication of SARS-CoV-2 and other positive-sense single-stranded RNA viruses // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022. V. 79. № 8.
32. Hagemeyer M.C., Monastyrska I., Griffith J., van der Sluijs P., Voortman J., van Bergen en Henegouwen P.M. Membrane rearrangements mediated by coronavirus nonstructural proteins 3 and 4 // *Virology*. 2014. V. 458–459. P. 125–135.
33. Ghosh S., Dellibovi-Ragheb T.A., Kerviel A., Pak E., Qiu Q., Fisher M.  $\beta$ -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway // *Cell*. 2020. V. 183. № 6. P. 1520–1535.
34. Rossman J.S., Lamb R.A. Viral membrane scission // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2013. V. 29. P. 551–569.
35. Alsaadi E.A.J., Jones I.M. Membrane binding proteins of coronaviruses // *Future Virol.* 2019. V. 14. № 4. P. 275–286.
36. Artika I.M., Dewantari A.K., Wiyatno A. Molecular biology of coronaviruses: current knowledge // *Heliyon*. 2020. V. 6. № 8.
37. Yan W., Zheng Y., Zeng X., He B., Cheng W. Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022. V. 27. № 1.
38. Arya R., Kumari S., Pandey B., Mistry H., Bihani S.C., Das A. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins // *J. Mol. Biol.* 2021. V. 433. № 2.
39. Shang J., Ye G., Shi K., Wan Y., Luo C., Aihara H. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2 // *Nature*. 2020. V. 581. № 7807. P. 221–224.

40. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor // *Cell*. 2020. V. 181. № 2. P. 271–280.
41. Sungnak W., Huang N., Bécavin C., Berg M., Queen R., Litvinukova M. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes // *Nat Med*. 2020. V. 26. № 5. P. 681–687.
42. Lukassen S., Chua R.L., Trefzer T., Kahn N.C., Schneider M.A., Muley T. SARS -CoV-2 receptor ACE 2 and TMPRSS 2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells // *EMBO J*. 2020. V. 39. № 10.
43. Harrison A.G., Lin T., Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis // *Trends Immunol*. 2020. V. 41. № 12. P. 1100–1115.
44. Jackson C.B., Farzan M., Chen B., Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2022. V. 23. № 1. P. 3–20.
45. Chambers J.P., Yu J., Valdes J.J., Arulanandam B.P. SARS-CoV-2, Early Entry Events // *J. Pathog*. 2020.
46. Harrison S.C. Viral membrane fusion // *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2008. V. 15. № 7. P. 690–698.
47. Wu W., Cheng Y., Zhou H., Sun C., Zhang S. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: its role in the viral life cycle, structure and functions, and use as a potential target in the development of vaccines and diagnostics // *Virology*. 2023. V. 20. № 1.
48. Peng Y., Du N., Lei Y., Dorje S., Qi J., Luo T. Structures of the SARS -CoV-2 nucleocapsid and their perspectives for drug design // *EMBO J*. 2020. V. 39. № 20.
49. Mu J., Xu J., Zhang L., Shu T., Wu D., Huang M. SARS-CoV-2-encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells // *Sci. China Life Sci*. 2020. V. 63. № 9. P. 1413–1416.
50. Zhao H., Nguyen A., Wu D., Li Y., Hassan S.A., Chen J. Plasticity in structure and assembly of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein // *PNAS Nexus*. 2022. V. 1. № 2.
51. Yang H., Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development // *Nat. Rev. Microbiol*. 2021. V. 19. № 11. P. 685–700.
52. Iserman C., Roden C.A., Boerneke M.A., Sealfon R.S.G., McLaughlin G.A., Jungreis I. Genomic RNA Elements Drive Phase Separation of the SARS-CoV-2 Nucleocapsid // *Mol Cell*. 2020. V. 80. № 6. P. 1078–1091.
53. Wang B., Zhang L., Dai T., Qin Z., Lu H., Zhang L. Liquid–liquid phase separation in human health and diseases // *Signal Transduct. Target. Ther*. 2021. V. 6. № 1.

54. Lu S., Ye Q, Singh D., Cao Y., Diedrich J.K., Yates J.R. The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1.
55. Nieto-Torres J.L., DeDiego M.L., Álvarez E., Jiménez-Guardeño J.M., Regla-Nava J.A., Llorente M. Subcellular location and topology of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein // *Virology.* 2011. V. 415. № 2. P. 69–82.
56. Cao Y., Yang R., Lee I., Zhang W., Sun J., Wang W. Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors // *Protein Science.* 2021. V. 30. № 6. P. 1114–1130.
57. Schoeman D., Fielding B.C. Coronavirus envelope protein: Current knowledge // *Virol. J.* 2019. V. 16. № 1.
58. Liao Y., Tam J.P., Liu D.X. Viroporin activity of SARS-CoV E protein // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006. V. 581. P. 199–202.
59. Parthasarathy K., Ng L., Lin X., Ding X.L., Pervushin K., Gong X. Structural flexibility of the pentameric SARS coronavirus envelope protein ion channel // *Biophys. J.* 2008. V. 95. № 6. P. 39–41.
60. Pervushin K., Tan E., Parthasarathy K., Lin X., Jiang F.L., Yu D. Structure and inhibition of the SARS coronavirus envelope protein ion channel // *PLoS Pathog.* 2009. V. 5. № 7.
61. Torres J., Maheswari U., Parthasarathy K., Ng L., Liu D.X., Gong X. Conductance and amantadine binding of a pore formed by a lysine-flanked transmembrane domain of SARS coronavirus envelope protein // *Protein Science.* 2007. V. 16. № 9. P. 2065–2071.
62. Kuzmin A., Orekhov P., Astashkin R., Gordeliy V., Gushchin I. Structure and dynamics of the SARS-CoV-2 envelope protein monomer // *Proteins.* 2022. V. 90. № 5. P. 1102–1114.
63. Marques-Pereira C., Pires M.N., Gouveia R.P., Pereira N.N., Caniceiro A.B., Rosário-Ferreira N. SARS-CoV-2 Membrane Protein: From Genomic Data to Structural New Insights // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 6.
64. Ujike M., Taguchi F. Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions // *Viruses.* 2015. V. 7. № 4. P. 1700–1725.
65. Zhang Z., Nomura N., Muramoto Y., Ekimoto T., Uemura T., Liu K. Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly // *Nat Commun.* 2022. V. 13. № 1.
66. Tseng Y.T., Chang C.H., Wang S.M., Huang K.J., Wang C.T. Identifying SARS-CoV Membrane Protein Amino Acid Residues Linked to Virus-Like Particle Assembly // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 5.



67. Neuman B.W., Kiss G., Kunding A.H., Bhella D., Baksh M.F., Connelly S. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology // *J. Struct. Biol.* 2011. V. 174. № 1. P. 11–22.
68. Liu J., Sun Y., Qi J., Chu F., Wu H., Gao F. The membrane protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus acts as a dominant immunogen revealed by a clustering region of novel functionally and structurally defined cytotoxic T-lymphocyte epitopes // *Journal of Infectious Diseases.* 2010. V. 202. № 8. P. 1171–1180.
69. Yao H., Song Y., Chen Y., Wu N., Xu J., Sun C. Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus // *Cell.* 2020. V. 183. № 3. P. 730–738.
70. Liu C., Mendonça L., Yang Y., Gao Y., Shen C., Liu J. The Architecture of Inactivated SARS-CoV-2 with Postfusion Spikes Revealed by Cryo-EM and Cryo-ET // *Structure.* 2020. V. 28. № 11. P. 1218–1224.
71. Rahman M.S., Hoque M.N., Islam M.R., Islam I., Mishu I.D., Rahaman M.M. Mutational insights into the envelope protein of SARS-CoV-2 // *Gene Rep.* 2021. V. 22.
72. Pezeshkian W., Grünewald F., Narykov O., Lu S., Arkhipova V., Solodovnikov A. Molecular architecture and dynamics of SARS-CoV-2 envelope by integrative modeling // *Structure.* 2023. V. 31. № 4. P. 492–503.
73. Kern D.M., Sorum B., Mali S.S., Hoel C.M., Sridharan S., Remis J.P. Cryo-EM structure of SARS-CoV-2 ORF3a in lipid nanodiscs // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2021. V. 28. № 7. P. 573–582.
74. Neuman B.W., Adair B.D., Yoshioka C., Quispe J.D., Orca G., Kuhn P. Supramolecular Architecture of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Revealed by Electron Cryomicroscopy // *J. Virol.* 2006. V. 80. № 16. P. 7918–7928.
75. Neuman B.W., Kiss G., Kunding A.H., Bhella D., Baksh M.F., Connelly S. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology // *J. Struct. Biol.* 2011. V. 174. № 1. P. 11–22.
76. Bai C., Zhong Q., Gao G.F. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins // *Sci. China Life Sci.* 2022. V. 65. № 2. P. 280–294.
77. Ullrich S., Nitsche C. SARS-CoV-2 Papain-Like Protease: Structure, Function and Inhibition // *ChemBioChem.* 2022. V. 23. № 19.
78. Barretto N., Jukneliene D., Ratia K., Chen Z., Mesecar A.D., Baker S.C. The Papain-Like Protease of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Has Deubiquitinating Activity // *J. Virol.* 2005. V. 79. № 24. P. 15189–15198.
79. Simeoni M., Cavinato T., Rodriguez D., Gatfield D. I(nsp1)ecting SARS-CoV-2–ribosome interactions // *Commun. Biol.* 2021. V. 4. № 1.

80. Suryawanshi R.K., Koganti R., Agelidis A., Patil C.D., Shukla D. Dysregulation of Cell Signaling by SARS-CoV-2 // *Trends Microbiol.* 2021. V. 29. № 3. P. 224–37.
81. Lindner H.A., Lytvyn V., Qi H., Lachance P., Ziomek E., Ménard R.. Selectivity in ISG15 and ubiquitin recognition by the SARS coronavirus papain-like protease // *Arch. Biochem. Biophys.* 2007. V. 466. № 1. P. 8–14.
82. Mahmoudvand S., Shokri S. Interactions between SARS coronavirus 2 papain-like protease and immune system: A potential drug target for the treatment of COVID-19 // *Scand. J. Immunol.* 2021. V. 94. № 4.
83. Osipiuk J., Azizi S.A., Dvorkin S., Endres M., Jedrzejczak R., Jones K.A. Structure of papain-like protease from SARS-CoV-2 and its complexes with non-covalent inhibitors // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1.
84. David A., Parkinson N., Peacock T.P., Pairo-Castineira E., Khanna T., Cobat A. A common TMPRSS2 variant has a protective effect against severe COVID-19 // *Curr. Res. Transl. Med.* 2022. V. 70. № 2.
85. Zhou Y., Vedantham P., Lu K., Agudelo J., Carrion R., Nunneley J.W. Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry // *Antiviral Res.* 2015. V. 116. P. 76–84.
86. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor // *Cell.* 2020. V. 181. № 2. P. 271–280.
87. Lei Z.N., Wu Z.X., Dong S., Yang D.H., Zhang L., Ke Z. Chloroquine and hydroxychloroquine in the treatment of malaria and repurposing in treating COVID-19 // *Pharmacol. Ther.* 2020. V. 216.
88. Martinez G.P., Zabaleta M.E., Di Giulio C., Charris J.E., Mijares M.R. The Role of Chloroquine and Hydroxychloroquine in Immune Regulation and Diseases // *Curr. Pharm. Des.* 2020. V. 26. № 35. P. 4467–4485.
89. Aljadeed R. The Rise and Fall of Hydroxychloroquine and Chloroquine in COVID-19 // *J. Pharm. Pract.* 2022. V. 35. № 6. P. 971–978.
90. Warren T.K., Jordan R., Lo M.K., Ray A.S., Mackman R.L., Soloveva V. Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys // *Nature.* 2016. V. 531. № 7594. P. 381–385.
91. Sheahan T.P., Sims A.C., Graham R.L., Menachery V.D., Gralinski L.E., Case J.B. Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses // *Sci. Transl. Med.* 2017. V. 9. № 396.

92. Williamson B.N., Feldmann F., Schwarz B., Meade-White K., Porter D.P., Schulz J. Clinical benefit of remdesivir in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2. *Nature*. 2020. V. 585. № 7824. P. 273–276.
93. Grein J., Ohmagari N., Shin D., Diaz G., Asperges E., Castagna A. Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19 // *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 382. № 24. P. 2327–2336.
94. Lee T.C., Murthy S., Del Corpo O., Senécal J., Butler-Laporte G., Sohani Z.N. Remdesivir for the treatment of COVID-19: a systematic review and meta-analysis // *Clin. Microbiol. Infect.* 2022. V. 28. № 9. P. 1203–1210.
95. Grundeis F., Ansems K., Dahms K., Thieme V., Metzendorf M.I., Skoetz N. Remdesivir for the treatment of COVID-19 // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2023 V. 1. № 1.
96. Zhao Z., Zhang F., Xu M., Huang K., Zhong W., Cai W. Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China // *J. Med. Microbiol.* 2003. V. 52. № 8. P. 715–720.
97. Krishnan H., Leema M., Gopika G.S., Hari Prasad P.M., Rajan A., Anil A. SARS CoV-2: Progression and treatment protocols – An overview // *Mater. Today Proc.* 2021. V. 46. P. 3144–3147.
98. Cai Q., Yang M., Liu D., Chen J., Shu D., Xia J. Experimental Treatment with Favipiravir for COVID-19: An Open-Label Control Study // *Engineering (Beijing)*. 2020. V. 6. № 10. P. 1192–1198.
99. Korula P., Alexander H., John J.S., Kirubakaran R., Singh B., Tharyan P. Favipiravir for treating COVID-1 // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2024. V. 2. № 2.
100. Chen F., Chan K.H., Jiang Y., Kao R.Y.T., Lu H.T., Fan K.W. In vitro susceptibility of 10 clinical isolates of SARS coronavirus to selected antiviral compounds // *Journal of Clinical Virology*. 2004. V. 31. № 1. P. 69–75.
101. De Wilde A.H., Jochmans D., Posthuma C.C., Zevenhoven-Dobbe J.C., Van Nieuwkoop S., Bestebroer T.M. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014. V. 58. № 8. P. 4875–4884.
102. Kaizer A.M., Shapiro N.I., Wild J., Brown S.M., Cwik B.J., Hart K.W. Lopinavir/ritonavir for treatment of non-hospitalized patients with COVID-19: a randomized clinical trial // *International Journal of Infectious Diseases*. 2023. V. 128. P. 223–229.
103. Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression // *Lancet*. 2020. V. 395. № 10229. P. 1033–1034.

104. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China // *Lancet*. 2020. V. 395. № 10223. P. 497–506.
105. COVID-19 Treatment Guidelines: [Электронный ресурс]. URL: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov> (Дата обращения: 16.02.2024).
106. Mourad A., Thibault D., Holland T.L., Yang S., Young A.R., Arnold Egloff S.A. Dexamethasone for Inpatients With COVID-19 in a National Cohort // *JAMA Netw. Open*. 2023. V. 6. № 4.
107. Xu X., Han M., Li T., Sun W., Wang D., Fu B. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020. V. 117. № 20. P. 10970–10975.
108. Swets M.C., Moss R.J., Kor F., Hilarius D., Moes D.J.A.R., Berkhout W.E. A comparison of the effectiveness of different doses of tocilizumab and sarilumab in the treatment of severe COVID-19: a natural experiment due to drug shortages // *Int. J. Infect. Dis.* 2023. V. 129. P. 57–62.
109. El Bairi K., Trapani D., Petrillo A., Le Page C., Zbakh H., Daniele B. Repurposing anticancer drugs for the management of COVID-19 // *Eur. J. Cancer*. 2020. V. 141. P. 40–61.
110. Pang J., Xu F., Aondio G., Li Y., Fumagalli A., Lu M. Efficacy and tolerability of bevacizumab in patients with severe Covid-19 // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1.
111. Rother R.P., Rollins S.A., Mojciak C.F., Brodsky R.A., Bell L. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. № 11. P. 1256–1264.
112. Karabag Yilmaz E., Cebi M.N., Karahan I., Saygılı S., Gulmez R., Demirgan E.B. COVID-19 associated thrombotic microangiopathy // *Nephrology (Carlton)*. 2023. V. 28. № 10. P. 557–560.
113. Gill J., Hebert C.A., Colbert G.B. COVID-19-associated atypical hemolytic uremic syndrome and use of Eculizumab therapy // *J. Nephrol.* 2022. V. 35. № 1. P. 317–321.
114. Mimori M., Komatsu T., Maku T., Mitsumura H., Iguchi Y. Generalized myasthenia gravis patients infected with COVID-19 should continue eculizumab // *Neurol. Sci.* 2022. V. 43. № 7. P. 4081–4083.
115. Mantlo E., Bukreyeva N., Maruyama J., Paessler S., Huang C. Antiviral activities of type I interferons to SARS-CoV-2 infection // *Antiviral Res.* 2020. V. 179.
116. Tobian A.A.R., Cohn C.S., Shaz B.H. COVID-19 convalescent plasma // *Blood*. 2022. V. 140. № 3. P. 196–207.
117. Li L., Zhang W., Hu Y., Tong X., Zheng S., Yang J. Effect of Convalescent Plasma Therapy on Time to Clinical Improvement in Patients With Severe and Life-threatening COVID-19: A Randomized Clinical Trial // *JAMA*. 2020. V. 324. № 5. P. 460–70.
118. Prasad M., Seth T., Elavarasi A. Efficacy and Safety of Convalescent Plasma for COVID-19: A Systematic Review and Meta-analysis // *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 2021. V. 37. № 3. P. 347–365.

119. Bansal V., Mahapure K.S., Mehra I., Bhurwal A., Tekin A., Singh R. Mortality Benefit of Convalescent Plasma in COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Front. Med. (Lausanne)*. 2021. V. 8.
120. Klassen S.A., Senefeld J.W., Johnson P.W., Carter R.E., Wiggins C.C., Shoham S. The Effect of Convalescent Plasma Therapy on Mortality Among Patients With COVID-19: Systematic Review and Meta-analysis // *Mayo Clin. Proc.* 2021. V. 96. № 5. P. 1262–1275.
121. Corti D., Purcell L.A., Snell G., Veessler D. Tackling COVID-19 with neutralizing monoclonal antibodies // *Cell*. 2021. V. 184. № 12. P. 3086–3108.
122. Ren Z., Shen C., Peng J. Status and Developing Strategies for Neutralizing Monoclonal Antibody Therapy in the Omicron Era of COVID-19 // *Viruses*. 2023. V. 15. № 6.
123. Focosi D., McConnell S., Casadevall A., Cappello E., Valdiserra G., Tuccori M. Monoclonal antibody therapies against SARS-CoV-2 // *Lancet Infect. Dis.* 2022. V. 22. № 11. P. 311–326.
124. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues // *Physiol. Rev.* 2010. V. 90. № 3. P. 1103–1163.
125. Frommer W.B., Davidson M.W., Campbell R.E. Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins // *Chem. Soc. Rev.* 2009. V. 38. № 10. P. 2833–2841.
126. Greenwald E.C., Mehta S., Zhang J. Genetically encoded fluorescent biosensors illuminate the spatiotemporal regulation of signaling networks // *Chem. Rev.* 2018. V. 118. № 24. P. 11707–11794.
127. Sanford L., Palmer A. Recent Advances in Development of Genetically Encoded Fluorescent Sensors // *Methods Enzymol.* 2017. V. 589.
128. Kim H., Ju J., Lee H.N., Chun H., Seong J. Genetically encoded biosensors based on fluorescent proteins // *Sensors (Switzerland)*. 2021. V. 21. № 3.
129. Idevall-Hagren O., De Camilli P. Detection and manipulation of phosphoinositides // *Biochim. Biophys. Acta*. 2015. V. 1851. № 6. P. 736–745.
130. Stauffer T.P., Ahn S., Meyer T. Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> concentration monitored in living cells // *Current Biology*. V. 8. № 6. P. 343–346.
131. Zadran S., Standley S., Wong K., Otiniano E., Amighi A., Baudry M. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensors: Visualizing cellular dynamics and bioenergetics // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 96. № 4. P. 895–902.
132. Miyawaki A., Llopis J., Heim R., Mccaffery J.M., Adams J.A., Ikurak M. Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin // *Nature*. 1997. V. 388. № 6645. P. 882–887.
133. Bajar B.T., Wang E.S., Zhang S., Lin M.Z., Chu J. A guide to fluorescent protein FRET pairs // *Sensors (Switzerland)*. 2016. V. 16. № 9.

134. Akerboom J., Rivera J.D.V., Rodríguez Guilbe M.M., Malavé E.C.A., Hernandez H.H., Tian L. Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design // *Journal of Biological Chemistry*. 2009. V. 284. № 10. P. 6455–6464.
135. Chatroraj M., King B.A., Bublitz G.U., Boxer S.G. Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: Multiple states and proton transfer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. V. 93. № 16. P. 8362–8367.
136. Miesenböck G., Angelis D.A. De, Rothman J.E. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins // *Nature*. 1998. V. 394. № 6689. P. 192–195.
137. Li Y., Tsien R.W. pHTomato, a red, genetically encoded indicator that enables multiplex interrogation of synaptic activity // *Nat. Neurosci.* 2012. V. 15. № 7. P. 1047–1053.
138. Nakai J., Ohkura M., Imoto K. A high signal-to-noise Ca<sup>2+</sup> probe composed of a single green fluorescent protein // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. № 2. P. 137–141.
139. Zhao Y., Araki S., Wu J., Teramoto T., Chang Y.F., Nakano M. An expanded palette of genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators // *Science*. 2011. V. 333. № 6052. P. 1888–1891.
140. Akerboom J., Calderón N.C., Tian L., Wabnig S., Prigge M., Tolö J. Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics // *Front. Mol. Neurosci.* 2013. V. 6.
141. Shaner N.C., Lin M.Z., McKeown M.R., Steinbach P.A., Hazelwood K.L., Davidson M.W. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins // *Nat. Methods*. 2008. V. 5. № 6. P. 545–551.
142. Kredel S., Oswald F., Nienhaus K., Deuschle K., Röcker C., Wolff M. mRuby, a bright monomeric red fluorescent protein for labeling of subcellular structures // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 2.
143. Кост Л.А., Путинцева Е.В., Переверзева А.Р., Чудаков Д.М., Лукьянов К.А., Богданов А.М. Бимолекулярная флуоресцентная комплементация на основе красного флуоресцентного белка FusionRed // *Биоорганическая химия*. 2016. V. 42. P. 683–688.
144. Hu C-D, Chinenov Y., Kerppola T.K. Visualization of Interactions among bZIP and Rel Family Proteins in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation // *Mol. Cell*. 2002. V. 9. № 4. P. 789–798.
145. Bae E.J., Lee H.J., Lee S.J. Cell models to study cell-to-cell transmission of  $\alpha$ -synuclein // *Methods in Molecular Biology*. 2016. V. 1345. P. 291–298.
146. Shyu Y.J., Liu H., Deng X., Hu C.D. Identification of new fluorescent protein fragments for bimolecular fluorescence complementation analysis under physiological conditions // *Biotechniques*. 2006. V. 40. № 1. P. 61–66.

147. Jach G., Pesch M., Richter K., Frings S., Uhrig J.F. An improved mRFP1 adds red to bimolecular fluorescence complementation // *Nat. Methods*. 2006. V. 3. № 8. P. 597–600.
148. Fan J.Y., Cui Z.Q., Wei H.P., Zhang Z.P., Zhou Y.F., Wang Y.P. Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 367. № 1. P. 47–53.
149. Chu J., Zhang Z., Zheng Y., Yang J., Qin L., Lu J. A novel far-red bimolecular fluorescence complementation system that allows for efficient visualization of protein interactions under physiological conditions // *Biosens. Bioelectron.* 2009. V. 25. № 1. P. 234–239.
150. Zhang Q., Schepis A., Huang H., Yang J., Ma W., Torra J. Designing a Green Fluorogenic Protease Reporter by Flipping a Beta Strand of GFP for Imaging Apoptosis in Animals // *J. Am. Chem. Soc.* 2019. V. 141. № 11. P. 4526–4530.
151. Alford S.C., Abdelfattah A.S., Ding Y., Campbell R.E. A Fluorogenic Red Fluorescent Protein Heterodimer // *Chem. Biol.* V. 19. № 3. P. 353–360.
152. Alford S.C., Ding Y., Simmen T., Campbell R.E. Dimerization-dependent green and yellow fluorescent proteins // *ACS Synth. Biol.* 2012. V. 1. № 12. P. 569–575.
153. Campbell R.E., Tour O., Palmer A.E., Steinbach P.A., Baird G.S., Zacharias D.A. A monomeric red fluorescent protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. V. 99. № 12. P. 7877–7882.
154. Raturi A., Simmen T. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: The mitochondria-associated membrane (MAM) // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1833. № 1. P. 213–224.
155. Baker M.J., Frazier A.E., Gulbis J.M., Ryan M.T. Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function // *Trends Cell Biol.* 2007. V. 17. № 9. P. 456–464.
156. Lynes E.M., Bui M., Yap M.C., Benson M.D., Schneider B., Ellgaard L. Palmitoylated TMX and calnexin target to the mitochondria-associated membrane // *EMBO Journal.* 2012. V. 31. № 2. P. 457–470.
157. Ong I.L.H., Yang K.L. Recent developments in protease activity assays and sensors // *Analyst.* 2017. V. 142. № 11. P. 1867–1881.
158. Zlobovskaya O.A., Sergeeva T.F., Shirmanova M.V., Dudenkova V.V., Sharonov G.V., Zagaynova E.V. Genetically encoded far-red fluorescent sensors for caspase-3 activity // *Biotechniques.* 2016. V. 60. № 2. P. 62–68.
159. D’Arcy M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy // *Cell Biol. Int.* 2019. V. 43. № 6. P. 582–592.
160. Yan G., Li D., Lin Y., Fu Z., Qi H., Liu X. Development of a simple and miniaturized sandwich-like fluorescence polarization assay for rapid screening of SARS-CoV-2 main protease inhibitors // *Cell Biosci.* 2021. V. 11. № 1.

161. Yan H., Liu Z., Yan G., Liu X., Liu X., Wang Y. A robust high-throughput fluorescence polarization assay for rapid screening of SARS-CoV-2 papain-like protease inhibitors // *Virology*. 2022. V. 574. P. 18–24.
162. Du Y. Fluorescence polarization assay to quantify protein-protein interactions in an HTS format // *Methods Mol. Biol.* 2015. V. 1278. P. 529–544.
163. Jones C.T., Catanese M.T., Law L.M.J., Khetani S.R., Syder A.J., Ploss A. Real-time imaging of hepatitis C virus infection using a fluorescent cell-based reporter system // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 28. № 2. P. 167–171.
164. Meylan E., Curran J., Hofmann K., Moradpour D., Binder M., Bartenschlager R. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus // *Nature*. 2005. V. 437. № 7062. P. 1167–1172.
165. Li X., Yang E., Li X., Fan T., Guo S., Yang H. MAVS-Based Reporter Systems for Real-Time Imaging of EV71 Infection and Antiviral Testing // *Viruses*. 2023. V. 15. № 5.
166. Choi H.J., Park A., Kang S., Lee E., Lee T.A., Ra E.A. Human cytomegalovirus-encoded US9 targets MAVS and STING signaling to evade type I interferon immune responses // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1.
167. van Huizen M., Vendrell X.M., de Gruyter H.L.M., Boomaars-van der Zanden A.L., van der Meer Y., Snijder E.J. The Main Protease of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Induces Cleavage of Mitochondrial Antiviral Signaling Protein to Antagonize the Innate Immune Response // *Viruses*. 2024. V. 16. № 2.
168. Yang Y., Liang Y., Qu L., Chen Z., Yi M.K., Li K. Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. V. 104. № 17. P. 7253–7258.
169. Sun L., Feng H., Misumi I., Shirasaki T., Hensley L., González-López O. Viral protease cleavage of MAVS in genetically modified mice with hepatitis A virus infection // *J. Hepatol.* 2023. V. 78. № 2. P. 271–280.
170. Wang B., Xi X., Lei X., Zhang X., Cui S., Wang J. Enterovirus 71 protease 2Apro targets MAVS to inhibit anti-viral type I interferon responses // *PLoS Pathog.* 2013. V. 9. № 3.
171. Yan Y., Wu L., Yuan Y., Wang H., Yin H., Li M. Species-specific cleavage of cGAS by picornavirus protease 3C disrupts mitochondria DNA-mediated immune sensing // *PLoS Pathog.* 2023. V. 19. № 9.
172. Knauer S.K., Fetz V., Rabenstein J., Friedl S., Hofmann B., Sabiani S. Bioassays to Monitor Taspase1 Function for the Identification of Pharmacogenetic Inhibitors // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 5.



173. Hsieh J.J.D., Cheng E.H.Y., Korsmeyer S.J. Taspase1: A threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression // *Cell*. 2003. V. 115. № 3. P. 293–303.
174. Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., Marillonnet S. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 2.
175. Engler C., Kandzia R., Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability // *PLoS One*. 2008. V. 3. № 11.
176. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T. Fiji - an Open Source platform for biological image analysis // *Nat Methods*. 2012. V. 9. № 7. P. 676–682.
177. Centers for Disease Control and Prevention: [Электронный ресурс]. URL: <http://www.cdc.gov> (Дата обращения: 28.03.2024).
178. Snapp E.L., Hegde R.S., Francolini M., Lombardo F., Colombo S., Pedrazzini E. Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions // *Journal of Cell Biology*. 2003. V. 163. № 2. P. 257–269.
179. Costantini L.M., Fossati M., Francolini M., Snapp E.L. Assessing the Tendency of Fluorescent Proteins to Oligomerize Under Physiologic Conditions // *Traffic*. 2012. V. 13. № 5. P. 643–649.
180. Monje-Galvan V., Voth G.A. Molecular interactions of the M and E integral membrane proteins of SARS-CoV-2 // *Faraday Discuss*. 2021. V. 232.
181. Campelo F., Malhotra V. Membrane Fission: The Biogenesis of Transport Carriers // *Annu. Rev. Biochem*. 2012. V. 81. P. 407–427.
182. Komatsu T., Kukelyansky I., McCaffery J.M., Ueno T., Varela L.C., Inoue T. Organelle-specific, rapid induction of molecular activities and membrane tethering // *Nat. Methods*. 2010. V. 7. № 3. P. 206–208.
183. Eskelinen E.L. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy // *Mol. Aspects. Med*. 2006. V. 27. № 5–6. P. 495–502.
184. Fung T.S., Liu D.X. Post-translational modifications of coronavirus proteins: Roles and function // *Future Virol*. 2018. V. 13. № 6. P. 405–430.
185. Oostra M., de Haan C.A.M., de Groot R.J., Rottier P.J.M. Glycosylation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Triple-Spanning Membrane Proteins 3a and M // *J. Virol*. 2006. V. 80. № 5. P. 2326–2336.
186. Hasegawa H. Simultaneous induction of distinct protein phase separation events in multiple subcellular compartments of a single cell // *Exp. Cell Res*. 2019. V. 379. № 1. P. 92–109.
187. Dawood A.A. Glycosylation, ligand binding sites and antigenic variations between membrane glycoprotein of COVID-19 and related coronaviruses // *Vacunas*. 2021. V. 22. № 1. P. 1–9.
188. Gong Y., Qin S., Dai L., Tian Z. The glycosylation in SARS-CoV-2 and its receptor ACE2 // *Signal Transduct. Target. Ther*. 2021. V. 6. № 1.

189. Subach O.M., Cranfill P.J., Davidson M.W., Verkhusha V.V. An enhanced monomeric blue fluorescent protein with the high chemical stability of the chromophore // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 12.
190. Ibrahim A., Velde G. Vande, Reumers V., Toelen J., Thiry I., Vandeputte C. Highly efficient multicistronic lentiviral vectors with peptide 2A sequences // *Hum. Gene Ther.* 2009. V. 20. № 8. P. 845–860.
191. Shaner N.C., Lambert G.G., Chammas A., Ni Y., Cranfill P.J., Baird M.A. A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum* // *Nat. Methods*. 2013. V. 10. № 5. P. 407–409.
192. Bindels D.S., Haarbosch L., Van Weeren L., Postma M., Wiese K.E., Mastop M. mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging // *Nat Methods*. 2017. V. 14. № 1. P. 53–56.
193. McCulloch T.W., MacLean D.M., Kammermeier P.J. Comparing the performance of mScarlet-I, mRuby3, and mCherry as FRET acceptors for mNeonGreen // *PLoS One*. 2020. V. 15. № 2.
194. Anderie I., Schulz I., Schmid A. Characterization of the C-terminal ER membrane anchor of PTP1B // *Exp. Cell Res.* 2007. V. 313. № 15. P. 3189–3197.
195. Mishina N.M., Tyurin-Kuzmin P.A., Markvicheva K.N., Vorotnikov A.V., Tkachuk V.A., Laketa V. Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally? // *Antioxid. Redox Signal.* 2011. V. 14. № 1. P. 1–7.
196. Costantini L.M., Baloban M., Markwardt M.L., Rizzo M., Guo F., Verkhusha V.V. A palette of fluorescent proteins optimized for diverse cellular environments // *Nat. Commun.* 2015. V. 6.
197. Costantini L.M., Snapp E.L. Fluorescent proteins in cellular organelles: serious pitfalls and some solutions // *DNA Cell. Biol.* 2013. V. 32. № 11. P. 622–627.
198. Sokolinskaya E.L., Putlyaeva L.V., Polinovskaya V.S., Lukyanov K.A. Genetically Encoded Fluorescent Sensors for SARS-CoV-2 Papain-like Protease PLpro // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 14.
199. Smirnova O.A., Ivanova O.N., Fedyakina I.T., Yusubalieva G.M., Baklaushev V.P., Yanvarev D.V. SARS-CoV-2 Establishes a Productive Infection in Hepatoma and Glioblastoma Multiforme Cell Lines // *Cancers (Basel)*. 2023. V. 15. № 3.
200. Şimşek Yavuz S., Komşuoğlu Çelikyurt İ. An update of anti-viral treatment of COVID 19 // *Turk. J. Med. Sci.* 2021. V. 51. P. 3372–3390.
201. Musinova Y.R., Lisitsyna O.M., Golyshchev S.A., Tuzhikov A.I., Polyakov V.Y., Sheval E.V. Nucleolar localization/retention signal is responsible for transient accumulation of histone H2B in the nucleolus through electrostatic interactions // *Biochim. Biophys. Acta*. 2011. V. 1813. № 1. P. 27–38.

202. Kitamura A., Nakayama Y., Kinjo M. Efficient and dynamic nuclear localization of green fluorescent protein via RNA binding // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. V. 463. № 3. P. 401–406.
203. Xiao F., Fofana I., Heydmann L., Barth H., Soulier E., Habersetzer F. Hepatitis C virus cell-cell transmission and resistance to direct-acting antiviral agents // *PLoS Pathog.* 2014. V. 10. № 5.