

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

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий».

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук **Лукьянов Константин Анатольевич**

**Официальные оппоненты:**

**Савицкий Александр Павлович**, доктор химических наук, заведующий Лабораторией физической биохимии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

**Чуланов Владимир Петрович**, доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе и инновационному развитию Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава РФ

**Ведущая организация:**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук**

Защита состоится «18» декабря 2024 г. в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,**

**д.ф.-м.н. В.А. Олейников**



# ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

## Актуальность исследования

Вирус SARS-CoV-2, выявленный в китайском городе Ухань в декабре 2019 года, вызвал тяжелую острую респираторную инфекцию COVID-19, ставшую причиной глобальной пандемии в истории человечества. С момента начала пандемии смертность от коронавирусной инфекции значительно снизилась благодаря созданию вакцин. Однако в результате постоянно возникающих мутаций SARS-CoV-2 эффективность существующих вакцин снижается, и более актуальным становится применение препаратов, оказывающих ингибирующее влияние на звенья патологического процесса инфекции. По этой причине высоко необходимым становится проведение исследований по созданию новых целевых веществ, инактивирующих SARS-CoV-2, а также тестирование и перепрофилирование уже известных препаратов, способных нейтрализовать провоспалительное действие коронавируса на организм пациента. Высокая патогенность SARS-CoV-2 вынуждает большинство лабораторий отказаться от прямого изучения поведения функционального вируса. Следовательно, актуальными являются безопасные клеточные системы, позволяющие моделировать отдельные аспекты функционирования вируса, а также применение этих систем в качестве платформ для высокопроизводительного скрининга новых или уже существующих противовирусных препаратов.

## Цели и задачи 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 антивирусных препаратов.

Для достижения цели были поставлены 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 PL<sub>pro</sub> 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.

### **Научная новизна и практическая значимость**

В данной работе при помощи методов флуоресцентной микроскопии при экспрессии нативного М-белка в клетках человека впервые была выявлена тенденция М-белка SARS-CoV-2 к формированию межмембранных олигомеров. Также было обнаружено, что в некоторых клеточных линиях М-белок способен формировать жесткие филаментоподобные структуры длиной около 10 мкм.

В настоящей работе впервые созданы генетически кодируемый флуоресцентный FRET-сенсор дальнекрасного спектра и генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры на основе транслокации для детекции активности протеазы PL<sub>pro</sub> SARS-CoV-2 в живых клетках человека в режиме реального времени.

Разработанные методы флуоресцентной визуализации внутриклеточной локализации и активности белков SARS-CoV-2 могут послужить основой для новых платформ безопасного скрининга ингибиторов олигомеризации М-белка и протеолитической активности PL<sub>pro</sub>.

### **Апробация работы**

Результаты диссертационной работы были представлены на двух международных конференциях: Focus on Microscopy (онлайн-конференция, 2022); The 2nd International Electronic Conference on Biomolecules: Biomacromolecules and the Modern World Challenges (онлайн-конференция, 2022).

По материалам работы опубликовано три статьи в рецензируемых научных журналах.

### **Личный вклад автора**

Автором была проведена работа по поиску и анализу литературы по теме исследования. Автор совместно с научным

руководителем участвовал в формулировке цели и задач исследования, а также разработал методики проведения экспериментов. Все генетические конструкции и стабильные клеточные линии были созданы автором. Все эксперименты с использованием рекомбинантной протеазы PLpro SARS-CoV-2 были проведены автором. Интерпретация данных была проведена автором совместно с научным руководителем.

### **Структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 123 страницах и состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, описания полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 203 ссылки. Диссертация содержит 48 рисунков.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

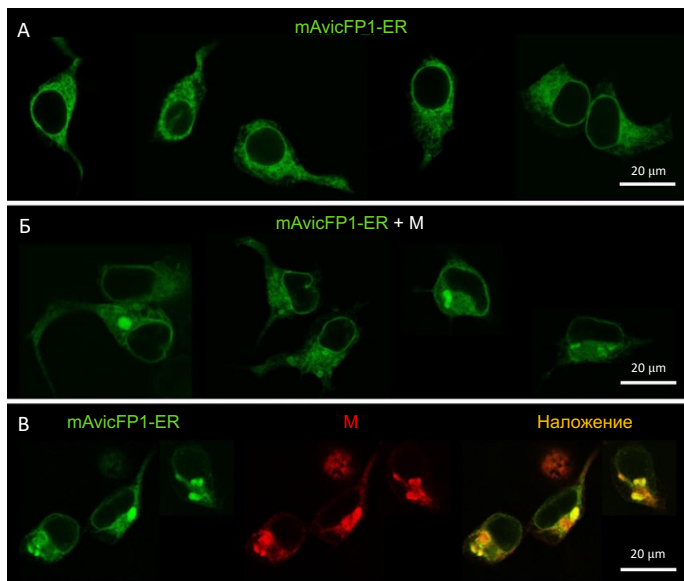
Настоящая работа направлена на разработку методов для изучения отдельных белков SARS-CoV-2 в безопасных клеточных модельных системах с использованием флуоресцентной микроскопии. Разработанные подходы в дальнейшем могут быть использованы для высокопроизводительного скрининга потенциальных веществ-ингибиторов SARS-CoV-2. В качестве целевых вирусных белков были выбраны структурный белок SARS-CoV-2 – М-белок, являющийся наиболее представленным белком вирусной оболочки и участвующий в сборке вириона, а также папаин-подобная протеаза PLpro, выполняющая ключевые функции при репликации вируса и подавлении иммунитета клетки-хозяина.

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

Экспрессию М-белка SARS-CoV-2 проводили в двух клеточных линиях: HEK293T и HeLa. Для визуализации нативного М-белка в ходе флуоресцентной микроскопии использовали метод иммуноцитохимической окраски с применением антител, специфичных к М-белку. Для установления внутриклеточной локализации М-белка проводили котрансфекцию с флуоресцентными маркерами различных клеточных компартментов.

## Экспрессия М-белка SARS-CoV-2 в клетках линии HEK293T

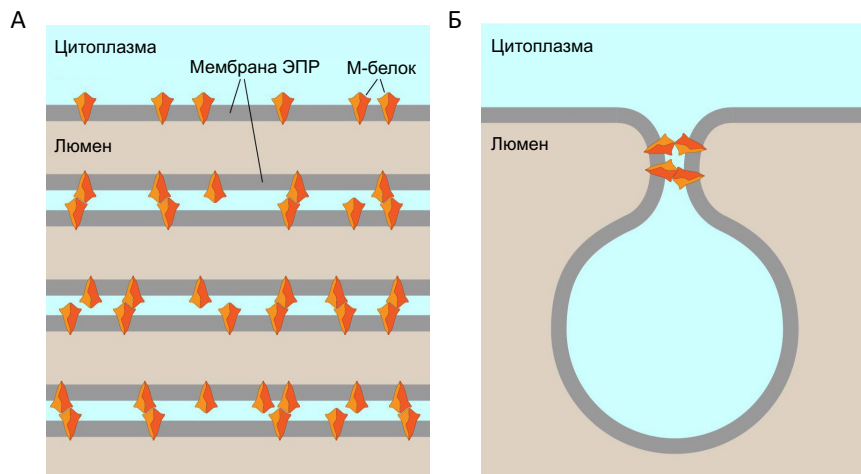
При экспрессии нативного М-белка в клетках HEK293T было обнаружено формирование необычных структур, свидетельствующих о ранее неизвестной тенденции М-белка к образованию межмембранных олигомеров. При котрансфекции с маркером ЭПР помимо эндоплазматической сети в большинстве клеток можно было наблюдать яркие округлые структуры размером 1–5 мкм. Выявленная при котрансфекции и дальнейшем иммуноокрашивании колоколизция М-белка с маркером ЭПР дает основания предположить, что наблюдаемые в сети ЭПР яркие округлые образования представляют из себя OSER-структуры, в образовании которых участвуют молекулы М-белка (Рис. 1).



**Рисунок 1.** Конфокальная микроскопия клеток HEK293T, экспрессирующих М-белок SARS-CoV-2. Результаты трансфекции плазмидой, кодирующей маркер ЭПР mAvicFP1-ER (зеленый канал) (А), котрансфекции плазмидами, кодирующими mAvicFP1-ER и М-белок (не окрашен) (Б), котрансфекции плазмидами, кодирующими mAvicFP1-ER (зеленый канал) и М-белок, с последующей окраской антителами против М-белка (красный канал) (В). Справа представлено наложение двух каналов (области колокализации окрашены оранжевым цветом).

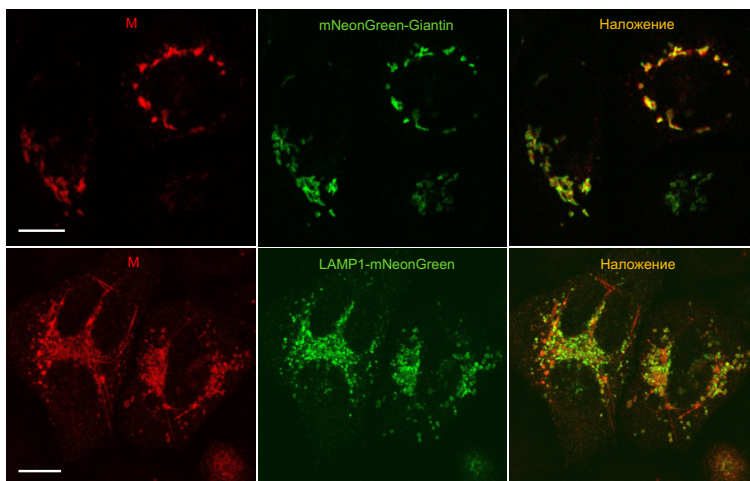
Известно, что М-белок формирует внутримембранные димеры. Наши результаты позволяют заключить, что М-белок проявляет также тенденцию к олигомеризации между димерами, локализованными в соседних мембранах. Вероятно, в этом принимают участие С-концевые домены белка, экспонированные в цитозоль (Рис. 2, А).

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. Размер С-концевого домена М-белка составляет около 3 нм. 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 (Рис. 2, Б).



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

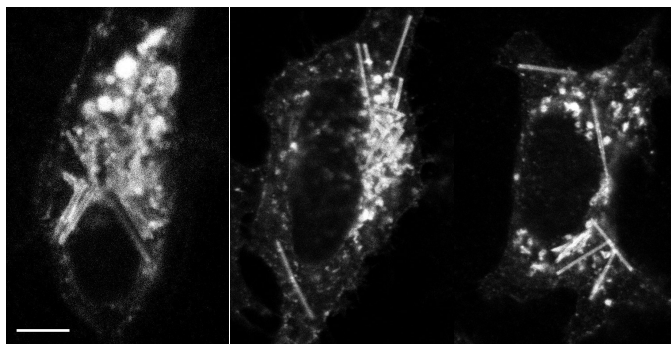
При экспрессии в клетках HeLa М-белок располагался в цистернах в области клеточного ядра, либо образовывал скопления везикул. При котрансфекции с маркерами компартментов экзоцитарного пути с последующим иммуноокрашиванием была установлена колокализация с цистернами комплекса Гольджи, а также с лизосомальными везикулами (коэффициент корреляции Пирсона 0,66 и 0,62, соответственно), что согласуется литературными данными (Рис. 3).



*Рисунок 3. Коэкспрессия маркера комплекса Гольджи (верхняя панель) и маркера лизосом (нижняя панель) с нативным М-белком, окрашенным 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.*

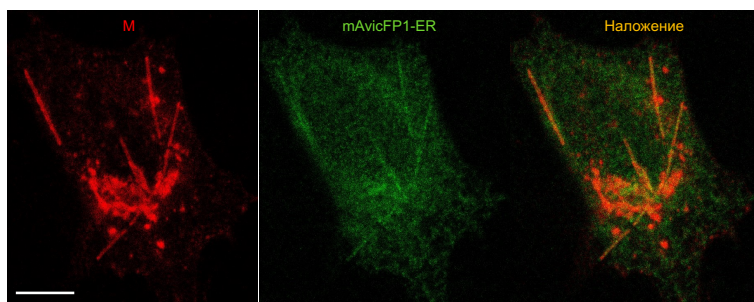
Однако в части клеток мы обнаружили формирование жестких филаментоподобных структур, длина которых лежит в диапазоне 7,5–15,7 мкм (Рис. 4), не описанных ранее в литературе. Анализ микрофотографий позволил сделать начальное описание филаментов. Структуры представляют из себя макромолекулярные образования, лишённые изгибов, которые можно выявить при иммуноокрашивании клеток человека с последующей флуоресцентной микроскопией.





**Рисунок 4.** *Репрезентативные изображения клеток линии HeLa, экспрессирующих М-белок SARS-CoV-2 с образованием филаментоподобных структур. Изображения получены при помощи флуоресцентной конфокальной микроскопии. Масштабная линейка 10 мкм.*

Котрансфекция с маркерами актиновых филаментов, микротрубочек и белком фокальных контактов зиксином показала отсутствие связи данных структур с цитоскелетом. Однако в ходе экспериментов была обнаружена колокализация филаментов с маркером ЭПР (коэффициент корреляции Пирсона 0,53) (Рис. 5). Это дает основания предположить, что наблюдаемые структуры имеют мембранное происхождение и возникают вследствие частичной реорганизации ЭПР из-за экспрессии М-белка.



**Рисунок 5.** *Кокспрессия маркера ЭПР (mAvicFP1-ER) с нативным М-белком, окрашенным после фиксации клеток антителами с флуоресцентной меткой. 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.*

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

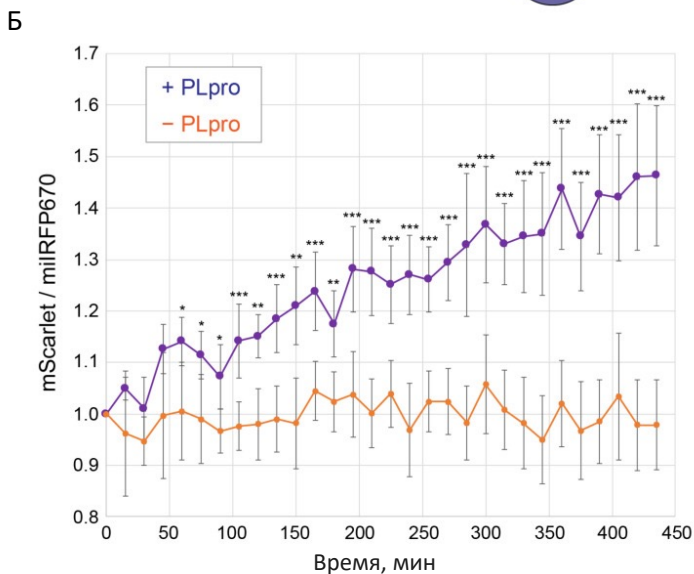
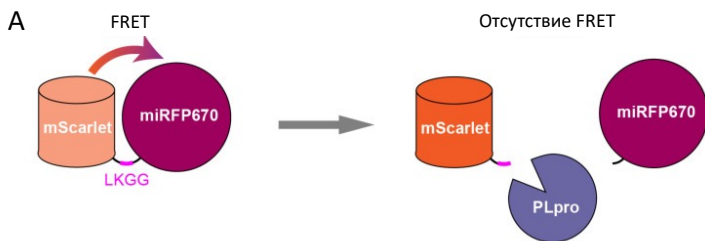
Папаин-подобная протеаза PLpro, входящая в состав мультидоменного белка nsp3, является одним из ключевых белков в жизненном цикле SARS-CoV-2. PLpro осуществляет расщепление вирусных полипротеинов на первых стадиях инфекции и участвует в подавлении клеточного иммунитета. Все это делает PLpro привлекательной мишенью для противовирусной терапии. В настоящей 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.

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

Генетически кодируемый сенсор mScarlet-LKGG-miRFP670 основан на Ферстеровском резонансном переносе энергии (FRET) между GFP-подобным красным флуоресцентным белком mScarlet в качестве донора и биливердин-связывающим 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 (Рис. 6, А).

Для тестирования mScarlet-LKGG-miRFP670 мы разработали генетическую конструкцию для экспрессии растворимой PLpro в клетках человека – PLpro-TetON, где домен папаин-подобной протеазы PLpro был помещен под контроль индуцируемого промотора TRE3G. В качестве маркера эффективности трансфекции в состав конструкции был добавлен синий флуоресцентный белок mTagBFP2, отделенный от протеазы T2A-пептидом.

Для проверки работы сенсора клетки линии HeLa были котрансфицированы генетическими конструкциями mScarlet-LKGG-miRFP670 и PLpro-TetON. На следующий день, после накопления



**Рисунок 6. FRET-сенсор для изучения активности PLpro. (А)** Схематическое изображение биосенсора mScarlet-LKGG-miRFP670. **(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).

молекул mScarlet-LKGG-miRFP670 в клетке, экспрессия PLpro-TetON была индуцирована при помощи доксицилина. 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.

Для оценки эффективности FRET в данной системе мы использовали соотношение флуоресцентных сигналов mScarlet/miRFP670. 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, в то время как в контрольном эксперименте значимого увеличения соотношения mScarlet/miRFP670 не наблюдалось (Рис. 6, Б).

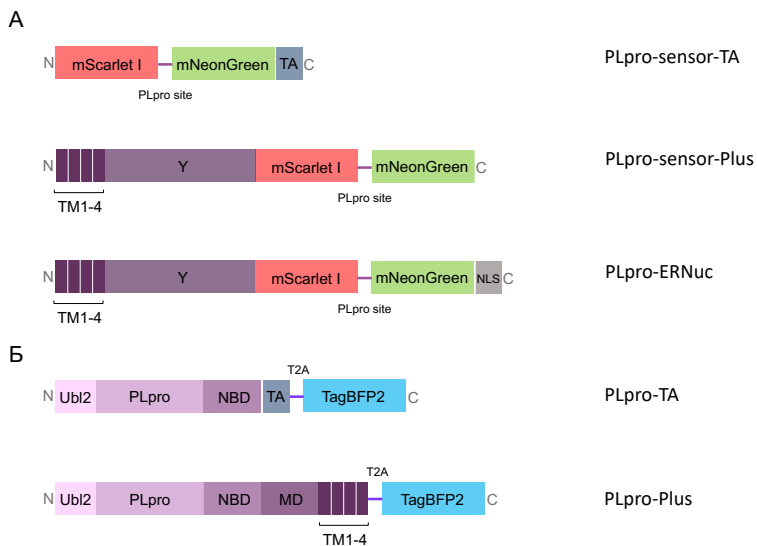
### **Генетически кодируемые транслокационные сенсоры для изучения активности мембран-ассоциированной PLpro**

Так как на этапе синтеза полипротеинов в жизненном цикле SARS-CoV-2 каталитический домен PLpro и сайты узнавания протеазы являются частью мультидоменного мембранного белка nsp3, мы предположили, что ассоциация с мембраной ЭПР 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. Для создания условий, максимально приближенных 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 (Рис. 7).

В основе дизайна всех биосенсоров лежит использование зеленого (mNeonGreen) и красного (mScarlet I) флуоресцентных белков, разделенных сайтом узнавания PLpro (LKGGAPTKV). Флуоресцентные белки mNeonGreen и mScarlet I характеризуются высокой яркостью сигнала, эффективной экспрессией и быстрым созреванием в клетках млекопитающих.

### **Транслокационный сенсор PLpro-sensor-TA**

В первом варианте транслокационного сенсора, PLpro-sensor-TA, на C-конец конструкции был добавлен короткий мембранный «хвостовой якорь» (TA, tail anchor) из тирозинфосфатазы PTP1B,

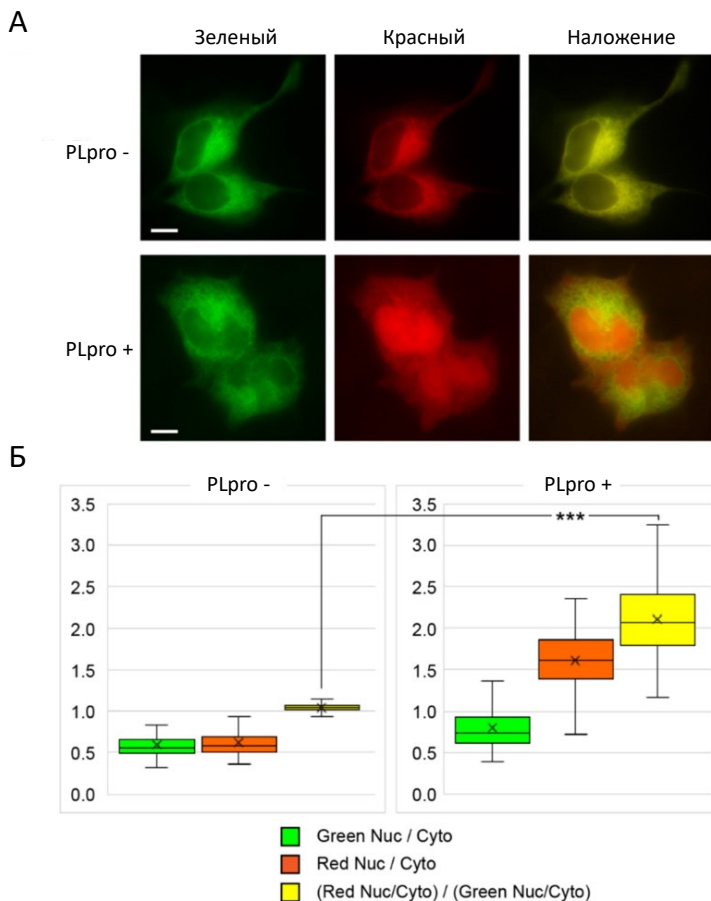


**Рисунок 7. Генетически кодируемые транслокационные сенсоры для изучения активности мембран-ассоциированной PLpro. (А) Транслокационные сенсоры на основе белков mNeonGreen и mScarlet I, ассоциированные с мембраной ЭПР. (Б) Генетические конструкции для экспрессии рекомбинантной PLpro в клетках млекопитающих.**

который обеспечивает локализацию биосенсора на цитозольной стороне мембраны ЭПР. Генетическая конструкция для экспрессии мембран-ассоциированной PLpro (PLpro-TA) содержала протеазный домен PLpro, помещенный под контроль индуцируемого промотора TRE3G, и «хвостовой якорь» TA для направления PLpro на поверхность ЭПР.

Для проверки работы сенсора клетки линии HeLa были котрансфицированы генетическими конструкциями PLpro-sensor-TA и PLpro-TA. Через 24 часа экспрессия PLpro-TA индуцировалась при помощи доксицилина. 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 ЭПР в виде тонкой сети в цитоплазме как в зеленом, так и в красном каналах (Рис. 8, А). При индукции экспрессии



**Рисунок 8. Генетически кодируемый транслокационный сенсор PLpro-sensor-TA.** (А) Репрезентативные изображения клеток линии HeLa, экспрессирующих PLpro-sensor-TA в отсутствие (верхняя панель) или в присутствии (нижняя панель) PLpro-TA. Масштабная линейка 10 мкм. (Б) Диаграмма «ящики 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 «ящики с усами» показывают соотношение флуоресценции ядра и цитоплазмы в соответствующих каналах, желтый «ящик с усами» — отношение полученных значений друг к другу. \*, \*\*, \*\*\*: p-значения менее 0.05, 0.01, и 0.001, соответственно (t-критерий).

PLpro-TA красная флуоресценция претерпевала постепенное изменение внутриклеточной локализации: сеть ЭПР исчезала, а красный сигнал становился равномерно распределенным по всей клетке. В то же время зеленый сигнал сохранял 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.

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 (Рис. 8, Б).

### **Транслокационный сенсор PLpro-sensor-Plus**

Дизайн транслокационного сенсора PLpro-sensor-Plus был основан на использовании части молекулы nsp3, содержащей трансмембранный домен (TM1-4), для закоривания сенсора на мембране ЭПР. Для направления генетической конструкции для экспрессии мембран-ассоциированной PLpro (PLpro-Plus) на мембрану ЭПР также использовалась мембран-ассоциированная часть молекулы белка nsp3. Подобный дизайн позволяет смоделировать реальное расположение каталитического домена PLpro и его мишени во внутриклеточном пространстве при инфекции. В состав PLpro-Plus вошли домен Ubl2, папаин-подобная протеаза PLpro, домен NBD, домен MD и 4 трансмембранных участка (TM1-4), помещенные под контроль конститутивного промотора CMV. В качестве маркера эффективности трансфекции в составе конструкции также использовался mTagBFP2, отделенный от протеазы T2A-пептидом.

Для проверки работы сенсора мы создали стабильную линию клеток HeLa, экспрессирующих PLpro-sensor-Plus, при помощи метода лентивирусной трансдукции. Далее клетки стабильной линии были трансфицированы генетической конструкцией 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).

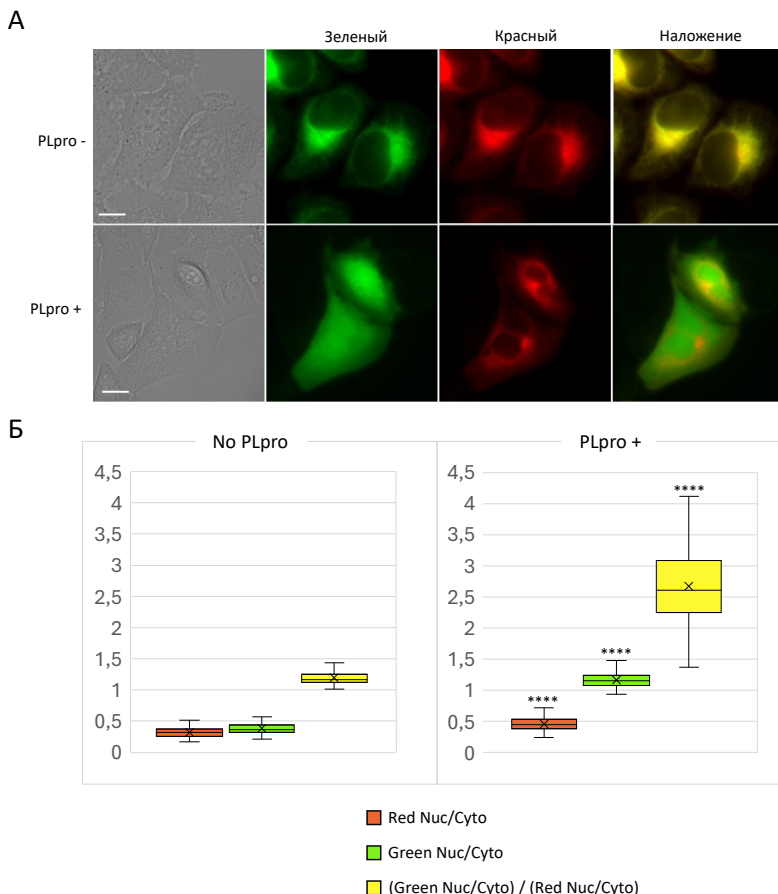
В отсутствие протеазы PLpro-sensor-Plus показал ожидаемую внутриклеточную локализацию в виде ретикулярной сети как в зеленом, так и в красном каналах (Рис. 9, А). При наличии протеазы в клетках наблюдалась транслокация зеленого флуоресцентного сигнала в цитоплазму, вызванная протеолизом, в то время как красный сигнал сохранял 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 (Рис. 9, Б). Несмотря на то что данная версия сенсора не показала большой разницы в динамическом диапазоне по сравнению с PLpro-sensor-TA, ее главным преимуществом остается обеспечение нативных условий для работы протеазы благодаря использованию части белка nsр3 для ассоциации с мембраной ЭПР. Данная особенность важна при использовании полученной системы в контексте скрининговой платформы для тестирования ингибиторов PLpro.

### **Транслокационный сенсор PLpro-ERNuc**

Биосенсор PLpro-ERNuc был получен в результате модернизации конструкции PLpro-sensor-Plus, проведенной с целью увеличения динамического диапазона работы сенсора. Отличительной особенностью дизайна PLpro-ERNuc является добавление сигнала ядерной локализации (NLS) на С-конец молекулы, что обеспечивает накопление mNeonGreen в ядре после расщепления линкера в ходе протеолиза. Это позволило увеличить динамический диапазон работы сенсора в 7 раз, в связи с чем дизайн PLpro-ERNuc был признан наиболее успешным.

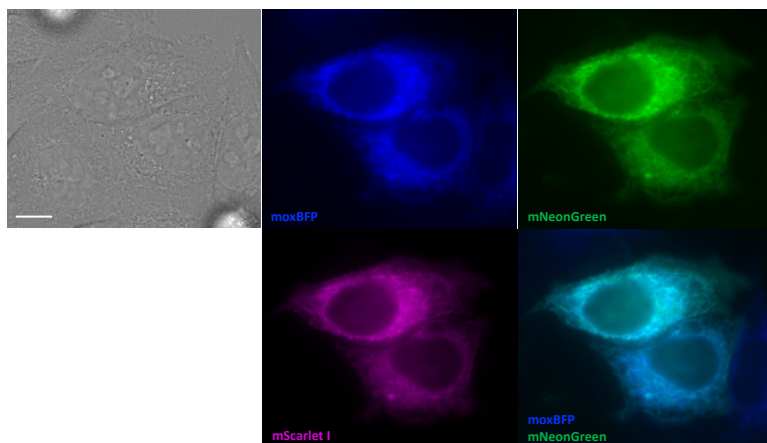
PLpro-ERNuc был протестирован в двух типах модельных систем – в клетках, экспрессирующих рекомбинантную PLpro (генетическая конструкция PLpro-Plus), и в клетках, зараженных вирусом SARS-CoV-2. Для проверки работы сенсора в системе с рекомбинантной протеазой мы создали стабильную линию клеток HeLa, экспрессирующих PLpro-ERNuc, при помощи метода лентивирусной трансдукции.





**Рисунок 9. Генетически кодируемый транслокационный сенсор PLpro-sensor-Plus. (А)** Репрезентативные изображения клеток стабильной линии HeLa, экспрессирующих PLpro-sensor-Plus в отсутствие (верхняя панель) или в присутствии (нижняя панель) PLpro-Plus. Масштабная линейка 10 мкм. **(Б)** 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).

Для подтверждения локализации PLpro-ERNuc на мембране эндоплазматической сети мы провели котрансфекцию биосенсора с маркером ЭПР – mChBFP (Рис. 10). Коэффициент корреляции

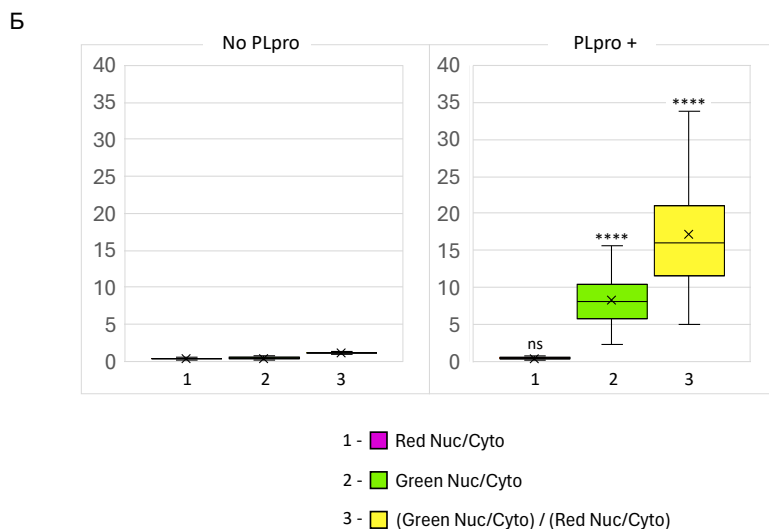
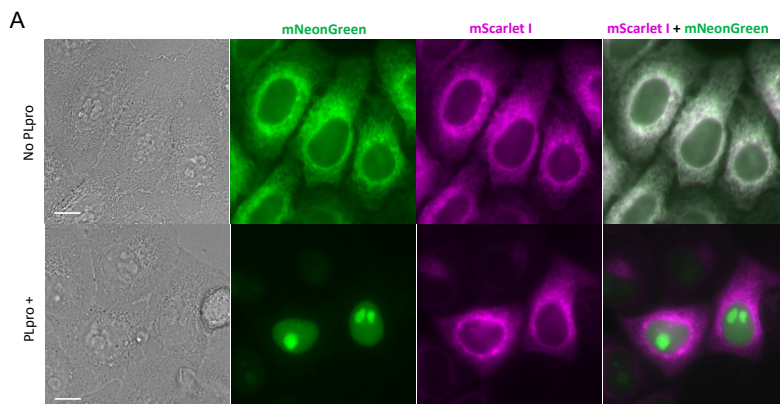


**Рисунок 10. Колокализация PLpro-ERNuc с маркером ЭПР – mChBFP.** Клетки линии HeLa были котрансфицированы плазмидами PLpro-ERNuc и mChBFP. Флуоресцентные изображения в синем, зеленом и красном (использован псевдоцвет magenta) каналах показаны вместе с наложением синего и зеленого каналов. Масштабная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

Пирсона при статистической оценке колокализации на поздних этапах экспрессии составил 0,93. Отсутствие расщепления и транслокации биосенсора в отсутствие PLpro говорит о том, что мотив LKGGARTKV в составе линкера не распознается эндогенными клеточными протеазами, что обеспечивает селективность PLpro-ERNuc.

Далее клетки стабильной линии HeLa, экспрессирующие PLpro-ERNuc, 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. 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. При наличии протеазы в клетках наблюдалась транслокация зеленого флуоресцентного сигнала в ядро, вызванная протеолизом, в то время как красный сигнал продолжал детектироваться в сети ЭПР (Рис. 11, А).

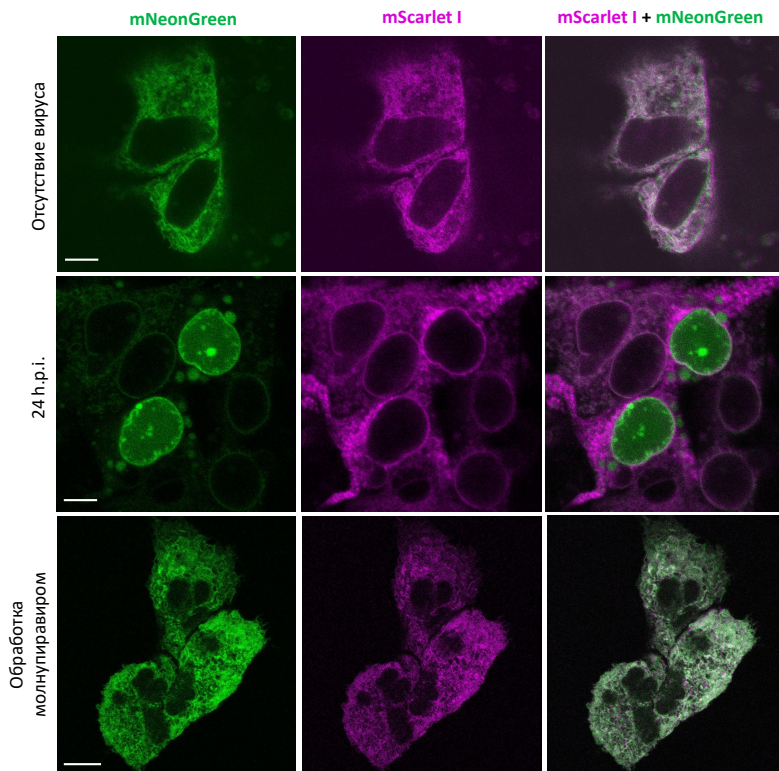


**Рисунок 11. Генетически кодируемый транслокационный сенсор PLpro-ERNuc.** (А) Репрезентативные изображения клеток стабильной линии HeLa, экспрессирующих PLpro-ERNuc в отсутствие (верхняя панель) или в присутствии (нижняя панель) PLpro-Plus. На рисунке показаны

изображения в зеленом и красном (использован псевдоцвет magenta) каналах, а также их наложение. Масштабная линейка 10 мкм. **(Б)** Диаграмма «ящички 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) «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), ns - not significant, не является статистически значимым.

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 (Рис. 11, Б). Рассчитанное соотношение сигналов для PLpro-ERNuc увеличилось в 14,3 раза в клетках с экспрессией PLpro по сравнению с контрольными клетками. 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, а версия PLpro-ERNuc является наиболее успешным вариантом дизайна транслокационного сенсора для PLpro.

Далее мы оценили работу полученного биосенсора в экспериментальной модели культуры клеток млекопитающих, зараженных SARS-CoV-2. Для данного эксперимента была использована клеточная линия Huh7.5, так как, согласно данным недавних исследований, вирус SARS-CoV-2 способен эффективно заражать линии опухолевых клеток печени (линии Huh7.5 и HepG2). В нашем эксперименте клетки стабильной линии Huh7.5, экспрессирующие PLpro-ERNuc, были инфицированы вирусом SARS-CoV-2, который удалялся из системы спустя два часа после заражения. В результате расщепление линкера в сенсоре происходило за счет работы вирусной протеазы, которая экспрессировалась во время репликации SARS-CoV-2 в культуре клеток. Конфокальная флуоресцентная микроскопия показала, что в клетках, не подвергавшихся обработке вирусом, красный и зеленый флуоресцентные сигналы были локализованы в сети ЭПР (Рис. 12).



**Рисунок 12.** Заражение клеток линии *Huh7.5*, экспрессирующих *PLpro-ERNis*, 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 молниупиривиром, 24 h.p.i. (нижняя панель). Масштабная линейка 10 мкм.

Спустя 24 часа после заражения в некоторых клетках зеленая ретикулярная сеть исчезла, а зеленый флуоресцентный сигнал накапливался в ядре (Рис. 12).

Для подтверждения гипотезы о том, что изменение внутриклеточной локализации зеленого сигнала происходит в результате работы вирусной протеазы, мы обработали зараженные вирусом клетки РНК-ингибитором *SARS-CoV-2* – молниупиривиром. Результаты флуоресцентной микроскопии показали, что при

обработке инфицированных SARS-CoV-2 клеток противовирусным агентом транслокации сенсора не происходит (Рис. 12). Это подтверждает тот факт, что PLpro-ERNuc демонстрирует эффективную работу в системе с нативной вирусной протеазой.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе 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 исследования посвящена созданию генетически кодируемых биосенсоров для детекции активности протеазы SARS-CoV-2 PLpro. В настоящей работе были разработаны дальнекрасный FRET-сенсор, а также три варианта флуоресцентных сенсоров на основе транслокации для детекции активности PLpro. 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).

Разработанные в настоящей работе методы флуоресцентной визуализации внутриклеточной локализации и активности белков SARS-CoV-2 могут послужить основой новых платформ безопасного скрининга ингибиторов олигомеризации М-белка и протеолитической активности PLpro.

## 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 сенсоров 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых научных изданиях:

1. **Е. Л. Sokolinskaya**, L. V. Putlyaeva, V. S. Polinovskaya, K. A. Lukyanov. Genetically Encoded Fluorescent Sensors for SARS-CoV-2 Papain-like Protease PLpro // International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(14):7826.
2. **Е. Л. Sokolinskaya**, L. V. Putlyaeva, 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. **Е. Л. Sokolinskaya**, O. N. Ivanova, I. T. Fedyakina, A. V. Ivanov, 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, 25(12): 6635.

### Тезисы докладов и материалы конференций:

1. **Е. Л. Sokolinskaya**, L. V. Putlyaeva, 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. **Е. Л. Sokolinskaya**, L. V. Putlyaeva 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).