

МЕЖМЕМБРАННАЯ ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ М-БЕЛКА КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2: ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В ПОЧКОВАНИИ ВИРУСА

Е. Л. Соколинская, Л. В. Путляева, А. А. Горшкова, К. А. Лукьянов ✉

Центр молекулярной и клеточной биологии, Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Несмотря на интенсивные исследования, стимулированные катастрофическими последствиями пандемии COVID-19, точные молекулярные механизмы некоторых стадий жизненного цикла коронавируса SARS-CoV-2, в частности, отрыва вирусных частиц при почковании, остаются неизвестными. При экспрессии М-белка SARS-CoV-2 в клетках человека мы наблюдали образование специфических структур эндоплазматического ретикулума, появление которых свидетельствует о способности М-белка к олигомеризации в составе параллельных мембран. На наш взгляд, такая межмембранная олигомеризация М-белка может быть движущей силой для сближения и слияния мембран при отшнуровывании вирусных частиц SARS-CoV-2.

Ключевые слова: мембранный белок SARS-CoV-2, белок-белковые взаимодействия, флуоресцентная микроскопия, эндоплазматический ретикулум, почкование вирусных частиц

Финансирование: работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, грант 20-04-60370.

Вклад авторов: Е. Л. Соколинская, Л. В. Путляева, А. А. Горшкова — проведение экспериментов; К. А. Лукьянов — концепция и написание статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Константин Анатольевич Лукьянов
Большой бульвар, д. 30, стр. 1, Москва, 121205, Россия; lukyanov.konstantin@gmail.com

Статья получена: 13.05.2022 **Статья принята к печати:** 28.05.2022 **Опубликована онлайн:** 04.06.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.029

INTERMEMBRANE OLIGOMERIZATION OF SARS-COV-2 M-PROTEIN: POSSIBLE ROLE IN VIRAL BUDDING

Sokolinskaya EL, Putlyaeva LV, Gorshkova AA, Lukyanov KA ✉

Center for Molecular and Cellular Biology, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

Despite the extensive research spurred by the catastrophic effects of COVID-19 pandemic, precise molecular mechanisms of some stages in SARS-CoV-2 life cycle remain elusive. One of such stages is the detachment of viral particles during budding. Using confocal fluorescence microscopy, we observed formation of specific structures by endoplasmic reticulum in human cells expressing SARS-CoV-2 M-protein, implicating oligomerization of M-protein across parallel membranes. In our opinion, such intermembrane oligomerization may provide a driving force for pinching off the viral particles during SARS-CoV-2 budding.

Keywords: SARS-CoV-2 membrane protein, protein-protein interactions, fluorescence microscopy, endoplasmic reticulum, OSER structures, viral budding

Funding: the study was funded by the Russian Foundation for Basic Research, project number 20-04-60370.

Author contribution: Sokolinskaya EL, Putlyaeva LV, Gorshkova AA — experiments; Lukyanov KA — concept and writing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Konstantin A. Lukyanov
Bolshoy Bulvar, 30, str. 1, Moscow, 121205, Russia; lukyanov.konstantin@gmail.com

Received: 13.05.2022 **Accepted:** 28.05.2022 **Published online:** 04.06.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.029

Продолжающаяся пандемия SARS-CoV-2 заставляет нас признать, что наши нынешние возможности лечения угрожающих жизни зоонозных коронавирусных инфекций очень ограничены. Комбинированное применение препаратов, воздействующих на разные молекулярные мишени, представляется перспективной стратегией по предотвращению быстрой адаптации вируса к терапии. Таким образом, разработка скрининговых платформ и поиск ингибиторов с новым механизмом действия являются высокоактуальной задачей.

Зрелый вирион SARS-CoV-2 несет одноцепочечный РНК-геном (кодирующую цепь) и четыре структурных белка — N, M, S и E [1, 2]. Растворимый нуклеокапсидный белок N обеспечивает связывание и компактизацию вирусной РНК. Остальные структурные белки представляют собой интегральные мембранные белки. S-белок обеспечивает специфичное связывание с рецептором ACE2 на поверхности клеток и последующую интернализацию в клетку и слияние мембран вируса и хозяйской клетки. В структуре этого крупного (1272 аминокислотных остатка (а. о.)) гомотримерного белка можно выделить большую внеклеточную N-концевую часть, одну трансмембранную спираль и небольшой цитоплазматический C-концевой домен. Наиболее представлен в вирионе SARS-CoV-2 М-белок. Считается, что он играет

центральную роль в формировании вирусных частиц, обеспечивая необходимые взаимодействия с N-белком (и, соответственно, с геномом вируса), а также с другими структурными белками. М-белок длиной 222 а. о. имеет короткую внеклеточную N-концевую часть, три трансмембранных сегмента и C-концевой внутриклеточный домен. Структура М-белка SARS-CoV-2 не определена экспериментально, однако имеются модели, основанные на гомологичных белках. Е-белок имеет длину 75 а. о., формирует гомопентамер и представлен в вирионе всего несколькими копиями. N-конец этого белка экспонирован во внеклеточное пространство, далее идет один трансмембранный сегмент и небольшой цитоплазматический C-концевой домен. Имеющиеся данные указывают на роль Е-белка в формировании вирусных частиц, а также в его функционировании в качестве ионного канала виропорина.

Несмотря на очень интенсивные исследования последних двух лет, некоторые ключевые этапы жизненного цикла SARS-CoV-2 остаются плохо изученными. В частности, не ясны точные молекулярные механизмы почкования вирусных частиц. В образовании мембранных вирусных частиц есть два важнейших этапа: появление сферических выпячиваний на мембранах клетки и последующий отрыв вирусных частиц от основной

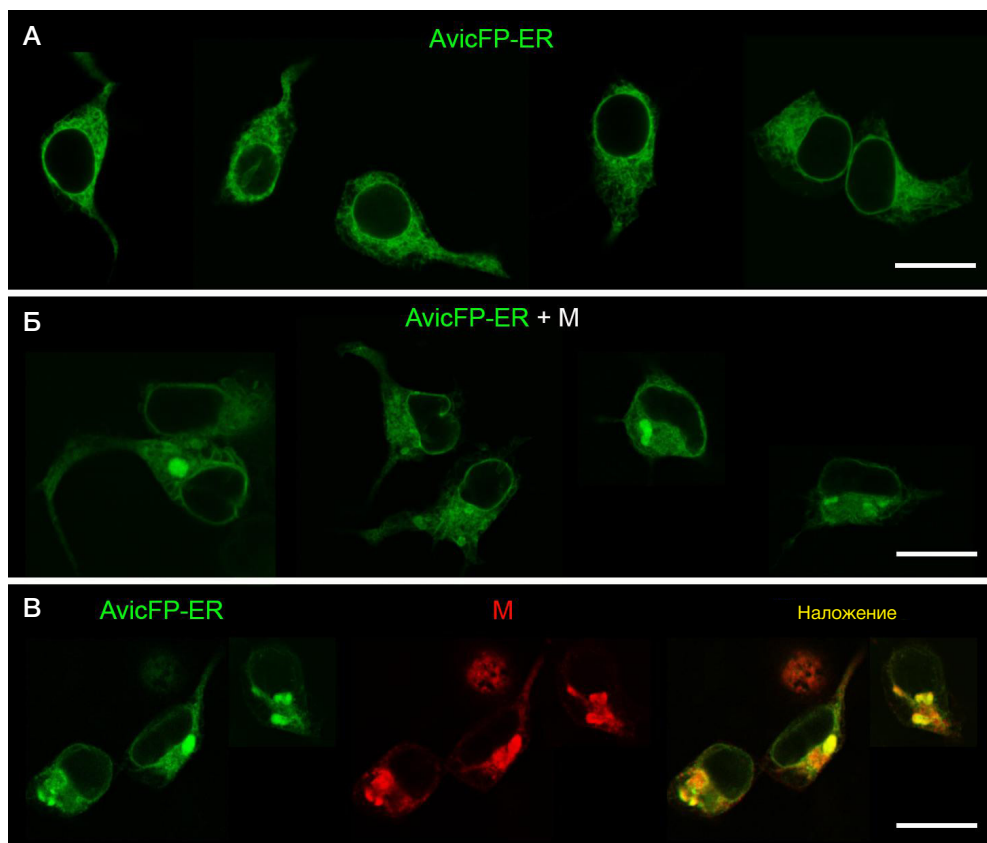


Рис. 1. Конфокальная микроскопия клеток HEK293Т, трансфицированных целевыми плазмидами. Масштабные линейки — 20 мкм. **А.** Трансфекция плазмидой, кодирующей маркер ЭПР AvicFP-ER (зеленый канал). **Б.** Котрансфекция плазмидами, кодирующими AvicFP-ER (зеленый канал) и М-белок. **В.** Котрансфекция плазмидами, кодирующими AvicFP-ER (зеленый канал) и М-белок, с последующей окраской антителами против М-белка (красный канал; справа — наложение двух каналов). Представлены коллажи из четырех (**А**), четырех (**Б**) и двух (**В**) полей зрения, показывающие типичные для каждого образца клетки

мембраны [3]. Известно множество вирусных белков, которые могут деформировать мембрану и формировать почкующийся вирион, но лишь немногие белки могут опосредовать разрыв мембраны для завершения процесса почкования. Большинство оболочечных вирусов при окончательном разрыве мембраны используют механизм клетки-хозяина — комплекс белков ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) [4]. Однако у некоторых вирусов, включая коронавирусы, на этом этапе задействованы только свои собственные белки [5, 6].

Недавно проведенное компьютерное моделирование показало, что Е-белок может как чувствовать, так и индуцировать кривизну мембраны таким образом, что его цитоплазматический С-конец предпочитает находиться на выпуклых областях мембраны [7]. Полностью сформированные вирусные частицы имеют противоположную кривизну. В то же время выпуклая кривизна появляется при почковании вируса в области шейки, соединяющей будущий вирион с хозяйской мембраной. Это может служить объяснением того, что лишь небольшое количество молекул Е-белка попадает в отпочкованный вирион, а также позволяет выдвинуть гипотезу об активном участии этого белка в образовании и, возможно, разделении перешеечной области [8].

Мы использовали флуоресцентную микроскопию клеток человека, экспрессирующих М-белок SARS-CoV-2 в качестве модельной системы. По сравнению с заражением клеток нативным вирусом, такая модель имеет следующие преимущества. Во-первых, поведение целевого белка можно изучать отдельно, без влияния остальных вирусных белков, что позволяет упростить систему и

выявить свойства индивидуальных белков. Во-вторых, отсутствие функционального вируса делает исследования безопасными с возможностью проводить их в обычной лаборатории. В-третьих, такая экспериментальная система может служить прототипом скрининговых платформ для безопасного и легко масштабируемого поиска ингибиторов функционирования целевых вирусных белков. Вместе с тем редуционистская модель экспрессии отдельных вирусных генов, безусловно, имеет существенные ограничения, и полученные результаты нуждаются в дальнейшей верификации на полных вирусных системах.

Экспрессионный вектор, кодирующий М-белок (pGBW-m4134547, AddGene plasmid #152583), был трансфицирован в культуру клеток человека HEK293Т. Для одновременной визуализации эндоплазматического ретикулаума (ЭПР) была использована котрансфекция с плазмидой, кодирующей зеленый флуоресцентный белок mAvicFP1 с сигналом локализации на ЭПР (mAvicFP1-ER) [9]. Конфокальную микроскопию проводили на инвертированном микроскопе DMIRE2 TCS SP2 (Leica; Германия) в зеленом (возбуждение 488 нм, детекция 500–535 нм) и красном (возбуждение 543 нм, детекция 560–660 нм) каналах. Предварительные контрольные эксперименты с экспрессией mAvicFP1-ER в клетках HEK293Т показали его ожидаемую локализацию в виде ажурной сети в цитоплазме, очевидно, соответствующей ЭПР (рис. 1А). При коэкспрессии с М-белком сигнал mAvicFP1-ER претерпел существенные изменения. Помимо сети, в большинстве клеток можно было наблюдать яркие округлые структуры размером 1–5 мкм (рис. 1Б). Дополнительная окраска антителом против М-белка

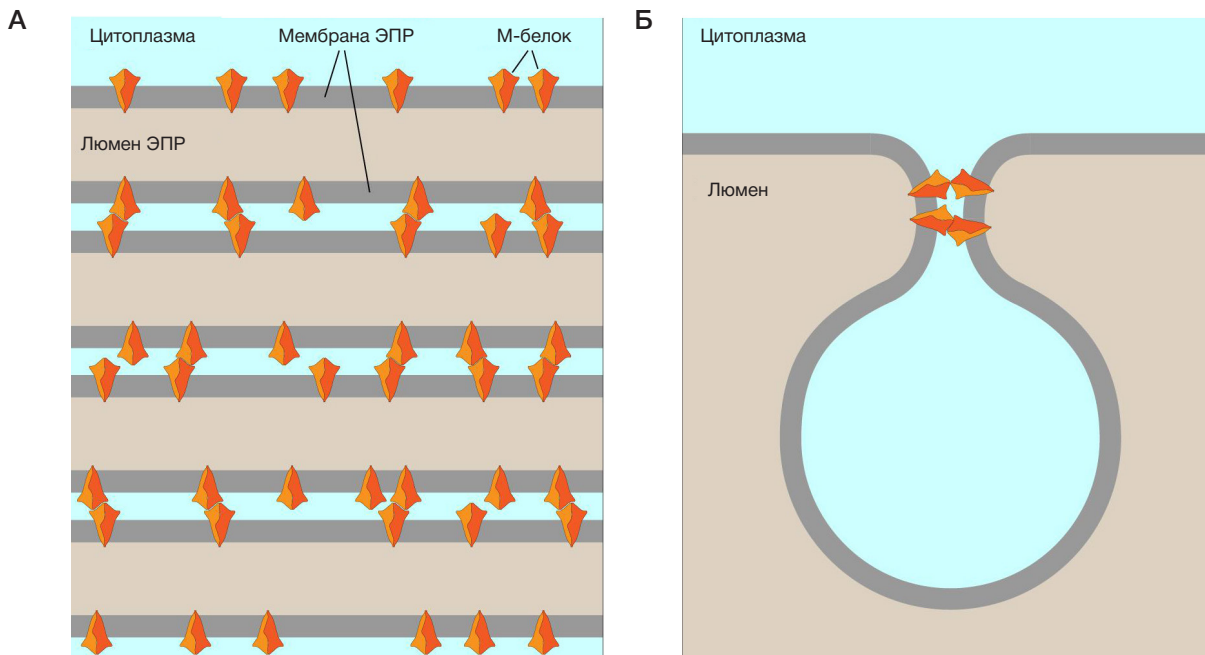


Рис. 2. Схема образования межмембранных олигомеров М-белка. **А.** Образование стопки мембран ЭПР (OSER-структур) за счет взаимодействия М-белков на соседних мембранах. **Б.** Предполагаемое участие межмембранных олигомеров М-белка в формировании перешеечной области при отшнуровывании вирусной частицы (молекулы М-белка в других областях не показаны для ясности)

(поликлональные кроличьи IgG, ABIN6952906; Antibodies-online Inc., США) и вторичными козьими антителами с красным красителем Alexa Fluor 594 (A-11012; Invitrogen, США) показала колокализацию М-белка и mAvicFP1-ER (рис. 1В). Мы сделали вывод, что М-белок локализуется на мембранах ЭПР и способен формировать из этих мембран крупные внутриклеточные скопления.

Ранее появление таких необычных структур ЭПР было описано при экспрессии олигомеризующихся белков с локализацией в мембране ЭПР, что объяснялось взаимодействием белков, связанных с параллельными мембранами ЭПР и их последующим «слипанием» в многослойные образования различной формы — так называемые OSER-структуры (organized smooth endoplasmic reticulum) [9, 10] (рис. 2А).

Известно, что М-белок формирует внутримембранные димеры [11]. 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.

Известно, что для эффективного отделения мембранного пузырька необходимо сближение мембран в перешеечной области на расстояние 1–5 нм [12]. Размер С-концевого домена М-белка составляет около 3 нм (от поверхности мембраны) [11]. Таким образом, взаимодействия между ними сводят противоположные мембраны на дистанцию 3–6 нм. По нашему мнению, межмембранная олигомеризация М-белка является

движущей силой для сближения и слияния мембран при отшнуровывании вирусных частиц SARS-CoV-2 (рис. 2Б).

Эта гипотеза может быть в дальнейшем 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы описали появление OSER-структур при экспрессии М-белка SARS-CoV-2 в клетках человека. Это указывает на наличие белок-белковых взаимодействий между молекулами М-белка, расположенными на соседних параллельных мембранах. Мы предполагаем, что межмембранные взаимодействия М-белков позволяют сформировать перешеечную область и отшнуровать вирусную частицу. В случае подтверждения этой гипотезы описанный тест на образование OSER-структур может быть использован для высокопроизводительного скрининга ингибиторов олигомеризации М-белка.

Литература

1. 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; 7: 26.
2. Putlyaeva LV, Lukyanov KA. Studying SARS-CoV-2 with Fluorescence Microscopy. *Int J Mol Sci.* 2021; 22.
3. Rossman JS, Lamb RA. Viral membrane scission. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2013; 29: 551–69.
4. Barnes J, Wilson DW. Seeking Closure: How Do Herpesviruses Recruit the Cellular ESCRT Apparatus? *J Virol.* 2019; 93.
5. Rossman JS, Jing X, Leser GP, Lamb RA. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell.* 2010; 142: 902–13.
6. J Alsaadi EA, Jones IM. Membrane binding proteins of coronaviruses. *Future Virol.* 2019; 14: 275–86.
7. Kuzmin A, Orekhov P, Astashkin R, Gordeliy V, Gushchin I. Structure and dynamics of the SARS-CoV-2 envelope protein monomer. *Proteins.* 2022; 90: 1102–14.
8. Venkatagopalan P, Daskalova SM, Lopez LA, Dolezal KA, Hogue BG. Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly. *Virology.* 2015; 478: 75–85.
9. Costantini LM, Fossati M, Francolini M, Snapp EL. Assessing the tendency of fluorescent proteins to oligomerize under physiologic conditions. *Traffic.* 2012; 13: 643–9.
10. Snapp EL, Hegde RS, Francolini M, Lombardo F, Colombo S, Pedrazzini E, et al. Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J Cell Biol.* 2003; 163: 257–69.
11. Monje-Galvan V, Voth GA. Molecular interactions of the M and E integral membrane proteins of SARS-CoV-2. *Faraday Discuss.* 2021; 232: 49–67.
12. Campelo F, Malhotra V. Membrane fission: the biogenesis of transport carriers. *Annu Rev Biochem.* 2012; 81: 407–27.

References

1. 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; 7: 26.
2. Putlyaeva LV, Lukyanov KA. Studying SARS-CoV-2 with Fluorescence Microscopy. *Int J Mol Sci.* 2021; 22.
3. Rossman JS, Lamb RA. Viral membrane scission. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2013; 29: 551–69.
4. Barnes J, Wilson DW. Seeking Closure: How Do Herpesviruses Recruit the Cellular ESCRT Apparatus? *J Virol.* 2019; 93.
5. Rossman JS, Jing X, Leser GP, Lamb RA. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell.* 2010; 142: 902–13.
6. J Alsaadi EA, Jones IM. Membrane binding proteins of coronaviruses. *Future Virol.* 2019; 14: 275–86.
7. Kuzmin A, Orekhov P, Astashkin R, Gordeliy V, Gushchin I. Structure and dynamics of the SARS-CoV-2 envelope protein monomer. *Proteins.* 2022; 90: 1102–14.
8. Venkatagopalan P, Daskalova SM, Lopez LA, Dolezal KA, Hogue BG. Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly. *Virology.* 2015; 478: 75–85.
9. Costantini LM, Fossati M, Francolini M, Snapp EL. Assessing the tendency of fluorescent proteins to oligomerize under physiologic conditions. *Traffic.* 2012; 13: 643–9.
10. Snapp EL, Hegde RS, Francolini M, Lombardo F, Colombo S, Pedrazzini E, et al. Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J Cell Biol.* 2003; 163: 257–69.
11. Monje-Galvan V, Voth GA. Molecular interactions of the M and E integral membrane proteins of SARS-CoV-2. *Faraday Discuss.* 2021; 232: 49–67.
12. Campelo F, Malhotra V. Membrane fission: the biogenesis of transport carriers. *Annu Rev Biochem.* 2012; 81: 407–27.