



УДК 578.22

КОНДЕНСАТЫ НУКЛЕОПРОТЕИНА SARS-CoV-2 НА ВИРУСНОЙ РНК И ИХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ МОДУЛЯТОРЫ

© 2023 г. Ю. И. Светлова*, Ю. И. Павлова*, **, А. В. Аралов***, А. М. Варижук*, **, #

*ФГБУ “Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины”

Федерального медико-биологического агентства,
Россия, 119435 Москва, ул. Малая Пироговская, 1а**ФГАОУ ВО “Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)”,
Россия, 141701, Долгопрудный, Институтский переулок, 9***ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 16.11.2022 г.

После доработки 24.11.2022 г.

Принята к публикации 25.11.2022 г.

Феномен разделения фаз “жидкость—жидкость” (LLPS) описан для ряда биополимеров и достаточно полно изучен на примере нескольких белков с неструктурированными фрагментами. К ним относится нуклеокапсидный белок (N-белок) коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2. В данном обзоре проанализированы закономерности формирования конденсатов N-белка в присутствии вирусной РНК. Основное внимание уделено типам транзитных контактов внутри конденсатов и фрагментам N-белок/РНК, участвующим в формировании таких контактов; обобщены современные представления о роли конденсатов в жизненном цикле вируса и их влиянии на защитные свойства клетки-хозяина. В заключительной части обзора рассмотрена возможность регуляции формирования вирусных конденсатов с помощью низкомолекулярных соединений — эндогенных и экзогенных модуляторов разделения фаз, что может стать основой нового направления дизайна противовирусных терапевтических агентов.

Ключевые слова: разделение фаз, конденсаты, N-белок, SARS-CoV-2, вирусная РНК, низкомолекулярные противовирусные агенты

DOI: 10.31857/S0132342323050081, **EDN:** BKSUBV

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	443
РАЗДЕЛЕНИЕ ФАЗ N-БЕЛКА И РНК SARS-CoV-2 <i>in vitro</i>	444
ПРЕДПОЛАГАЕМАЯ РОЛЬ КОНДЕНСАТОВ N-БЕЛКА В КЛЕТКЕ	447

МОДУЛЯТОРЫ КОНДЕНСАТОВ N-БЕЛКА И РНК SARS-CoV-2	449
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	451
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	451

ВВЕДЕНИЕ

COVID-19 внесла заметный вклад в социально-экономические потери последних лет. Вирус SARS-CoV-2 продолжает циркулировать в российской популяции, несмотря на программы массовой вакцинации. Активно ведется разработка противовирусных агентов — блокаторов заражения, ингибиторов репликации SARS-CoV-2, индукторов летального мутагенеза и др. [1]. Помимо конвенциональных вирусных мишеней, таких как поверхностные гликопротеины [2], химо-трипсин-подобная протеаза [3] или РНК-зависимая РНК-полимераза [4], внимание исследователей все чаще привлекает нуклеокапсидный белок, обеспечивающий упаковку вирусного генома (N-белок) [5]. Упаковка соответствует модели

Сокращения: COVID-19 — коронавирусная инфекция 2019 года; CVL218 — 5-фтор-2-[4-(метиаминометил)фенил]-1-бензофуран-7-карбоксамид (мефупариб); DD — димеризационный домен; G3BP1/2 — белки, связывающие Ras-ГТФаза-активирующий белок; EC₅₀ — полумаксимальная эффективная концентрация; EGCG — эпигаллокатехин-3-галлат; GCG — галлокатехин-3-галлат; IDR — протяженные неструктурированные участки; LCT — низкая критическая температура; LLPS — разделение фаз “жидкость—жидкость”; MAVS — митохондриальный анти-вирусный сенсор; PJ34 — N-(5,6-дигидро-6-оксо-2-фенантридинил)-2-ацетамид; RBD1 — РНК-связывающий N-концевой домен 1; RBD2 — РНК-связывающий домен 2; SARS-CoV-2 — коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2; SR — фрагмент, богатый остатками серина и аргинина; TRS — сигнал регуляции транскрипции.

Автор для связи: (тел.: +7 (916) 502-78-32; эл. почта: annavarizhuk@rcpcm.org).

“бусин на нити” и подразумевает наличие множества (~35–40 в случае SARS-CoV-2) морфологически изолированных рибонуклеопротеиновых комплексов на единичной РНК [6].

Исследования в модельных системах показали, что такие комплексы, вероятно, представляют собой продукт созревания биомакромолекулярных конденсатов [7]. Последние формируются по механизму разделения фаз “жидкость–жидкость” (liquid–liquid phase separation, LLPS) [8] подобно стресс-гранулам и иным немембранным органеллам клетки-хозяина [9, 10]. Их стоит отличать от нерастворимых белковых агрегатов (телец включения) [11]. Биологическая роль конденсатов N-белка SARS-CoV-2 не ограничивается инициацией сборки вирусной частицы: они также регулируют репликацию [12] и ряд других процессов, значимых для выживания вируса. Это предполагает возможность разработки терапевтических подходов на основе модуляторов LLPS. Под модуляцией в данном случае стоит понимать изменение динамики разделения фаз или физико-химических характеристик конденсатов.

С 2020 г. было опубликовано множество экспериментальных работ и несколько аналитических обзоров [13–15], посвященных феномену LLPS N-белка SARS-CoV-2. В последнем и наиболее полном обзоре [14] рассмотрены фрагменты N-белка, играющие ключевую роль в стабилизации конденсатов, но не обобщена информация о геномной РНК. В текущем обзоре проанализированы оба компонента, что позволяет выделить более точные детерминанты конденсатов и наметить стратегии рационального дизайна их модуляторов. Кроме того, в текущем обзоре характеристики модельных конденсатов, получаемых в бесклеточных системах, сопоставлены с их предполагаемыми внутриклеточными функциями. В заключительной части обзора рассмотрены известные низкомолекулярные соединения, показавшие LLPS-модулирующую активность в бесклеточных системах *in vitro* или на клеточных линиях.

РАЗДЕЛЕНИЕ ФАЗ N-БЕЛКА И РНК SARS-CoV-2 *in vitro*

Ряд биополимеров (некоторые белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды) формирует в водных растворах отдельную, более плотную жидкую фазу. Обособленные скопления биополимеров, морфологически подобные каплям масла в жидкости (биомолекулярные конденсаты), удерживаются гомо- и гетеротипическими нековалентными взаимодействиями, динамичны (внутри них сохраняется диффузия) и способны к слиянию [16, 17]. В общем случае такое разделение фаз (LLPS) реализуется при условии высокого поверхностного натяжения на границе “биополимер–вода” [18]. При физиологических условиях склонность к LLPS

демонстрируют растворы белков с неструктурированными участками (intrinsically disordered regions, IDR) [19]. За счет ассоциации IDR внутри конденсата сосредотачиваются и функциональные (структурированные) домены. Это позволяет направленно активировать биохимические процессы в клетке за счет высокой локальной концентрации ферментов или кофакторов при условии, что они также включаются в конденсаты, или, напротив, временно подавлять функцию белка за счет его изоляции в конденсате [20]. В ряду эукариот выраженный вклад IDR-опосредованной регуляции биохимических процессов и в целом высокое содержание IDR в протеоме характерны для сложных организмов. У простейших и вирусов высокая доля IDR обеспечивает адаптивность при сохранении компактного генома [21]. N-белок SARS-CoV-2 – яркий пример многофункциональных IDR-содержащих белков, вовлеченных в регуляцию функционирования генома и адаптацию вируса к внутриклеточным условиям [14].

Наряду с IDR N-белок содержит два структурированных фрагмента: РНК-связывающий домен 1 (RNA-binding domain 1, RBD1) и C-концевой димеризационный домен (dimerization domain, DD) (рис. 1а). При димеризации белка гомотипические контакты (N-белок–N-белок) обеспечивают экранирование гидрофобной части DD, снижая поверхностное натяжение [22]. В случае нарушения димеризации равновесие смещается в сторону динамичных мультимеров (конденсатов) [23]. Триггером может выступать частичная или полная денатурация DD [24]. Возможность частичной денатурации N-белка объясняет температурную зависимость LLPS, а именно наличие критической температуры (low critical temperature, LCT), ниже которой конденсаты в отсутствие других факторов не образуются (рис. 1б). Примечательно, что определенная в модельных бесклеточных системах LCT N-белка близка к 37°C [24, 25].

Помимо температуры ключевой фактор, влияющий на равновесие мономер–димер–мультимер (конденсат), – общая концентрация N-белка в растворе (рис. 1б). При достижении критической концентрации, варьирующейся по разным оценкам в диапазонах от высокого наномолярного до среднего микромолярного [12, 23], разделение фаз происходит и в отсутствие вирусной РНК. Дальнейшее повышение общей концентрации в системе практически не сказывается на распределении N-белка между основным раствором и конденсатами, но приводит к увеличению количества конденсатов и/или их размера. Подобное поведение типично для разделения фаз в однокомпонентных системах [16]. Более точная имитация вирусных нуклеопротеиновых частиц требует двухкомпонентной модели (N-белок–РНК) (рис. 1в). В таких системах можно выделить

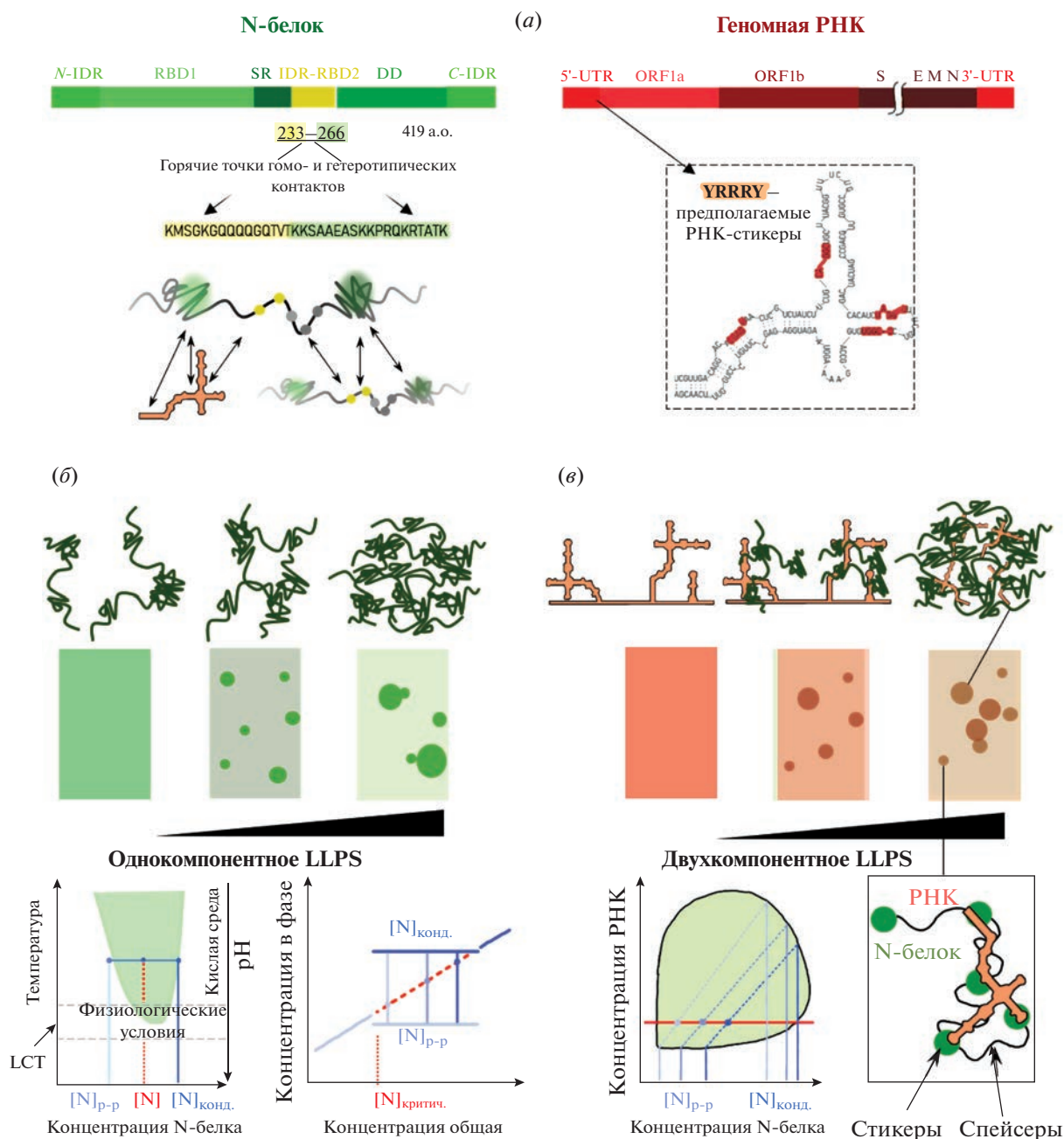


Рис. 1. Общие принципы формирования конденсатов N-белка и геномной РНК SARS-CoV-2. (a) – Структурные особенности N-белка и РНК. На левой панели представлена доменная структура N-белка и схематически изображены характерные гомотипические (N-белок–N-белок) и гетеротипические (N-белок–РНК) конденсаты, на правой панели схематически представлены вирусный геном и пример склонного к формированию транзитных контактов с N-белком элемента вторичной структуры геномной РНК (шпилька с несколькими протяженным дуплексными фрагментами и мотивами YRRRY, где Y и R – остатки пиримидинового и пуринового нуклеотидов соответственно) [24, 25]; (б) – конденсаты N-белка. Схематически показано разделение фаз “жидкость–жидкость” (LLPS) в однокомпонентной системе, оно наблюдается при температуре и концентрации N-белка выше критических значений (LCT и $[N]_{критич.}$ соответственно) [24, 25]. Итоговая концентрация белка в растворе ($[N]_{p-p}$) – ниже исходной (общей) концентрации в системе до LLPS, итоговая концентрация белка в конденсате ($[N]_{конд.}$) – выше исходной; (в) – конденсаты N-белок–РНК. Схематически показано разделение фаз в двухкомпонентной системе [26]. Итоговые концентрации каждого компонента в растворе и в конденсате зависят от общих концентраций и соотношения компонентов. Стабилизацию конденсатов обеспечивают контакты стикеров белка/РНК, перемежающихся условно инертными гибкими фрагментами – спейсерами.

критические концентрации обоих компонентов [26]. Хотя в широком диапазоне концентраций (от наномолярной до микромолярной) доля конденсатов возрастает с увеличением общего количества каждого компонента, итоговая фазовая диаграмма имеет более сложную форму, которая отражает значимость соотношения N-белок : РНК.

Для понимания роли вирусной РНК в формировании конденсатов N-белка (или, как минимум, снижении критической концентрации N-белка) необходимо рассмотреть специфические и неспецифические взаимодействия N-белок–РНК (рис. 1б). Данные о них получены методом, основанным на перекрестной сшивке биополимеров, фрагментации и обратной транскрипции РНК с последующим секвенированием кДНК [27]. Специфическим можно считать узнавание RBD1-доменом N-белка мотивов YRRRY в составе стеблей шпильчатых структур геномной РНК (рис. 1а). Мотив YRRRY представляет собой пятизвенный олигонуклеотидный фрагмент, включающий три центральных пуриновых нуклеотидных остатка (R) и фланкирующие их пиримидиновые нуклеотидные остатки (Y) [25]. Примыкающий к RBD1 N-концевой IDR N-белка способен формировать слабые неспецифические контакты с одноцепочечными и, вероятно, двуцепочечными фрагментами РНК [28]. Основное неспецифическое связывание двуцепочечных фрагментов РНК отмечено для центрального IDR N-белка – возможно, при участии примыкающего к нему серин/аргинин-богатого фрагмента (SR) и DD (рис. 1а) [24]. На этом основании центральный IDR и фланкирующие его области называют РНК-связывающим доменом 2 (RNA-binding domain 2, RBD2). Предполагается, что взаимодействие IDR с РНК инициирует конформационные изменения DD. Эффект такого взаимодействия аналогичен эффекту частичной термической денатурации DD: экспонирование гидрофобных аминокислотных остатков DD смещает равновесие в сторону динамичных мультимерных ассоциатов [24].

Нуклеопротеиновые конденсаты SARS-CoV-2 в целом соответствуют классической для РНК-белковых систем модели “скаффолд–клиент”. IDR-содержащий “скаффолд” (N-белок) – это основной компонент, а “клиент” (РНК) выполняет регуляторную функцию [29]. Поиск детерминант LLPS традиционно начинают с исследования транзientных взаимодействий скаффолда путем перекрестной сшивки конденсатов с последующей фрагментацией и масс-спектрометрическим анализом фрагментов [7]. Детерминанты LLPS можно определить как уникальное распределение “горячих точек” гомо/гетеротипических контактов (стикеров) среди условно инертных, т.е. не формирующих контакты, фрагментов (спейсеров) (рис. 1б) [30]. Последние, хотя и не участвуют в стабилизации конденсатов напрямую, определяют

гидродинамический объем IDR, интерфазу IDR–растворитель и соотношение контактов IDR–IDR против контактов IDR–растворитель. Если следовать теории гомополимеров, часть положений которой справедлива для небольших IDR-содержащих белков, ключевой для LLPS параметр спейсеров – это соотношение разветвленных и неразветвленных аминокислот [31]. Оно определяет гибкость спейсеров, вероятность контактов между стикерами и общий гидродинамический объем молекулы. Гибкость спейсеров и доступность стикеров регулируются на уровне пост-трансляционных модификаций белка. В случае SARS-CoV-2 основной модификацией выступает фосфорилирование сериновых остатков в N-IDR, центральном IDR и фланкирующем его SR [32, 33].

Ключевые стикеры N-белка SARS-CoV-2 сосредоточены в центральном IDR [7]. По-видимому, это положительно заряженные и ароматические аминокислотные остатки, участвующие, соответственно, в электростатических гетеротипических (N-белок–РНК взаимодействиях) и гомотипических (N-белок–N-белок) взаимодействиях типа “ π -катион” [34] и “ π - π ” [35]. Вероятные стикеры – положительно заряженные и ароматические аминокислотные остатки фланкирующих центральный IDR SR и DD (стикеры последнего скрыты в структурированном DD в составе димера N-белка) [7, 36]. Помимо отдельных аминокислотных остатков внутри IDR, к стикерам с долей условности можно отнести оба домена N-белка, поскольку наряду с транзientным неспецифическим связыванием через случайные контакты “ π -катион” и “ π - π ” в составе конденсатов реализуется специфическое связывание RBD1–РНК, и не исключено частичное сохранение димеризации за счет структурированного DD. Дополнительные контакты N-белок–N-белок могут реализовываться за счет транзientных спиральных структур в центральном IDR. Характерная для ряда поздних вариантов SARS-CoV-2 мутация в центральном IDR (G215C) повышает устойчивость таких спиралей и вероятность контактов N-белок–N-белок (по-видимому, за счет дисульфидных связей). Показано, что эта мутация способствует LLPS [37]. Таким образом, хотя первостепенно наличие IDR, структурированные фрагменты, обеспечивающие мультивалентность скаффолда, благоприятствуют образованию конденсатов.

Пассивная роль, традиционно отводимая РНК в модели “скаффолд–клиент”, не соответствует действительности, если принять тезис о специфичности стикеров RBD1 к шпилькам и мотивам YRRRY в РНК [24]. Распределение таких мотивов в геноме вируса определяет положение конденсатов на молекуле РНК [7].

Как и большинство “клиентов”, РНК регулирует чувствительность конденсатов к внешним

условиям (стимулам) [28]. Внешние условия (рН и концентрация солей) определяют сравнительную значимость контактов N-белок–N-белок и N-белок–РНК [38]. Низкая ионная сила раствора повышает вклад электростатических взаимодействий (гетеротипических контактов положительно заряженных стикеров N-белка с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом РНК) и снижает вклад гидрофобных взаимодействий (гомотипических контактов DD). При этом может увеличиваться и вклад взаимного отталкивания между молекулами РНК в конденсате. Электростатические гетеротипические взаимодействия N-белок–РНК существенны для LLPS в слабнокислой и нейтральной средах. При дальнейшем повышении рН часть основных аминокислот N-белка депротонируется (теоретическая pI 10.07 [39]), и возрастает роль гомотипических взаимодействий гидрофобных участков. Обобщая результаты физико-химических исследований разделения фаз N-белок–РНК SARS-CoV-2 в модельных системах, можно отметить максимум разделения фаз в слабнокислой среде с пониженной концентрацией солей при повышенной ($>37^{\circ}\text{C}$) температуре. Конденсаты с оптимизированным соотношением N-белок : РНК устойчивы и в физиологических условиях [21, 22].

ПРЕДПОЛАГАЕМАЯ РОЛЬ КОНДЕНСАТОВ N-БЕЛКА В КЛЕТКЕ

Роль конденсатов N-белок–РНК проявляется на различных этапах жизненного цикла вируса — от упаковки/распаковки до репликации генома и трансляции субгеномных РНК (рис. 2). Изначально распаковка нуклеокапсида обеспечивается LLPS-модулирующей активностью эндогенных гидротропов [40]. Солюбилизация способствует перераспределению N-белка и локальному экспонированию геномной РНК. Это необходимо для осуществления трансляции открытых рамок считывания ORF1ab и репликации плюс-цепи путем транскрипции минус-цепи. Компоненты репликационно-транскрипционного комплекса формируют конденсаты с N-белком [12], что позволяет поддерживать их высокую локальную концентрацию. Перераспределение N-белка после частичной солюбилизации завершается кластеризацией на 5'-конце РНК, поскольку эта область генома богата шпилечными фрагментами с YRRRY-мотивами, для которых отмечено повышенное сродство к RBD1 N-белка [24]. Кластеры N-белка ограничивают трансляцию ORF1ab, открывая возможность транскрипции и трансляции 3'-концевых субгеномных РНК. Среди них наиболее широко представлена в клетке субгеномная РНК, кодирующая N-белок [41]. Это связывают с особенностями регулирующих транскрипцию последовательностей (transcription regulatory sequence,

TRS) непосредственно перед открытой рамкой считывания (TRS body) и в 5'-концевом участке генома (TRS leader). Все они содержат узнаваемые RBD1 мотивы YRRRY, но именно в TRS субгеномной РНК, кодирующей N-белок, количество таких мотивов максимально [24]. Предполагается, что молекулы N-белка, сформировавшие благодаря RBD1-домену комплексы с сайтами геномной РНК TRS leader и TRS body, димеризуются при участии DD или формируют конденсаты за счет неспецифических гомотипических контактов IDR–IDR. Оба варианта в теории способствуют сближению TRS и слиянию “leader–body” [42]. Аналогичным образом может происходить сближение 5'- и 3'-концов РНК при циклизации генома [43], обеспечивающей корректную стехиометрию нуклеокапсида (одна молекула РНК на вирусную частицу).

Чередование в геноме богатых YRRRY-мотивами шпилечных фрагментов и одноцепочечных неструктурированных участков задает распределение конденсатов, соответствующее модели “бусин на нити” [7]. Наличие “бусин” (рибонуклеопротеиновых комплексов) внутри вирусной частицы установлено методом криоэлектронной томографии [44]. Хотя точный механизм сборки вирусной частицы еще предстоит прояснить, выявлена его завершающая стадия — формирование оболочки из декорированной гликопротеинами мембраны со встроенным в мембрану М-белком. М-белок проявляет способность формировать конденсаты с N-белком, обособленные от конденсатов N-белок–РНК или включающие их в качестве дополнительного внутреннего компартмента [7, 45]. На данный момент не очевидно, служит ли конденсация N-белок–М-белок на поверхности эндоплазматического ретикулума (с последующим включением РНК) триггером упаковки вируса или же на первом этапе происходит разделение фаз N-белок–РНК в цитоплазме, и полученные конденсаты оборачиваются в липидную оболочку с заякоренными в ней мембранным, оболочечным и структурными белками. Так или иначе, упаковка происходит с участием разделения фаз.

Помимо регуляторной роли в жизненном цикле вируса, стоит отметить вклад LLPS N-белок–РНК в противодействие вируса хозяину. N-белок нарушает функционирование ассоциированных с процессингом РНК немембранных органелл человека, выступая партнером или конкурентом соответствующих белков-скаффолдов (FUS, hnRNP A2 и TDP-43) [46]. Кроме того, он позволяет вирусу уклоняться от иммунной системы хозяина, действуя на митохондриальный антивирусный сенсор (mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS) [23] и скаффолды стресс-гранул G3BP1/2 [47, 48]. Образование стресс-гранул можно представить как клеточный ответ на попадание в нее

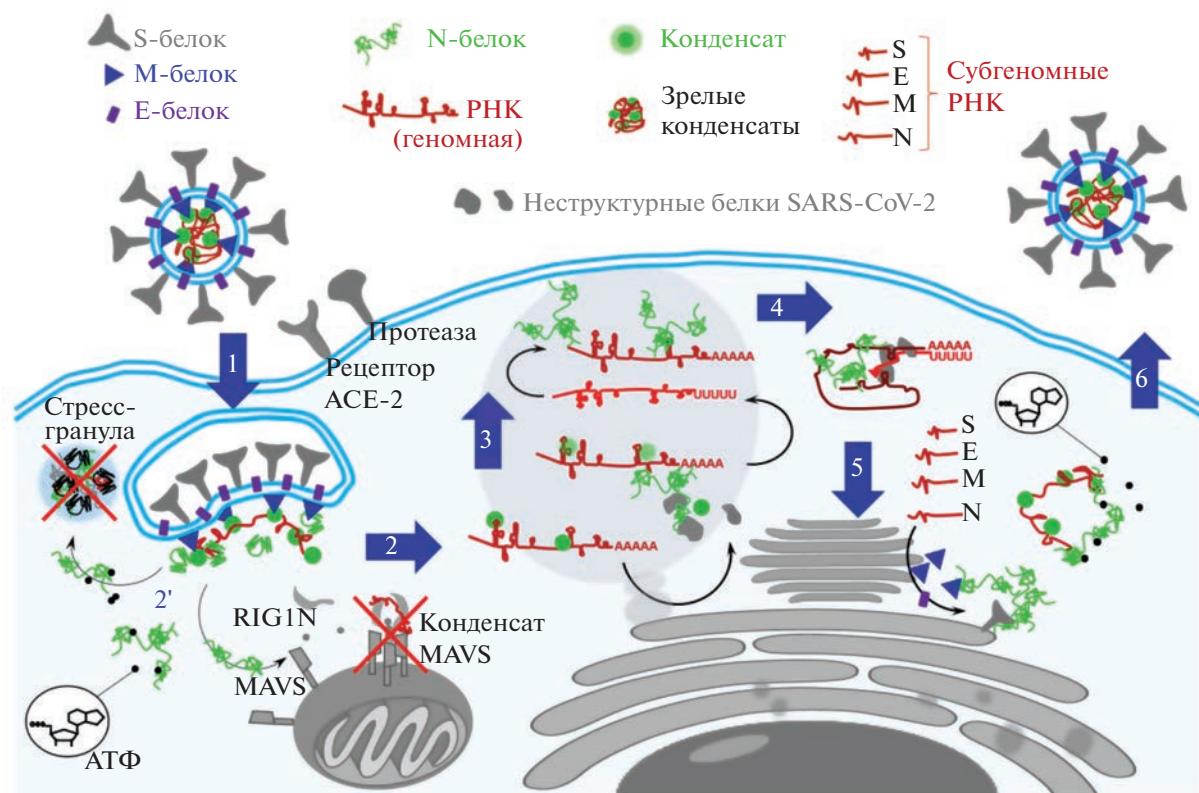


Рис. 2. Предполагаемая роль фазовых переходов N-белка в клетке. 1 — После проникновения вирусной частицы в клетку распаковка вируса сопровождается частичной сольюбилизацией N-белка при участии внутриклеточного гидрофоба АТФ [40]; 2 — частичная сольюбилизация необходима для частичного экспонирования РНК и синтеза неструктурных белков, включая компоненты транскрипционно-репликационного аппарата; 2' — экспонирование фрагментов вирусной РНК может активировать систему внутриклеточной защиты, т.е. инициировать сборку стресс-гранул для изоляции патогена, либо выработку цитокинов по механизму, инициируемому самоассоциацией сигнального белка MAVS [23], что позволяет вирусу обойти систему защиты хозяина [47, 48]; 3 — N-белок способствует сборке транскрипционно-репликационного аппарата — также по механизму разделения фаз [12]; 4 — преимущественная локализация N-белка в участках генома, богатых шпильками и специфическими мотивами связывания, способствует сближению этих участков, в том числе в ходе прерывистой транскрипции [42]; 5 — результат прерывистой транскрипции — субгеномные РНК, кодирующие структурные белки вируса, в первую очередь N- и M-белки; 6 — после трансляции субгеномных РНК не исключено выделение в отдельную фазу M-белка и формирование конденсатов M-белок–N-белок [45]. При накоплении N-белка (в условиях его локального избытка) АТФ способствует конденсации N-белка на РНК, что может инициировать циклизацию РНК и дальнейшую компактизацию при сборке вирусной частицы [7].

патогена вирусной или иной природы. Оно позволяет физически изолировать патоген в отдельном компартменте. В случае коронавирусной инфекции данный защитный механизм не реализуется: наблюдается снижение числа гранул или их полное растворение [47]. Сходным образом (через аберрации фазовых переходов) осуществляется блокирование сигнального каскада, обеспечивающего повышенную экспрессию интерферонов I типа зараженными клетками [23]. Каскад включает активацию прион-подобного MAVS цитозольным рецептором патогенов RIGIN. В норме такая активация завершается самоассоциацией MAVS и разделением фаз, однако в присутствии конденсатов N-белка конденсаты MAVS не формируются, передача сигнала подавляется [49].

Примечательно, что при высоких концентрациях N-белок активирует сигнальный путь, опосредованный фактором NF-κB и регулирующий выделение провоспалительных цитокинов [50]. Итоговый эффект согласуется с клинической картиной тяжелого течения коронавирусной инфекции — подавлением врожденного иммунитета с последующей гиперактивацией [51].

Таким образом, фазовые переходы N-белка и его воздействие на конденсаты клетки-хозяина в значительной степени определяют выживание вируса. Управление фазовыми переходами открывает новые перспективы в противовирусной терапии. Биосовместимые низкомолекулярные регуляторы LLPS представляются подходящей основой для создания соответствующих препаратов. Ре-

зультаты подбора и рационального дизайна таких соединений рассмотрены в следующем разделе обзора.

МОДУЛЯТОРЫ КОНДЕНСАТОВ N-БЕЛКА И РНК SARS-CoV-2

Основной эндогенный модулятор конденсатов — аденозинтрифосфат (АТФ) (рис. 3а) [15, 39, 52]. За счет сочетания ароматического (нуклеиновое основание) и гидрофильного (трифосфат) фрагментов АТФ способствует солюбилизации белков с экспонированными в раствор гидрофобными участками [53]. Хотя это соединение наиболее известно как “аккумулятор энергии” для биохимических процессов, именно гидротропные свойства объясняют необходимость поддержания его высокой внутриклеточной концентрации (2–12 мМ в зависимости от типа клеток) [54]. Вместе с тем отрицательно заряженный (трифосфатный) фрагмент повышает вероятность случайных электростатических гетеротипических взаимодействий при условии накопления белка-скаффолда, что может инициировать разделение фаз [53, 55]. Нередко наблюдается двухфазная зависимость LLPS от соотношения N-белок : АТФ [15, 40]. В бесклеточной модели фазовых переходов N-белок–РНК SARS-CoV-2 при соотношении ~1 : 1000 (на начальных этапах заражения) преобладает растворение конденсатов. При увеличении количества N-белка и соотношении N-белок : АТФ ≈ 200 : 1 LLPS усиливается, а при дальнейшем накоплении N-белка — снова снижается [40]. Эти наблюдения соответствуют предполагаемой роли АТФ в распаковке вирусной частицы и упаковке нуклеокапсида после синтеза дополнительных молекул N-белка.

Для прояснения молекулярных основ LLPS-модулирующей активности АТФ требуются дополнительные исследования. При дизайне экзогенных модуляторов на основе аналогов АТФ особенно актуален вопрос влияния АТФ на контакты N-белок–РНК. Оптимальный модулятор должен обладать избирательностью к вирусным конденсатам, т.е. не затрагивать немембранные органеллы клетки хозяина. Универсальные гидротропы в этом плане малоперспективны. Некоторой избирательности можно ожидать от конкурентного ингибитора специфических гетеротипических контактов в вирусных конденсатах. Анализ взаимодействий N-белок–АТФ методами ЯМР-спектроскопии с привлечением молекулярного моделирования выявил два наиболее вероятных сайта связывания АТФ в RBD1 ($K_d \sim 3.0$ мМ) и RBD2 ($K_d \sim 1.5$ мМ) N-белка [45]. В обоих сайтах расположение аргининовых и лизиновых остатков предполагает комбинацию электростатических взаимодействий с трифосфатом АТФ и взаимодействий “катион-π” с пуриновым фрагментом.

Константы связывания допускают конкуренцию с РНК ($K_d = 8.0$ мкМ) [56] лишь за счет большого избытка АТФ.

Доступные на данный момент экзогенные модуляторы вирусных конденсатов были получены преимущественно путем скрининга соединений с показанной ранее противовирусной активностью, т.е. в рамках прояснения механизма или попытки перепрофилирования существующих препаратов с широким спектром действия. Яркий пример — низкомолекулярные ингибиторы поли(АДФ-рибозо)полимеразы 1 (PARP1) CVL218 и PJ34 (рис. 3а) [57]. Изначально интерес к их возможной роли в модуляции LLPS SARS-CoV-2 был обусловлен способностью проникать в легочную ткань и подтвержденным сродством к N-белку ($K_d = 4.7$ и 696 мкМ для CVL218 и PJ34 соответственно). Оба соединения меняют физические свойства конденсатов — снижают их плотность и тем самым облегчают доступ другим терапевтическим агентам к РНК и репликативному/транскрипционному аппарату. Облегчение доступа к компонентам конденсатов было продемонстрировано с использованием ремдесивира (пролекарственное нуклеозидное производное, метаболизируемое в клетке до аналога АТФ) (рис. 3б). Данный ингибитор репликации показал двухкратное снижение эффективной концентрации EC_{50} в присутствии модулятора LLPS CVL218 [57]. Эти результаты стимулируют дальнейшую разработку стратегий комбинированной противовирусной терапии.

Еще один эффективный модулятор вирусных конденсатов — флавоноид галлокатехин-3-галлат (GCG) (рис. 3а) [58]. Данное природное соединение наиболее известно как антиоксидант, он проявляет умеренную ингибиторную активность в отношении SARS-CoV-2 (константы ингибирования в среднем/высоком микромолярном диапазоне концентраций, в зависимости от схемы введения), обладает выраженным сродством к N-белку и эффективно подавляет образование конденсатов в клетке. LLPS-модулирующая способность до некоторой степени проявляется и у гомологов GCG, таких как эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG) (наиболее эффективный ингибитор SARS-CoV-2 катехинового ряда) (рис. 3а), но не коррелирует с противовирусной активностью [58].

Флавоноиды — не единственные антиоксиданты, оказывающие влияние на вирусные и эндогенные конденсаты. Универсальный ингибитор опосредующих LLPS гидрофобных взаимодействий — липоевая кислота (рис. 3а) [59]. Помимо конденсатов N-белок–РНК SARS-CoV-2 [60] липоевая кислота может влиять на стресс-гранулы и иные немембранные органеллы [61]. То же касается модельного универсального ингибитора разделения фаз — 1,6-гександиола (рис. 3а) [25]. Это

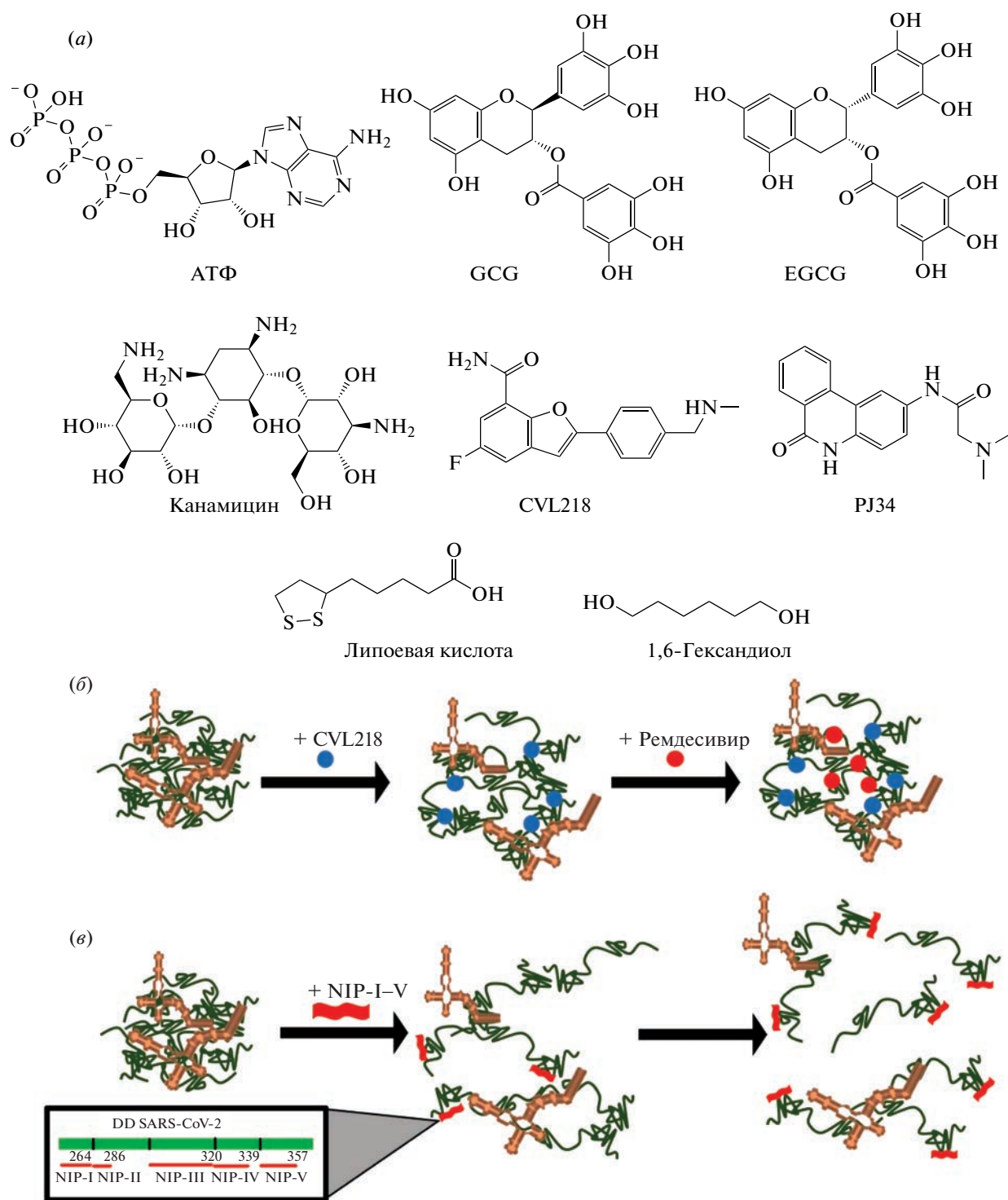


Рис. 3. Модуляторы LLPS и примеры их действия на конденсаты N-белок–РНК. (a) – Известные низкомолекулярные модуляторы конденсатов N-белок–РНК [15, 40, 57–59]; (б) – пример модуляции физических свойств конденсатов как основа возможного подхода к комбинированной противовирусной терапии. Низкомолекулярное соединение CVL218, известное как ингибитор PARP1, способствует разрыхлению конденсатов N-белок–РНК (предположительно с включенными в них компонентами транскрипционно-репликационного аппарата). Снижение плотности конденсатов открывает ингибитору репликации (ремдесивиру) доступ к мишени [57]; (в) – пример потенциально селективных ингибиторов вирусных конденсатов на основе миметиков стикеров N-белка [23]. Миметики представляют собой ретроинвертированные пептиды, имитирующие фрагменты DD N-белка. Предполагается, что данные миметики ингибируют значимые для разделения фаз гомотипические контакты.

соединение широко используется в фундаментальных исследованиях, но не имеет перспектив применения в клинике ввиду выраженного цитотоксического действия [62]. Наряду с неспецифическим блокированием гидрофобных контактов возможно неспецифическое подавление электростатических взаимодействий РНК–белок в конденсатах. По такому принципу действуют антибиотики группы аминогликозидов, в частности канамицин (рис. 3а) [25]. Как и прочие представленные в данном разделе модуляторы, отобранные полуэмпирически, они не обладают избирательностью к конденсатам SARS-CoV-2 [63].

На данный момент известен один пример успешного рационального дизайна ингибиторов LLPS, предположительно специфичных к SARS-CoV-2. Ингибиторы представляют собой ретроинвертированные пептиды — миметики боковых участков DD N-белка, полученные из неприродных D-аминокислотных остатков (для защиты от протеолиза) в инвертированной последовательности (для обеспечения расположения боковых групп, идентичного природному прототипу). В целях повышения эффективности внутриклеточного транспорта к ретроинвертированным пептидам добавляют направляющую последовательность TAT-белка вируса иммунодефицита человека. Принцип действия итоговых пептидных модуляторов LLPS сводится к блокированию гомотипических контактов N-белка за счет конкурентного связывания с DD (рис. 3в). Подавление димеризации смещает равновесие в сторону конденсатов. Примечательно, что наиболее активный ретроинвертированный пептид не только подавлял образование конденсатов N-белок–РНК SARS-CoV-2, но и восстанавливал внутриклеточные сигнальные пути системы врожденного иммунитета, что удалось отследить при заражении экспрессирующих N-белок клеток сторонним вирусом в присутствии/в отсутствие пептидного блокатора LLPS [23].

Помимо ингибиторов LLPS N-белка интерес представляют противовирусные соединения — активаторы LLPS. В их число входят 5'-норкарбоциклические аналоги нуклеозидов, некоторые представители класса флексимеров (модифицированные нуклеозиды, в которых основание разделено на два гетероциклических фрагмента, соединенных простой связью C—C) и перилен-содержащие нуклеозидные и нуклеозидные производные [64]. Теоретически, индуцируемое данными соединениями смещение равновесия между мономерами/димерами N-белка и конденсатами в сторону последних может нарушать распаковку нуклеокапсида на первой стадии инфекции, однако этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Таким образом, показано, что модуляция свойств вирусных конденсатов вносит вклад в общую противовирусную активность препаратов.

Это открывает возможность разработки новой эффективной стратегии борьбы с SARS-CoV-2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогресс в исследовании феномена LLPS и особенностей конденсатов N-белка и РНК SARS-CoV-2 создал предпосылки для подавления вирусной инфекции с помощью модуляторов LLPS. Стимулом к изучению конденсатов послужили данные об их вероятном участии в нескольких этапах цикла размножения вируса SARS-CoV-2, включая транскрипцию, репликацию и сборку вирусной частицы. Важным аргументом в пользу терапевтической значимости конденсатов стали свидетельства их способности подавлять защитные функции клетки-хозяина за счет блокирования MAVS-опосредованной передачи сигнала и формирования стресс-гранул.

В настоящее время активно ведется разработка модуляторов вирусных конденсатов, и наиболее перспективным направлением представляется рациональный дизайн модуляторов с учетом горячих точек транзитных контактов в конденсатах и специфических взаимодействий N-белок–РНК. Прояснение особенностей пространственной организации N-белка и РНК SARS-CoV-2 способствовало первым успехам в этом направлении.

Хотя сравнительная значимость отдельных элементов первичной и вторичной структуры N-белка и РНК для устойчивости конденсатов остается спорным вопросом и может определяться внешними условиями, все ключевые типы контактов уже описаны. Это открывает возможности создания модуляторов LLPS, избирательно действующих на вирусные конденсаты.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации № МД-5000.2022.3, а также Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1049).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aleem A., Akbar Samad A.B., Slenker A.K. // Emerging Variants of SARS-CoV-2 and Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19). In: StatPearls.

- Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34033342/>
2. Huang Y., Yang C., Xu X., Xu W., Liu S. // *Acta Pharmacol. Sin.* 2020. V. 41. P. 1141–1149. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
 3. Ullrich S., Nitsche C. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2020. V. 30. P. 127377. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127377>
 4. Uengwetwanit T., Chutiwitoonchai N., Wichapong K., Karoonuthaisiri N. // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2022. V. 20. P. 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.02.001>
 5. Bai Z., Cao Y., Liu W., Li J. // *Viruses.* 2022. V. 13. P. 1115. <https://doi.org/10.3390/v13061115>
 6. Yao H., Song Y., Chen Y., Wu N., Xu J., Sun C., Zhang J., Weng T., Zhang Z., Wu Z., Cheng L., Shi D., Lu X., Lei J., Crispin M., Shi Y., Li L., Li S. // *Cell.* 2020. V. 183. P. 730–738.E13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.018>
 7. Lu S., Ye Q., Singh D., Cao Y., Diedrich J.K., Yates III J.R., Villa E., Cleveland D.W., Corbett K.D. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 502. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20768-y>
 8. Cubuk J., Alston J.J., Incicco J.J., Singh S., Stuchell-Breton M.D., Ward M.D., Zimmerman M.I., Vithani N., Griffith D., Wagoner J.A., Bowman G.R., Hall K.B., Soranno A., Holehouse A.S. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 1936. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21953-3>
 9. Wang B., Zhang L., Dai T., Qin Z., Lu H., Zhang L., Zhou F. // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021. V. 6. P. 290. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00678-1>
 10. Li H., Ernst C., Kolonko-Adamska M., Man J., Parissi V., Wai-Lung Ng B. // *Trends Microbiol.* 2022. V. 30. P. 1217–1231. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.06.005>
 11. Bäuerlein F.J.B., Fernández-Busnadiego R., Baumeister W. // *Trends Cell. Biol.* 2020. V. 30. P. 951–966. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.08.007>
 12. Savastano A., Ibáñez de Opakua A., Rankovic M., Zweckstetter M. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 6041. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19843-1>
 13. Cascarina S.M., Ross E.D. // *FASEB J.* 2020. V. 34. P. 9832–9842. <https://doi.org/10.1096/fj.202001351>
 14. Cascarina S.M., Ross E.D. // *J. Biol. Chem.* 2022. V. 298. P. 101677. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101677>
 15. Dang M., Song J. // *Biophys. Rev.* 2022. V. 14. P. 709–715. <https://doi.org/10.1007/s12551-022-00957-3>
 16. Alberti S., Gladfelter A., Mittag T. // *Cell.* 2019. V. 176. P. 419–434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.035>
 17. Abyzov A., Blackledge M., Zweckstetter M. // *Chem. Rev.* 2022. V. 122. P. 6719–6748. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00774>
 18. Titus A.R., Ferreira L.A., Belgovskiy A.I., Kooijman E.E., Mann E.K., Mann J.A., Meyer W.V., Smart A.E., Uversky V.N., Zaslavsky B.Y. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2020. V. 22. P. 4574–4580. <https://doi.org/10.1039/C9CP05810A>
 19. Jo Y., Jang J., Song D., Park H., Jung Y. // *Chem. Sci.* 2022. V. 13. P. 522–530. <https://doi.org/10.1039/D1SC05672G>
 20. O'Flynn B.G., Mittag T. // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2021. V. 69. P. 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.12.012>
 21. Brocca S., Grandori R., Longhi S., Uversky V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 9045. <https://doi.org/10.3390/ijms21239045>
 22. Zhou R., Zeng R., von Brunn A., Lei J. // *Mol. Biomed.* 2020. V. 1. P. 2. <https://doi.org/10.1186/s43556-020-00001-4>
 23. Wang S., Dai T., Qin Z., Pan T., Chu F., Lou L., Zhang L., Yang B., Huang H., Lu H., Zhou F. // *Nat. Cell. Biol.* 2021. V. 23. P. 718–732. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00710-0>
 24. Roden C.A., Dai Y., Giannetti C.A., Seim I., Lee M., Sealfon R., McLaughlin G.A., Boerneke M.A., Iserman C., Wey S.A., Ekena J.L., Troyanskaya O.G., Weeks K.M., You L., Chilkoti A., Gladfelter A.S. // *Nucleic Acids Res.* 2022. V. 50. P. 8168–8192. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac596>
 25. Iserman C., Roden C.A., Boerneke M.A., Sealfon R.S.G., McLaughlin G.A., Jungreis I., Fritch E.J., Hou Y.J., Ekena J., Weidmann C.A., Theesfeld C.L., Kellis M., Troyanskaya O.G., Baric R.S., Sheahan T.P., Weeks K.M., Gladfelter A.S. // *Mol. Cell.* 2020. V. 80. P. 1078–1091.E6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.11.041>
 26. Riback J.A., Zhu L., Ferrolino M.C., Tolbert M., Mirtre D.M., Sanders D.W., Wei M.-T., Kriwacki R.W., Brangwynne C.P. // *Nature.* 2020. V. 581. P. 209–214. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2256-2>
 27. Weidmann C.A., Mustoe A.M., Jariwala P.B., Calabrese J.M., Weeks K.M. // *Nat. Biotechnol.* 2021. V. 39. P. 347–356. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0709-7>
 28. Zachrdla M., Savastano A., Ibáñez de Opakua A., Cima-Omori M.S., Zweckstetter M. // *Protein Sci.* 2022. V. 31. P. e4409. <https://doi.org/10.1002/pro.4409>
 29. Banani S.F., Rice A.M., Peeples W.B., Lin Y., Jain S., Parker R., Rosen M.K. // *Cell.* 2016. V. 166. P. 651–663. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.010>
 30. Choi J.-M., Holehouse A.S., Pappu R.V. // *Annu. Rev. Biophys.* 2020. V. 49. P. 107–133. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-121219-081629>
 31. Lin Y.-H., Brady J.P., Chan H.S., Ghosh K. // *J. Chem. Phys.* 2020. V. 152. P. 045102. <https://doi.org/10.1063/1.5139661>
 32. Supekar N.T., Shajahan A., Gleinich A.S., Rouhani D.S., Heiss C., Chapla D.G., Moremen K.W., Azadi P. // *Glycobiology.* 2021. V. 31. P. 1080–1092. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwab044>
 33. Wu J., Zhong Y., Liu X., Lu X., Zeng W., Wu C., Xing F., Cao L., Zheng F., Hou P., Peng H., Li C., Guo D. // *J. Mol. Cell. Biol.* 2022. V. 14. P. mjac003. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjac003>
 34. Wang J., Choi J.-M., Holehouse A.S., Lee H.O., Zhang X., Jahnel M., Maharana S., Lemaitre R., Pozniakovsky A.,

- Drechsel D., Poser I., Pappu R.V., Alberti S., Hyman A.A.* // Cell. 2018. V. 174. P. 688–699. E16.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.006>
35. *Vernon R.M., Chong P.A., Tsang B., Kim T.H., Bah A., Farber P., Lin H., Forman-Kay J.D.* // eLife. 2018. V. 7. P. e31486.
<https://doi.org/10.7554/eLife.31486>
36. *Caruso I.P., dos Santos Almeida V., do Amaral M.J., de Andrade G.C., de Araújo G.R., de Araújo T.S., de Azevedo J.M., Barbosa G.M., Bartkevihi L., Bezerra P.R., dos Santos Cabral K.M., de Lourenço I.O., Malizia-Motta C.L.F., de Luna Marques A., Mebus-Antunes N.C., Neves-Martins T.C., de Sá J.M., Sanches K., Santana-Silva M.C., Vasconcelos A.A., da Silva Almeida M., de Amorim G.C., Anobom C.D., da Poian A.T., Gomes-Neto F., Pinheiro A.S., Almeida F.C.L.* // Int. J. Biol. Macromol. 2022. V. 203. P. 466–480.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.121>
37. *Zhao H., Nguyen A., Wu D., Li Y., Hassan S.A., Chen J., Shroff H., Piszczek G., Schuck P.* // PNAS Nexus. 2022. V. 1. P. pgac049.
<https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgac049>
38. *Bogunia M., Makowski M.* // J. Phys. Chem. B. 2020. V. 124. P. 10326–10336.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c06399>
39. *Gao T., Gao Y., Liu X., Nie Z., Sun H., Lin K., Peng H., Wang S.* // BMC Microbiol. 2021. V. 21. P. 58.
<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02107-3>
40. *Dang M., Li Y., Song J.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2021. V. 541. P. 50–55.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.01.018>
41. *Kim D., Lee J.-Y., Yang J.-S., Kim J.W., Kim V.N., Chang H.* // Cell. 2020. V. 181. P. 914–921. E10.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>
42. *Malone B., Urakova N., Snijder E.J., Campbell E.A.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2022. V. 23. P. 21–39.
<https://doi.org/10.1038/s41580-021-00432-z>
43. *Ziv O., Price J., Shalamova L., Kamenova T., Goodfellow I., Weber F., Miska E.A.* // Mol. Cell. 2022. V. 80. P. 1067–1077. E5.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.11.004>
44. *Klein S., Cortese M., Winter S.L., Wachsmuth-Melm M., Neufeldt C.J., Cerikan B., Stanifer M.L., Boulant S., Bartenschlager R., Chlanda P.* // Nat. Commun. 2020. V. 11. P. 5885.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-19619-7>
45. *Zhang Z., Nomura N., Muramoto Y., Ekimoto T., Uemura T., Liu K., Yui M., Kono N., Aoki J., Ikeguchi M., Noda T., Iwata S., Ohto U., Shimizu T.* // Nat. Commun. 2022. V. 13. P. 4399.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-32019-3>
46. *Perdikari T.M., Murthy A.C., Ryan V.H., Watters S., Naik M.T., Fawzi N.L.* // EMBO J. 2020. V. 39. P. e106478.
<https://doi.org/10.15252/embj.2020106478>
47. *Luo L., Li Z., Zhao T., Ju X., Ma P., Jin B., Zhou Y., He S., Huang J., Xu X., Zou Y., Li P., Liang A., Liu J., Chi T., Huang X., Ding Q., Jin Z., Huang C., Zhang Y.* // Sci. Bull. (Beijing). 2021. V. 66. P. 1194–1204.
<https://doi.org/10.1016/j.scib.2021.01.013>
48. *Wang W., Chen J., Yu X., Lan H.Y.* // Int. J. Biol. Sci. 2022. V. 18. P. 4704–4713.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.72663>
49. *Oh S.J., Shin O.S.* // Cells. 2021. V. 10. P. 530.
<https://doi.org/10.3390/cells10030530>
50. *Wu Y., Ma L., Cai S., Zhuang Z., Zhao Z., Jin S., Xie W., Zhou L., Zhang L., Zhao J., Cui J.* // Signal Transduct. Target. Ther. 2021. V. 6. P. 167.
<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00575-7>
51. *Tay M.Z., Poh C.M., Rénia L., MacAry P.A., Ng L.F.P.* // Nat. Rev. Immunol. 2020. V. 20. P. 363–374.
<https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
52. *Dang M., Song J.* // Protein Sci. 2022. V. 31. P. 345–356.
<https://doi.org/10.1002/pro.4221>
53. *Patel A., Malinowska L., Saha S., Wang J., Alberti S., Krishnan Y., Hyman A.A.* // Science. 2017. V. 356. P. 753–756.
<https://doi.org/10.1126/science.aaf6846>
54. *Song J.* // Protein Sci. 2021. V. 30. P. 1277–1293.
<https://doi.org/10.1002/pro.4079>
55. *Kang J., Lim L., Lu Y., Song J.* // PLoS Biol. 2019. V. 17. P. 1–33.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000327>
56. *Dinesh D.C., Chalupska D., Silhan J., Koutna E., Nencika R., Veverka V., Boura E.* // PLoS Pathog. 2020. V. 16. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009100>
57. *Zhao D., Xu W., Zhang X., Wang X., Ge Y., Yuan E., Xiong Y., Wu S., Li S., Wu N., Tian T., Feng X., Shu H., Lang P., Li J., Zhu F., Shen X., Li H., Li P., Zeng J.* // Protein Cell. 2021. V. 12. P. 734–740.
<https://doi.org/10.1007/s13238-021-00832-z>
58. *Zhao M., Yu Y., Sun L.-M., Xing J.-Q., Li T., Zhu Y., Wang M., Yu Y., Xue W., Xia T., Cai H., Han Q.-Y., Yin X., Li W.-H., Li A.-L., Cui J., Yuan Z., Zhang R., Zhou T., Zhang X.-M., Li T.* // Nat. Commun. 2021. V. 12. P. 2114.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22297-8>
59. *Gorąca A., Huk-Kolega H., Piechota A., Kleniewska P., Ciejk E., Skibska B.* // Pharmacol. Rep. 2011. V. 63. P. 849–858.
[https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(11\)70600-4](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(11)70600-4)
60. *Gordon D.E., Jang G.M., Bouhaddou M., Xu J., Obernier K., White K.M., O'Meara M.J., Rezelj V.V., Guo J.Z., Swaney D.L., Tummino T.A., Hüttenhain R., Kaake R.M., Richards A.L., Tutuncuoglu B., Foussard H., Batra J., Haas K., Modak M., Kim M., Haas P., Polacco B.J., Braberg H., Fabius J.M., Eckhardt M., Soucraey M., Bennett M.J., Cakir M., McGregor M.J., Li Q., Meyer B., Roesch F., Vallet T., Mac Kain A., Miorin L., Moreno E., Naing Z.Z.C., Zhou Y., Peng S., Shi Y., Zhang Z., Shen W., Kirby I.T., Melnyk J.E., Chiorba J.S., Lou K., Dai S.A., Barrio-Hernandez I., Memon D., Hernandez-Armenta C., Lyu J., Mathy C.J.P., Perica T., Pilla K.B., Ganesan S.J., Saltzberg D.J., Rakesh R., Liu X., Rosenthal S.B., Calviello L., Venkataramanan S., Liboy-Lugo J., Lin Y., Huang X.P., Liu Y., Wankowicz S.A., Bohn M., Safari M., Ugur F.S., Koh C., Savar N.S., Tran Q.D., Shengjuler D., Fletcher S.J., O'Neal M.C., Cai Y., Chang J.C.J., Broadhurst D.J., Klippsten S., Sharp P.P., Wenzell N.A., Ku-zuoglu-Ozturk D., Wang H.Y., Trenker R., Young J.M., Cavero D.A., Hiatt J., Roth T.L., Rathore U., Subramani-*

- an A., Noack J., Hubert M., Stroud R.M., Frankel A.D., Rosenberg O.S., Verba K.A., Agard D.A., Ott M., Emerman M., Jura N., von Zastrow M., Verdin E., Ashworth A., Schwartz O., d'Enfert C., Mukherjee S., Jacobson M., Malik H.S., Fujimori D.G., Ideker T., Craik C.S., Floor S.N., Fraser J.S., Gross J.D., Sali A., Roth B.L., Ruggero D., Taunton J., Kortemme T., Beltrao P., Vignuzzi M., García-Sastre A., Shokat K.M., Shoichet B.K., Krogan N.J. // *Nature*. 2020. V. 583. P. 459–468. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9>
61. Wheeler R.J., Lee H.O., Poser I., Pal A., Doeelman T., Kishigami S., Kour S., Anderson E.N., Marrone L., Murthy A.C., Jahnke M., Zhang X., Boczek E., Fritsch A., Fawzi N.L., Sternecker J., Pandey U., David D.C., Davis B.G., Baldwin A.J., Hermann A., Bickle M., Alberti S., Hyman A.A. // *bioRxiv*. 2019. <https://doi.org/10.1101/721001>
62. Itoh Y., Iida S., Tamura S., Nagashima R., Shiraki K., Goto T., Hibino K., Ide S., Maeshima K. // *Life Sci. Alliance*. 2021. V. 4. P. e202001005. <https://doi.org/10.26508/lsa.202001005>
63. Blount K.F., Zhao F., Hermann T., Tor Y. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 9818–9829. <https://doi.org/10.1021/ja050918w>
64. Svetlova J., Knizhnik E., Manuvera V., Severov V., Shirokov D., Gafskaya E., Bobrovsky P., Matyugina E., Khandazhinskaya A., Kozlovskaya L., Miropolskaya N., Aralov A., Khodarovich Y., Tsvetkov V., Kochetkov S., Lazarev V., Varizhuk A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 15281. <https://doi.org/10.3390/ijms232315281>

Condensates of SARS-CoV-2 Nucleoprotein on Viral RNA and Their Small Molecule Modulators

J. I. Svetlova*, Iu. I. Pavlova*, **, A. V. Aralov***, and A. M. Varizhuk*, **, #

#Phone: +7 (916) 502-78-32; e-mail: annavarizhuk@rcpcm.org

*Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, ul. Malaya Pirogovskaya 1a, Moscow, 119435 Russia

**Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskii per. 9, Dolgoprudny, 141701 Russia

***Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

Several types of biopolymers undergo liquid-liquid phase separation (form condensates) in aqueous solutions, and this phenomenon has been characterized in detail for proteins with intrinsically disordered regions. One example of such proteins is the nucleocapsid (N) protein of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. In this review, we analyzed available data on N-protein separation in the presence of viral RNA. Particular attention was paid to transient contacts within the condensates and the N-protein/RNA fragments that form these contacts. We also discussed the presumed role of the condensates in the SARS-CoV-2 life cycle and summarized their influence on the host protective machinery. Finally, we commented on the possibility of regulating the viral condensates using synthetic or native small molecules (phase separation modulators), which can provide a new option in the design of antiviral agents.

Keywords: phase separation, condensates, N-protein, SARS-CoV-2, viral RNA, small molecule antivirals