

УДК 577.2

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПИСАНИЕ ДЕГРАДАЦИИ N-БЕЛКА ВИРУСА SARS-CoV-2 В КЛЕТКАХ, СТАБИЛЬНО ЕГО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ, ПОД ДЕЙСТВИЕМ НОВЫХ МОДУЛЬНЫХ НАНОТРАНСПОРТЕРОВ

© 2024 г. Ю. В. Храпцов¹, А. В. Уласов¹, Т. Н. Лупанова¹,
академик РАН Г. П. Георгиев¹, член-корреспондент РАН А. С. Соболев^{1,2,*}

Поступило 29.11.2023 г.

После доработки 10.12.2023 г.

Принято к публикации 11.12.2023 г.

Были получены две линии эукариотических клеток A549 и A431 со стабильной экспрессией нуклеокапсидного белка (N-белка) вируса SARS-CoV-2, слитого с красным флуоресцентным белком mRuby3. С помощью микроскопии для данных клеток были определены объемы цитоплазмы и ядра. Используя методы количественного иммуноблоттинга, были оценены концентрации слитого белка N-mRuby3 в их цитоплазме. Они составили 19 и 9 мкМ для клеток A549 и A431 соответственно. Используя эти концентрации, по уменьшению флуоресценции клеток была оценена начальная скорость деградации N-белка в изучаемых клетках. В клетках A549 и A431 она оказалась одинаковой и равной 84 нМ/ч. Подход по количественному описанию процесса деградации можно применить для анализа эффективности широкого класса противовирусных препаратов, вызывающих деградацию вирусных белков.

Ключевые слова: нуклеокапсидный белок, SARS-CoV-2, иммуноблоттинг, внутриклеточные концентрации, направленная деградация белков.

DOI: 10.31857/S2686738924020053, **EDN:** WFRQEA

При разработке новых противовирусных препаратов, в частности против коронавируса SARS-CoV-2, часто бывает необходимо получение модельных клеточных систем для изучения данного вируса. Для большинства вирусов существуют ключевой белок или белки, без которых невозможно образование вирусного капсида. Примером одного из таких белков может служить нуклеокапсидный белок или N-белок вируса SARS-CoV-2 [1–3]. Так, обычное взаимодействие с этим белком антителоподобных молекул может привести к нарушению образования вирусного капсида, т.е. препятствовать распространению вирусной инфекции [4]. Взаимодействие с данным белком различных препаратов удобнее всего исследовать на клетках, с временной или стабильной экспрессией данного белка. В данной работе в качестве модели были получены две линии клеток, со стабильной экспрессией N-белка вируса SARS-CoV-2. Многие системы доставки ши-

роко используют различные антителоподобные молекулы [5]. Так, ранее мы показали, что модульные нанотранспортеры (МНТ), содержащие NC2 монободии [6] к N-белку вируса SARS-CoV-2, способны связываться с этим белком как в растворе, так и в клетке [7]. Если включить в эти МНТ аминокислотную последовательность DPETGEYL, способную с высоким сродством связываться с убиквитинлигазой Kear1 [8], то одновременное связывание МНТ с Kear1 и N-белком предположительно должно привести к деградации N-белка как следствие его убиквитинирования [9]. Настоящая работа посвящена количественному описанию процесса деградации N-белка в клетках под влиянием МНТ, для чего прежде всего была оценена внутриклеточная концентрация N-белка в полученных линиях клеток.

Клетки A549 и A431 со стабильной экспрессией N-белка, слитого с флуоресцентным белком mRuby3 (N-mRuby3), получали путем лентивирусной трансфекции клеток, используя плазмиды pMD2.G, psPAX2 и pHAGE N-mRuby3 (из SARS-CoV-2) IRES puro (Addgene). Рекombинантные лентивирусные частицы получали контраффецией клеток HEK293T в 25 см² флаконе с помощью 2.3 мкг pMD2.G, 4.3 мкг psPAX2 и 10.2 мкг pHAGE N-mRuby3 (from SARS-CoV-2) IRES puro,

¹Институт биологии гена Российской Академии наук, Москва

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

*E-mail: alsobolev@yandex.ru

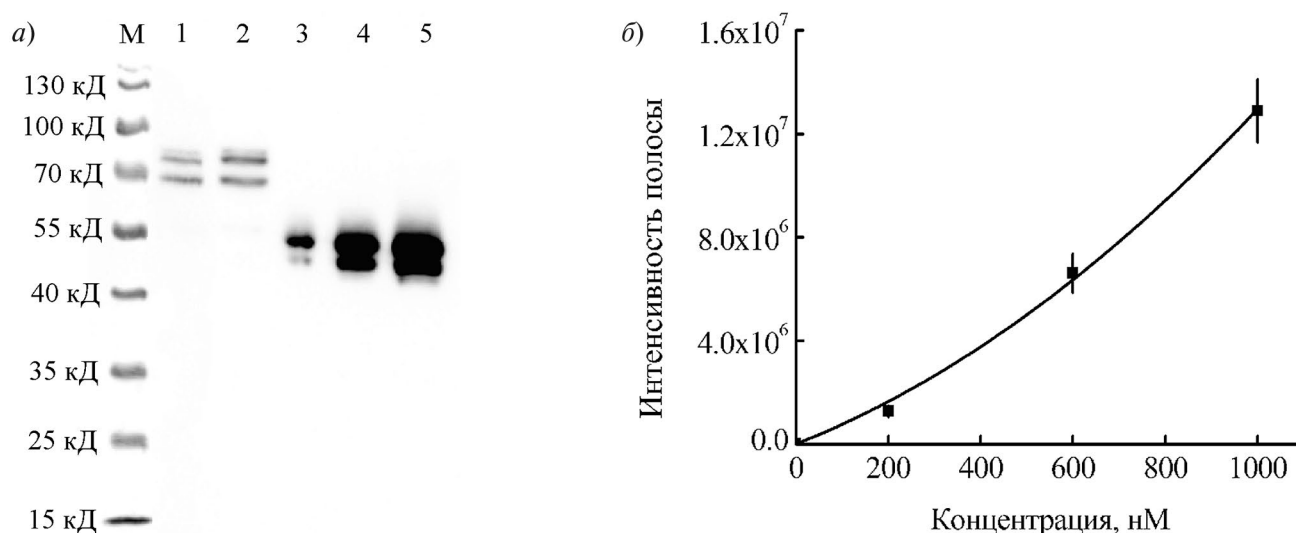


Рис. 1. Вестерн-блот с антителами на N-белок вируса SARS-CoV-2 для лизатов трансфицированных N-mRuby3 клеток A549 (1) и клеток A431 (2) и рекомбинантного N-белка концентраций: 200 нМ (3), 600 нМ (4) и 1000 нМ (5). М – белковые стандарты (а); калибровочная кривая зависимости суммарной интенсивности полосы на вестерн-блоте от концентрации N-белка (б).

используя Calcium Phosphate Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific). Суспензию вируса собирали спустя 72 ч после трансфекции. Лентивирус сконцентрировали, используя Lenti-X concentrator (Takara Bio), согласно прилагаемому фирмой протоколу. Клетки аденокарциномы легких человека A549 и эпидермоидной карциномы человека A431 были рассеяны в 24-луночные плашки ($1 \cdot 10^4$ клеток на лунку) за один день перед вирусной инфекцией. Для осуществления лентивирусной трансфекции лентивирусные частицы добавлялись в культуральную среду, содержащую 10 мкг/мл polybrene (Sigma-Aldrich). Стабильные клеточные линии отбирали на среде, содержащей 1 мкг/мл пиромидина (Acros Organics). Наличие трансфекции клеток слитым белком N-mRuby3 определяли как визуально, с помощью конфокальной микроскопии в канале mRuby3, используя мультифотонный сканирующий микроскоп LSM 510 META NLO (Carl Zeiss, Германия) и объектив с увеличением 20 $\times$ (NA 0.4), так и с помощью вестерн-блота с антителами на N-белок (PA5-116894, Invitrogen) (рис. 1а).

Экспрессию МНТ проводили в штамме *E. coli* Ros(DE3)pLysS. Автоиндукцию экспрессии МНТ проводили инкубацией в течение 48 ч при 18 °С. МНТ выделяли из растворимой фракции [10], а затем очищали аффинной хроматографией на носителе HisTrap FF (Cytiva). Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле продемонстрировал достаточную степень чистоты полученного МНТ (86.6%).

В результате анализа, проведенного так же, как это описано в [11], 69–87 изображений откреплен-

ных от подложки клеток были определены объемы клеток и их ядер; они дали следующие значения: объемы клеток – 1814 ± 87 и 1450 ± 37 мкм³, объемы ядер – 374 ± 28 и 160 ± 7 мкм³ для клеток A549 и A431 соответственно. Слитый белок N-mRuby3 находился преимущественно в цитоплазме клеток A549 и A431. Объемы цитоплазмы клеток составляли 1439 ± 91 и 1289 ± 38 мкм³ для клеток A549 и A431 соответственно. Эти размеры использовали в дальнейшем для расчета концентрации N-mRuby3 в цитоплазме.

Полученные клетки A549 и A431 собирали с подложки с помощью обработки трипсином и последующего центрифугирования. Затем клетки суспендировали в 100 мкл фосфатного буфера (pH 8.0), содержащего cOmplete (EDTA free protease inhibitor cocktail, 11873580001, www.sigmaaldrich.com) и 10 mM EDTA. Количество клеток в изучаемых образцах измеряли на проточном цитофлуориметре MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec GmbH, Франция). Клетки были лизированы тремя циклами замораживания в жидком азоте-оттаивания при 37 °С. При лизисе клеток N-белок выходит из них и распределяется во всем объеме образца. Отношение объема образца к суммарному объему цитоплазмы всех клеток, которые были в образце до лизиса, т.е. так называемый коэффициент разбавления, было 126–280 и 197–371 для клеток A549 и A431, соответственно (по 3–4 образца с разной концентрацией клеток).

Измерение концентрации белка N-mRuby3 в лизатах клеток A549 и A431 проводили, с помощью калибровочных растворов N-белка известных кон-

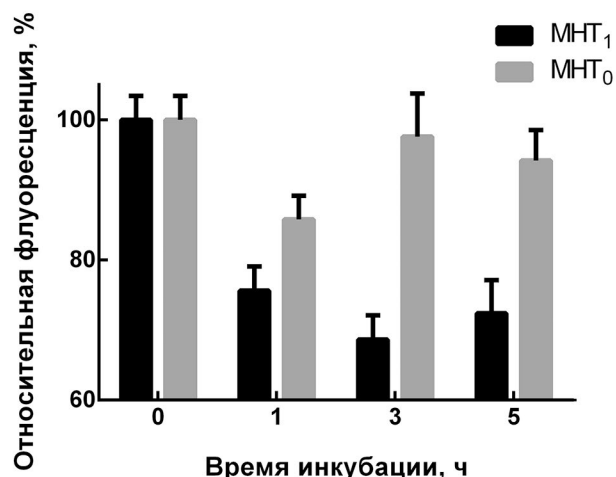


Рис. 2. Зависимость между концентрацией N-белка, подвергающегося деградации, и временем инкубации с 500 нМ МНТ клеток A431 и A549, стабильно экспрессирующих N-белок, слитый с mRuby3. Указаны средние значения с соответствующей среднеквадратичной ошибкой ($n = 8-17$).

центраций. Используемый для этих целей N-белок получали и очищали, как описано в [7]; чистота N-белка составила 98.9%. Полученные лизаты клеток A549 и A431 наносили на полиакриламидный гель вместе с N-белком известной концентрации. После электрофореза проводили иммуноблоттинг: образцы переносили на 0.22-мкм нитроцеллюлозную мембрану и прокрашивали антителами на N-белок и вторичными антителами goat-antirabbit+Peroxidase (G21234, ThermoFisher Scientific) (см. рис. 1a). По известной концентрации N-белка строили калибровочные зависимости (см. рис. 1b), а по ним рассчитывали концентрацию N-белка в изучаемых образцах. Зная коэффициент разбавления белка N-mRuby3 при лизисе клеток и концентрацию N-белка в лизатах, рассчитали концентрацию N-mRuby3 в цитоплазме клеток: 19.0 ± 1.3 и 9.0 ± 1.8 мкМ для клеток A549 и A431 соответственно.

Различия в концентрациях N-mRuby3 в клетках A549 и A431 хорошо заметны при флуоресцентной их микроскопии: интенсивность флуоресценции клеток A549 заметно выше, чем клеток A431. Если рассчитать среднюю флуоресценцию mRuby3 в области клеток и вычесть из нее среднюю флуоресценцию шумового сигнала (для мест, где нет клеток), то отношение флуоресценции mRuby3 для клеток A549 к флуоресценции клеток A431 составит 1.6 ± 0.2 . Это близко к определенному нами отношению концентраций N-mRuby3 для этих двух линий клеток (2.1 ± 0.4). Таким образом, различие флуоресценции клеток A549 и A431 отражает различие концентраций белка N-mRuby3 в этих клетках.

За процессом деградации слитого белка N-mRuby3 в клетках A431 и A549 наблюдали с использова-

Таблица 1. Относительная флуоресценция клеток A431 и A549 (флуоресценция клеток, к которым не добавлялся МНТ, была принята за 100%) при их инкубации различные времена с 500 нМ МНТ. Указаны средние значения с соответствующей среднеквадратичной ошибкой ($n = 8-17$).

Время инкубации, ч	A431	A549
0	100.00 ± 0.48	100.00 ± 0.77
15	86.04 ± 3.31	94.89 ± 2.44
24	74.63 ± 3.41	89.20 ± 1.36
39	60.55 ± 1.59	85.69 ± 1.30
48	63.35 ± 1.94	88.43 ± 1.11

нием проточной цитофлуориметрии на приборе CytoFLEX S (Beckman Coulter) MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, Франция) в канале флуоресценции 564–606 нм, флуоресценцию возбуждали лазером с длиной волны 561 нм. Клетки с временной экспрессией белка N-mRuby3 инкубировали с 500 нМ МНТ в течение заданного времени, отмывали, снимали с подложки и изучали на проточном цитофлуориметре. В Таблице показаны значения флуоресценции клеток A431 и A549 при различных временах инкубации с МНТ. Считая, что падение флуоресценции обусловлено деградацией белка N-mRuby3, и зная концентрации N-белка в изучаемых линиях клеток, можно рассчитать зависимость концентрации N-белка, подвергающегося деградации, от времени инкубации с МНТ (рис. 2). Оказалось, что для клеток A431 и A549 эти зависимости дают одну и ту же начальную скорость деградации N-белка, равную 84 ± 7 нМ/ч (рис. 2). Следует отметить, что реальная скорость деградации N-белка может быть больше, так как флуоресцентный белок mRuby3, как и другие флуоресцентные белки, может деградировать не полностью [12], а значит, даже после деградации возможна остаточная флуоресценция mRuby3.

Таким образом, в предложенной работе были получены линии клеток A431 и A549 со стабильной экспрессией N-белка, слитого с флуоресцентным белком mRuby3. МНТ, добавленный к этим клеткам, вызывал деградацию N-белка. Была определена начальная скорость деградации N-белка в клетках, и показано, что она одинакова для клеток A431 и A549. Предложенные МНТ могут стать основой будущего противовирусного препарата, а сам подход к количественному анализу процесса деградации можно применить для анализа эффективности широкого класса препаратов, направленных на подавление активности различных вирусов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-14-00130). Авторы выражают благодарность Бунину Е. С. за помощь в выполнении вестерн-блоттинга и Сабурову А. С.

за помощь в выделении белков. Эксперименты были выполнены с использованием оборудования Центра коллективного пользования ИБГ РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Surjit M., Lal S.K. // *Infect Genet Evol.* 2008. V. 8. P. 397–405.
2. Wu C., Zheng M. // *Preprints.* 2020. 2020020247.
3. Prajapat M., Sarma P., Shekhar N., et al. // *Indian J Pharmacol.* 2020. V. 52. P. 56.
4. Liao H.-I., Olson C.A., Hwang S., et al. // *J Biol Chem.* 2009. V. 284. P. 17512–17520.
5. Shipunova V.O., Deyev S.M. // *Acta Naturae.* 2022. V. 14. № 1(52). P. 54–72.
6. Du Y., Zhang T., Meng X., et al. // *Preprints.* 2020. DOI:10.21203/rs.3.rs-25828/v1.
7. Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Lupanova T.N., et al. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2023. V. 510. P. 87–90.
8. Lu M., Liu T., Jiao Q., et al. // *Eur J Med Chem.* 2018. V. 146. P. 251–259.
9. Fulcher L.J., Hutchinson L.D., Macartney T.J. et al. // *Open biology.* 2017. V. 7. 170066.
10. Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Khramtsov Y.V., et al. // *Drug Des Devel Ther.* 2017. V. 11. P. 1315–1334.
11. Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., et al. // *Pharmaceutics.* 2023. V. 15, 324.
12. Klionsky D.J., Abdel-Aziz A.K., Abdelfatah S., et al. // *Autophagy.* 2021. V. 17. № 1. P. 1–382.

QUANTITATIVE DESCRIPTION OF THE N-PROTEIN OF THE SARS-COV-2 VIRUS DEGRADATION IN CELLS STABLY EXPRESSING IT UNDER THE INFLUENCE OF NEW MODULAR NANOTRANSPORTERS.

Y. V. Khramtsov^a, A. V. Ulasova^a, T. N. Lupanova^a, Academician of the RAS G. P. Georgiev^a,
Corresponding Member of the RAS A. S. Sobolev^{a, b, #}

^a*Institute of Gene Biology, RAS, Moscow, Russian Federation*

^b*Lomonosov Moscow State University Moscow, Russian Federation*

[#]*E-mail: alsobolev@yandex.ru*

Two eukaryotic cell lines, A549 and A431, were obtained with stable expression of the nucleocapsid protein (N-protein) of the SARS-CoV-2 virus fused with the red fluorescent protein mRuby3. Using microscopy, the volumes of the cytoplasm and nucleus were determined for these cells. Using quantitative immunoblotting techniques, the concentrations of the N-mRuby3 fusion protein in their cytoplasm were assessed. They were 19 and 9 μ M for A549 and A431 cells, respectively. Using these concentrations, the initial rate of N-protein degradation in the studied cells was estimated from the decrease in cell fluorescence. In A549 and A431 cells it turned out to be the same and equal to 84 nM per hour. The approach of quantitatively describing the degradation process can be applied to analyze the effectiveness of a wide class of antiviral drugs that cause degradation of viral proteins.

Keywords: nucleocapsid protein, SARS-CoV-2, immunoblotting, cell sizes, intracellular concentrations, targeted protein degradation.