

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия
человека

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
(ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» РОСПОТРЕБНАДЗОРА)



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора, д-р биол. наук
Р.А. Максютов

« 12 » _____ 2022 г.

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

«СОЗДАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОДГОТОВКИ БИМОЛЕКУЛ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
СТРУКТУРЫ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ И ВИРУСНЫХ БЕЛКОВ НА ПРИМЕРЕ
ЛОКАЛИЗАЦИИ САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ ГЛИКАНОВ НА СПАЙК-БЕЛКЕ
КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНХРОТРОННОГО
ИЗЛУЧЕНИЯ (СИ)»

Влияние структурной биологии на все области биологической науки непрерывно расширяется. В процессе этого развития произошло увеличение как размера, так и сложности определяемых макромолекулярных структур, а также сложности проводимых экспериментов, что привело к тому, что структурная биология на основе синхротронного излучения расширила свою роль и теперь вносит значительный вклад в решение фундаментальных вопросов о том, как осуществляются жизненные процессы и в практическое применение лечения болезней на молекулярном уровне. Таким образом, не просто растёт число макромолекулярных кристаллических структур, но, что более важно, структурная биология оказывает все большее влияние на такие разнообразные области, как иммунология, нейробиология, клеточная биология, вирусология, физиология, молекулярная биология, медицина и биотехнология.

Эти достижения можно объяснить тремя ключевыми элементами в методологии:

1. Возможность экспрессировать широкий спектр белков в количествах, достаточных для структурных исследований.
2. Использование криокристаллографии для получения стабильных кристаллов.
3. Наличие технологических новшеств на установках синхротронного излучения, позволяющих проводить автоматизированное и высокоточное определение структуры.

На сегодняшний день более 85% известных белковых структур получены с помощью рентгеновской кристаллографии, причем более 80% из них с использованием синхротронного излучения [1]. С использованием замороженных кристаллов кристаллографические исследования крупных многокомпонентных комплексов стали почти рутинными. Некристаллографические синхротронные методы также предоставляют дополнительную информацию об исследуемых макромолекулах. Эти факторы привели к появлению в области структурной биологии многих проектов, имеющих большое биологическое значение. Синхротронные источники сделали возможной реализацию проектов, представляющих собой сложные биофизические исследования.

Исследования в области структурной биологии дают результаты с высокой значимостью и имеют прямое отношение к проблемам здоровья человека.

Одним из ключевых направлений развития структурных исследований является дизайн лекарств на основе структур биомолекул. Разработка новых медицинских препаратов, таких как ингибиторы ВИЧ-протеазы и ингибиторы нейраминидазы гриппа, является прямым следствием исследований в области структурной биологии. Ожидается, что эта тенденция сохранится и будет приобретать все большее значение в борьбе с множеством вновь появляющихся вирусных и микробных патогенов, представляющих опасность для человеческой популяции. Новые терапевтические средства также необходимы для борьбы с лекарственно-устойчивыми патогенами, такими как некоторые формы туберкулеза. Структурная биология также приобретает все большее значение в биотехнологии, например, при разработке ферментов для разложения загрязняющих веществ или в качестве термостабильных промышленных катализаторов [2]. Эти приложения биотехнологии могут иметь значительные экологические и экономические последствия.

Сегодня на современных синхротронных станциях времена полного сбора данных измеряются в секундах при скорости вращения кристалла, превышающей 90°с^{-1} , и частоте кадров дифракционного изображения, превышающей 100 Гц [3]. Полученные изображения контролируются на качество дифракции в режиме реального времени и передаются в автоматизированные конвейеры обработки для упрощения анализа данных. По мере развития технологий структурные исследования выходят за рамки решения отдельных статических структур. Последовательные серии структурных снимков применяются для получения подробной информации о положениях и движении атомов, которые определяют

различные аспекты динамического процесса. Многие белки сохраняют функциональную активность в кристаллическом состоянии, и макромолекулярная кристаллография предлагает возможности для их изучения в различных средах и при различных условиях.

Для наблюдения событий с характерным временем менее 10 мс требуются методы с высоким временным разрешением, которые иницируют и контролируют реакции в реальном времени. Таким образом, все большее влияние оказывают новые методы макромолекулярной кристаллографии и рентгеновские источники нового поколения, в частности, для изучения структур при физиологически значимых температурах. В то время как криоконсервация образцов была важным технологическим прорывом в макромолекулярной кристаллографии с синхротронным излучением, мультикристаллические стратегии представляют собой мощный альтернативный подход к преодолению ограничений радиационного повреждения. В рентгеновском лазере на свободных электронах короткий (5–50 фс) рентгеновский импульс создает неподвижную дифракционную картину до того, как внутри кристалла произойдут существенные радиационно-индуцированные атомные перестройки [4, 5, 6]. Эта технология помогла расширить структурную информацию, доступную из небольших чувствительных к излучению кристаллов при комнатной температуре, и обеспечить сверхбыстрые измерения с высоким временным разрешением. Однако, поскольку образец разрушается во время этого процесса, для получения полного набора данных должен быть экспонирован ряд кристаллов в процессе, называемом серийной кристаллографией [7]. Распределяя дозу рентгеновского излучения по множеству кристаллов, применение методов серийной кристаллографии на синхротроне позволяет проводить структурные исследования с более мелкими кристаллами и измерения необратимых реакций с разрешением во времени [8]. Когда кристаллы могут выдержать многократное воздействие, возможны методы быстрого последовательного вращения, в которых несколько моментов времени исследуются из каждого кристалла с использованием детектора с высокой частотой кадров. Полученные данные анализируются с помощью новых мощных алгоритмов, первоначально разработанных для экспериментов с рентгеновским лазером на свободных электронах. Кристаллография макромолекул с временным разрешением на синхротроне может обеспечить структуры с атомным разрешением с микросекундным временным разрешением с использованием монохроматических рентгеновских лучей или субнаносекундным разрешением с использованием режимов работы с PinkBeam-пучком [9, 10, 11, 12]. Кристаллографические исследования макромолекул с временным разрешением при комнатной температуре позволяют визуализировать функционально значимые водные сети и альтернативные конформации, нарушенные криоконсервацией. Конформационная гибкость, сохраняющаяся при комнатной температуре, обеспечивает больший доступ к карманам связывания лиганда, облегчая исследования взаимодействия. Структуры промежуточного состояния из измерений с временным разрешением могут предоставить электронные и пространственные характеристики, которые помогут в моделировании новых соединений.

Наибольший интерес структурно-функциональных исследований вирусных белков представляют оболочечные гликопротеины, которые формируют димеры или тримеры на вирусной оболочке и ответственны за связывание вируса с клеткой-мишенью и проникновение вируса в клетку. Из-за важной роли гликопротеинов вирусной оболочки в связывании клеточных рецепторов важно получить информацию об их структуре для понимания вирусной инфекции и разработки терапевтических и профилактических стратегий. Однако, критическим препятствием является неспособность получать для структурных исследований полноразмерные оболочечные гликопротеины в нативной конформации тримера. Для большинства вирусных гликопротеинов наиболее подробная структурная характеристика основана на рентгено-кристаллографическом анализе лишь фрагментов растворимых эктодоменов этих белков.

Ключевая роль в адгезии коронавирусов (CoV) к клеткам-хозяевам принадлежит шиповидному белку (S). Этот белок представляет собой гомотример, каждый мономер которого состоит из двух субъединицы, S1 и S2. Субъединица S2 закреплена в вирусной оболочке и отвечает за слияние вирусов с клеткой-хозяином [13, 14]. Эктодомен S1 состоит из четырех субдоменов (S1A – S1D). Каждый из этих субдоменов может связываться с рецептором, но пока не ясно действуют ли они совместно или по отдельности [15]. В случае коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) субдомен S1B отвечает за взаимодействие с дипептидилпептидазой 4 и имеет решающее значение для проникновения вируса в клетку-хозяина, в то время как лектиноподобная субстанция S1A субдомена связывает O-ацетилированный сиалогликан [16, 17]. S1B субдомен SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2, опознает ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) [18]. Специфичность других субдоменов еще не определена, хотя ACE2 не единственная возможная мишень S белки SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2, например, он также взаимодействует с гликопротеином CD147 [19, 20]. Белки S других коронавирусов человека, HKU1 и OC43, также как и у бычьего BCoV, имеют домен S1A, подобный лектину, который связывает 9-O-ацетилированную сиаловую кислоту; это взаимодействие низкоаффинное, но тем не менее способствует проникновению вируса к своей основной мишени [21]. Данные о сиалосвязывающей активности S-белка SARS-CoV-2 противоречивы: в исследовании [22] сообщается об отсутствии такого взаимодействия; однако другие исследования предполагают возможность связывание S-белка с ганглиозидами [23]. Следует отметить, что все поверхностные белки SARS-CoV-2 являются сиалилированными, особенно белок S с его 22 сайтами гликозилирования. Поскольку вирус не должен связываться сам с собой, его гликансвязывающий белок не может связывать обычную сиаловую кислоту (Sia), содержащую концевые мотивы, такие как Neu5Ac α 2'3Gal и Neu5Ac α 2'6Gal; хотя это не исключает его взаимодействие с O-ацетилированными сиалозидами, которые необычны для эпителиальных клеток хозяина, что происходит с S-белком MERS-CoV. Другими словами, если SARS CoV-2 связывает Sia-содержащие гликозиды, последние должны отличаться от обычных Neu5Ac α 2'3Gal и Neu5Ac α 2'6Gal мотивы. Было показано [24], что низкомолекулярные гепарин оказывает значительное противовоспалительное действие у больных COVID-19 в связи с выраженным снижением содержание провоспалительного цитокина IL-6. Также считалось, что гепарин может напрямую взаимодействовать с SARS-CoV-2. Гликозаминогликаны (ГАГ) могут действовать как адгезивные факторы на аденовирусы, вирусы герпеса, папилломавирусы, цитомегаловирус и др., причем это связывание эффективно ингибируется растворимой формой ГАГ [25]. Коронавирусы не исключение — NL63 и SARS-CoV-1 (в форме псевдовirusа) использует ГАГ для адгезия на клетке-хозяине вместе с рецептором ACE2 [26]. Тримерная форма белка S из пандемического SARS-CoV-2 связывается с полноразмерным гепарином с удивительно высоким сродством 40 пМ, что на несколько порядков лучше, чем для S белка MERS-CoV [27]. Наличие 2'О и 6'О сульфатов важно для связывания [28]. Учитывая все вышеизложенное, мы исследовали специфичность связывания гликанов и рекомбинантного S-белка SARS-CoV-2. Был сконструирован рекомбинантный тример гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2 и показана его способность связываться с гликанами семейства лактозаминов с аффинностью сравнимой с таковой для рецептора ACE2. Хотя мы ожидали увидеть способности белка S связывать такие углеводные рецепторы, как сульфатированные или необычные сиалированные гликаны млекопитающих (см. выше), мы обнаружили, что белок S связывается с высокоаффинным взаимодействием прежде всего с гликанами лактозаминового типа. [29].

Рентгеноструктурный анализ комплексов «тример S-белка-гликан» и локализация сайта связывания гликанов на тримере спайк-белка коронавируса позволит предложить возможную новую стратегию противовирусной терапии.

Для подготовки биомолекул для последующих структурных исследований с использованием синхротронного излучения необходимо решить следующие задачи:

оптимизация методов экспрессии рекомбинантных вирусных белков, их очистка и концентрирование при сохранении функциональных свойств, разработка и внедрение методов белковой кристаллизации.

Определение структуры биологических макромолекул с помощью рентгеноструктурного анализа включает ряд этапов: выбор молекулы-мишени; получение клеток-продуцентов, экспрессия молекул белка, очистка, концентрирование и кристаллизация продуктов экспрессии; рентгеноструктурные исследования, включая сбор данных рентгеновской дифракции и определение положения атомов. Первой и зачастую самой объемной задачей в этом процессе является этап экспрессии и очистки белка. Необходимо получить концентрированный раствор (обычно 5–15 мг/мл) белка высокой степени чистоты [30]. Однако даже при наличии чистого растворимого белка получение высококачественных кристаллов остается основной сложностью в определении структуры. До сих пор не существует каких-либо очевидных корреляций между условиями кристаллизации и структурой или семейством белков, а также не существует каких-либо установленных правил, которые гарантировали бы получение хороших кристаллов.

Наиболее широко используемый метод кристаллизации – диффузия пара. Белковый раствор представляет собой либо висящую, либо сидячую каплю, которая уравнивается резервуаром, содержащим кристаллизующие агенты в более высоких или более низких концентрациях, чем в капле. Это обеспечивает способ выборки пространства параметров кристаллизации, поскольку условия постоянно меняются по мере установления равновесия. Испытания обычно проводятся в 24-луночных планшетах, где каждая лунка заполнена 0,5–1 мл резервуарного раствора и закрыта силиконизированным стеклянным или пластиковым покровным стеклом. В микромасштабе стандартными являются 96- и 384-луночные планшеты в сочетании с роботизированной станцией дозирования.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. The Protein Data Bank [электронный ресурс]. URL: <https://www.rcsb.org/stats/>.
2. L. Merminga. Energy Recovery Linacs. Synchrotron Light Sources and Free-Electron Lasers / E. Jaeschke, S. Khan, J. Schneider, and J. Hastings // Springer, Cham. – 2016. – 1840 p.
3. Cohen, A.E. A new era of synchrotron-enabled macromolecular crystallography // *Nat Methods*. – 2021. – Vol. 18. P. 433–434.
4. Mora, E. de la, Coquelle, N., et al. Radiation damage and dose limits in serial synchrotron crystallography at cryo- and room temperatures // *Biophysics and Computational Biology*. – 2020. – Vol. 117 (8). P. 4142-4151.
5. Barends, T.R.M., Stauch, B., Cherezov, V. et al. Serial femtosecond crystallography // *Nat Rev Methods Primers*. – 2022. – Vol. 2. № 59.
6. Lan Zhu, Xiaoyu Chen, Enrique E. Abola, Liang Jing, Wei Liu. Serial Crystallography for Structure-Based Drug Discovery // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2020. – Vol. 41. Issue 11. P. 830-839.
7. Chapman, H., Fromme, P., Barty, A. et al. Femtosecond X-ray protein nanocrystallography // *Nature*. – 2011. – Vol. 470. P. 73–77.
8. Isabelle Martiel, Henrike M. Muller-Werkmeister, Aina E. Cohen. Strategies for sample delivery for femtosecond crystallography // *Acta Crystallographica Section D*. – 2019. – Vol. 75. P.160 -177.
9. Meents, A., Wiedorn, M.O., Srajer, V. et al. Pink-beam serial crystallography // *Nat Commun*. – 2017. - Vol. 8. №1281.
10. Kim, Y.; Nam, K.H. Pink-Beam Serial Synchrotron Crystallography at Pohang Light Source II // *Crystals*. – 2022. – Vol. 12. № 1637.

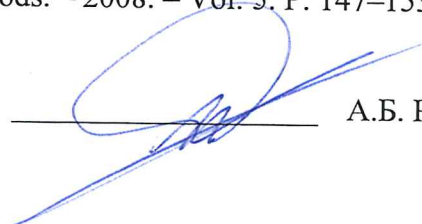
11. Nass, K., Bacellar, C., Cirelli, C., et al. Pink-beam serial femtosecond crystallography for accurate structure-factor determination at an X-ray free-electron laser // *IUCrJ*. – 2021. – Vol. 8. P. 905-920.
12. Fischer, M. Macromolecular room temperature crystallography // *Quarterly Reviews of Biophysics*. – 2021. – Vol. 54. P. 1–15.
13. Tortorici, M. A., Walls, A. C., Lang, Y., Wang, C., Li, Z., et al. (2019) Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 481_489, doi: 10.1038/s41594_019_0233_y.
14. Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., and Velesler, D. (2020) Structure, function, and antigenicity of the SARS_CoV_2 spike glycoprotein, *Cell*, **181**, 282_291, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
15. Wang, C., Li, W., Drabek, D., Okba, N. M. A., van Haperen, R., et al. (2020) A human monoclonal antibody blocking SARS_CoV_2 infection, *Nat. Commun.*, **11**, 1_6, doi: 10.1038/s41467_020_16256_y.
16. Li, W., Hulswit, R. J. G., Widjaja, I., Raj, V. S., McBride, R., et al. (2017) Identification of sialic acid_binding function for the Middle East respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E8508-E8517, doi: 10.1073/pnas.1712592114.
17. Park, Y. J., Walls, A. C., Wang, Z., Sauer, M. M., Li, W., et al. (2019) Structures of MERS_CoV spike glycoprotein in complex with sialoside attachment receptors, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 1151_1157, doi:10.1038/s41594_019_0334_7.
18. Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., et al. (2020) Characterization of spike glycoprotein of SARS_CoV_2 on virus entry and its immune cross_reactivity with SARS_CoV, *Nat. Commun.*, **11**, 1620, doi: 10.1038/s41467_020_15562_9.
19. Chen, Z., Mi, L., Xu, J., Yu, J., Wang, X., et al. (2005) Function of HAb18G/CD147 in invasion of host cells by severe acute respiratory syndrome coronavirus, *J. Infect. Dis.*, **191**, 755_760, doi: 10.1086/427811.
20. Wang, K., Chen, W., Zhou, Y. S., Lian, J. Q., Zhang, Z., et al. (2020) SARS_CoV_2 invades host cells via a novel route: CD147_spike protein, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.03.14.988345.
21. Qing, E., Hantak, M., Perlman, S., and Gallagher, T. (2020) Distinct roles for sialoside and protein receptors in coronavirus infection, *MBio*, **11**, e02764_e02819, doi: 10.1128/mBio.02764_19.
22. Hao, W., Ma, B., Li, Z., Wang, X., Gao, X., et al. (2020) Binding of the SARS_CoV_2 spike protein to glycans, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.05.17.100537.
23. Engin, A. B., Engin, E. D., and Engin, A. (2020) Dual function of sialic acid in gastrointestinal SARS_CoV_2 infection, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **79**, 103436, doi: 10.1016/j.etap.2020.103436.
24. Shi, C., Wang, C., Wang, H., Yang, C., Cai, F., et al. (2020) Clinical observations of low molecular weight heparin in relieving inflammation in COVID_19 patients: a retrospective cohort study, *medRxiv*, doi:10.1101/2020.03.28.20046144.
25. Struh, L. J., and Stehle, T. (2014) Glycan engagement by viruses: receptor switches and specificity, *Annu. Rev. Virol.*, **1**, 285_306, doi: 10.1146/annurev_virology_031413_085417.
26. Milewska, A., Zarebski, M., Nowak, P., Stozek, K., Potempa, J., and Pyrc, K. (2014) Human Coronavirus NL63 utilizes heparan sulfate proteoglycans for attachment to target cells, *J. Virol.*, **88**, 13221_13230, doi: 10.1128/JVI.02078_14.
27. Kim, S. Y., Jin, W., Sood, A., Montgomery, D. W., Grant, O. C., et al. (2020) Glycosaminoglycan binding motif at S1/S2 proteolytic cleavage site on spike glycoprotein may facilitate novel coronavirus (SARS_CoV_2) host cell entry, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.04.14.041459.

28. Mycroft_West, C., Su, D., Pagani, I., Rudd, T., Elli, S., et al. (2020) Heparin inhibits cellular invasion by SARS_CoV_2: structural dependence of the interaction of the surface protein (spike) S1 receptor binding domain with heparin, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.04.28.066761.

29. Ryzhikov AB, Onkhonova GS, Imatdinov IR, Gavrilova EV, Maksyutov RA, Gordeeva EA, Pazynina GV, Ryzhov IM, Shilova NV, Bovin NV. Recombinant SARS-CoV-2 S Protein Binds to Glycans of the Lactosamine Family in vitro. *Biochemistry* (Mosc). 2021 Mar;86(3):243-247).

30. Chayen, N., Saridakis, E. Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal // *Nat Methods*. – 2008. – Vol. 5. P. 147–153.

Зав. отделом, канд. биол. наук



А.Б. РЪЖИКОВ