

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

УДК 578.834.11:[616.9+616-022.3

**МЕХАНИЗМ ИНФИЦИРОВАНИЯ КЛЕТОК  
ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ SARS-COVID-II**

<sup>1</sup>Сесорова И.С., <sup>2</sup>Безнусенко Г.В., <sup>1</sup>Карасева Е.В.,  
<sup>3</sup>Сесоров В.В., <sup>4</sup>Савин М.А., <sup>1</sup>Бедяев Е.В., <sup>2</sup>Миронов А.А.  
<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации», Иваново,  
e-mail: irina-S3@yandex.ru;

<sup>2</sup>Институт молекулярной онкологии, Милан;

<sup>3</sup>МБОУ «Средняя школа № 2», Иваново;

<sup>4</sup>ФГАОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», Пермь

Обзор посвящен критическому анализу известных исследований вируса SARS-CoV-2, вызвавшего самую масштабную эпидемию XXI в., позволивших, с высокой степенью вероятности, описать биогенез вируса. SARS-CoV-2 проникает в клетку путем клатрин-зависимого эндоцитоза. В эндосоме S-белок SARS-CoV-2 расщепляется с помощью TMDRSS2, и образовавшаяся S<sup>2</sup>-субъединица перфорирует мембраны эндосом, в результате чего его +РНК оказывается в цитозоле. Вирус вызывает в клетке образование органеллы вирусной репликации, состоящей из сети замкнутых мембран эндоплазматического ретикулома и двухмембранных вакуолей (ДМВ), где он генерирует репликационную вилку. ДМВ образуются из мембран эндоплазматического ретикулома с ключевым участием белка NSP6 и содержат дцРНК вируса. Через поры ДМВ дцРНК может выходить в цитозоль. Из репликационной органеллы вирус доставляется к комплексу Гольджи, транспортируется через него, после чего белки вируса становятся высоко гликозилированными. Вирионы концентрируются в пост-Гольджи переносчиках, которыми они доставляются к плазмалемме инфицированной клетки и сливаются с ней, высвобождая вирус в просвет дыхательных путей. Ключевые механизмы биогенеза изучены, однако остается много неясных моментов, понимание которых поможет в лечении и профилактике инфекции.

**Ключевые слова:** COVID-19, SARS-CoV-2, комплексе Гольджи, репродукция вируса, внутриклеточный транспорт, органелла репликации вируса

**MECHANISM OF THE SARS-COVID-II INFECTION  
OF RESPIRATORY CELLS**

<sup>1</sup>Sesorova I.S., <sup>2</sup>Beznusenko G.V., <sup>1</sup>Karaseva E.V., <sup>3</sup>Sesorov V.V.,  
<sup>4</sup>Savin M.A., <sup>1</sup>Bedyayev E.V., <sup>2</sup>Mironov A.A.

<sup>1</sup>Ivanovo State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation,  
Ivanovo, e-mail: irina-S3@yandex.ru;

<sup>2</sup>Institute of Molecular Oncology, Milan;

<sup>3</sup>Secondary School № 2, Ivanovo;

<sup>4</sup>Perm National Research Polytechnic University, Perm

This review presents itself as a critical analysis of the well-known studies of the SARS-CoV-2 virus, which caused the largest epidemic of the 21st century, making it possible with a high degree of probability to describe the biogenesis of the virus. SARS-CoV-2 enters the cell by clathrin-dependent endocytosis. In the endosome, the SARS-CoV-2 S protein is cleaved by TMDRSS2, and the resulting S<sup>2</sup> subunit perforates the endosome membranes, that allows its +RNA to enter the cytosol. The virus causes the formation of a viral replication organelle in the cell, which consists of a network of closed membranes of the endoplasmic reticulum and double-membrane vacuoles (DMV), where it generates a replication fork. DMV are formed from the membranes of the endoplasmic reticulum with the key participation of the NSP6 protein and contain the dsRNA of the virus. Through the pores of the DMV, dsRNA can enter the cytosol. From the replication organelle, the virus is then delivered to the Golgi complex, transported through it, after which the viral proteins become highly glycosylated. Virions are concentrated in post-Golgi carriers, that deliver them to the plasmalemma of an infected cell and merge with it, releasing the virus into the airways of the body. The key mechanisms of biogenesis have been studied, but many unclear points still remain, the understanding of which will help in the treatment and prevention of the infection.

**Keywords:** COVID-19, SARS-CoV-2, Golgi complex, virus reproduction, intracellular transport, viral replication organelle

Биогенез вируса SARS-CoV-2, вызвавшего самую масштабную эпидемию XXI в., продолжает активно изучаться учеными всего мира. На сегодняшний день расшифрова-

на структура и основные белки вируса. Однако остаются неясными целый ряд ключевых вопросов взаимодействия вируса с клеткой и его внутриклеточного транспорта.

Цель обзора – провести критический анализ данных о биогенезе вируса SARS-CoV-2 и предложить гипотезы для понимания механизмов взаимодействия вируса с инфицированными клетками.

#### *Особенности строения вируса SARS-CoV-2*

Вирус SARS-CoV-2 – представитель семейства коронавирусов, имеет сферическую форму с диаметром вириона 90–100 нм и «корону» из 25–50 «шипов» спайковых белков длиной 23 нм. Это самый большой одноцепочечный РНК-вирус с геномом около 29903 пар оснований, 5'-конец РНК-вируса содержит метилированный КЭП, а на 3'-конце находятся несколько аденинов [1]. РНК и нуклеопротеины окружены липидным би-слоем, состоящим в первую очередь из фосфолипидов. Би-слой является производимой мембраны эндоплазматического ретикулума клетки-хозяина, поэтому его толщина меньше, чем у плазмолеммы инфицированной клетки, и составляет соответственно  $3,6 \pm 0,5$  нм.

На поверхности «шипов» SARS-CoV-2 находится большое количество сильно гликозилированных белков и полисахаридов, благодаря которым вирус может долго оставаться незамеченным для иммунной системы человека [2].

Геном SARS-CoV-2 кодирует 29 белков, в том числе 4 структурных и 16 неструктурных белков (NSP1–NSP16), необходимых для реализации жизненного цикла вируса, а также 9 вспомогательных белковых факторов (ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c и ORF10) [3].

К структурным белкам вируса SARS-CoV-2 относятся 4 основных: спайковый белок (S-белок), белок мембраны (М-белок), белок оболочки (Е-белок), белок нуклеокапсида (N-белок) [3].

S-белок «шипа» вируса представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа с молекулярной массой 600 кДа, который состоит из двух субъединиц – S1 и S2 [2]. S1-субъединица белка отвечает за связывание с рецептором и стабилизацию вириона перед слиянием. С помощью S2-субъединицы происходит слияние вириона с плазматической мембраной клетки-хозяина.

S-белки SARS-CoV и SARS-CoV-2 имеют 75% совпадений аминокислотных последовательностей [4]. Однако существуют и важные различия. Участок связывания S1 и S2 субъединицы у SARS-CoV-2, в отличие от SARS-CoV, имеет вставку из четырех аминокислот, что повышает аффинность субъединицы к рецептору – ангиотензин-превращающему ферменту-2 (АПФ-2). Сайт S1-S2 SARS-CoV-2 расщепляется протеа-

зой фурина (и некоторыми другими), что активирует S-белок и облегчает его проникновение в клетку [5]. Кроме того, в строении С-хвоста «шипов» SARS-CoV-2 и SARS-CoV выявлена разница в одну аминокислоту: Cys1247 вместо Ala1229 соответственно [6].

Трансмембранный М-белок необходим для поддержания сферической формы вируса. Он может менять конформацию, связываясь при этом с нуклеокапсидом и искривляет мембрану клетки-хозяина. М-белок способен образовывать комплекс с Е-белком, который обеспечивает одинаковый размер вирусных частиц и опосредует высвобождение вирионов.

Трансмембранный Е-белок активно реплицируется внутри инфицированной клетки, но обнаруживается в основном в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) и комплексе Гольджи. Важен для почкования и репликации вируса [6].

N-белок может взаимодействовать с геномной РНК и М-белком, имеет высокую скорость изменения конформации. Участвует в транскрипции и репликации вирусной РНК, а также необходим для сборки вирионов. Большинство белков семейства NSP интенсивно не изучались [7].

#### *Механизм проникновения вируса SARS-CoV-2 в клетку*

*Клетки-мишени вируса.* Заражение вирусом SARS-CoV-2, как сейчас хорошо известно, чаще всего происходит в верхних дыхательных путях человека. Показано, что проникновение вируса в клетку начинается после его прикрепления в плазматической мембране клетки через взаимодействие с АПФ-2 [8], который является для SARS-CoV-2 рецептором. Между тем АПФ-2 широко экспрессируется в различных тканях и органах: в легких, головном мозге, почках [9], тонкой и толстой кишке, яичках, сердечной мышце, щитовидной железе [10]. Не обнаружен АПФ-2 в клетках крови, нет доказательств проникновения вируса в альвеолярные макрофаги [11].

Дыхательные (воздухоносные) пути выстланы респираторной слизистой оболочкой, включающей в себя восемь основных типов клеток: реснитчатые, щеточные, бокаловидные, вставочные, базальные, «булавовидные» («клетки Клара») и эндокринные клетки. SARS-CoV-2 обнаружен на микроворсинках и на апикальной плазматической мембране реснитчатых клеток, микроворсинках «булавовидных» клеток и не выявлен на бокаловидных клетках [12]. Было показано *in vivo*, что в культуре MUC5B+ клетки Клара не были инфицированы вирусом [4]. В дыхательных путях наблюдает-

ся градиент экспрессии АПФ-2 от верхних к нижним отделам [13].

Предполагается, что бокаловидные клетки защищают клетки слизистой дыхательных путей от проникновения вируса выработкой слизи, нарушение секреции которой повышает чувствительность пациентов к вирусу, например больных муковисцидозом [14]. Кроме того, в слизь, вероятнее всего посредством бокаловидных клеток, попадает иммуноглобулин-А (IgA), который может предотвратить доступ большей части вируса к апикальной поверхности клетки-мишени [15]. Наиболее вероятный путь IgA через бокаловидную клетку нам видится следующим образом: синтез IgA плазматическими клетками собственной пластинки слизистой оболочки бронхов; базолатеральный эндоцитоз в транспортную систему комплекса Гольджи бокаловидной клетки с последующей секрецией вместе со слизью в дыхательные пути.

В обонятельной области полости носа бокаловидные клетки отсутствуют. Рецептор АПФ-2 экспрессируется в высокой степени на микроворсинках, поддерживающих эпителиоциты слизистой оболочки, при этом на самих нейросекреторных эпителиоцитах не обнаруживается [16]. Поэтому, вероятнее всего, что SARS-CoV-2 не является нейротропным вирусом [16] и проблемы со вкусом и обонянием у пациентов с COVID-19 не связаны с поражением самих нейросекреторных эпителиоцитов [13].

Между тем предполагается, что SARS-CoV-2 проникает в центральную нервную систему [17]. Через 7 дней после попадания в клетку вирус наблюдался в обонятельной коре головного мозга макак-резусов [18]. У пациентов, умерших от COVID-19, SARS-CoV-2 был обнаружен в тканях головного мозга [19].

Маркер АПФ-2 регистрируется на щеточной кайме (микроворсинках) энтероцитов в подвздошной, двенадцатиперстной, тощей, слепой и толстой кишках [20]. Вирус найден в железистых клетках и эпителии слизистой оболочки выводных протоков больших слюнных желез полости рта [20]. Во всех имеющихся исследованиях АПФ-2 обнаруживается в эндотелиальных клетках мелких и крупных артерий и вен [21].

Клинически было показано и доказано на клетках культуры A549 (у которых трансфекция с АПФ-2 приводила к увеличению чувствительности к вирусу SARS-CoV-2), что клетки с низким уровнем экспрессии АПФ-2 менее чувствительны к заражению вирусом [22]. Вероятнее всего, поэтому дети, экспрессирующие меньше АПФ-2, чем взрослые, более устойчивы к вирусу

[23]. Нужно также отметить, что экспрессия АПФ-2 выше у мужчин и увеличивается с возрастом [23].

*Структура АПФ-2 рецептора.* АПФ-2 – белок, который превращает ангиотензин I и II в ангиотензин I-IX и I-VII соответственно, а также действует на [Des-Arg<sup>9</sup>37]-Bradykinin- кинин-калликреиновую систему, регулируя процессы воспаления и свертывания крови [24]. В организме человека АПФ-2 встречается в двух формах: мембранного белка I-типа и растворенной [9].

АПФ-2 первого типа состоит из 805 аминокислот и имеет: неклеточный N-концевой домен с каталитически активным цинк-связывающим участком HEXXH, трансмембранный домен и C-концевой цитозольный хвост [9]. Внеклеточный домен способен связываться с S1 участком S-белка [14, 15, 17]. Ген, кодирующий АПФ-2, находится в X-хромосоме и имеет 40% идентичности и 61% сходства с АПФ-металлопротеазой [24].

Вторая, растворимая форма АПФ-2 редко обнаруживается в крови из-за ее низкой концентрации [25]. Однако показано, что повышенный уровень растворимого АПФ-2 коррелирует с тяжестью заболевания [25].

Таким образом, мембраносвязанная форма АПФ-2 представляет собой цинкосо-держущий трансмембранный металлофермент, который экспрессируется большим количеством клеток.

*Роль TMPRSS2 в проникновении SARS-CoV-2 в клетку.* Белок TMPRSS2 – мембрано-связанная сериновая протеаза-II человека. Этот фермент стимулирует протеолитическое расщепление АПФ-2, сохраняя его связанную с мембраной форму и каталитическую функцию (в отличие от фермента ADAM17, регулирующего количество тканевой и циркулирующей формы АПФ-2) [25]. После инфицирования клетки SARS-CoV-2 TMPRSS2 расщепляет S-белок по S1-S2 последовательности, активируя последний [26].

Белок TMPRSS2 выявляется в респираторном эпителии [26], на щеточной кайме (микроворсинках) энтероцитов в подвздошной, двенадцатиперстной, тощей, слепой и толстой кишках [20], на микроворсинках поддерживающих клеток обонятельной области полости носа [16]. Так же как и АПФ-2, экспрессия TMPRSS2 демонстрирует градиент от верхних до нижних отделов дыхательных путей. В отличие от АПФ-2, TMPRSS2 наблюдается не только на мембранах микроворсинок, но и в тонком слое апикальной цитоплазмы в реснитчатых клетках и клетках [21]. Нужно отметить, что и другие протеазы (фурин/фуриноподобные, сериновая эндопротеаза, пропроте-

инконвертаза-1 (PC1), трипсин, матриптаза, катепсины) могут быть вовлечены в процесс проникновения SARS-CoV-2 в клетку и усиливать его инфекционность [27].

*Проникновение вируса в клетку.* SARS-CoV-2 для проникновения в клетку использует как клатринзависимый, так и клатриннезависимый эндоцитоз [7]. На первом этапе вирус прикрепляется к плазматической мембране клеток слизистой оболочки дыхательных путей человека (преимущественно реснитчатых клеток) [28] с помощью S1 субъединицы S-белка, которая связывается с рецептором АПФ-2. При этом важным механизмом, способствующим доставке вируса в клетку, являются реснички [15]. Далее, мембраносвязанная протеаза TMPRSS2 (возможно, фурин и др.) расщепляет S-белок на участке между S1 и S2 субъединицами, тем самым активируя его. В эксперименте было показано, что ингибирование активности TMPRSS2, а также фурина блокирует проникновение SARS-CoV-2 в клетку [4]. Напротив, повышенная экспрессия TMPRSS2 или фурина стимулирует инфекцию [16].

Согласно наиболее доказанной в настоящее время гипотезе, связывание АПФ-2 с S-белком вызывает эндоцитоз вириона (рис. 1). Необходимость кислой среды для процессинга S-белка также предполагает важность эндоцитоза для проникновения SARS-CoV-2 в клетки. Однако имеются редкие данные, свидетельствующие о том, что среда с низким pH не является решающим фактором для инфицирования, что также было показано во время наблюдений за SARS-CoV, MERS-CoV и вирусом мышинного гепатита [27]. Существуют предположения, что мембрана SARS-CoV-2 может напрямую сливаться с апикальной частью плазматической мембраны клетки-хозяина, без эндоцитоза, что было обнаружено, но только в клеточных культурах [28]. Согласно этой гипотезе, SARS-CoV-2 прикрепляется к поверхности клетки зависимым от АПФ-2 способом, а после расщепления S-белка мембрана вируса сливается с плазматической мембраной микроворсинки клетки-хозяина, и нуклеокапсид выходит в цитозоль [15]. Такой путь возможен для неполяризованных клеток в культуре.

В поляризованных клетках слизистой дыхательных путей плазматическая мембрана в основании микроворсинки содержит клатриновые почки, которые, при захвате вириона, сразу формируют клатриновую везикулу. Слияние с плазматической мембраной микроворсинки проблематично, так как неизвестны механизмы для доставки нуклеокапсидов в перинуклеарную часть

клетки. Кроме того, в микроворсинке «мало места» для высвобождения нуклеокапсидов.

Таким образом, связывание АПФ-2 с S-белком вызывает эндоцитоз вириона, после чего вирусная оболочка сливается с эндосомальной мембраной клетки-хозяина, что позволяет вирусу высвободить свой геном в цитоплазму.

*Биогенез SARS-CoV-2 в клетке-хозяине.*

*Влияние вируса на клетку-хозяина*

После проникновения вируса в клетку-хозяина трагически меняется морфология и метаболизм. Происходит накопление коркового актина вблизи плазматической мембраны инфицированных клеток [29]. SARS-CoV-2 запускает фрагментацию комплекса Гольджи посредством подавления белка GRASP55, а также повышает экспрессию белка TGN46 (напротив, увеличение экспрессии GRASP55 или уменьшение TGN46 в эксперименте снижает уровень инфицирования) [30]. При этом органелла не содержит стопок и приобретает вид скопления мелких мембранных фрагментов, рассеянных в цитоплазме клетки и содержащих вирионы [30].

Инфекция COVID-19 приводит не только к разборке «ленты Гольджи», но и мобилизации компартментов клетки-хозяина и белковых механизмов, которые способствуют доставке вириона на клеточную поверхность независимо от комплекса Гольджи [30]. Кроме того, происходит разборка микротрубочек, которые не нужны для биогенеза SARS-CoV-2 или других коронавирусов [17].

Вирус оказывает влияние на ЭР, в частности индуцирует повышенную экспрессию нескольких генов, например экспрессию белков GRP78 и GRP94, ключевых регуляторов реакции ЭР на стресс, которые сами регулируются глюкозой [17]. SARS-CoV-2 нарушает: липидный обмен [29]; вызывает слияние митохондрий [17]; ингибирует механизм метилирования РНК хозяина [30], работу SNAR-белков и аутофагию; предотвращает захват вакуолей с двойной мембраной (ДМВ), преобразованных вирусом в аутофагосомы [31].

SARS-CoV-2 вызывает острый респираторный дистресс-синдром, который характеризуется некрозом альвеолярного эпителия на ранней стадии заболевания. Некроз альвеолярных эпителиальных клеток включает два типа запрограммированного некроза, а именно: некроптоз и пироптоз [32]. Маркеры эпителиального некроза, и в особенности высокоподвижная группа box-1 (HMGB-1), выходят в кровь. Уровень HMGB-1 в сыворотке является одним из молекулярных маркеров, выделяемых из некротизированных клеток.

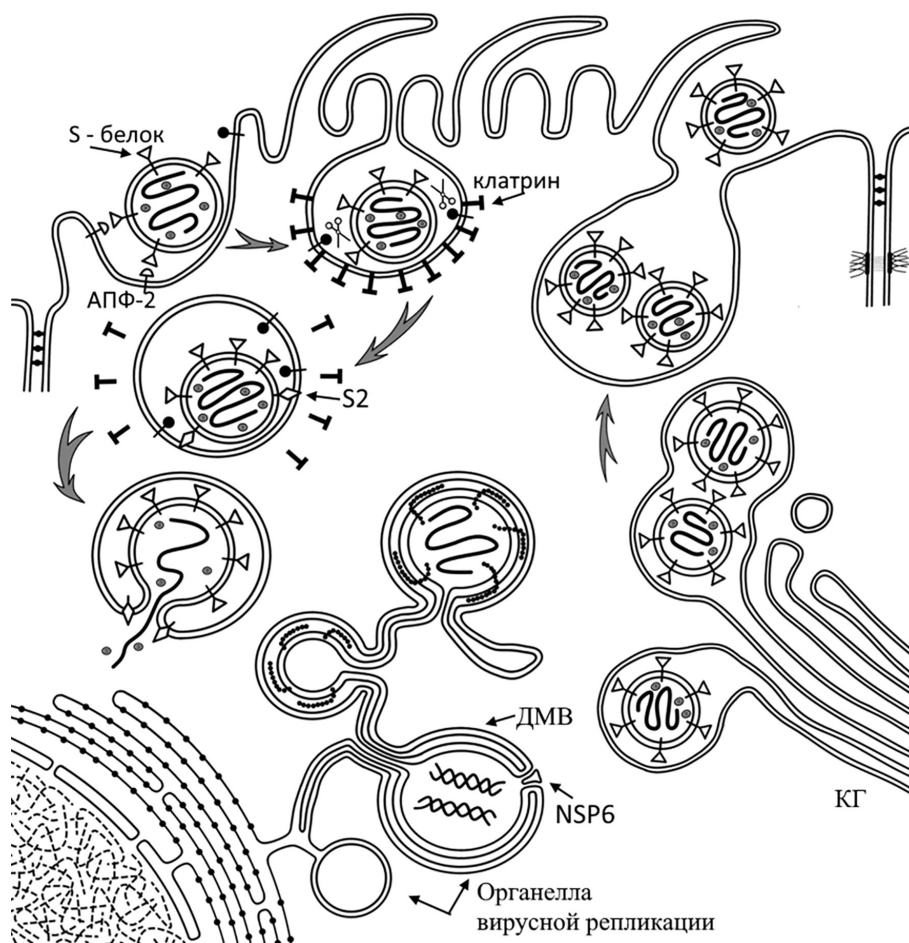


Рис. 1. Схема биогенеза вируса SARS-CoV-2

Репликация происходит в органелле вирусной репликации (рис. 1). С фрагмента ORF1ab считывается полипептид, который разрезается папаин-подобной протеазой (PLP) и 3С-подобной протеазой (3CL Pro) на 16 неструктурных белков вируса [33]. Среди них белки, необходимые для синтеза РНК-зависимой РНК-полимеразы и создания комплексов репликации и транскрипции.

В клетках, инфицированных SARS-CoV, ДМВ являются местами синтеза вирусной РНК [34]. Просвет ДМВ не содержит цитозольных белков, а вместо этого заполнен молекулами двухцепочечной РНК (дцРНК). Одноцепочечных РНК не наблюдается. Длина отдельных фрагментов дцРНК в ДМВ варьирует от 4 до 263 нм при их средней длине 52 нм [35]. ДМВ имеют поры, через которые в цитозоль выходят дцРНК. Мы предположили, что дцРНК служит матрицей для синтеза новой вирусной РНК, а также такая структура необходима для защиты вирусной РНК [36], так как в цитозоле на-

ходится много РНКаз, способных легко разрушать одноцепочечные РНК (рис. 2).

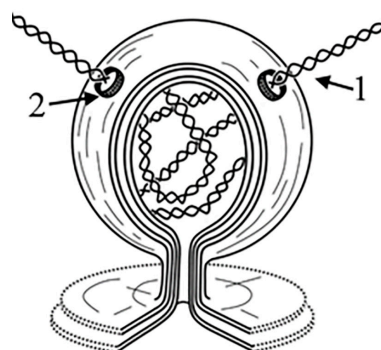


Рис. 2. Схема двухмембранной вакуоли SARS-CoV-2:  
1 – двухцепочечная РНК вируса;  
2 – мембранная пора

Наличие хеликаз в вирусном геноме предполагает важную роль дцРНК в биогенезе SARS-CoV-2. Хеликазы необходи-

мы для раскручивания или деспирализации дцРНК и, таким образом, для эффективной репликации +РНК вирусных геномов. Описана трехмерная структура хеликаз-полимеразы в репликационно-транскрипционном комплексе SARS-CoV-2 [37].

*Гипотеза о механизме формирования двойной мембранной вакуоли и функции NSP6 белка.* Внутри ДМВ вакуоли обнаружена дцРНК вируса, что позволяет говорить о ее важности для созревания вириона и защиты от цитозольных РНКаз [38]. В межмембранном пространстве ДМВ отсутствует белковая матрица, при этом мембраны плотно «склеены» между собой [34]. Вероятно, что ДМВ формируется из мембран ЭР, однако в этом случае возникает целый ряд вопросов. Так, неясно, как ЭР образует парные мембраны и как белки NSP и другие вирусные белки, лишенные сигнальных пептидов, встраиваются в липидный би-слой. Неизвестен механизм удаления матрицы ЭР из парного мембранного домена и накопления дцРНК внутри просвета вакуоли при полностью закрытом межмембранном пространстве и то, как формируются и работают специальные (подобные ядерным) поры, с помощью которых дцРНК вируса выходит из ДМВ и, по-видимому, регулируется приток белков в вакуольное пространство [39].

В эксперименте было показано, что трансфекция белка NSP6 вызывает закрытие просвета ЭР с образованием очень плотно расположенных и не содержащих просвета двойных парных мембран, связанных с ЭР [17]. Это явление не может быть объяснено известными на сегодняшний день молекулярными механизмами. При этом мембраны ДМВ имеют низкое содержание холестерина [39]. Иногда на цитозольной стороне ДМВ у других коронавирусов выявляются рибосомы [40].

Между тем можно предположить, что две двойные мембраны соединяются друг с другом, а их края постепенно превращаются в поры, где скапливаются белки ядерных пор. Очень тонкие трубчатые соединения, наблюдаемые между ЭР и ДМВ, позволяют предположить, что ДМВ формируется из ЭР [40]. Поры будут регулировать транспорт молекул, в том числе позволяя проходить только дцРНК. Действительно, в инфицированных SARS-CoV-2 во время контакта двух ДМВ наблюдаются двойные парные мембраны [39].

Не вызывает сомнения, что белок NSP6 участвует в образовании двойной мембранной вакуоли [41]. Однако, как работают молекулярные механизмы, остается загадкой. NSP6 вырезается пептидазой NSP5 из мега-

полипептида, после чего у него отсутствует сигнальный домен для встраивания в липидный би-слой мембраны ЭР. Вставка такого белка непосредственно из цитозоля в содержащий холестерин би-слой ЭР чрезвычайно затруднена. Трансфекция NSP6 [41] косвенно демонстрирует, что NSP6-содержащий замкнутый ЭР имеет низкую концентрацию холестерина. На эту роль могли бы подойти мембраны митохондрий, которые имеют мало холестерина и много ненасыщенных длинноцепочечных жирных кислот. Действительно, есть данные, что NSP6 нескольких других коронавирусов локализуется в митохондриях [42]. С другой стороны, инфекция клетки SARS-CoV-2 приводит к слиянию митохондрий [17] с образованием митохондриальных мультиламеллярных везикул митохондриального происхождения – митохондриальных мультиламеллярных органелл (ММО), которые могут служить резервуаром мембран для построения ДМВ [43], так как для их формирования большое количество мембран требуется в короткие сроки. В пользу этой гипотезы говорит тот факт, что ММО произошли от наружной мембраны грамотрицательных архей, следовательно, NSP6 с его шестью трансмембранными доменами может быстро проникнуть в липидный би-слой [35].

Кроме того, в строении двухмембранной вакуоли мог бы использоваться митохондриальный порин, который является основным интегральным мембранным белком ММО, но не взаимодействующим с собственно мембранами ЭР [44]. Тем не менее эта гипотеза требует дополнительного анализа.

#### *Внутриклеточный транспорт вируса и выход вириона из клетки*

Формирование вирусной оболочки происходит в так называемых местах выхода из ЭР. Известно, что для сборки SARS-CoV-2 необходим определенный температурный диапазон [45].

Сборка вирусной оболочки начинается с накопления S-белка на люминальной поверхности мембраны ЭР, где образует отдельный комплекс [35]. В накоплении S-белка необходимы E- или M-белки.

KxHxx-мотив в цитозольном хвосте «шипа» вируса слабо связывает  $\beta$ -COP субъединицу коатомера COP1, что облегчает рециркуляцию шипа в комплекс Гольджи, высвобождая молекулу на поверхность клетки [5]. Образуются уменьшенные комплексы, состоящие из N-белков и РНК, позволяющие эффективно упаковывать большую молекулу РНК в мелкие вирусные частицы [17].

Мембранные белки SARS-CoV-2 сильно гликозилированы, поэтому они попадают

из ЭР в комплекс Гольджи [17]. Механизм транспорта вирусных частиц через комплекс Гольджи неизвестен. Однако размер вириона SARS-CoV-2 свидетельствует против «везикулярной» и «диффузионной» моделей транспорта через органеллу [46]. С другой стороны, более высокая численность плотность вирионов на транс-полусоме комплекса Гольджи, по сравнению с цис-полусомом, свидетельствует и против модели «созревания и прогрессии цистерн» [47].

Опубликованы изображения, показывающие, что в пост-Гольджи переносчиках обнаружены частицы, идентичные вирионам, расположенным вне клеточной мембраны, что позволяет предположить, что в них находятся уже зрелые частицы вируса [48]. Утверждается, что коронавирусы используют лизосомы для своей секреции [48]. Однако большая часть частиц проходит через эндосомы, которые часто LAMP1-положительны [47].

Гликозилирование вирусных белков происходит в течение 4 ч после их синтеза. Пост-Гольджи переносчик, наполненный вирусными частицами, сливается с плазматической мембраной, и вирусы секретируются. Неясно, происходит ли секреция непосредственно через апикальную часть плазмолеммы, которая покрыта слизью, или первоначально вирусы доставляются к базолатеральной ее части, а затем в просвет дыхательных путей. Неизвестно, могут ли пост-Гольджи переносчики сливаться с базолатеральной частью плазмолеммы. Чтобы ответить на этот вопрос, необходим анализ распределения SNARE-белков на мембранах секреторного пути.

После люминальной секреции, SARS-CoV-2 связывается с микроворсинками дыхательных путей и индуцирует образование апикально вытянутых и сильно разветвленных микроворсинок, которые помогают SARSCoV-2 проходить через слизь [12]. Эти длинные микроворсинки объясняют, почему люди, выздоровевшие от COVID-19 страдают кашлем с обильным выделением слизи еще в течение длительного времени.

Между тем, несмотря на то, что достигнут значительный прогресс в изучении вируса, многие моменты, касающиеся механизмов взаимодействия SARS-CoV-2 с клетками, остаются непонятными. Неясно, почему АПФ-2 транспортируется к апикальной части плазмолеммы, тогда как сигналов для апикальной сортировки для него не обнаружено? Если АПФ-2 является апикальнонаправленным белком, то почему в клетке культуры могут быть инфицированы неполяризованные клетки? Какие механизмы участвуют в почковании SARSCoV-2?

Как транспортируются незрелые вирионы в комплекс Гольджи? Каков механизм внутри-Гольджи транспорта незрелых и зрелых вирионов?

Между тем основные этапы биогенеза вируса в целом понятны. SARS-CoV-2 проникает в клетку путем клатрин-зависимого эндоцитоза. В эндосоме S-белок расщепляется с помощью TMDRSS2, и образовавшаяся S<sup>2</sup>-субъединица перфорирует мембраны эндосом. Оказавшись в цитозоле, РНК вируса вызывает образование органеллы вирусной репликации, состоящей из сети замкнутых мембран эндоплазматического ретикулума и двухмембранных вакуолей (ДМВ), где вирус генерирует репликационную вилку. Из репликационной органеллы дцРНК вируса через поры ДМВ выходит в цитозоль и доставляется к комплексу Гольджи. Пройдя через комплекс Гольджи, вирус доставляется переносчиками к плазмалемме инфицированной клетки.

Понимая клеточные механизмы транспорта вируса, можно научиться эффективно воздействовать на целый ряд белков и молекулярных машин клетки и внутриклеточного транспорта, что может остановить или значительно уменьшить заражение SARS-CoV-2, например на ингибитор кальциевой помпы SERCA (тапсигаргин) и ингибитор гликозилирования белка (туникамицин); ингибитор ArfGEF (брефелдин А) и ингибитор транс-Гольджи транспорта (монензин); ингибитор H<sup>+</sup>-АТФазы вакуолярного типа (бафиломицин А1) и вакуолин-1 (индуктор лизосом), ингибиторы лизосомальных гидролаз (Е64d, лейпептин и пепстатин) и целый ряд других, ингибирующих внутриклеточный транспорт и эндоцитоз.

### Список литературы

1. El-Shennawy L., Hoffmann A.D., Dashzeveg N.K., McAndrews K.M., Mehl P.J., Cornish D., Yu Z., Tokars V.L., Nicolaescu V., Tomatsidou A., Mao C., Felicelli C.J., Tsai C.F., Ostiguin C., Jia Y., Li L., Furlong K., Wysocki J., Luo X., Ruiivo C.F., Batlle D., Hope T.J., Shen Y., Chae Y.K., Zhang H., LeBleu V.S., Shi T., Swaminathan S., Luo Y., Missiakas D., Randall G.C., Demonbreun A.R., Ison M.G., Kalluri R., Fang D., Liu H. Circulating ACE2-expressing extracellular vesicles block broad strains of SARS-CoV-2 // *Nat. Commun.* 2022. Vol. 13, Is. 1. P. 405.
2. Gong Y., Qin S., Dai L., Tian Z. The glycosylation in SARS-CoV-2 and its receptor ACE2 // *Signal Transduct. Target Ther.* 2021. Vol. 6. P. 396.
3. Gordo D.E., Jang G.M., Bouhaddo M., Xu J., Obernier K., White K.M., O'Meara M.J., Rezelj V.V., Guo J.Z., Swaney D.L. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing // *Nature.* 2020. Vol. 583. P. 459–468.
4. Hou Y.J., Okuda K., Edwards C.E., Martinez D.R., Asakura T., Dinno K.H. 3rd, Kato T., Lee R.E., Yount B.L., Mascenik T.M., Chen G., Olivier K.N., Ghio A., Tse L.V., Leist S.R., Gralinski L.E., Schäfer A., Dang H., Gilmore R., Nakano S., Sun L., Fulcher M.L., Livraghi-Buttrico A., Nicely N.I., Cameron M., Cameron C., Kelvin D.J., de Silva A., Margolis D.M.,

- Markmann A., Bartelt L., Zumwalt R., Martinez F.J., Salvatore S.P., Borczuk A., Tata P.R., Sontake V., Kimple A., Jaspers I., O'Neal W.K., Randell S.H., Boucher R.C., Baric R.S. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract // *Cell*. 2020. Vol. 182. P. 429–446.
5. Medeiros-Silva J., Somberg N.H., Wang H.K., McKay M.J., Mandala V.S., Dregni A.J., Hong M. pH- and Calcium-Dependent Aromatic Network in the SARS-CoV-2 Envelope Protein // *J. Am. Chem. Soc.* 2022. Vol. 144, Is. 15. P. 6839–6850.
6. Jennings B.C., Kornfeld S., Doray B. A weak COPI binding motif in the cytoplasmic tail of SARS-CoV-2 spike glycoprotein is necessary for its cleavage, glycosylation, and localization // *FEBS Lett.* 2021. Vol. 595. P. 1758–1767.
7. Hopfer H., Herzig M.C., Gosert R., Menter T., Hench J., Tzankov A., Hirsch H.H., Miller S.E. Hunting coronavirus by transmission electron microscopy – A guide to SARS-CoV-2-associated ultrastructural pathology in COVID-19 tissues // *Histo-pathology*. 2021. Vol. 78. P. 358–370.
8. Barlow J.L., McKenzie A.N.J. Innate Lymphoid Cells of the Lung // *Annu. Rev. Physiol.* 2019. Vol. 81. P. 429–452.
9. Donoghue M., Hsieh F., Baronas E., Godbout K., Gosselin M., Stagliano N., Donovan M., Woolf B., Robison K., Jeyaseelan R., Breitbart R.E., Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9 // *Circ. Res.* 2000. Vol. 87. P. E1–E9.
10. Peng Q., Peng R., Yuan B., Zhao J., Wang M., Wang X., Wang Q., Sun Y., Fan Z., Qi J., Gao G.F., Shi Y. Structural and Biochemical Characterization of the nsp12-nsp7-nsp8 Core Polymerase Complex from SARS-CoV-2 // *Cell Rep.* 2020. Vol. 31. P. 107774.
11. Scialo F., Daniele A., Amato F., Pastore L., Matera M.G., Cazzola M., Castaldo G., Bianco A. ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2 // *Lung* 2020. Vol. 198. P. 867–877.
12. Lee I.T., Nakayama T., Wu C.T., Goltsev Y., Jiang S., Gall P.A., Liao C.-K., Shih L.-C., Schürch C.M., McIlwain D.R., Chu P., Borchard N.A., Zarabanda D., Dholakia S.S., Yang A., Kim D., Chen H., Kanie T., Lin C.D., Tsai M.H., Phillips K.M., Kim R., Overdevest J.B., Tyler M.A., Yan C.H., Lin C.F., Lin Y.T., Bau D.T., Tsay G.J., Patel Z.M., Tsou Y.A., Tzankov A., Matter M.S., Tai C.J., Yeh T.H., Hwang P.H., Nolan G.P., Nayak J.V., Jackson P.K. ACE2 localizes to the respiratory cilia and is not increased by ACE inhibitors or ARBs // *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11. P. 5453.
13. Fodoulian L., Tuberosa J., Rossier D., Boillat M., Kan C., Pauli V., Egervari K., Lobrinus J.A., Landis B.N., Carleton A., Landis B.N., Carleton A., Rodriguez I. SARS-CoV-2 receptors and entry genes are expressed in the human olfactory neuroepithelium and brain // *Science*. 2020. Vol. 23. P. 101839.
14. Bezzetti V., Gentili V., Api M., Finotti A., Papi C., Tamanini A., Boni C., Baldisseri E., Oliosio D., Duca M., Tedesco E., Leo S., Borgatti M., Volpi S., Pinton P., Cabrini G., Gambari R., Blasi F., Lippi G., Rimessi A., Rizzo R., Cipolli M. SARS-CoV-2 viral entry and replication is impaired in Cystic Fibrosis airways due to ACE2 downregulation // *Nat. Commun.* 2023. Vol. 14. P. 132.
15. Pinto A.L., Rai R.K., Brown J.C., Griffin P., Edgar J.R., Shah A., Singanayagam A., Hogg C., Barclay W.S., Fütter C.E., Burgoyne T. Ultrastructural insight into SARS-CoV-2 entry and budding in human airway epithelium // *Nat. Commun.* 2022. Vol. 13. P. 1609.
16. Khan M., Yoo S.J., Clijsters M., Backaert W., Vanstapel A., Speleman K., Lietaer C., Choi S., Hether T.D., Marcellis L., Nam A., Pan L., Reeves J.W., Van Bulck P., Zhou H., Bourgeois M., Debaveye Y., De Munter P., Gunst J., Jorissen M., Lagrou K., Lorent N., Neyrinck A., Peetermans M., Thal D.R., Vandembrielle C., Wauters J., Mombaerts P., Van Gerven L. Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb // *Cell*. 2021. Vol. 184. P. 5932–5949.
17. Santerre M., Arjona S.P., Allen C.N., Shcherbik N., Sawaya B.E. Why do SARS-CoV-2 NSPs rush to the ER? // *J. Neurol.* 2021. Vol. 268. P. 2013–2022.
18. Beckman D., Bonillas A., Diniz G.B., Ott S., Roh J.W., Elizaldi S.R., Schmidt B.A., Sammak R.L., Van Rompay K.K., Iyer S.S., Morrison J.H. SARS-CoV-2 infects neurons and induces neuroinflammation in a non-human primate model of COVID-19 // *Cell Rep.* 2022. Vol. 41. P. 111573.
19. Stein S.R., Ramelli S.C., Grazioli A., Chung J.Y., Singh M., Yinda C.K., Winkler C.W., Sun J., Dickey J.M., Ylaya K., Ko S.H., Platt A.P., Burbelo P.D., Quezado M., Pittaluga S., Purcell M., Munster V.J., Belinky F., Ramos-Benitez M.J., Boritz E.A., Lach I.A., Herr D.L., Rabin J., Saharia K.K., Madathil R.J., Tabatabai A., Soherwardi S., McCurdy M.T., NIH COVID-19 Autopsy Consortium, Peterson K.E., Cohen J.I., de Wit E., Vannella K.M., Hewitt S.M., Kleiner D.E., Chertow D.S. SARS-CoV-2 infection and persistence in the human body and brain at autopsy // *Nature*. 2022. Vol. 612. P. 758–763.
20. Matuck B.F., Dolhnikoff M., Duarte-Neto A.N., Maia G., Gomes S.C., Sendyk D.I., Zarpellon A., Andrade N.P., Monteiro R.A., Pinho J.R.R., Gomes-Gouvêa M.S., Souza S.C., Kanamura C., Mauad T., Saldiva P.H.N., Braz-Silva P.H., Caldini E.G., da Silva L.F.F. Salivary glands are a target for SARS-CoV-2: A source for saliva contamination // *J. Pathol.* 2021. Vol. 254. P. 239–243.
21. Brann D.H., Tsukahara T., Weinreb C., Lipovsek M., Van den Berge K., Gong B., Chance R., Macaulay I.C., Chou H.-J., Fletcher R.B., Das D., Street K., de Bezioux H.R., Choi Y.G., Risso D., Dudoit S., Purdom E., Mill J., Hachem R.A., Matsunami H., Logan D.W., Goldstein B.J., Grubb M.S., Ngai J., Datta S.R. Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia // *Sci. Adv.* 2020. Vol. 6. P. 5801.
22. Blanco-Melo D., Nilsson-Payant B.E., Liu W.C., Uhl S., Hoagland D., Möller R., Jordan T.X., Oishi K., Panis M., Sachs D., Wang T.T., Schwartz R.E., Lim J.K., Albrecht H.R., Choi Y.G., Rimbschlag B.R. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19 // *Cell*. 2020. Vol. 181. P. 1036–1045.
23. Bunyavanich S., Do A., Vicencio A. Nasal gene expression of angiotensin-converting enzyme 2 in children and adults // *JAMA*. 2020. Vol. 323. P. 2427.
24. Mironov A.A., Savin M.F., Beznoussenko G.V. COVID-19. Biogenesis and Intracellular Transport // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24, Is. 5. P. 4523.
25. Scialo F., Daniele A., Amato F., Pastore L., Matera M.G., Cazzola M., Castaldo G., Bianco A. The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2 // *Lung*. 2020. Vol. 198. P. 867–877.
26. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T.S., Herrler G., Wu N.-H., Nitsche A., Müller M.A., Drosten C., Pöhlmann S. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor // *Cell*. 2020. Vol. 181. P. 271–280.
27. Peng R., Wu L.A., Wang Q., Qi J., Gao G.F. Cell entry by SARS-CoV-2 // *Trends Biochem. Sci.* 2021. Vol. 46. P. 848–860.
28. Cortese M., Lee J.Y., Cerikan B., Neufeldt C.J., Oorschot V.M.J., Köhrer S., Hennies J., Schieber N.L., Ronchi P., Mizzon G., Romero-Brey I., Santarella-Mellwig R., Schorb M., Boermel M., Mocaer K., Beckwith M.S., Templin R.M., Gross V., Pape C., Tischer C., Frankish J., Horvat N.K., Laketa V., Stanifer M., Boulant S., Ruggieri A., Chatel-Chaix L., Schwab Y., Bartenschlager R. Integrative Imaging Reveals SARS-CoV-2-Induced Reshaping of Subcellular Morphologies // *Cell Host Microbe*. 2020. V. 28. P. 853–866.
29. Turonová B., Sikora M., Schürmann C., Hagen W.J.H., Welsch S., Blanc F.E.C., Von Bülow S., Gecht M., Bagola K., Hörner C., van Zandbergen G., Landry J., de Azevedo N.T.D., Mosalaganti S., Schwarz A., Covino R., Mühlebach M.D., Hummer G., Krijnse Locker J., Beck M. In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges // *Science*. 2020. Vol. 370. P. 203–208.
30. Yang Y., Zheng L., Zheng X., Ge L. Autophagosomal Membrane Origin and Formation. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer: Singapore. 2021. Vol. 1208. P. 17–42.



31. Miao G., Zhao H., Li Y., Ji M., Chen Y., Shi Y., Bi Y., Wang P., Zhang H. ORF3a of the COVID-19 virus SARS-CoV-2 blocks HOPS complex-mediated assembly of the SNARE complex required for autolysosome formation. *Dev // Cell*. 2021. Vol. 56. P. 427–442.
32. Tojo K., Yamamoto N., Tamada N., Mihara T., Abe M., Nishii M., Takeuchi I., Goto T. Early alveolar epithelial cell necrosis is a potential driver of COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome // *Science*. 2023. Vol. 26. P. 105748.
33. Harcourt B.H., Jukneliene D., Kanjanahaluethai A., Bechill J., Severson K.M., Smith C.M., Rota P.A., Baker S.C. Identification of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase products and characterization of papain-like protease activity // *J Virol*. 2004. Vol. 78, Is. 24. P. 13600–13612.
34. Snijder E.J., Limpens R.W.A.L., de Wilde A.H., de Jong A.W.M., Zevenhoven-Dobbe J.C., Maier H.J., Faas F.F.G.A., Koster A.J., Bárcena M. A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis // *PLoS Biol*. 2020. Vol. 18. P. 3000715.
35. Baena V., Conrad R., Friday P., Fitzgerald E., Kim T., Bernbaum J., Berensmann H., Harned A., Nagashima K., Narayan K. FIB-SEM as a Volume Electron Microscopy Approach to Study Cellular Architectures in SARS-CoV-2 and Other Viral Infections: A Practical Primer for a Virologist. *Viruses* 2021. Vol. 13. P. 611.
36. Wolff G., Limpens R.W.A.L., Zevenhoven-Dobbe J.C., Laugs U., Zheng S., de Jong A.W.M., Koning R.I., Agard D.A., Grünewald K., Koster A.J., Snijder E.J., Bárcena M. A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle // *Science*. 2020. Vol. 369. P. 1395–1398.
37. Ogando N.S., Dalebout T.J., Zevenhoven-Dobbe J.C., Limpens R.W.A.L., van der Meer Y., Caly L., Druce J., de Vries J.J.C., Kikkert M., Bárcena M., Sidorov I., Snijder E.J. SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology // *J. Gen. Virol*. 2020. Vol. 101, Is. 9. P. 925–940.
38. Gorshkov K., Chen C.Z., Bostwick R., Rasmussen L., Tran B.N., Cheng Y.S., Xu M., Pradhan M., Henderson M., Zhu W., Oh E., Susumu K., Wolak M., Shamim K., Huang W., Hu X., Shen M., Klumpp-Thomas C., Itkin Z., Shinn P., Carlos de la Torre J., Simeonov A., Michael S.G., Hall M.D., Lo D.C., Zheng W. The SARS-CoV-2 Cytopathic Effect Is Blocked by Lysosome Alkalinizing Small Molecules // *ACS Infect. Dis*. 2021. Vol. 7. P. 1389–1408.
39. Saraste J., Prydz K. Assembly and Cellular Exit of Coronaviruses: Hijacking an Unconventional Secretory Pathway from the Pre-Golgi Intermediate Compartment via the Golgi Ribbon to the Extracellular Space // *Cells*. 2021. Vol. 10. P. 503.
40. Romero-Brey I., Merz A., Chiramel A., Lee J.Y., Chlanda P., Haselman U., Santarella-Mellwig R., Habermann A., Hoppe S., Kallis S., Walther P., Antony C., Krijnse-Locker J., Bartenschlager R. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication // *PLoS Pathog*. 2012. Vol. 8. P. 1003056.
41. Ricciardi S., Guarino A.M., Giaquinto L., Polischuk E.V., Santoro M., Di Tullio G., Wilson C., Panariello F., Soares V.C., Dias S.S.G., Santos J.C., Souza T.M.L., Fusco G., Viscardi M., Brandi S., Bozza P.T., Polischuk R.S., Venditti R., De Matteis M.A. The role of NSP6 in the biogenesis of the SARS-CoV-2 replication organelle // *Nature*. 2022. Vol. 606. P. 761–768.
42. Benvenuto D., Angeletti S., Giovanetti M., Bianchi M., Pascarella S., Cauda R., Ciccozzi M., Cassone A. Evolutionary analysis of SARS-CoV-2: How mutation of Non-Structural Protein 6 (NSP6) could affect viral autophagy // *J. Infect*. Vol. 2020. P. 8124–8127.
43. Mironov A.A., Beznoussenko G.V. The Regulated Secretion and Models of Intracellular Transport: The Goblet Cell as an Example // *Int. J. Mol. Sci*. 2023. Vol. 24, Is. 11. P. 9560.
44. Tirinci A., Sicking M., Hadzibeganovic D., Haßden-teufel S., Lang S. The Molecular Biodiversity of Protein Targeting and Protein Transport Related to the Endoplasmic Reticulum // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. Vol. 23. P. 143.
45. Li S., Zandi R. Biophysical Modeling of SARS-CoV-2 Assembly: Genome Condensation and Budding // *Viruses*. 2022. Vol. 14. P. 2089.
46. Mironov A.A., Sesorova I.S., Beznoussenko G.V. Golgi's way: A long path toward the new paradigm of the intra-Golgi transport // *Histochemistry and Cell Biology*. 2013, Vol. 140, Is. 4. P. 383–393.
47. Mironov A.A., Beznoussenko G.V., Sesorova I.S., Seliverstova E.V. Different Golgi ultrastructure across species and tissues: implications under functional and pathological conditions, and an attempt at classification // *Tissue and Cell*. 2017. Vol. 49, Is. 2. P. 186–201.
48. Mannar D., Saville J.W., Sun Z., Zhu X., Marti M.M., Srivastava S.S., Berezuk A.M., Zhou S., Tuttle K.S., Sobolewski M.D., Kim A., Treat B.R., Da Silva Castanha P.M., Jacobs J.L., Barratt-Boyes S.M., Mellors J.W., Dimitrov D.S., Li W., Subramaniam S. SARS-CoV-2 variants of concern: spike protein mutational analysis and epitope for broad neutralization // *Nat. Commun*. 2022. Vol. 13, Is. 1. P. 4696.