

Современные подходы в области молекулярной генетики вирусов при изучении представителей семейства *Coronaviridae*

М.В. Супотницкий

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации, 105005, Российская Федерация, Москва, Бригадирский переулок, д. 13

Поступила 01.09.2021 г. Принята к публикации 23.09.2021 г.

Существующие подозрения об искусственном происхождении пандемии COVID-19 и об использовании технологии обратной генетики для создания вируса SARS-CoV-2 требуют понимания ее возможностей в конструировании новых вирусов. Цель работы – показать, каким образом применение обратной генетики позволяет конструировать ранее не существовавшие коронавирусы, технологии и основные достижения в их создании. Для подготовки данной статьи использовалась информация, находящаяся в открытом доступе и легко проверяемая по приведенным источникам. Название технологии – «обратная генетика» – произошло из-за того, что при получении способных к размножению РНК-вирусов идут не от ДНК к РНК, как это обычно делается в клетке при синтезе белка, а наоборот, от РНК вируса к комплементарной ей ДНК (кДНК), а с нее с помощью РНК-полимеразы фага T7 – «обратно» к инфекционной РНК. Так как полученная плюс-РНК генома коронавируса имитирует клеточную матричную РНК (мРНК), она немедленно распознается машиной трансляции клетки и запускает формирование собственных инфекционных вирусных частиц. Разработано две системы обратной генетики, предполагающие получение инфекционной плюс-РНК – в условиях *in vitro* и *in vivo*. Проблема получения полноразмерной кДНК гигантского генома коронавирусов решается путем его фрагментации и последующей сшивки фрагментов с использованием стандартных подходов молекулярной биологии. В статье приведены примеры, каким образом данная технология позволяет получать синтетические коронавирусы, по свойствам неотличимые от выделенных из природы, менять круг их хозяев, усиливать вирулентность и устойчивость к специфическим антителам, влиять на патогенез болезни. Также показаны перспективы использования рекомбинантных вирусов в клеточных скрининговых анализах и моделях инфекции *in vivo* для идентификации профилактических и терапевтических подходов к лечению вирусных инфекций.

Ключевые слова: атипичная пневмония; коронавирус; межвидовая передача; обратная генетика; пандемия; COVID-19; SARS-CoV-2.

Библиографическое описание: Супотницкий М.В. Современные подходы в области молекулярной генетики вирусов при изучении представителей семейства *Coronaviridae* // Вестник войск РХБ защиты. 2021. Т. 5. № 3. С. 217–235. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-1-3-217-235>

Коронавирусы уже не менее 25 лет являются рутиной генной инженерии. Создание их рекомбинантных производных стало обычным делом в практике двух сотрудничающих/конкурирующих научных школ – Университета Северной Каролины в Чапел-Хилл (University of

North Carolina at Chapel Hill, UNC, UNC-Chapel Hill; United States) (руководитель – Ральф Стивен Барик) (Ralph Steven Baric, 1954 г.р.) [1, 2] и Уханьского института вирусологии (Wuhan Institute of Virology, WIV; China)¹ (руководитель школы – Ши Чжэнли) (Zhengli-Li Shi, 1964 г.р.) [3]. Но это

¹ Институт был основан в 1956 г. как Уханьская лаборатория микробиологии Академии наук Китая. В январе 2015 г. в институте французским подрядчиком из Лиона построена первая в КНР лаборатория с уровнем защиты BSL-4. Стоимость контракта – 44 млн долл. США. Сотрудники прошли обучение в лаборатории BSL-4 в Галвестоне, штат Техас (The Galveston National Laboratory in Galveston, Texas, United States). В но-

не единственные научные школы, экспериментирующие с геномами коронавирусов. В допандемический период исследования по изменению генома коронавирусов проводились открыто, с благородными, публично озвучиваемыми целями² – определить, какой именно белок отвечает за способность коронавирусов переходить от одного биологического вида животных к другому; могут ли они попасть от животных к людям; и могут ли распространяться воздушно-капельным путем между людьми; как создать спасительную вакцину на тот случай, «если» ..., и т.п. SARS-CoV-2 стал объектом манипуляций обратной генетики еще до объявления пандемии COVID-19³ [4]. После объявления пандемии работы по получению синтетических вариантов SARS-CoV-2 приобрели взрывной характер [4–8]. В 2021 г. были созданы клеточные и векторные системы для получения вируса в количествах, выходящих за рамки нужд диагностических исследований [8]. Получение вариантов коронавирусов летучих мышей, способных вызывать инфекцию у других видов животных и в клетках человека [9], а также вариантов SARS-CoV-2, ранее не существовавших в природе [5–8], говорит о переходе генетических исследований коронавирусов на уровень синтетической биологии [10, 11]. В условиях затянувшейся пандемии COVID-19, а также с учетом того обстоятельства, что природный резервуар SARS-CoV-2 остался не выясненным, такие исследования и их методология должны быть объектом пристального мониторинга, а его результаты – общедоступными.

Цель работы – показать, каким образом применение обратной генетики позволяет конструировать ранее не существовавшие коронавирусы, технологии и основные достижения в их создании.

Вся информация, использованная для подготовки данной статьи, находится в открытом доступе и может быть проверена по приведенным ссылкам на источники. Ее поиск проводился с помощью текстовой медицинской базы PubMed, поисковых возможностей Google Scholar, Научной электронной библиотеки

eLIBRARY.RU и научных специализированных изданий.

Первые коронавирусыные химеры. Одним из отличительных признаков вирусов семейства *Coronaviridae* является высокая специфичность к виду хозяина. Основной задачей исследований по получению коронавирусных химер в конце 1990-х гг. было выявление молекулярной основы взаимодействия коронавирусов с соответствующими им рецепторами клетки-хозяина. Ее решение облегчило бы понимание патогенеза коронавирусных инфекций, однако этому мешало незнание деталей процесса сборки вирионов. Возможность начать изучение роли отдельных белков в морфогенезе коронавируса предоставила новая технология – сборка коронавирусаподобных частиц (coronavirus-like particles, VLP) из коэкспрессируемых в культуре клеток белков М (белок мембранной матрицы), Е (мембранный белок) и гликопротеина шипа (S-белок) без участия нуклеокапсида вируса (белок N). VLP высвобождались из клеток и образовывали гомогенную популяцию, морфологически неотличимую от нормальных вирионов [12].

Белки М и Е могли самостоятельно образовывать VLP. Роль S-белка в сборке вириона и его почковании оставалась непонятной. Он сам транспортировался к плазматической мембране и удерживался в комплексе Гольджи за счет его ассоциации с белком М. S-мультимеры каким-то образом специфически вписывались в пустоты массивов мономеров М (или М и Е), но они не вносили особого вклада в стабильность VLP [13]. Стало очевидным, что S-белок, хотя и не требуется для сборки вируса, необходим ему для какой-то иной важной функции – например, для инфицирования клетки [14].

Чтобы доказать роль S-белка в специфическом узнавании рецепторов на поверхности клеток-мишеней и, таким образом, показать его участие в иницировании инфекционного процесса, L. Куо с соавт.⁴ [14] сконструировали *мутант* вируса гепатита мышей (mouse hepatitis virus, MHV), у которого эктодомен гли-

вом лабораторном здании – 3000 м² площади BSL-4, а также 20 лабораторий BSL-2 и две лаборатории BSL-3. Объекты BSL-4 были аккредитованы Китайской национальной службой аккредитации для оценки соответствия (CNAS) в январе 2017 г., а лаборатория уровня BSL-4 была введена в эксплуатацию в январе 2018 г. См. https://en.wikipedia.org/wiki/Wuhan_Institute_of_Virology (дата обращения: 25.05.2021).

² Подробно о манипуляциях с геномом коронавирусов, предшествующих пандемии COVID-19, можно прочесть в научном «эссе» российского ученого Юрия Дейгина. В этой же работе Юрий Дейгин предлагает подходы к определению признаков вмешательства в геном вирусов. См. Deigin Y. Lab-Made? SARS-CoV-2 Genealogy through the Lens of Gain-of-Function Research. <https://yurideigin.medium.com/lab-made-cov2-genealogy-through-the-lens-of-gain-of-function-research-f96dd7413748> (дата обращения: 16.06.2021).

³ Название новой болезни и вызвавшего ее вируса было определено ВОЗ 11.02.2020 г. следующим образом: возбудитель болезни – коронавирус острого респираторного синдрома 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARSCoV-2). Болезнь – коронавирусное заболевание 2019 (Coronavirus Disease 2019, COVID-19).

⁴ Работа выполнена в David Axelrod Institute, Wadsworth Center for Laboratories and Research, New York State Department of Health, Albany (New York 12201) и Institute of Virology, Department of Infectious Diseases

копротеина шипа (S-белок) был заменен сильно дивергировавшим эктодоменом гликопротеина шипа вируса инфекционного перитонита кошек (feline infectious peritonitis virus, FIPV). MNV и FIPV относятся к двум разным группам коронавируса и каждая из них высокоспецифична для соответствующего вида хозяина. S-белки MNV и FIPV имеют только 26% общей аминокислотной идентичности, их наибольшее расхождение происходит в аминоконцевой половине каждой молекулы. Они распознают разные рецепторы: MNV – членов семейства билиарных гликопротеинов мышей; FIPV – кошачью аминопептидазу N (fAPN).

Полученный жизнеспособный химерный вирус, обозначенный как fMNV, приобрел способность *пересекать видовой барьер* – т.е. инфицировать клетки кошек, и одновременно он потерял способность инфицировать клетки мыши в культуре ткани. Это реципрокное переключение видовой специфичности убедило исследователей в том, что диапазон клеток-хозяев коронавируса определяется, в первую очередь, на уровне взаимодействий между S-белком и рецептором вируса на клетке хозяина. S-белок коронавируса – основной и, возможно, единственный фактор его видовой специфичности. В то же время исследователи отдавали себе отчет в ограниченности использованного ими метода сайт-специфического мутагенеза для исследований экспрессии и функции генов из-за чрезвычайно большого размера генома коронавируса – 28–32 т.п.н. [14].

Разработка обратной генетической системы конструирования коронавируса. Получение полноразмерной кДНК⁵ гигантского (для вирусов!) генома, да еще в сочетании с участками нестабильности, способной в пермиссивных клеточных линиях сформировать полную инфекционную РНК вируса – для молекулярных биологов 1990-х гг. было сложной задачей. В начале нулевых годов ее решила группа Ральфа Баррика, пойдя по пути деконструкции РНК-генома коронавируса на фрагменты кДНК, полученные с помощью ОТ-ПЦР⁶ или химическим синтезом. Затем эти фрагменты последовательно сшивали в соответствии с последовательностью РНК-цепи вируса, максимизируя стабильность генома. При необходимости вносили нуклеотидные замены в отдельные фраг-

менты. Полноразмерную кДНК вируса в условиях *in vitro* использовали в качестве матрицы для транскрипции РНК с помощью РНК-полимеразы фага T7. Полученная плюс-РНК генома коронавируса имитирует клеточную мРНК. Поэтому при введении в пермиссивную клетку она немедленно распознается ее машиной трансляции и запускает формирование собственных инфекционных вирусных частиц. То есть создатели такого способа синтеза вирусов пошли в «обратную сторону» – не от ДНК к РНК, как это обычно делается в клетке при синтезе белка, а наоборот, от РНК вируса к его кДНК, с нее – «обратно» к инфекционной РНК. Нуклеотидные замены и делеции, внесенные в кДНК-фрагменты перед их сшивкой в полноразмерную кДНК вируса, после транскрипции с нее РНК и образования вирусных частиц, если не знать об их искусственном происхождении, будут в эпидемических цепочках рассматриваться как мутации природного штамма вируса, например, Wuhan-Hu-1. В этом суть работы обратной генетической системы (англ. reverse genetic system, RGS) конструирования коронавируса [15].

В настоящее время для получения синтетических коронавируса используются две системы обратной генетики, предполагающие получение инфекционной плюс-РНК в условиях *in vitro* [4–6, 16], а также две системы, позволяющие получение инфекционной плюс-РНК вируса в условиях *in vivo* [7, 8].

Получение инфекционной плюс-РНК коронавируса в условиях *in vitro*. Первопроходцами этой технологии стала группа Ральфа Баррика. Используя вирусы трансмиссивного гастроэнтерита (transmissible gastroenteritis virus, TGEV) и гепатита мышей (штамм MNV-A59), тогда наиболее изученных среди коронавируса, они собрали полноразмерные кДНК обоих вирусов. На плаزمиде были получены субклоны кДНК, охватывающие весь геном вируса. Затем субклоны кДНК «сшивали» вместе в условиях *in vitro* и получали интактную конструкцию кДНК, полностью соответствующую исходной плюс-цепи РНК коронавируса. Признаков сборки полноразмерной кДНК не оставалось. Транскрипты, полученные из полноразмерной кДНК коронавируса, с помощью электропорации вводили в пермиссивные клеточные линии

and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, and Institute of Biomembranes, Utrecht University (3584 CL Utrecht, The Netherlands).

⁵ кДНК (комплементарная ДНК, англ. cDNA) – ДНК, синтезированная на матрице зрелой мРНК в реакции, катализируемой обратной транскриптазой.

⁶ ПЦР с обратной транскрипцией (англ. – reverse transcription polymerase chain reaction, ОТ-ПЦР) – метод амплификации специфического фрагмента рибонуклеиновой кислоты (РНК). Одноцепочечную молекулу РНК превращают в реакции обратной транскрипции (ОТ, англ. – RT, reverse transcription) в комплементарную ДНК (кДНК) и далее амплифицируют уже одноцепочечную молекулу ДНК, используя традиционную ПЦР.

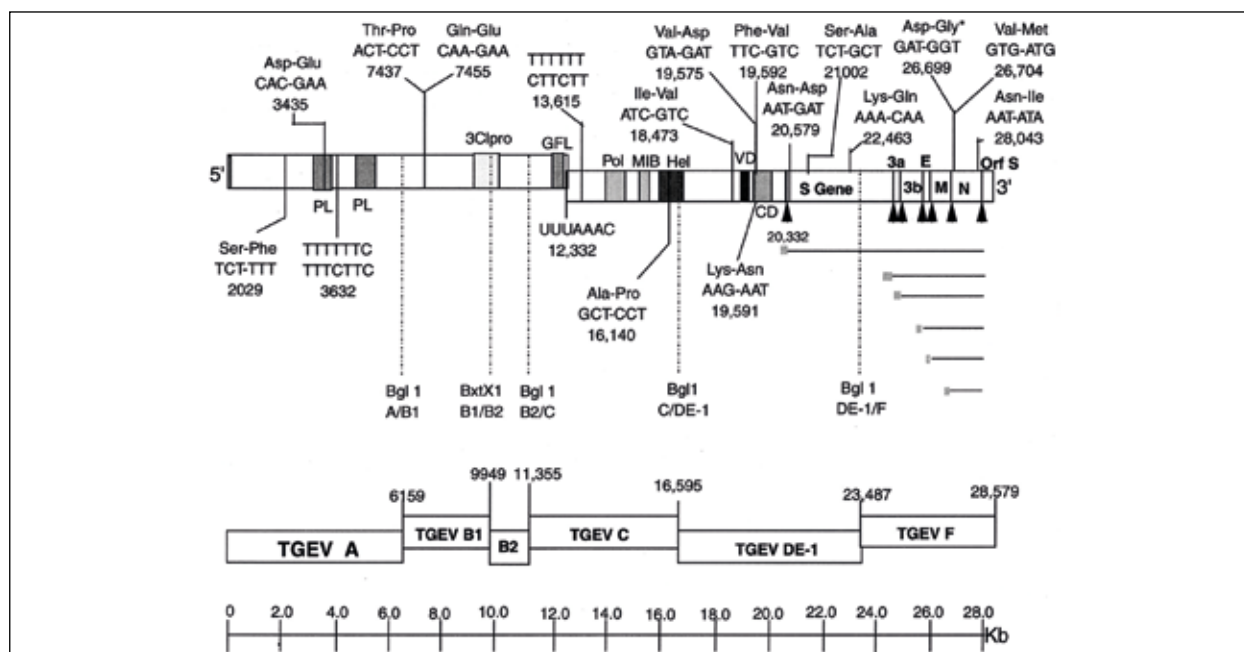


Рисунок 1 – Обратная генетическая система конструирования коронавируса. Показана общая схема сборки шести клонов кДНК (TGEV A–TGEV F) в полноразмерную кДНК TGEV. Вирус, полученный из бляшек, эффективно реплицировался и проявлял сходную морфологию бляшек в перmissive клеточных линиях. Цифровые обозначения соответствуют положению нуклеотидов в геноме вируса. Сокращения: BglI и VxtX1 – рестрикционные эндонуклеазы класса IIS и IIG, формировавшие «липкие концы», по которым шло бесшовное соединение клонов кДНК; PL – папаин-подобная протеаза; GFL – домен, подобный фактору роста; Pol – полимеразный мотив; MIB – металл-связывающий мотив (metal-binding motif); Hel – мотив геликазы; VD – варибельный домен; CD – консервативный домен; ↑ – межгенные начала (intergenic starts). Подробности в статье В. Yount с соавт. [1]

(Vero E6) и в них начиналась сборка полноценных, обладающих инфекционностью, вирусных частиц⁷ [1, 2]. Общая схема сборки клонов кДНК TGEV в полноразмерную кДНК инфекционного РНК-вируса показана на рисунке 1.

Полный геном SARS-CoV Urbani был собран этим же способом в виде шести смежных субклонов. Через уникальные сайты рестрикционной эндонуклеазы BglI их соединяли (лигировали) в полноразмерную кДНК вируса и в условиях *in vitro* использовали в качестве матрицы для транскрипции РНК с помощью РНК-полимеразы фага T7. Полученные РНК-транскрипты вводили в перmissive клетки с помощью электропорации, где по ним

клеточная машина трансляции формировала инфекционные вирусные частицы [1].

Эта же технология, адаптированная Х. Хие с соавт.⁸ [5, 6] для получения синтетических производных SARS-CoV-2, представлена на рисунке 2. Она позволяет: 1) генерировать мутантные и репортерные SARS-CoV-2 и другие вирусы путем манипулирования плазмидой, содержащей фрагмент кДНК с необходимой мутацией (или мутациями), снижая риск нецелевых мутаций или делеций, непреднамеренно включенных в рекомбинантный вирус; 2) одновременно манипулировать множественными мутациями из разных фрагментов кДНК, так как для создания комбинаторных мутантных вирусов можно

⁷ Работа выполнена в Department of Epidemiology, School of Public Health, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina; Department of Pediatrics and Microbiology and Immunology, Elizabeth B. Lamb Center for Pediatric Research, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Tennessee; Department of Microbiology, School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania; Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina.

⁸ Работа выполнена в Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Texas Medical Branch, Galveston TX, США. Она уникальна еще и тем, что на 40 страницах на примере SARS-CoV-2 приведено детальное описание 108 этапов получения синтетических коронавируса с указанием возможных ошибок и критических точек при их выполнении. Например, раздел «TROUBLESHOOTING» (поиск и устранение ошибок) стоит посмотреть просто из любопытства [6]. В целом методика получения SARS-CoV-2 расписана так подробно, как расписывают лабораторную работу на младших курсах университетов. В этом же учреждении проходили стажировку китайские ученые из Института вирусологии в Ухани (URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Wuhan_Institute_of_Virology; дата обращения: 25.05.2021).

параллельно сконструировать более одной мутации из разных фрагментов кДНК. Такая гибкость важна при характеристике комбинаторного эффекта нескольких вирусных мутаций на иммунный ответ хозяина или течение болезни; 3) быстро вставлять в геном искусственного вируса мутации, обнаруженные у новых клинических изолятов или проводить замены участков генома исходного вируса на аналогичные родственных коронавирусов животных.

Т.Т.Н. Thao с соавт. [4] предложили платформу для сборки крупных геномов коронавирусов, альтернативную платформе Ральфа Барика⁹. Их платформа использует для создания синтетических РНК-вирусов дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Обоснованием использования системы клонирования в дрожжах является способность дрожжей рекомбинировать перекрывающиеся фрагменты ДНК *in vivo*, что позволило разработать метод, названный клонированием с рекомбинацией, связанной с трансформацией (англ. transformation-associated recombination cloning, TAR). Субгеномные фрагменты вирусов были созданы Т.Т.Н. Thao с соавт. [4] с использованием вирусных изолятов, клонированной вирусной ДНК, клинических образцов или синтетической ДНК, а затем эти фрагменты были повторно собраны в один геном в *S. cerevisiae* с использованием технологии TAR, позволяющей сохранить полученный рекомбинант в качестве искусственной хромосомы в дрожжах¹⁰ [17]. Затем с помощью РНК-полимеразы Т7 получали инфекционную РНК репликационно способно-

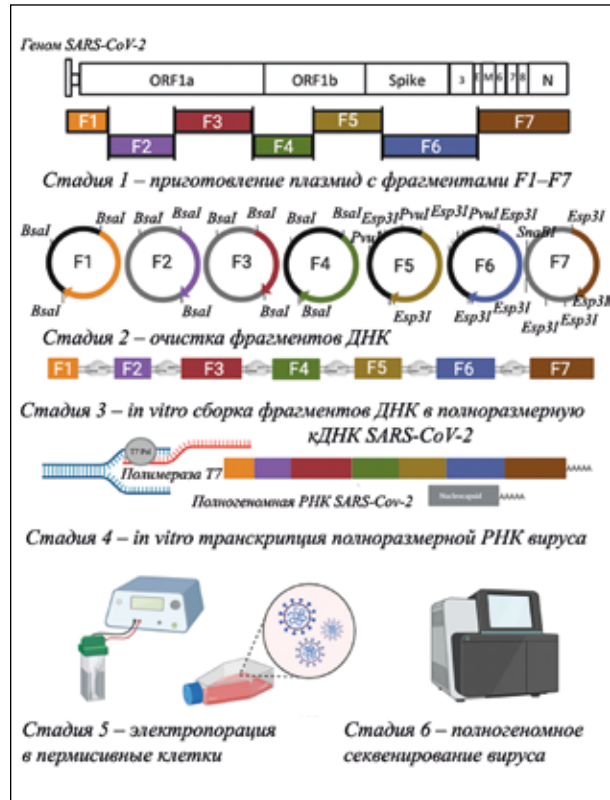


Рисунок 2 – Основные шесть стадий получения синтетического SARS-CoV-2 и его производных при получении плюсРНК вируса в условиях *in vitro*. Стадии разделены на 108 этапов. Стадии 1–4 выполняют в общей лаборатории. Процедуры стадий 5–6, связанные с манипуляциями с SARS-CoV-2, должны выполняться в лаборатории уровня биобезопасности 3 (BSL-3).

Стадия 1 – приготовление семи плазмид, содержащих фрагменты F1–F7 SARS-CoV-2. Нежелательные мутации в плазидах перед сборкой полноразмерной ДНК SARS-CoV-2 исключаются рестрикционным анализом и секвенированием по Сэнгеру. **Стадия 2** – подготовка высококачественных фрагментов ДНК для последующих экспериментов путем переваривания (гидролиза) рестриктазами плазмид. **Стадия 3** – сборка семи фрагментов ДНК в полноразмерную ДНК SARS-CoV-2 в условиях *in vitro* с использованием ДНК-лигазы Т4. Полноразмерный продукт лигирования немедленно очищают фенол-хлороформной экстракцией и осаждением изопропанолом. **Стадия 4** – транскрипция в условиях *in vitro* полноразмерной РНК и РНК N-гена. **Стадия 5** – электропорация в перmissive клетки (Vero E6 или ВНК-21 и VeroE6) полноразмерной РНК вируса и выделение рекомбинантного вируса SARS-CoV-2 из клеточной культуры. **Стадия 6** – полногеномное секвенирование вируса по Сэнгеру для проверки всей последовательности генома полученного вируса.

По X. Xie с соавт. [6]

⁹ Работа выполнена в Institute of Virology and Immunology (IVI), Switzerland; Department of Infectious Diseases and Pathobiology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Switzerland; Graduate School for Biomedical Science, University of Bern, Switzerland; Institute of Veterinary Bacteriology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Switzerland; Institute for Infectious Diseases, University of Bern, Switzerland; Department for Molecular and Medical Virology, Ruhr-Universität Bochum, Germany; Institute of Virology, Charité-Universitäts corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, и Berlin Institute of Health, Germany; German Centre for Infection Research, associated partner Charité, Berlin, Germany; Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Москва, Российская Федерация.

¹⁰ Искусственные хромосомы дрожжей (англ. yeast artificial chromosome, YAC) – это хромосомы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, предназначенные для клонирования генов. Основными компонентами YAC являются автономно реплицирующаяся последовательность, центромера и теломеры *S. cerevisiae*. Для отбора трансформированных дрожжевых клеток используются гены селективируемых маркеров, таких как устойчивость к антибиотикам или визуализируемый маркер. В такую хромосому можно вставлять фрагменты ДНК размером от 100 до 1000 т.п.н.

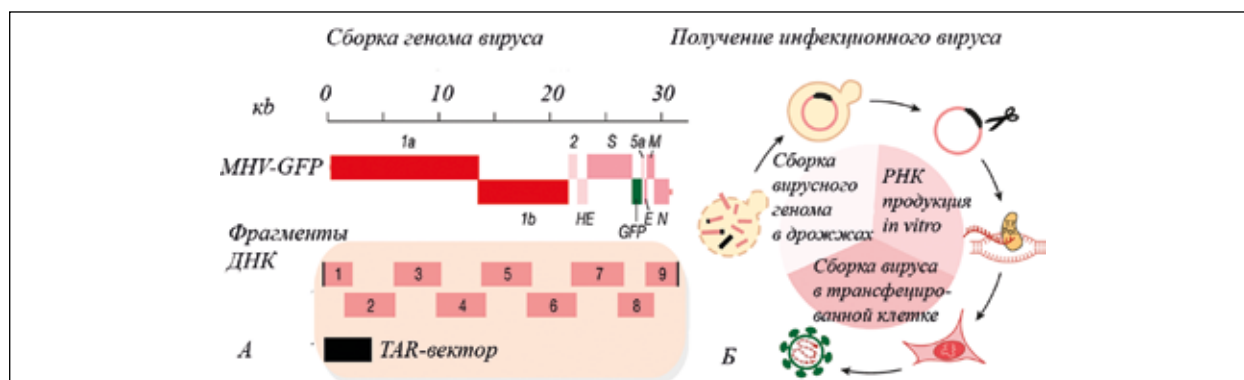


Рисунок 3 – Схема создания синтетического инфекционного коронавируса с помощью технологии TAR. А. Вирусную РНК получали из клеток 17С1-1 мыши, инфицированных МНВ-ГФР, и использовали для амплификации с помощью ОТ-ПЦР перекрывающихся фрагментов ДНК, охватывающих геном МНВ-ГФР от 2024 до 29672 нуклеотида. Фрагменты ДНК, содержащие 5' и 3'-концы, были клонированы на вирусе осповакцины, амплифицированы с помощью ПЦР. Б. Все фрагменты ДНК были одновременно трансформированы в *S. cerevisiae* (штамм VL6-48N). Трансформированные фрагменты ДНК собирали путем гомологичной рекомбинации в дрожжах для создания ЯАС, которая содержит полную последовательность вирусной кДНК. Производство инфекционной экпированной вирусной РНК в условиях *in vitro* начинается с выделения ЯАС с последующей линейризацией плазмиды, чтобы обеспечить матрицу ДНК для транскрипции РНК вируса РНК-полимеразой Т7. Получение инфекционного вируса иницируется электропорацией клеток ВНК-МНВ-Н, после чего производство и амплификация вируса осуществляются путем культивирования вируса в перmissive линиях клеток. Подробное описание технологии см. в работе Т.Т.Н. Thao с соавт. [4]

го вируса. Первоначально эта технология отрабатывалась на МНВ А59 (рисунок 3).

Для оценки возможности применить платформу синтетической геномики к другим коронавирусам, исследователи воссоздали МЕРS-СoV из восьми перекрывающихся фрагментов ДНК. В результате были получены рекомбинантные гМЕРS-СoV и гМЕРS-СoV-ГФР. Этим экспериментом они показали, что платформа синтетической геномики подходит для модификации генома коронавируса. Синтетический гМЕРS-СoV-ГФР уникален тем, что содержал вставку гена зеленого флуоресцирующего протеина (англ. green fluorescent protein, GFP), состоящего из 238 аминокислот (ММ 27 кДа). Клоны синтетических вирусов пассировали на перmissive клетках 15–17 раз, последующее секвенирование показало, что полученные геномы стабильно сохранялись в процессе пассажей.

Далее Т.Т.Н. Thao с соавт. [4] клонировали несколько других коронавирусов: НСoV-229Е2, НСoV-НКУ1 (GenBank: NC_006577), МЕРS-СoV-Riyadh-1734-2015 (GenBank: MN481979); и вирусов других семейств – таких, как вирус ЗИКА из семейства Flaviviridae (GenBank: KX377337) и респираторно-синцитиальный вирус человека

из семейства Pneumoviridae (hRSV). Клонирование этих вирусных геномов с помощью технологии TAR во всех случаях было успешным вне зависимости от источника вируса, матрицы нуклеиновой кислоты или количества фрагментов ДНК. Клонирование hRSV-B осуществлено без какой-либо предварительной информации о генотипе вируса, непосредственно из клинического образца (носоглоточный аспират), из четырех перекрывающихся фрагментов ДНК (GenBank: MT107528). В совокупности эти результаты демонстрируют, что платформа синтетической геномики TAR обеспечивает технический прогресс для быстрого создания молекулярных клонов различных РНК-вирусов с использованием вирусных изолятов, клонированной ДНК, синтетической ДНК или клинических образцов в качестве исходного материала.

Получение инфекционной плюсРНК непосредственно в перmissive клетках. Системы данного типа отличаются от описанных выше отсутствием этапа подверженной ошибкам транскрипции кДНК в условиях *in vitro*. Первая такая система обратной генетики была создана в 2020 г. Ye Ch. с соавт.¹¹ [7] на ос-

¹¹ Работа выполнена в Texas Biomedical Research Institute, San Antonio, Texas, USA; Department of Veterinary Microbiology, University of Ilorin, Ilorin, Nigeria; Department of Molecular and Cell Biology, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Madrid, Spain; Department of Immunology and Microbiology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA.

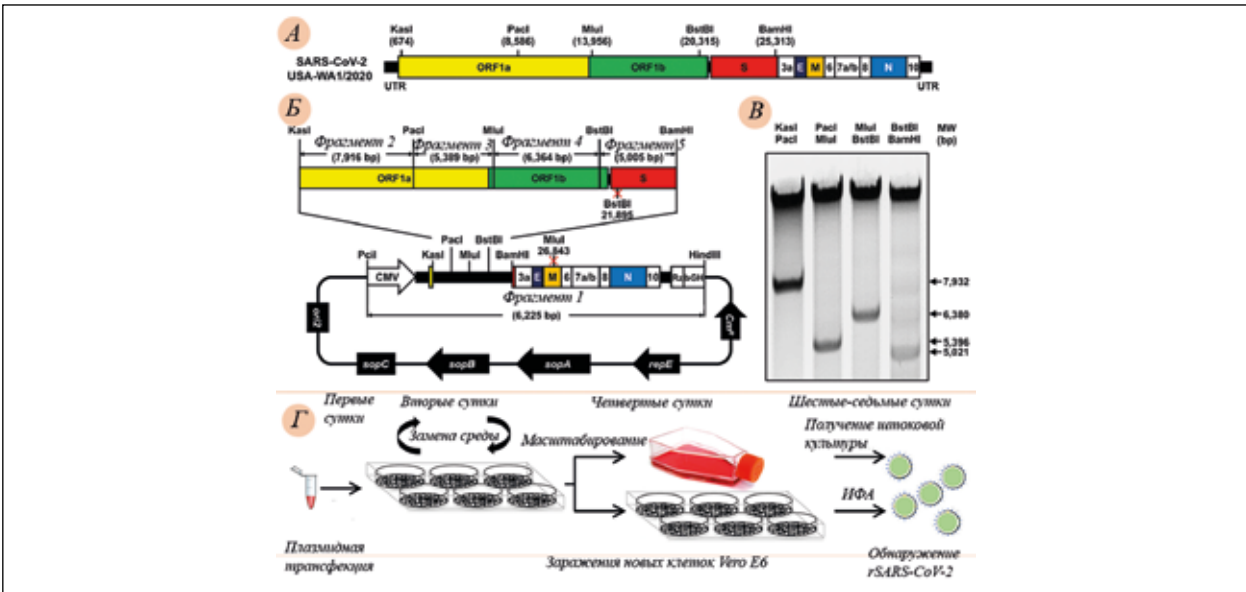


Рисунок 4 – Сборка синтетического генома SARS-CoV-2 в BAC и получение синтетического вируса непосредственно в перmissive клетках. А. Схематическое изображение генома SARS-CoV-2. Указанные сайты рестрикции использовали для клонирования всего вирусного генома (29903 нуклеотида) SARS-CoV-2 (штамм USA-WA1/2020) в плазмиду pBeloBAC. Показаны открытые рамки считывания структурных белков 1a, 1b, шипа (S), оболочки (E), матрицы (M) и нуклеокапсида (N) и дополнительных белков (2a, 6, 7a, 7b, 8 и 10). UTR. Длина не в масштабе. Б и В. Сборка вирусного генома. Б. Полноразмерный клон инфекционной кДНК собирали путем последовательного клонирования в плазмиду pBeloBAC химически синтезированных фрагментов с 1 по 5, покрывающих весь вирусный геном, в плазмиду с использованием указанных сайтов рестрикции под контролем промотора цитомегаловируса (CMV); клон был фланкирован на 3'-конце рибозимом (Rz) вируса гепатита дельта (HDV) и последовательно терминирующей и полиаденилированной бычьего гормона роста (bGH). Указана длина каждого из химически синтезированных вирусных фрагментов. Ori2 указывает участок начала репликации BAC. *sopA*, *sopB* и *sopC* – элементы плазмиды, гарантирующие, что каждая бактериальная клетка получит копию BAC. *СтR* указывает на ген устойчивости к хлорамфениколу. В. После сборки ДНК клона BAC, несущего весь вирусный геном, переваривали указанными рестрикционными ферментами (вверху), и продукты ДНК анализировали в 0,5 % агарозном геле. Г. Схематическое изображение подхода к спасению rSARS-CoV-2. Клетки Vero E6 трансфицировали BAC SARS-CoV-2. Через 24 ч среду для трансфекции заменяли на среду для постинфекции. На 4-е сутки клетки вносили во флаконы T75 и супернатант культуры клеток использовали для заражения новых клеток Vero E6. Через 48 ч после инфицирования в клетках Vero E6 с помощью иммунофлуоресценции обнаруживали rSARS-CoV-2. В качестве контроля эксперимента клетки Vero E6 трансфицировали BAC. По Ch. Ye с соавт. [7]

нове бактериальной искусственной хромосомы (BAC)¹². Она использована для генерации инфекционного рекомбинантного SARS-CoV-2 (rSARS-CoV-2), проявляющего в условиях *in vivo* признаки, аналогичные свойствам природного изолята вируса.

Исследователи химически синтезировали пять фрагментов генома штамма SARS-CoV-2, выделенного из мазка, взятого из ротоглотки

пациента с симптомами респираторного заболевания в округе Снохомиш, штат Вашингтон (США). Они были собраны в плазмиде pBeloBAC¹³ с использованием стандартных подходов молекулярной биологии (рисунок 4).

Чтобы облегчить сборку вирусного генома, в него включили генетические метки, позволяющие отличить клон rSARS-CoV-2 от природного изолята – две молчащие мутации. Одна – в гене

¹² Бактериальная искусственная хромосома (англ. bacterial artificial chromosome, BAC) – это конструкция ДНК, основанная на функциональной плазмиде фертильности (или F-плазмиде), используемой для трансформации и клонирования бактерий, обычно *E. coli*. F-плазмиды содержат гены разделения, которые способствуют равномерному распределению плазмид после деления бактериальных клеток. Обычный размер вставки бактериальной искусственной хромосомы составляет 150–350 т.п.н.

¹³ pBeloBAC – однокопийный плазмидный вектор, реплицирующийся в кишечной палочке. Предназначен для создания BAC. Подробное описание см. https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=basic_cloning_vectors&plasmid=pBeloBAC11 (дата обращения: 20.07.2021).

S-белка (21895 нуклеотид), другая – в гене M-белка (26843 нуклеотид); удалив сайты рестрикции BstBI и MluI соответственно (рисунок 4Б).

Для восстановления rSARS-CoV-2 клетки Vero E6 трансфицировали ВАС SARS-CoV-2 и ВАС (контроль), и в сравнении с контролем отслеживали наличие цитопатического эффекта в клетках, проявлявшегося через 72 ч после трансфекции. Продукция инфекционного вируса (пассаж 0) трансфицированными клетками составляла $3,4 \times 10^5$ БОЕ/мл¹⁴ (рисунок 4Г). Восстановление rSARS-CoV-2 было подтверждено обнаружением вирусного антигена в клетках Vero E6, инфицированных супернатантами культур клеток, собранных ранее из культур клеток Vero E6, трансфицированных SARS-CoV-2 ВАС.

Несколькими месяцами позже аналогичная система разработана S. Rihn с соавт.¹⁵ [8]. От описанной выше системы Ch. Ye с соавт. [7] она отличается тем, что для введения ДНК, кодирующей плюсРНК вируса в перmissive клетки, используется не ВАС, а *плазмидный вектор*. Прямую визуализацию и количественную оценку реплицирующегося вируса в клетках обеспечивали кассеты, содержащие маркеры. Исследователи назвали ее *плазмидной системой обратной генетики* (англ. reverse genetics, RG). Ими с использованием низкокопийной

плазмиды pCC1-4K (не содержащей фактора F, отвечающего за конъюгацию плазмиды) на основе вируса Wuhan-Hu-1 создан инфекционный клон кДНК (icDNA) SARS-CoV-2.

Геном icDNA SARS-CoV-2 собран из 5 синтетических фрагментов ДНК, каждый из которых фланкирован уникальными сайтами рестрикции SanDI (1524)¹⁶, PacI (8586), MluI (13956), Bsu36I (18176) и BamHI (25313). Промотор цитомегаловируса человека (CMV) был вставлен в положение, соответствующее 5'-концу генома; двойной рибозим вируса гепатита (HDV)¹⁷ и терминатор вируса обезьяны 40 (SV40) были добавлены после поли-А-хвоста 3'-конца вирусного генома. Эти элементы обеспечивают эффективную транскрипцию и гомогенный процессинг 3'-конца во время спасения инфекционного вируса. Прямую визуализацию и количественную оценку реплицирующегося вируса в клетках обеспечивали кассеты, содержащие последовательности, кодирующие флуоресцентные (mCherry и ZsGreen) и биолюминесцентные (нанолюцифераза или NLuc) белковые маркеры¹⁸, вставленные в остов плазмиды. Чтобы избежать делеции вирусных последовательностей, маркеры были клонированы внутри рамки считывания (in-frame) ближе к С-концу белка ORF7a с использованием линкера «пропуска рибосом» (2A) вируса ящура 2A19. Так

¹⁴ Бляшкообразующая единица, БОЕ (plaque-forming unit, PFU) – наименьшее количество вируса, способное вызвать образование одной негативной колонии («бляшка») соответственно на однослойной культуре клеток позвоночных или на агаровой культуре бактерий.

¹⁵ Работа выполнена в MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research (CVR), Glasgow, United Kingdom; Institute of Technology, University of Tartu, Tartu, Estonia; MRC Protein Phosphorylation and Ubiquitylation Unit, School of Life Sciences, University of Dundee, Dundee, United Kingdom; Institute of Biodiversity, Animal Health and Comparative Medicine, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom; Emerging Viruses, Inflammation and Therapeutics Group, Menzies Health Institute Queensland, Griffith University, Gold Coast, Queensland, Australia; Division of Biological Sciences, College of Arts and Sciences, University of the Philippines Visayas, Miagao, Iloilo, Philippines; West of Scotland Specialist Virology Centre, Glasgow, United Kingdom; Indian Immunologicals Ltd (IIL), Rakshapuram, Gachibowli Post, Hyderabad Telangana, India; Drug Discovery Unit (DDU), Wellcome Centre for Anti-Infectives Research, School of Life Sciences, University of Dundee, Dundee, United Kingdom; School of Medical Sciences, Griffith University, Gold Coast, Queensland, Australia.

¹⁶ В скобках указано положение нуклеотидного остатка в геноме вируса.

¹⁷ Рибозим вируса гепатита дельта (HDV) – некодирующая РНК (non-coding RNA), обнаруженная в геноме HDV, необходимая для его репликации. HDV – единственный известный человеческий вирус, который использует активность рибозима для заражения своего хозяина. Рибозим активен в условиях *in vivo* в отсутствии каких-либо белковых факторов.

¹⁸ mCherry – белок, входящий в группу мономерных красных флуоресцентных белков mFruits. Его природный белок-предшественник – DsRed (RFP) был выделен из кораллов рода *Discosoma* отряда морских анемонов. В отличие от DsRed, mCherry является мономерным белком и его флуоресценция более стабильна, чем у его природного предшественника. Ген mCherry содержит 711 пар оснований. Белок включает 236 аминокислот, ММ 26,7 кДа.

ZsGreen – исключительно ярко-зеленый флуоресцентный белок, полученный из рифтового коралла *Zoanthus* sp. (ММ 26,1 кДа).

NLuc – мутантная форма люциферазы (171 аминокислота, ММ 19 кДа), обладает лучшими характеристиками по сравнению с белком дикого типа.

¹⁹ 2A-пептиды (англ. 2A self-cleaving peptides) – группа пептидов длиной от 18 до 22 аминокислот. Разделяют два белка, самовырезание из полипептидной цепи происходит после трансляции. Предполагается, что при вырезании 2A-пептидов происходит не настоящее протеолитическое расщепление, а «проскок» рибосомы, в результате которого пептидная связь между остатками глицина и пролина просто не формируется.

S. Rihn с соавт. [8] удалось добиться высвобождения из белка ORF7a формирующегося репортерного белка (рисунок 5).

Разработанная S. Rihn с соавт. [8] плазмидная система обратной генетики позволяет получать репликационно-компетентный SARS-CoV-2 непосредственно из супернатантов клеточных культур. После трансфекции плазмиды в клетки ВНК-21 их помещали в шести-ячеечные планшеты и после трехсуточного подращивания супернатант с вирусом переносили в флаконы T25, содержащие клетки Vero E6. Кроме того, эта конструкция SARS-CoV-2 легко поддается генетическим манипуляциям (для изучения вариантов вируса) и вставке репортеров, таких как флюоресцентные или биолюминесцентные белки, которые могут использоваться в различных исследованиях как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, и обеспечивать прямое обнаружение и количественную оценку кинетики репликации вируса в клетке.

Изучение биологии химерных коронавируса. Исследователям необходимо было понять масштабы изменения S-белка и в какую сторону их менять для расширения специфичности коронавируса в органах и тканях традиционного хозяина, а также расширения диапазона его новых хозяев. Такие опыты велись с MHV. Диапазон хозяев и специфичность вируса пытались расширить путем его переключения с высокоспецифического рецептора (отдельные билиарные гликопротеины клеток печени мышей) на неспецифический – гепаринсульфат (линейный полисахарид, обнаруженный во всех тканях животных). Что из этого получилось, из статьи неясно. Но времена изменились. Смертоносная эпидемия SARS сместила интересы исследователей с вариаций S-белка модельных MHV и FIPV, к S-белку, обеспечивающему специфичность более опасных коронавирусов. Ключевой проблемой стал механизм, по которому они могут приобрести способность сменить «хозяина», т.е. передаваться от животного к человеку, а затем распространяться от человека к человеку²⁰ [18].

К.Е. Follis с соавт. [19] из University of Montana, (Missoula, USA) обратили внимание на отсутствие у S-белка SARS-CoV сайта расщепления фурином и фуриноподобными клеточными протеазами, что приводило к его неполному расщеплению при взаимодействии с рецептором, а, следовательно, к неиспользованию всего патогенного потенциала вируса. Эта находка противоречила существовавшим тогда представлениям об особой роли протеолитиче-

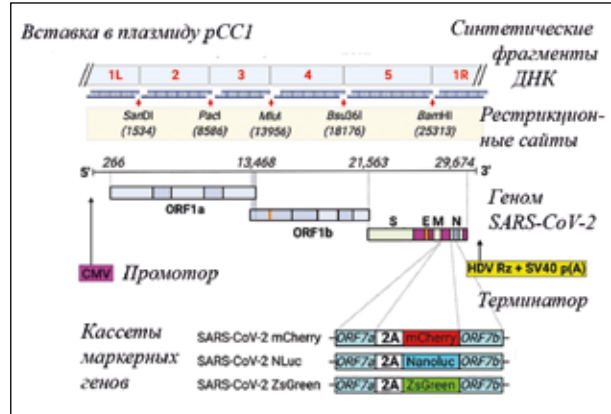


Рисунок 5 – Схема конструирования клона icDNA рСС1-4К-SARS-CoV-2-Wuhan-Hu-1. Синтетические фрагменты ДНК 1, 2 и 3 на основе последовательности SARS-CoV-2-Wuhan-Hu1 были клонированы в плазмиды рСС1 (производная от плазмиды рСС1BAC), а фрагменты 4 и 5 были клонированы в высококопийную плазмиду рUC57Кап компанией по синтезу генов (Genscript). Фрагменты были сконструированы так, чтобы они содержали специфические сайты рестрикционного клонирования *SanDI*, *PacI*, *MluI*, *Bsu36I* и *BamHI* для целей клонирования. Последовательности, кодирующие маркеры *mCherry*, *ZsGreen* и *NLuc*, клонировали в рамке считывания до С-конца белка ORF7a через линкер FMDV 2A. Значительная часть регуляторных последовательностей плазмиды рСС1 была удалена, чтобы получить плазмиду рСС1-4К (в которой отсутствует интактный фактор F). Система рСС1-4К поддерживается в количестве одной копии на клетку, что обеспечивает стабильность кДНК SARS-CoV-2. Для увеличения функциональности этой системы в геном icDNA вставлены кассеты различных репортерных молекул (например, *mCherry*, *ZsGreen* и *Nanoluciferase (NLuc)*). Сам вирусный геном был фланкирован эукариотическими промотором и терминатором.
По S. Rihn с соавт. [8]

ского созревания в структуре и функции других гликопротеинов I класса, входящих в оболочки вирусов. Расщепление S-белка клеточными протеазами требуется для обеспечения потенциала слияния гликопротеинов оболочки ретровирусов, ортомиксовирусов, парамиксовирусов, филовирусов, аренавирусов и многих коронавирусов (MHV, коронавирусы птиц, CoV OC43), так как исходно они синтезируются как неактивные предшественники. Протеолитическое расщепление им необходимо для созревания и полной функциональной активности. После последующей активации созревшего гли-

²⁰ Юрий Дейгин обратил внимание на то, что имя Ши Чжэнли появилось впервые в этой статье. Видимо, в 2005 г. она стажировалась под руководством Питера Роттиера в Утрехте (Faculty of Veterinary Medicine and Institute of Biomembranes, Utrecht University, The Netherlands). Этот институт был указан в качестве ее аффилиации.

копротеина оболочки класса I за счет связывания с рецептором и/или низкого эндосомального pH, эти комплексы претерпевают глубокую структурную реорганизацию с образованием в конечном итоге высокостабильных структур – шпилек, способствующих эффективному слиянию вирусной и клеточной мембран [20].

С помощью алгоритма МАХНОМ, использованного для выравнивания последовательностей предполагаемой области соединения S1–S2 S-гликопротеина коронавируса, К.Е. Follis с соавт. [19] обнаружили остатки фуринового сайта в гликопротеинах SARS-CoV, CoV 229E и NL63, исчезнувшего в результате спонтанных делеций. О некогда существовавшем сайте, чувствительном к протеазе, сигнализировал единственный аргинин (R) в положении 667 S-гликопротеина SARS-CoV. Введение синтетической последовательности распознавания фурина SLLR в R667, т.е. в предполагаемую область соединения S1–S2, сделало возможным эффективное расщепление S-гликопротеина с образованием дискретных субъединиц S1 и S2, и заметно увеличило способность комплекса шпилек опосредовать слияние клеток, т.е. формировать синтиций.

Отсутствие фуринового сайта у SARS-CoV, и без него приводящего к летальному исходу почти каждого десятого, заболевшего атипичной пневмонией, вызвало интерес у японских исследователей – R. Watanabe с соавт. [21] из National Institute of Infectious Diseases (Tokyo, Japan). Они ввели фуриноподобную последовательность расщепления в S-белок в аминокислотах с 798 по 801 и обнаружили, что S-белок теперь расщеплялся при экспрессии на клеточной поверхности и индуцировал слияние клеток без обработки трипсином. Кроме того, ими было обнаружено, что псевдотипированный вирус, несущий расщепленный S-белок, заражает клетки в присутствии лизосомотропного агента, а также ингибитора протеазы, оба из которых обычно блокируют проникновение SARS-CoV в клетку через эндосомы. Результаты R. Watanabe с соавт. [21] показали, что вставка фуринового сайта в S-белок SARS-CoV позволяет вирусу проникать в клетку непосредственно с ее поверхности.

Обнаружение SARS-подобных CoV (SL-CoV), идентичных по геномной организации с SARS-CoV, но отличающихся по связыванию с

ACE2²¹, поставило перед исследователями вопрос о том, насколько непреодолим для таких вирусов межвидовой барьер между людьми и летучими мышами. Иными словами, могут ли SARS-подобные CoV животных в результате случайной рекомбинации с геномами других коронавирусов приобрести способность вызывать инфекционный процесс у людей.

Первую попытку ответить на этот вопрос предприняла группа Ши Чжэнли. Для этого на основе вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) ими была сконструирована псевдовиральная система с клеточными линиями, экспрессирующими молекулы ACE2 человека, циветты или подковообразной летучей мыши. Псевдовирусы включали полноразмерный S-белок SL-CoV и SARS-CoV, и серию S-химер, включающих вставки различных последовательностей S-белка SARS-CoV в основную цепь S-белка SL-CoV. Они показали, что S-белок SL-CoV не может использовать ACE2 разных видов для входа в клетки. S-белок SARS-CoV также не может связывать молекулу ACE2 подковообразной летучей мыши *Rhinolophus pearsonii*. Однако, когда рецептор-связывающий домен (англ. receptor binding domain, RBD) S-белка SL-CoV заменяли на RBD S-белка из SARS-CoV, гибридный S-белок приобретал способность использовать человеческий ACE2 для входа в клетку (хотя и с разной эффективностью для разных конструкций), что означало структурное и функциональное сходство S-белка SL-CoV с S-белком SARS-CoV. Эти результаты предполагают, что хотя SL-CoV, обнаруженные у летучих мышей на момент проведения исследования, вряд ли заразят людей, еще предстоит выяснить, способны ли они использовать другие поверхностные молекулы определенных типов клеток человека. Также возможно, что эти вирусы могут стать инфекционными для человека, если они претерпевают вариацию N-концевой последовательности, например, путем рекомбинации с другими CoV, что, в свою очередь, может привести к продуктивному взаимодействию с ACE2 или другими поверхностными белками на клетках человека [3].

Группа Ральфа Баррика, в отличие от группы Ши Чжэнли, в исследованиях, посвященных взаимодействию «вирус-рецептор», не использовала псевдотипированные вирусы. Они считали эту систему безопасной, но слишком искусственной. Полученные на ее ос-

²¹ ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент 2, АПФ2) – рецептор входа. Позволяет SARS-подобным вирусам связаться с клеткой и инициировать их проникновение в клетку. Обнаружен на поверхности многих клеток человека, включая клетки полости носа (обонятельный эпителий), легких (мерцательные клетки бронхиального эпителия и пневмоциты), почек (клетки проксимальных канальцев почек), мочевого пузыря (уротелиальные клетки), поджелудочной железы (островки Лангерганса), кишечника (эпителиальные клетки подвздошной кишки и пищевода), мозга (нейроны и глиальные клетки), сердца (миокард), кровеносных сосудов (эндотелий).

нове результаты трудно экстраполировать на реальный инфекционный процесс, так как она в принципе не может обеспечить правильную структурную экспрессию S-белка на вирионах. Поэтому, используя методы синтетической биологии и систему обратной генетики (рассмотрены выше на примере конструирования TGEV и MHV), они получили серию изогенных штаммов, соответствующих штаммам, обнаруженным у пальмовых цветков и енотовидных собак, а также изолятов SARS-CoV, охватывающих раннюю, среднюю и позднюю фазы эпидемии атипичной пневмонии. Синтезированные ими в условиях *in vitro* рекомбинантные вирусы эффективно реплицировались в культуре клеток и демонстрировали различную чувствительность к нейтрализации антителами. Человеческие, но не зоонозные варианты вирусов, эффективно реплицировались в культурах эпителия дыхательных путей человека, подтверждая более ранние гипотезы о том, что зоонозные изоляты менее патогенны для человека, но могут развиваться в высокопатогенные штаммы. Все искусственные вирусы в перmissive линиях клеток размножались эффективно. Тяжелое поражение легких, проявляющееся диффузным альвеолярным повреждением, образованием гиалиновой мембраны, альвеолитом и смертью, было отмечено у 12-месячных мышей, зараженных интраназально штаммом пальмовой цветков HC/SZ/61/03 или вариантом SARS-CoV GZ02, выделенным во время ранней фазы эпидемии. Родственные линии штаммов SARS-CoV средней и поздней стадии эпидемии или енотовидных собак поражений легких не вызывали [22].

Этой же группой к 2008 г. был синтезирован SARS-подобный CoV размером 29,7 т.п.н. (Bat-SCoV) – вероятный, как они тогда считали, предшественник эпидемического SARS-CoV. К началу их исследования были идентифицированы четыре Bat-SCoV (HKU3-1, HKU3-2, HKU3-3 и RP3), но ни один из них не был выделен в культуре. Инфекционность этих вирусов была гипотетической, поскольку последовательности их геномной РНК получены путем ОТ-ПЦР секвенирования образцов генетического материала вирусов из фекалий или ректальных мазков летучих мышей. Для синтеза последовательности ранее не существовавшего вируса группой Ральфа Барика использовано консенсусное проектирование. Исследователи по четырём последовательностям Bat-SCoV, взя-

тым из базы GenBank (номер доступа FJ211859), спроектировали консенсусную последовательность коронавируса и «разбили» ее на фрагменты кДНК с точками соединения, точно согласованными с существующей системой обратной генетики SARS-CoV. У вируса была произведена замена домена связывания рецептора Bat-SCoV Spike (RBD) на SARS-CoV RBD (Bat-SRBD). Были использованы определенные и функциональные 5'-UTR SARS-CoV и регуляторные последовательности транскрипции, поскольку 5'-UTR Bat-SCoV оказались неполными. Синтезированные фрагменты геномной кДНК вставили в плазмидные векторы и собрали в полную размерную кДНК. Ее транскрибировали в условиях *in vitro* с получением РНК коронавируса, получившего обозначение Bat-SRBD. Он приобрел способность инфицировать культуру клеток и мышей [23].

Видимо, пришло время для объединения усилий обеих групп. В их совместной работе, имеющей, по утверждению авторов, цель «предсказать и подготовиться к будущим вирусам», методом обратной генетики был создан ранее не существовавший вирус – SHC014-MA15, способный к репликации в дыхательных путях человека и животных [9]. Для этого в нуклеотидную последовательность субъединицы S1, циркулирующей среди летучих мышей коронавируса SHC014 – ближайшего «родственника» SARS-CoV, и не проявившего себя в качестве патогена для людей из-за различия по 14 аминокислотным остаткам в участке шипа, связывающегося с ACE2 человека, были внесены точечные изменения²². Исследователи заменили нуклеотидную последовательность гена, кодирующего субъединицу S1 у SHC014, на аналогичную от SARS-CoV. Остальные гены, т.е. те, которые определяют формирование транскрипционного комплекса вирусной репликации и сборку его частиц в клетке, изменениям не подвергались²³. Новый химерный SARS-подобный коронавирус получил обозначение SHC014-MA15. Подобно SARS для инфицирования клеток легочного эпителия человека, цветоты и летучей мыши, он может использовать ACE2 в качестве рецептора-мишени и его ортолога, и реплицироваться в них до высоких титров, сравнимых с таковыми у природного штамма SARS-CoV Urbani, оставаясь по остальным генам прежним SHC014. Эксперименты в условиях *in vivo* продемонстрировали репликацию химерного

²² См. в работе Т. Sheahan с соавт. [24].

²³ Работы проводились в условиях уровня биобезопасности BSL3. Применяется для работы с микроорганизмами, которые могут вызвать потенциально смертельные заболевания при вдыхании аэрозоля. Более подробно об уровнях биобезопасности см. https://en.wikipedia.org/wiki/Biosafety_level#Biosafety_level_3 (дата обращения: 04.03.2020).

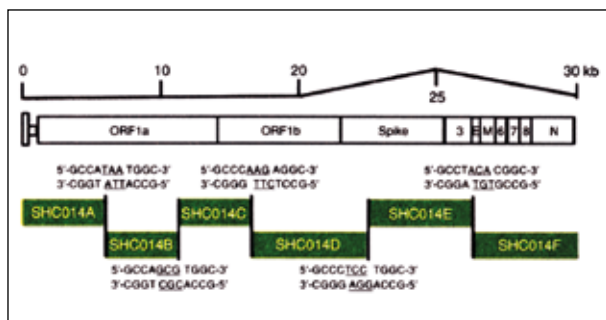


Рисунок 6 – Химерный вирус SHC014-MA15, способный к репликации в дыхательных путях человека и животных, имеющих рецептор ACE2 или его ортологи. Геномные последовательности и аминокислотные последовательности доменов S1 субъединицы шипа, репрезентативных CoV, были загружены из Genbank или Pathosystems Resource Integration Center (PATRIC). Вирусный геном синтезирован в виде шести смежных сегментов кДНК (обозначенных как SHC014A, SHC014B, SHC014C, SHC014D, SHC014E и SHC014F), фланкированных уникальными рестриктазными сайтами BglI, которые обеспечили направленную сборку полноразмерной кДНК. Новая химера оказалась более вирулентной в человеческих клетках, чем исходный вирус – SHC014 [9]

вируса в легких модельных мышей с выраженным патологическим процессом (рисунок 6)²⁴.

Но на общности способности субъединиц S1 узнавать ACE2-рецептор человека сходство обоих вирусов закончилось²⁵, проявился собственный патогенный потенциал вируса SHC014, о котором до этих экспериментов не подозревали – например, способность преодолевать искусственно созданный иммунитет. Исследователи попытались в условиях *in vitro* определить нейтрализующую эффективность в отношении SHC014-MA15 моноклональных антител (мАТ) широкого защитного спектра (109.8, SHC014-MA15, 230.15 и 227.14)²⁶, показавших хороший нейтрализующий эффект против SARS-CoV. Влияние этих антител на репликацию SHC014-MA15 оказалось незначительным, тогда как ре-

пликация SARS-CoV Urbani ими подавлялась при относительно низких концентрациях. Только использование высокой концентрации (10 мкг/мл) мАТ109.8 позволило в условиях *in vitro* достичь 50 % нейтрализации SHC014-MA15 [9].

Чтобы оценить эффективность существующих вакцин в отношении HC014-MA15, исследователи вакцинировали мышей (Balb/cAnNHsD) кандидатной двойной инактивированной цельной SARS-CoV (DIV)-вакциной. Предыдущая работа показала, что вакцина DIV может защитить мышей от заражения гомологичным вирусом [25].

Однако вакцинация от SARS-CoV не только не защищала животных от заражения HC014-MA15, но и утяжеляла течение вызванного им инфекционного процесса. Сыворотка крови, полученная от мышей, вакцинированных DIV, не смогла нейтрализовать SHC014-MA15 в условиях *in vitro* [9].

Попытка изготовить ослабленную живую вакцину на основе HC014-MA15 также оказалась неудачной. Ее использование давало незначительную перекрестную защиту от заражения SARS-CoV, что подтверждало наличие общих консервативных эпитопов, но возникли проблемы с безопасностью вакцинации. В тех дозах, которые обеспечивали некоторый защитный эффект от заражения SARS-CoV, вакцина сама вызывала патологический процесс у экспериментальных животных [9]. В целом эксперименты по получению из заражающего только летучих мышей коронавируса его генетически измененного варианта, представляющего опасность для людей, дали много для развития эпидемиологии коронавирусной инфекции. Они позволили понять существующий в природе механизм межвидового «прыжка» коронавирусов от летучих мышей к людям. Пришлось избавиться и от иллюзии, что распространение в человеческих популяциях новых видов коронавирусов, образующихся в результате рекомбинаций, может быть сдержано вакцинами, созданными в отношении видов, уже циркулирующих в природе²⁷.

²⁴ Работа в конце 2015 г. вызвала дебаты по поводу безопасности описанных экспериментов. Саймон Уэйн-Хобсон (Simon Wain-Hobson), вирусолог из Института Пастера в Париже (Pasteur Institute in Paris), отметил, что исследователи создали новый вирус, который «замечательно хорошо растет» в клетках человека. «Если вирус вырвется, никто не сможет предсказать траекторию». См. <https://www.nature.com/news/engineered-bat-virus-stirs-debate-over-risky-research-1.18787> (дата обращения: 01.03.2020). Еще менее надежно можно «предсказать траекторию», если не проводить такие эксперименты.

²⁵ Более подробно о структуре, функции и эволюции S-белка можно прочитать в работе F. Li [26].

²⁶ По уменьшению количества бляшек на клетках Vero E6 после совместного инкубирования мАТ и вируса.

²⁷ Интересен и состав исследовательских организаций: Departments of Epidemiology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC (США); Microbiology and Immunology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC (США); National Center for Toxicological Research, Food and Drug Administration, Jefferson, AR (США); Department of Cell Biology and Physiology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC (США); Marsico Lung Institute/Cystic Fibrosis Center, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC (США); Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona, Switzerland Institute of Microbiology,

Поиски подходов к конструированию синтетических CoV и изучению их биологических свойств все чаще выводили исследователей на вирусные химеры, не контролируемые вакцинацией. С таким явлением столкнулись исследователи Icahn School of Medicine at Mount Sinai (New York, NY), создавшие на основе адаптированного к мышам SARS-CoV Urbani и S-белка вируса WIV1-CoV китайских подковоносцев химерный вирус WIV1-MA15, у которого S-белок SARS-CoV был заменен на аналогичный из WIV1-CoV. Оказалось, что вакцинация двумя разными инактивированными вакцинами на основе SARS-CoV не смогла обеспечить защиту иммунизированных мышей от WIV1-MA15 [27].

Биологические свойства искусственных SARS-CoV-2. Для платформ обратной генетики коронавирусов получение SARS-CoV-2 – не более, чем частный случай. Судя по заявлениям авторов опубликованных работ, обратные генетические системы, обеспечивающие быстрый синтез инфекционных штаммов SARS-CoV-2 дикого типа, его мутантных и репортерных штаммов, разрабатываются исключительно для изучения патогенеза вирусной инфекции, механизмов передачи, разработки методов терапии и создания вакцин [5, 6]. Используя такой клон, можно оценить эффект генетических изменений вируса, удалив определенные последовательности из SARS-CoV-2 и изучив их влияние на репликацию вируса, процессинг S-белка, его иммуногенные и токсические свойства. Рекомбинантные SARS-CoV-2 (rSARS-CoV-2) обычно сравнивают с их природными изолятами по всей линейке маркеров, используемых для характеристики вируса. Клоны синтетических SARS-CoV-2 сохраняли стабильность на уровне исходных штаммов при 15–17-кратном пассировании в культурах клеток при сохранении геномов [4]. Чтобы дополнительно охарактеризовать генетическую идентичность rSARS-CoV-2 исходному штамму, используют секвенирование и рестрикционный анализ. Кинетика роста, пиковые титры, цитопатический эффект обычно аналогичны исходному штамму, выход вируса трансфицированными клетками мог составлять от $3,4 \times 10^5$ БОЕ/мл [7] до $2,9 \times 10^6$ БОЕ/мл вируса [5]. Восстановление rSARS-CoV-2 также подтверждалось обнаружением вирусного антигена в клетках Vero E6, инфицированных супернатантами, собранных ранее из культур клеток Vero E6, трансфицированных rSARS-CoV-2 [7].

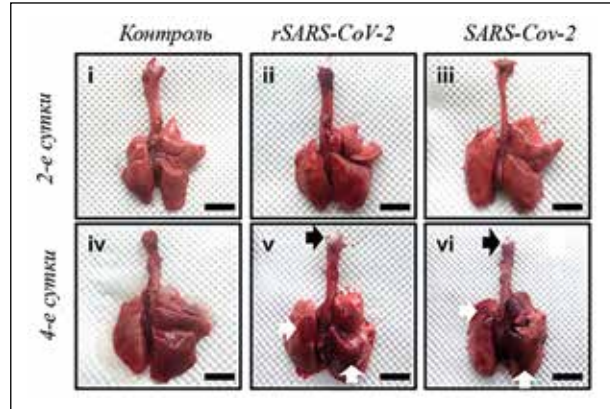


Рисунок 7 – Сравнение поражающей способности рекомбинантного и природного SARS-CoV-2. У животных, инфицированных rSARS-CoV-2 (ii) и SARS-CoV-2 (iii), на 2-е сут после инфицирования в легких наблюдалась умеренная мультифокальная гиперемия и уплотнение. Грубые патологические поражения в легких были выражены на 4-е сут после инфицирования, с тяжелым мультифокальным или локально обширным застоем и консолидацией (белые стрелки) на 40–50% поверхностей легких (v и vi). Эти поражения были широко распространены, охватывая как правую (краниальную, медиальную и каудальную доли), так и левую долю легких. В частности, наличие пенистого экссудата (черные стрелки) в трахее хомяков, инфицированных rSARS-CoV-2 или SARS-CoV-2, на 4-е сут постинфекции указывает на продолжающуюся бронхопневмонию. Значительных различий в патологических поражениях легких и титрах вирусов в оба дня после инфицирования между животными, инфицированными rSARS-CoV-2 или SARS-CoV-2, не наблюдалось [7]

Для сравнительных экспериментов по изучению свойств генетически измененных и природных вариантов rSARS-CoV-2 в условиях *in vivo* в настоящее время используют золотистых сирийских хомяков (*Mesocricetus auratus*) [28]. Ch. Ye с соавт. [7] для подтверждения того, что rSARS-CoV-2 проявляет ту же способность к репликации, вирулентность и патогенность, что и естественный изолят SARS-CoV-2, инфицировали обоими штаммами золотых сирийских хомяков интраназально в дозе 2×10^4 БОЕ. На 2-е и 4-е сут после инфицирования они извлекли верхние и нижние дыхательные пути у инфицированных животных, а также у контрольной группы животных и оценили общие патологические изменения

ETH Zurich, Zurich (Швейцария); Department of Cancer Immunology and AIDS, Dana-Farber Cancer Institute (США); Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston Massachusetts (США); Key Laboratory of Special Pathogens and Biosafety, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences (Юхань, КНР). Клетки Vero E6, использованные для конструирования химерного вируса SHC014-CoV, получены из USAMRIID (U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Форт Детрик, штат Мэриленд, США). В конце списка авторов – Zhengli-Li Shi и Ralph S. Baric – основатели китайской и американской школ по созданию коронавирусных химер.

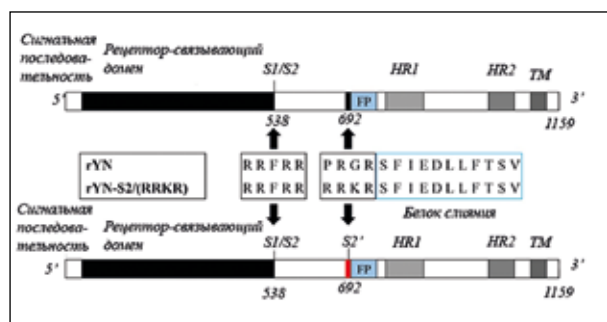


Рисунок 8 – Получение синтетического вируса бронхита кур rYN-S2/RRKR. Показано схематическое изображение S-белка. S-белок – слитый белок, опосредующий прикрепление к рецептору хозяина. Обычно он расщепляется фуриноподобной протеазой клетки-хозяина на два отдельных полипептида (субъединицы): S1 (слева) и S2 (справа). S1 – рецептор-связывающий домен белка S. S2-субъединица инициирует проникновение коронавируса в клетку. Она включает белок слияния (FP), центральную спираль (CH), связывающий домен (CD), домен гептадного повтора (HR1/2). Опосредует интеграцию между вирусной мембраной и мембраной клетки-хозяина. После связывания S-белка с рецептором он подвергается дальнейшим конформационным изменениям, позволяя протеазам клетки последовательно расщеплять его на двух сайтах: сначала на границе S1/S2 (т.е. на сайте S1/S2 – показано стрелками), что приводит к отщеплению S1 от S2 и его проникновению в кровь. В сайте S2' молекулярного клона штамма IBV-YN rYN-S2/RRKR последовательность PTKR (пролин–треонин–лизин–аргинин), расположенная перед FP, заменена на последовательность для расщепления фурином, состоящей также из четырех аминокислот – RRRR (аргинин–аргинин–лизин–аргинин). Штамм IBV-rYN представляет собой инфекционный молекулярный клон штамма IBV-YN (номер доступа в GenBank: JF893452), является родительским по отношению к rYN-S2/RRKR, используется для контроля. FP – белок слияния S2; HR1/2 – гептадные повторы, TM – трансмембранный домен S2 [32]

(легкие) и степень вирусной инфекции (верхние дыхательные пути и легкие) – рисунок 7.

Полученные Ch. Ye с соавт. [7] результаты экспериментов по интраназальному заражению хомяков показали невозможность различить по клинике и патоморфологии поражения, вызванные природными изолятами SARS-CoV-2 и его синтетическими копиями.

Создание отслеживаемых штаммов вируса SARS-CoV-2. Такие штаммы создаются путем включения в рамку вспомогательного белка ORF7a вируса генной кассеты с геном-маркером.

Генная кассета обеспечивает гену маркера эффективную экспрессию при отсутствии вредного воздействия на реплицирующийся вирус. Наибольшим преимуществом у исследователей пользуются флуоресцентные и биолюминесцентные маркеры. Молекулярная масса используемых в настоящее время маркерных белков находится в пределах 26,7–19,0 кДа. Как правило, сконструированные методами обратной генетики отслеживаемые штаммы SARS-CoV-2 по своим культуральным свойствам не отличаются от природных изолятов [4–8, 29]. Используя нано-люциферазу в качестве маркера репликации вируса, A. Pickard с соавт. [29] идентифицировали 35 препаратов, подавляющих репликацию SARS-CoV-2 в клетках Vero и гепатоцитах человека (амодиаксин, атоваквон, бедаквиллин, эбастин, LY2835219, манидипин, панобиностат, витамин D3 и др.). Таким образом, данное направление конструирования синтетических SARS-CoV-2 перспективно для ускоренного отбора лекарственных средств, обладающих терапевтическим действием при COVID-19. Сам способ скрининга образцов с нужными свойствами по яркости свечения маркера легко автоматизировать.

Эксперименты с синтетическим коронавирусом сельскохозяйственных животных. В последние годы в конструирование коронавирусных химер стали вовлекаться коронавирусы сельскохозяйственных животных. Результаты отдельных экспериментов позволили не только показать возможность повышения вирулентности синтетических коронавирусов, но и обнаружить изменения в патогенезе вызванной ими болезни. Например, введением фуринового сайта в S-белок вируса бронхита кур (infectious bronchitis virus, IBV)²⁸, вызывающего у молодняка поражение органов дыхания, репродуктивных органов и нефрозонефритный синдром, была переключена его тропность с клеток дыхательных путей и мочеполовой системы на клетки ЦНС. Как это сделано, показано на рисунке 8.

Синтетический вирус rYN-S2/RRKR оказался более фатальным для куриных яиц с 10-суточным эмбрионом по сравнению с его родительским штаммом rYN. Инокуляция rYN-S2/RRKR приводила к гибели всех зародышевых яиц в течение 36 ч, тогда как для такого же результата штамму rYN требовалось более 96 ч. Кроме того, 50 % инфекционная доза для эмбриона (англ. embryo infectious dose, EID₅₀) rYN-S2/RRKR в яйцах была примерно в десять раз меньше, чем у rYN. При оценке патогенности rYN-S2/RRKR уставлено, что летальные ис-

²⁸ Относится к гамма-коронавирусам (γ-CoV).

Таблица 1 – Роль мутаций в неструктурных и вспомогательных белках SARS-CoV-2 в патогенезе и исходе COVID-19*

Тип белка	Мутация	Белок	Влияние на течение болезни
Неструктурный	L37F	NSP6	Легкое течение болезни
	F308Y	NSP4	То же
	A97V, P323L	NSP12	Тяжелое течение болезни
	S1197R, T1198K	NSP3	То же
	L71F	NSP7	Летальный исход
Вспомогательный	L84S	ORF8	Легкое течение болезни
	G196V	ORF3a	То же
	I33T	ORF6	Тяжелое течение болезни
	Q57H, G251V	ORF3a	То же
	S253P	ORF3a	Летальный исход

* По работе А. Nagy с соавт. [33].

ходы при инокуляции rYN у цыплят достигали 10 %, клиническая картина была типичной для бронхита кур; в то время как у цыплят в группе, инокулированной rYN-S2/RRKR, появились неврологические признаки, такие как тремор и паралич. Ранее о них никогда не сообщалось. Летальность зараженных цыплят составила 90 %. У погибших после заражения rYN цыплят были обнаружены явные поражения дыхательной и мочевыводящей систем, включая слизь и точечное кровоизлияние в гортань, значительные отложения уратов в гортани, набухание мочеточника и почек. Цыплята, зараженные штаммом rYN-S2/RRKR, имели слизь и точечные кровоизлияния в гортани и не имели явных повреждений в почках. В образцах головного мозга в группах rYN и отрицательном контроле поражений мозга не обнаружено. В группе rYN-S2/RRKR наблюдались поражения ЦНС: значительная гиперплазия микроглии, образование микроглиальных узелков и периваскулярные воспалительные инфильтраты²⁹ [32].

Данный пример показывает последствия изменения всего двух аминокислот в сайте расщепления протеазой фурином. В результате произошло настолько значительное увеличение вирулентности IBV, изменение патогенеза и симптоматики бронхита кур, что эту болезнь можно было бы принять за ранее неизвестную, если не знать генетическую историю вызвавшего ее штамма вируса. Кроме бронхита кур, большой ущерб животноводству приносят: коронавирус крупного рогатого скота (BCoV) – вызывает респираторную инфекцию и диарею у

крупного рогатого скота; вирус трансмиссивного гастроэнтерита (TGEV) и вирус эпидемической диареи свиней (PEDV) – вызывают диарею у свиней; вирус гемагглютинирующего энцефаломиелита (PHEV) – вызывает у свиней рвоту и истощение.

Исчерпание возможностей экспериментов S-белком коронавирусов. Рассматривая достигнутый уровень обратной генетики при конструировании коронавирусов, нельзя не заметить и то, что эксперименты с коронавирусами шипами к началу текущего десятилетия близки к пределу в своем развитии, они стали повторяться³⁰. И тому есть серьезные причины. У каждого типа вирусной архитектуры существуют свои структурные ограничения и предел вариации формы, размера или конфигурации вирусной частицы, которые могут быть реализованы с помощью определенного набора структурных белков и их модификаций. Когда этот допуск превышен, результат конструирования вирусной частицы становится неопределенным, процесс ее сборки начинает делать ошибки и тут уже вирусу не до «межвидового прыжка» при любых шипах. К тому же, все «химеры» создавались по известному шаблону, т.е. по нуклеотидным последовательностям реально существующих вирусов и их отдельных генов, пусть даже принадлежащих разным видам. Их просто меняли местами и подгоняли аминокислотные последовательности шипа под более плотный контакт с рецептором клетки-мишени (замена неполярных аминокислот полярными), увеличивали процессивность шиповидного белка

²⁹ Работа выполнена в Key Laboratory of Animal Epidemiology of the Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China.

³⁰ См. работы [9, 27].

(т.е. добавляли сайт для расщепления фурином или другой протеазой)³¹. В то же время роль мутаций в неструктурных и вспомогательных белках в патогенезе и исходе COVID-19 изучена меньше, однако даже те ограниченные данные, что имеются, свидетельствуют о том, что она существенна (таблица 1).

Видимо, следующим этапом обратной генетики при конструировании коронавируса будет поднастройка *неструктурных и вспомогательных белков*, участвующих в проникновении вируса в эндосому клетки, подавлении интерфероновой активности репликации вируса в конкретные клетки, проникновении в другие среды организма и др. В дальнейшем произойдет переход к полностью синтетическим коронавирусам, когда «шаблоны» и «консенсусное проектирование» для конструирования химер уже не потребуются, а вирус будет конструироваться компьютером с «нуля» с целью

получения новых вакцин и лекарственных препаратов.

Возможность создания вирусов с использованием подходов обратной генетики представляет собой мощный инструмент для ответа на важные вопросы биологии вирусных инфекций. Он позволяет понять механизмы вирусной инфекции, выявить вирусные факторы и факторы хозяина и взаимодействия, которые контролируют проникновение, репликацию, сборку и почкование вирусов в клетках. Кроме того, обратная генетика облегчает создание рекомбинантных вирусов, экспрессирующих репортерные гены, для их использования в клеточных скрининговых анализах или в моделях инфекции в условиях *in vivo* для быстрой и легкой идентификации в условиях профилактических и терапевтических подходов к лечению вирусных инфекций, а также для создания аттенуированных штаммов вирусов для их использования в качестве аттенуированных вакцин.

³¹ Возможность искусственного происхождения SARS-CoV-2 подробно обсуждалась в работе Y. Deigin с соавт. [34]. Как инструмент политического давления на КНР версия искусственного происхождения вируса подробно изложена в книге S. Markson [35].

Вклад автора/ Autor Contribution

Идея и концепция статьи, поиск и анализ литературы, написание статьи, цифровая обработка изображений / Idea and concept of an article, search and analysis of literature, writing an article, digital image processing.

Информация о конфликте интересов

Автор заявляет, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

Сведения о рецензировании

Статья прошла открытое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе.

Список источников

1. Yount B., Curtis K., Baric R. Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model // *J. Virol.* 2000. V. 74(22). P. 10600–10611. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.22.10600-10611.2000>
2. Yount B., Denison M. Weiss S., Baric R. Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59 // *J. Virol.* 2002. V. 76(21). P. 11065–11078. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.21.11065-11078.2002>
3. Ren W., Qu X., Li W., Shi Z. et al. Difference in receptor usage between Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) coronavirus and SARS-Like coronavirus of bat origin // *J. Virol.* 2008. V. 82(4). P. 1899–1907. <https://doi.org/10.1128/JVI.01085-07>
4. Thao T.T.N., Labrousseau F., Thiel V. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform // *Nature.* 2020. V. 582. P. 561–565. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2294-9>
5. Xie X., Muruato A., Lokugamage K.G. et al. An infectious cDNA clone of SARS-CoV-2 // *Cell Host Microbe.* 2020 May 13. V. 27(5). P. 841–848.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.04.004>
6. Xie X., Lokugamage K.G., Zhang X. et al. Engineering SARS-CoV-2 using a reverse genetic system // *Nat. Protoc.* 2021. V. 16(3). P. 1761–1784. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00491-8>
7. Ye Ch., Chiem K., Park J-G et al. Rescue of SARS-CoV-2 from a single bacterial artificial chromosome // *mBio.* 2020. 11(5): e02168-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02168-20>
8. Rihn S., Merits A., Bakshi S. et al. A plasmid DNA-launched SARS-CoV-2 reverse genetics system and coronavirus toolkit for COVID-19 research // *PLoS*

Biol. 2021. V. 19(2). e3001091. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001091>

9. Menachery V.D., Yount B.L., Debbink K. et al. SARS-like cluster of circulating bat coronavirus pose threat for human emergence // *Nat. Med.* 2015. V. 21, № 12. P. 1508–1513. <https://doi.org/10.1038/nm.3985> (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4797993/>)

10. Lakota J. Today's Biothreats – Where the Past Predictions Meet the Future // *Journal of NBC Protection Corps.* 2020. V. 4. No 4. P. 421–440. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2020-4-4-421-430>

11. Lakota J. Synthetic Biology – Friend or Foe? What Kind of Threats Should We Expect? // *Journal of NBC Protection Corps.* 2021. V. 5. № 2. P. 103–122. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-2-103-122>

12. Godeke G.-J., de Haan C.A.M., Rossen J.W.A. et al. Assembly of spikes into coronavirus particles is mediated by the carboxy-terminal domain of the spike protein // *J. Virol.* 1999. V. 74. P. 1566–1571. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1566-1571.2000>

13. Opstelten D.-J.E., Raamsman M.J.B, Wolfs K. et al. Envelope glycoprotein interactions in coronavirus assembly // *J. Cell Biol.* 1995. V. 131. P. 339–349. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.2.339>

14. Kuo L., Godeke G.-J., Raamsman M.J. et al. Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier // *J. Virol.* 2000. V. 74(3). P. 1393–1406. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1393-1406.2000>

15. Perez D.R., Cockrell A.S., Beall A. et al. Efficient reverse genetic systems for rapid genetic manipulation of emergent and preemergent infectious coronaviruses // *Reverse Genetics of RNA Viruses.* 2017. V. 1602. P. 59–81. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6964-7_5

16. Yount B., Curtis K.M., Fritz E.A. et al. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100(22). P. 12995–13000. <https://doi.org/10.1073/pnas.1735582100>

17. Kouprina N., Larionov V. Selective isolation of genomic loci from complex genomes by transformation-associated recombination cloning in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Nat. Protoc.* 2008. V. 3(3). P. 371–377. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.5>

18. de Haan C., Li Z., Lintelo E. et al. Murine coronavirus with an extended host range uses heparan sulfate as an entry receptor // *J. Virol.* 2005. V. 79(22). P. 14451–14456. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.14451-14456.2005>

19. Follis K.E., York J., Nunberg J.H. Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell–cell fusion but does not affect virion entry // *Virology.* 2006. V. 350(2). P. 358–369. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.02.003>

20. Eckert D.M., Kim P.S. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition // *Ann. Rev. Biochem.* 2001. V. 70. P. 777–810. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.777>

21. Watanabe R., Matsuyama S., Shirato K. et al. Entry from the cell surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing cleaved S protein // *J. Virol.* 2008. V. 82(23). P. 11985–11991. <https://doi.org/10.1128/JVI.01412-08>

22. Rockx B., Sheahan T., Donaldson E. et al. Synthetic reconstruction of zoonotic and early human severe acute respiratory syndrome coronavirus isolates that produce fatal disease in aged mice // *J. Virol.* 2007. V. 81. P. 7410–7423. <https://doi.org/10.1128/JVI.00505-07>

23. Becker M.M., Graham R.L., Donaldson F. et al. Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105(50). P. 19944–19949. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808116105>

24. Sheahan T. Rockx B., Donaldson E. et al. Mechanisms of zoonotic severe acute respiratory syndrome coronavirus host range expansion in human airway epithelium // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 2274–2285. <https://doi.org/10.1128/JVI.02041-07>

25. Bolles M., Deming D., Long K. et al. A double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge // *J. Virol.* 2011. V. 85. P. 12201–12215. <https://doi.org/10.1128/JVI.06048-11>

26. Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins // *Ann. Rev. Virol.* 2016. V. 29. P. 237–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>

27. Menachery V., Yount B., Sims A. et al. SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence // *PNAS.* 2016. V. 113 (11). P. 3048–3053. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517719113>

28. Sia S.F., Yan L.-M., Chin A.W.H. et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters // *Nature.* 2020. V. 583. P. 834–838. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2342-5>

29. Pickard A., Calverley B., Chang J. et al. Discovery of re-purposed drugs that slow SARS-CoV-2 replication in human cells // *PLoS Pathog.* 2021. V. 17(9). e1009840. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009840>

30. Medical aspects of chemical and biological warfare / Ed. Sidell F.R., Tafuqi E.T., Franz D.R. Washington. 1997.

31. Jackson P.J., Ramsay A.J., Christensen C.D. et al. Expression of mouse interleukin-4 by a recombinant ectromelia virus suppresses cytolytic lymphocyte responses and overcomes genetic resistance to mousepox // *J. Virol.* 2001. V. 75(3). P. 1205–1210. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1205-1210.2001>

32. Cheng J., Zhao Y., Xu G. et al. The S2 subunit of QX-type infectious bronchitis coronavirus spike protein is an essential determinant of neurotropism // *Viruses.* 2019. V. 11(10). 972. <https://doi.org/10.3390/v11100972>

33. Nagy A., Pongor S., Gyorffy B. Different mutations in SARS-CoV-2 associate with severe

and mild outcome // Int. J. Antimicrob. Agents. 2021. V. 57. P. 106272. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106272>

34. Segreto R., Deigin Y., McCairn K., Sousa A. et al. Should we discount the laboratory origin of COVID-19?

// Environ. Chem. Lett. 2021. Mar 25. P. 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01211-0>

35. Markson S. What really happened in Wuhan. Harper Collins Publishers Australia Pty Limited. ISBN 978 1 4607 6092 5. 2021.

Об авторе

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации, 105005, Российская Федерация, г. Москва, Бригадирский переулок, д. 13.

Супотницкий Михаил Васильевич. Главный специалист, канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

Контактная информация для всех авторов: 27nc_1@mil.ru

Контактное лицо: Супотницкий Михаил Васильевич; 27nc_1@mil.ru

Modern Approaches to Molecular Genetics of Viruses in the Study of the Members of the Family Coronaviridae

M.V. Supotnitskiy

Federal State Budgetary Establishment «27 Scientific Centre» of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Brigadirskii Lane 13, Moscow 105005, Russian Federation

Received 1 September 2021. Accepted 23 September 2021.

The existence of certain suspicions about the artificial origin of the COVID-19 pandemic and about the possible use of reverse genetics technology to create the SARS-CoV-2 virus require an understanding of its capabilities in the design of new viruses. The *aim of this work* is to show how the use of reverse genetics allows the design of previously non-existent coronaviruses, technologies and the main achievements in their creation. Only the information in the public domain was used for the preparation of this article. The technology is called «reverse genetics» because when obtaining RNA viruses capable of replication, the process is going not from DNA to RNA, as usual, but on the contrary, from the RNA of the virus to its complementary DNA (cDNA), and from it with the help of T7 RNA polymerase – «back» to the infectious RNA. Since the resulting plus-RNA of the coronavirus genome mimics cellular messenger RNA (mRNA), it is immediately recognized by the cell's translation machine and triggers the formation of its own infectious viral particles. Two systems of reverse genetics have been developed, involving the production of an infectious plusRNA, *in vitro* and *in vivo*. The problem of obtaining a full-length cDNA of the giant genome of coronaviruses is solved by fragmentation and subsequent stitching of fragments using standard molecular biology approaches. The article provides the examples of how this technology makes it possible to obtain synthetic coronaviruses that are indistinguishable from those isolated from nature, to change the range of their hosts, to enhance virulence and resistance to specific antibodies, and to influence the pathogenesis of the disease. The article also shows the prospects for the use of recombinant viruses in cellular screening analyses and infection models *in vivo* for the identification of preventive and therapeutic approaches to the virus disease treatment.

Key words: *atypical pneumonia; coronavirus; interspecies transmission; reserve genetics; pandemic; COVID-19; SARS-CoV-2*

For citation: *Supotnitskiy M.V. Modern Approaches to Molecular Genetics of Viruses in the Study of the Members of the Family Coronaviridae // Journal of NBC Protection Corps. 2021. V. 5. № 3. P. 217–235. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-3-217-235>*

Conflict of interest statement

The author declares that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Peer review information

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board and from Russian Science Citation Index database.

References

See P. 233–234.

Author

Federal State Budgetary Establishment «27 Scientific Centre» of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Brigadirskii Lane 13, Moscow 105005, Russian Federation.

Mikhail Vasilyevich Supotnitskiy. Senior Researcher. Chief Specialist. Candidate of Biological Sciences.

Contact information for all authors: 27nc_1@mil.ru

Contact person: Supotnitskiy Mikhail Vasilyevich; 27nc_1@mil.ru