

СОЗДАНИЕ ПОЛНОРАЗМЕРНОГО РЕПЛИКОНА КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2 ДЛЯ БЕЗОПАСНОГО ТЕСТИРОВАНИЯ ИНГИБИТОРОВ РНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ВИРУСА

Научный руководитель – Королев Сергей Павлович

Стринкевич Александра Андреевна

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: a192smail@gmail.com

Заболевание COVID-19 (COronaVIrus Disease 2019), вызванное новым штаммом бетако-ронавируса SARS-CoV-2, унесло жизни более 5 млн. человек по всему миру. Для терапии COVID-19 специфических противовирусных препаратов пока не создано. В связи с этим дизайн и синтез таких соединений представляется совершенно необходимым. Одной из наиболее привлекательных мишеней для терапии COVID-19 является репликационный комплекс SARS-CoV-2, в первую очередь входящий в его состав ключевой фермент репликации - РНК-зависимая РНК-полимераза (РЗРП).

В рамках данной курсовой работы была протестирована серия нуклеозидных и ненуклеозидных производных в качестве ингибиторов РЗРП. Изначально для этого использовали минимальный репликон SARS-CoV-2, содержащий все регуляторные элементы из генома вируса, а также кодирующий гены репортерных белков: люциферазы светлячка (Fluc) и *Renilla* (Rluc). Репликация и транскрипция репликона обеспечивается неструктурными вирусными белками (NSPs), которые экспрессируются в клетке с дополнительных векторов. Причем при отсутствии NSPs возможен синтез только первой люциферазы Fluc, тогда как добавление вирусных белков обеспечивает прерывистую транскрипцию, в результате чего становится возможной экспрессия второй люциферазы Rluc. Однако из-за сложностей, вызванных необходимостью одновременной трансфекции клеток большим числом различных векторов, желанием увеличения уровня сигнала от второй люциферазы, а также проблемами с наработкой в *E. coli* некоторых последовательностей, кодирующих NSPs, было решено использовать модель полноразмерного репликона SARS-CoV-2.

В созданном нами полноразмерном репликоне используются два блока репортерных генов: в результате первого раунда транскрипции синтезируется только первый блок белков-репортеров Rluc-GFP, тогда как второй блок Fluc-RFP образуется только в результате протекания прерывистой транскрипции. В качестве вектора для репликона было решено использовать искусственную бактериальную хромосому, поскольку такой тип вектора позволяет получать генетические конструкции большого размера, содержащие токсичные для *E. coli* последовательности.

Тестирование соединений проводилось на клеточной линии НЕК 293Т-ТК, в которой стабильно экспрессируется тимидин-киназа простого вируса герпеса человека первого типа (ТК). Наличие ТК в клетках обеспечивает первый акт фосфорилирования исследуемых соединений, что позволяет обойтись без создания депо-форм для тестируемых нуклеозидных ингибиторов. Однако при тестировании ингибиторов с помощью полноразмерного репликона на клеточной линии НЕК 293Т-ТК не наблюдалось значимого снижения сигналов люцифераз. Поэтому было решено использовать другую клеточную линию Vero E6, в которой подавлен интерфероновый ответ, что способствует тестированию вирусных ингибиторов. В дальнейшем мы планируем получить клеточную линию Vero E6-ТК, чтобы повысить эффективность тестируемых соединений в качестве ингибиторов РЗРП.