

В ХОДЕ ЭВОЛЮЦИИ SARS-CoV-2 ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ ВИРУСНОЙ РНК И РНК-СВЯЗЫВАЮЩИМИ БЕЛКАМИ ХОЗЯИНА ОСЛАБЕВАЕТ

© 2024 г. К. Э. Малкова¹, А. П. Жиянов², А. В. Белая¹,
А. В. Арзуманова¹, И. Д. Кириллов¹, С. А. Тоневицкая¹ *

¹Факультет биологии и биотехнологии, Национальный исследовательский университет
“Высшая школа экономики”, Москва, 101000 Россия

²ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова” Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

*e-mail: stonevitskaya@hse.ru

Поступила в редакцию 13.11.2023 г.

После доработки 06.12.2023 г.

Принята к публикации 12.12.2023 г.

Коронавирус-2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2), вызывающий COVID-19, использует РНК-связывающие белки (RNA-binding proteins, RBP) клетки-хозяина для реализации инфекционного цикла. В то же время ряд RBP человека участвует в противовирусном иммунном ответе. В ходе циркуляции в человеческой популяции в геноме SARS-CoV-2 появились мутации, которые могли привести к изменению взаимодействия с ним клеточных RBP. Проведен анализ геномов различных штаммов SARS-CoV-2, включая варианты Alpha, Delta и Omicron, и предложена модель взаимодействия RBP с РНК SARS-CoV-2. Оказалось, что, несмотря на общепринятое мнение о важности взаимодействия вируса с клеточными RBP, с начала пандемии COVID-19 происходит постепенное снижение аффинности связывания RBP с РНК SARS-CoV-2.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, вирусная РНК, РНК-связывающие белки, взаимодействие РНК–белок, эволюция

DOI: 10.56304/S0234275824010071

РНК-связывающие белки (RNA-binding proteins, RBP) – семейство белков, которые, взаимодействуя с РНК, участвует в различных процессах, таких как биогенез транскриптов, их канонический и альтернативный сплайсинг, локализация и трансляция [1, 2]. Кроме того, RBP взаимодействуют и с чужеродными, в том числе вирусными, РНК.

Известно, что (+)РНК-содержащие вирусы используют RBP клетки хозяина для выполнения многих этапов инфекционного цикла, включая ре-

гуляцию синтеза геномных и субгеномных РНК, трансляцию, формирование вирусных частиц, а также стабилизацию вирусных РНК [3, 4]. В то же время RBP участвуют в активации врожденного иммунного ответа. Например, RIG-I (DDX58) и MDA5 (IFIH1) вовлечены в распознавание и элиминацию вирусных РНК [5, 6].

Коронавирус, вызвавший пандемию COVID-19, SARS-CoV-2, принадлежит к семейству Coronaviridae – оболочечных вирусов с одноцепочечным (+)РНК-геномом (размер ~30 т.н.) – и в ходе репликации взаимодействует с рядом RBP [7–9].

Предполагают, что взаимодействие RBP с РНК SARS-CoV-2 происходит не только в цитоплазме, но и в ядре. С одной стороны, показано, что геномные и субгеномные РНК SARS-CoV-2 преимущественно локализованы в цитоплазме, но некоторые вирусные мРНК транспортируются в ядро [10–12]. С другой стороны, значительная часть RBP постоянно перемещается между ядром и цитоплазмой [13, 14] и участвует в экспорте мРНК, ее деградации и инициации трансляции.

Список сокращений: RBP (RNA-binding protein) – РНК-связывающие белки; r – индекс RBP при перечислении; v – индекс SARS-CoV-2 при перечислении; n – позиция сайта связывания RBP и РНК SARS-CoV-2; S_v^p – сумма аффинностей сайтов белка r , приходящихся на вирус v ; S^p – максимальная суммарная RBP-аффинность r среди всех вариантов вируса v ; S_v – средняя суммарная аффинность RBP, приходящихся на вирус v ; $S_{v,n}^p$ – RBP-аффинность r для вируса v , соответствующая сайту связывания на позиции n ; $S_{v,n}$ – средняя относительная аффинность RBP, приходящихся на позицию n вируса v .

Мы предположили, что в геноме SARS-CoV-2 возникают и сохраняются мутации, приводящие к изменению взаимодействия вируса с клеточными RBP. В ходе данного исследования обнаружено, что число сайтов связывания RBP на РНК SARS-CoV-2 уменьшалось с начала пандемии COVID-19. Мы предполагаем, что взаимодействием RBP с вирусной РНК находится под давлением естественного отбора.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Выбор образцов РНК SARS-CoV-2 для исследования

Из базы данных GISAID было загружено 15786316 последовательностей РНК SARS-CoV-2 [15] и аннотировано с помощью программы Pangolin 1.21 [16] (версия 4.3, <https://cov-lineages.org/resources/pangolin.html>). Из 30 436 вариантов, аннотированных как “Berlin, Germany”, была отобрана 4441 последовательность по следующим критериям: (1) результаты секвенирования не содержали неопределенных нуклеотидов и (2) длина геномной РНК вируса отличалась от эталонной (штамм BetaCoV/Wuhan-Hu-1/2019, GISAID: EPI_ISL_402125) не более, чем на 5%. Выбранные варианты циркулировали с 14 января 2021 года по 3 июля 2023 года.

Учитывая, что длина поли(А)-хвоста мРНК, транскрибируемых с геномной РНК SARS-CoV-2, изменяется в ходе инфекционного цикла вируса [17] и, следовательно, зависит от времени выделения, мы удалили из рассмотрения эту последовательность всех вирусных мРНК.

Далее варианты были разделены на несколько групп в соответствии со штаммами в аннотации GISAID. Это вариант “Alpha”: B.1.1.7-like с 759 субвариантами; “Delta”: B.1.617.2-like с 841 субвариантами и AY.4-like с 49 субвариантами; “Other Ancestral variants”: суммарно 42 субварианта; “Omicrons BA-like”: BA.1-like с 564 субвариантами, BA.2-like с 946 субвариантами, BA.5-like с 876 субвариантами; “Omicrons XBB”: XBB-like с 64 субвариантами, XBB.1-like с 81 субвариантом, XBB.1.5-like с 163 субвариантами и XBB.1.16-like с 3 субвариантами; “Other Omicrons”: с малочисленными, а также неопределенными штаммами Omicron, суммарно 53 субварианта.

Выбор образцов RBP для исследования

RBP и их мотивы связывания были взяты из базы данных ATtRACT [18]. Всего отобрали 153 белка, которым соответствовало 2 274 уникальных мотива связывания. Из мотивов, присутствующих в ATtRACT, 85% были подтверждены экспериментально, в то время как остальные 15% (192 мотива) были получены анализом *in silico* комплексов белок–РНК, представленных в Protein Data Bank [19].

Для оценки экспрессии RBP данные прочтений высокопроизводительного секвенирования мРНК (RNA-seq) были загружены с портала TCGA (<https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>) для тканей толстой кишки (COAD) и легких (LUAD). Затем необработанные значения считывания были преобразованы в нормализованные значения FPKM по стандартной формуле. Следуя соответствующему клиническому описанию, образцы набора данных были отнесены к “здоровой” и “опухолевой” группам. Для оценки экспрессии RBP в анализе использовали только “здоровые” типы образцов: 8 в наборе данных COAD и 7 в проекте LUAD. Затем для каждого RBP было найдено среднее значение среди “здоровых” образцов. Вклад каждого белка в общую экспрессию RBP не превышал 1.5%, то есть не было высокоэкспрессированных RBP среди выбранных для анализа. В связи с этим экспрессию RBP принимали за равномерную.

Анализ потенциальных сайтов взаимодействия RBP–вирусная РНК

Для каждого варианта SARS-CoV-2 были найдены координаты сайтов связывания RBP, представленных в базе данных ATtRACT (на основе полного совпадения). В общей сложности более одного сайта связывания, по крайней мере в одном геноме SARS-CoV-2, имели 77 RBP. Каждый сайт связывания RBP в ATtRACT характеризуется “показателем качества” – величиной, отражающей аффинность RBP к данному сайту связывания в пределах одного эксперимента. Для более корректной оценки взаимодействий RBP–РНК для каждого белка (p) и вирусного варианта (v) была рассчитана сумма аффинностей его сайтов (S_v^p), представленных в геноме данного варианта SARS-CoV-2.

С целью оценить, какие RBP имеют наибольшее число мотивов связывания в геноме SARS-CoV-2, мы сравнили медианные значения числа сайтов связывания среди выбранных вариантов. В табл. 1 представлены RBP с наибольшим числом сайтов связывания.

Анализ аффинности взаимодействия RBP–вирусная РНК

Для подсчета скорости изменения связывания RBP и РНК вируса использована следующая процедура. Прежде всего, суммарную аффинность каждого RBP (S_v^p) нормировали на максимальную суммарную аффинность (S^p) этого белка по всем отобраным вариантам вируса ($S^p = \max_v S_v^p$). Полученная шкала позволяет сравнивать скорости изменения аффинности различных RBP к вирус-

Таблица 1. Медианное число потенциальных сайтов RBP на РНК SARS-CoV-2 вариантов Alpha, Delta и Omicron
Table 1. Median number of potential RNA-binding protein (RBP) sites on RNAs of SARS-CoV-2 Alpha, Delta and Omicron

RBP	РНК SARS-CoV-2, n^a				
	Alpha	Delta	Omicron		
	B.1.1.7-like ^b	B.1.617.2-like	BA.2-like	BA.5-like	XBB-like
HNRNPL	1260	1246	1252	1247	1241
TRA2B	375	378	377	376	376
HNRNPH1	339	340	343	336	337
SRSF9	316	314	312	309	307
HNRNPH2	296	296	300	294	295
SRSF5	261	259	260	260	260
SRSF10	204	206	200	200	201
YBX1	186	183	184	182	182
SRSF1	184	184	185	184	184
NOVA1	180	175	178	177	175

Примечание: ^aЧисло потенциальных сайтов связывания; ^bтоп-10 RBP, наиболее представленных по медианному числу сайтов связывания на РНК штаммов SARS-CoV-2 варианта Alpha (B.1.7-like).

Note: ^aNumber of potential binding sites; ^btop 10 RBPs most represented by the median number of binding sites on RNA of the SARS-CoV-2 Alpha (B.1.7-like) variant.

ной РНК. Затем для каждого вируса (v) рассчитывали среднюю относительную аффинность (S_v) по всем RBP в соответствии с формулой (1):

$$S_v = \frac{1}{N} \sum_{p=1}^N S_v^p \frac{1}{S^p}, \quad (1)$$

где N – число анализируемых RBP.

Затем для оценки скорости изменения аффинности RBP была обучена линейная регрессия, предполагающая, что $S_v = at_v + b + e_v$, где t_v – момент секвенирования варианта (v), а e_v – случайная погрешность с нулевым средним и заданной дисперсией. Оценка коэффициента линейной модели (a) характеризует скорость изменения относительной аффинности связывания, в то время как p -value дает фактический уровень значимости гипотезы $H_0: a = 0$ – против альтернативы $H_1: a \neq 0$.

С целью определить, как происходит взаимодействие RBP с различными регионами генома SARS-CoV-2, для каждого нуклеотида (n) по формуле (2) рассчитали суммарную аффинность всех RBP, потенциально связывающихся с данной позицией:

$$S_{v,n} = \frac{1}{N} \sum_{p=1}^N S_{v,n}^p \frac{1}{S^p}, \quad (2)$$

где $S_{v,n}^p$ – аффинность RBP (p) к сайту связывания, соответствующему позиции (n) вируса (v). В таком случае нуклеотид будет иметь ненулевой

коэффициент, если он соответствует сайту связывания по крайней мере одного RBP.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате определения коэффициента регрессии a методом наименьших квадратов (МНК) получили, что скорости изменения относительной аффинности RBP к вирусным РНК имеет вид $a = -1.58 \times 10^{-5}$ (p -value ≤ 0.001 , гипотеза $H_0: a = 0$). Так, в период с 14 января 2020 года по 3 июля 2023 года средняя относительная аффинность RBP снизилась на 2% (рис. 1). На основании этого можно предположить, что давление эволюционного отбора на SARS-CoV-2 было направлено на ослабление взаимодействия вирусная РНК–RBP.

Оказалось, что потенциальные сайты RBP на геномной РНК SARS-CoV-2 распределены неравномерно (рис. 2а): больше всего их обнаружено в участках, кодирующих неструктурные белки 2 и 13 (NSP2, NSP13), нуклеопротеин (N) и вспомогательные белки NS6–9.

Далее для каждого штамма SARS-CoV-2 мы определили “медианного представителя”, то есть для каждой позиции n вычисляли медиану $S_{v,n}$ среди вирусов (v), соответствующих данному штамму. Ранее показано, что взаимодействие микроРНК с РНК SARS-CoV-2 больше всего изменилось у варианта Omicron BA.2-like по сравнению с референсным штаммом Wuhan [20]. Нами показано, что аффинность RBP к геному вариантов SARS-CoV-2 наиболее заметно изменилась в случае Omicron XBB-like, особенно в регионах

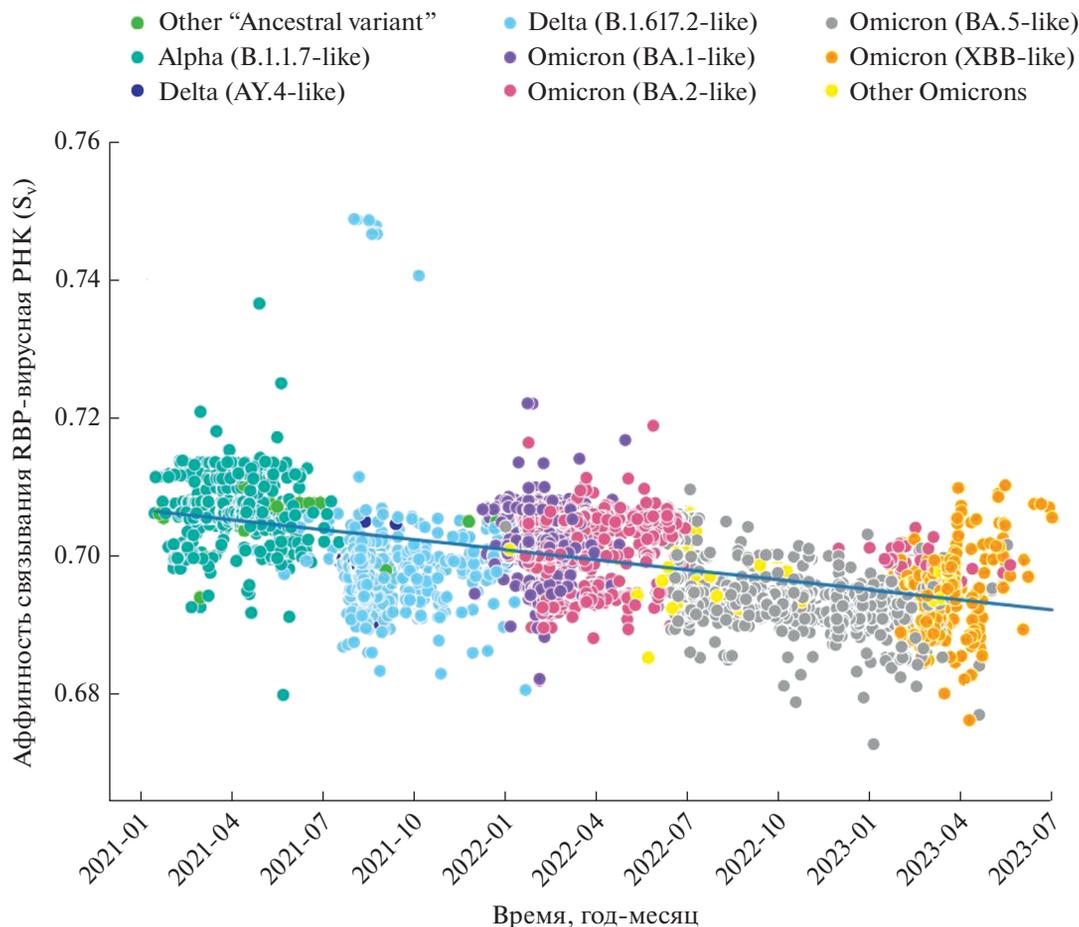


Рис. 1. В ходе циркуляции в человеческой популяции аффинность RBP к РНК SARS-CoV-2 постепенно снижалась. Расчет S_v проведен по формуле (1).

Fig. 1. During circulation in the human population, the affinity of RBPs for SARS-CoV-2 RNA gradually decreased. S_v values were calculated using formula (1).

NSP2–3 и NS6–9 (рис. 2b). Также видно, что, по сравнению с референсным вариантом, в различных областях генома происходило заметное снижение аффинности RBP.

Взаимодействие РНК SARS-CoV-2 с клеточными RBP играет ключевую роль в инфекционном цикле вируса. Так, RBP обеспечивают стабильность вирусной РНК, облегчая работу РНК-полимеразы и ускоряя трансляцию, а также принимают участие в формировании вирусных частиц, способствуя рекрутированию геномных РНК к вироплазмам. Нами показано, что 77 RBP человека, включая факторы сплайсинга (SRSFs) и гетерогенные ядерные РНП (hnRNPs), имеют сайты связывания в геномной РНК различных вариантов SARS-CoV-2, что согласуется с результатами предыдущих исследований [21–24].

Репликация, транскрипция и трансляция РНК SARS-CoV-2 происходит преимущественно в цитоплазме клетки-хозяина, в то время как некоторые RBP локализуются в ядре. Однако для некото-

рых ядерных RBP было показано взаимодействие с вирусными РНК или белками в цитоплазме [23, 25]. Возможно, что ядерные RBP в процессе синтеза захватываются вирусной РНК в цитоплазме, как было показано на примере сплайсинг-фактора SRSF1 [21]. Кроме того, большая часть факторов сплайсинга постоянно перемещается между ядром и цитоплазмой [26–28], что предполагает возможность их связывания с РНК SARS-CoV-2 в цитоплазме.

Таким образом, нами показано, что с начала пандемии COVID-19 наметилась тенденция снижения аффинности связывания клеточных RBP с РНК SARS-CoV-2. Наиболее заметные изменения, потерю или “ухудшение”, претерпели узнаваемые RBP мотивы в регионах вирусной РНК, кодирующих белки NSP2, NSP3 и NS6–9. Мы предполагаем, что, несмотря на важность участия RBP в инфекционном цикле SARS-CoV-2, обогащенность генома мотивами РНК-связывающих белков препятствует работе РНК-полимеразы, за-

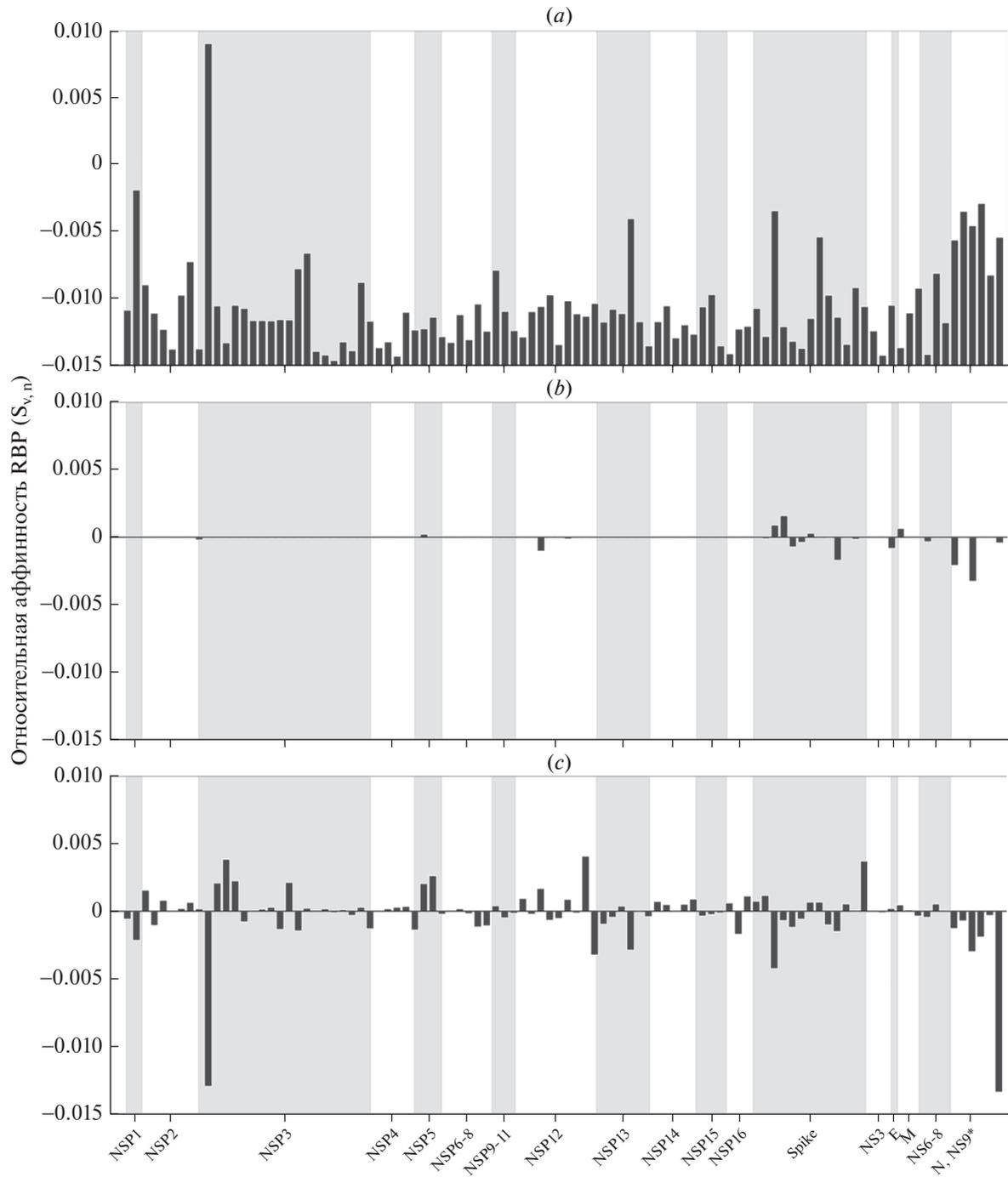


Рис. 2. Распределение относительной аффинности связывания RBP ($S_{v,n}$) по различным участкам ПНК SARS-CoV-2 для референсного штамма Wuhan (a), а также изменения в аффинности относительно референсного штамма для вариантов Omicron BA.2-like (b) и Omicron XBB-like (c). Для расчета значений $S_{v,n}$ использовали формулу (2).

Fig. 2. Distribution of relative RBP binding affinity ($S_{v,n}$) across different regions of SARS-CoV-2 RNA for the Wuhan reference strain (a), as well as changes in affinity relative to the reference strain for Omicron BA.2-like variants (b) and Omicron XBB-like (c). $S_{v,n}$ values were calculated using formula (2).

медля репликацию и транскрипцию. Как следствие, с начала пандемии COVID-19 давление естественного отбора было направлено на ослабление взаимодействия между вирусной РНК и РНК-связывающими белками хозяина.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1049).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hentze M.W., Castello A., Schwarzl T., Preiss T. A brave new world of RNA-binding proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2018, 19(5), 327–341. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.130>
2. Dedow L.K., Bailey-Serres J. Searching for a match: structure, function and application of sequence-specific RNA-binding proteins. *Plant Cell Physiol.*, 2019, 60(9), 1927–1938. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz072>
3. Khan M.A., Islam A.B.M.M.K. SARS-CoV-2 Proteins exploit host's genetic and epigenetic mediators for the annexation of key host signaling pathways. *Front. Mol. Biosci.*, 2021, 7, 598583. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.598583>
4. Rasekhian M., Roohvand F., Habtemariam S., Marzbani M., Kazemimanesh M. The role of 3'UTR of RNA viruses on mRNA stability and translation enhancement. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2021, 21(16), 2389–2398. <https://doi.org/10.2174/1389557521666210217092305>
5. Chan Y.K., Gack M.U. Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2016, 14(6), 360–373. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.45>
6. Girardi E., Pfeffer S., Baumert T.F., Majzoub K. Roadblocks and fast tracks: how RNA binding proteins affect the viral RNA journey in the cell. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2021, 111, 86–100. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.08.006>
7. Lee S., Lee Y.S., Choi Y., Son A., Park Y., Lee K.M., Kim J., Kim J.S., Kim V.N. The SARS-CoV-2 RNA interactome. *Mol. Cell*, 2021, 81(13), 2838–2850.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.04.022>
8. Srivastava M., Hall D., Omoru O.B., Gill H.M., Smith S., Janga S.C. Mutational landscape and interaction of SARS-CoV-2 with host cellular components. *Microorganisms*, 2021, 9(9), 1794. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091794>
9. Labeau A., Fery-Simonian L., Lefevre-Utile A., Pouchot M., Bonnet-Madin L., Soumelis V., Lotteau V., Vidalain P.O., Amara A., Meertens L. Characterization and functional interrogation of the SARS-CoV-2 RNA interactome. *Cell Rep.*, 2022, 39(4), 110744. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110744>
10. Sattar S., Kabat J., Jerome K., Feldmann F., Bailey K., Mehedi M. Nuclear translocation of spike mRNA and protein is a novel feature of SARS-CoV-2. *Front. Microbiol.*, 2023, 14, 1073789. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1073789>
11. Gussow A.B., Auslander N., Faure G., Wolf Y.I., Zhang F., Koonin E.V. Genomic determinants of pathogenicity in SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2020, 117(26), 15193–15199. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008176117>
12. Banerjee A.K., Blanco M.R., Bruce E.A., Honson D.D., Chen L.M., Chow A., Bhat P., Ollikainen N., Quinodoz S.A., Loney C., Thai J., Miller Z.D., Lin A.E., Schmidt M.M., Stewart D.G., Goldfarb D., De Lorenzo G., Rihn S.J., Voorhees R.M., Botten J.W., Majumdar D., Guttman M. SARS-CoV-2 disrupts splicing, translation, and protein trafficking to suppress host defenses. *Cell*, 2020, 183(5), 1325–1339.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.004>
13. Schneider-Lunitz V., Ruiz-Orera J., Hubner N., van Heesch S. Multifunctional RNA-binding proteins influence mRNA abundance and translational efficiency of distinct sets of target genes. *PLoS Comput. Biol.*, 2021, 17(12), e1009658. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009658>
14. Van Nostrand E.L., Freese P., Pratt G.A., Wang X., Wei X., Xiao R., Blue S.M., Chen J.Y., Cody N.A.L., Dominguez D., Olson S., Sundararaman B., Zhan L., Bazile C., Bouvrette L.P. B., Bergalet J., Duff M.O., Garcia K.E., Gelboin-Burkhardt C., Hochman M., Lambert N.J., Li H., McGurk M.P., Nguyen T.B., Palden T., Rabano I., Sathe S., Stanton R., Su A., Wang R., Yee B.A., Zhou B., Louie A.L., Aigner S., Fu X.D., Lécluyer E., Burge C.B., Graveley B.R., Yeo G.W. A large-scale binding and functional map of human RNA-binding proteins. *Nature*, 2020, 583(7818), 711–719. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2077-3>
15. Khare S., Gurry C., Freitas L., Schultz M.B., Bach G., Diallo A., Akite N., Ho J., Lee R., Yeo W. GISAID Core Curation Team, Sebastian Maurer-Stroh. GISAID's role in pandemic response. *China CDC Wkly*, 2021, 3(49), 1049–1051. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2021.255>
16. O'Toole Á., Scher E., Underwood A., Jackson B., Hill V., McCrone J.T., Colquhoun R., Ruis C., Abu-Dahab K., Taylor B., Yeats C., du Plessis L., Maloney D., Medd N., Attwood S.W., Aanensen D.M., Holmes E.C., Pybus O.G., Rambaut A. Assignment of epidemiological lineages in an emerging pandemic using the pangolin tool. *Virus Evol.*, 2021, 7(2), veab064. <https://doi.org/10.1093/ve/veab064>
17. Wu H.Y., Ke T.Y., Liao W.Y., Chang N.Y. Regulation of coronaviral poly(A) tail length during infection. *PLoS One*, 2013, 8(7), e70548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070548>
18. Giudice G., Sánchez-Cabo F., Torroja C., Lara-Pezzi E. ATTRACT – a database of RNA-binding proteins and associated motifs. *Database (Oxford)*, 2016, 2016, baw035. <https://doi.org/10.1093/database/baw035>
19. Burley S.K., Berman H.M., Kleywegt G.J., Markley J.L., Nakamura H., Velankar S. Protein Data Bank (PDB): The single global macromolecular structure archive.

- Methods Mol. Biol.*, 2017, 1607, 627–641.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7000-1_26
20. Zhiyanov A., Shkurnikov M., Nersisyan A., Hui C., Baranova A., Tonevitsky A. The signature of SARS-CoV-2 evolution reflects selective pressures within human guts. *J. Med. Virol.*, 2023, 95(8), e28996.
<https://doi.org/10.1002/jmv.28996>
 21. Rogan P.K., Mucaki E.J., Shirley B.C. A proposed molecular mechanism for pathogenesis of severe RNA-viral pulmonary infections. *F1000Res.*, 2020, 9, 943.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.25390.2>
 22. Srivastava R., Daulatabad S.V., Srivastava M., Janga S.C. Role of SARS-CoV-2 in altering the RNA-binding protein and miRNA-directed post-transcriptional regulatory networks in humans. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 21(19), 7090.
<https://doi.org/10.3390/ijms21197090>
 23. Singh A., Pandey K.K., Agrawal S.K., Srivastava R.K., Bhattacharyya S., Verma B. The SARS-CoV-2 UTR's intrudes host RBP's and modulates cellular splicing. *Adv. Virol.*, 2023, 2023, 2995443.
<https://doi.org/10.1155/2023/2995443>
 24. Kamel W., Noerenberg M., Cerikan B., Chen H., Järvelin A.I., Kammoun M., Lee Y., Shuai N., Garcia-Moreno M., Andrejeva A., Deery M.J., Johnson N., Neufeldt C.J., Cortese M., Knight M.L., Lilley K.S., Martinez J., Davis I., Bartenschlager R., Mohammed S., Castello A. Global analysis of protein-RNA interactions in SARS-CoV-2-infected cells reveals key regulators of infection. *Mol. Cell*, 2021, 81(13), 2851–2867.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.05.023>
 25. Wang J., Sun D., Wang M., Cheng A., Zhu Y., Mao S., Ou X., Zhao X., Huang J., Gao Q., Zhang S., Yang Q., Wu Y., Zhu D., Jia R., Chen S., Liu M. Multiple functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in the positive single-stranded RNA virus life cycle. *Front. Immunol.*, 2022, 13, 989298.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.989298>
 26. Haward F., Maslon M.M., Yeyati P.L., Bellora N., Hansen J.N., Aitken S., Lawson J., von Kriegsheim A., Wachten D., Mill P., Adams I.R., Caceres J.F. Nucleocytoplasmic shuttling of splicing factor SRSF1 is required for development and cilia function. *Elife*, 2021, 10, e65104. <https://doi.org/10.7554/eLife.65104>
 27. Turner M., Díaz-Muñoz M.D. RNA-binding proteins control gene expression and cell fate in the immune system. *Nat. Immunol.*, 2018, 19(2), 120–129.
<https://doi.org/10.1038/s41590-017-0028-4>
 28. Yugami M., Okano H., Nakanishi A., Yano M. Analysis of the nucleocytoplasmic shuttling RNA-binding protein HNRNPU using optimized HITS-CLIP method. *PLoS One*, 2020, 15(4), e0231450.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231450>

During SARS-CoV-2 Evolution, the Interaction between Virus RNA and Host RNA-Binding Proteins Gradually Weakened

K. E. Malkova^a, A. P. Zhiyanov^b, A. V. Belaya^a,
 A. V. Arzumanova^a, I. D. Kirillov^a, and S. A. Tonevitskaya^{a, #}

^aFaculty of Biology and Biotechnology, National Research University “Higher School of Economics”, Moscow, 101000 Russia

^bShemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

[#]e-mail: stonevitskaya@hse.ru

Abstract—SARS-CoV-2 utilizes host cell RNA-binding proteins (RBPs) to carry out many steps of the infectious cycle. At the same time, a number of human RBPs are involved in antiviral immunity. During circulation in the human population, mutations that appeared in the SARS-CoV-2 genome could alter the interaction of cellular RBPs with the virus. Here, we analyzed the genomes of various SARS-CoV-2 strains, including the Alpha, Delta and Omicron variants, and proposed a model of the interactions of RBPs with SARS-CoV-2 RNA. It turned out that despite the generally accepted opinion about the importance of the RBP–virus interaction, since the COVID-19 pandemic, there has been a gradual decrease in the affinity of RBPs for SARS-CoV-2 RNA.

Keywords: SARS-CoV-2, virus RNA, RNA-binding proteins, RNA–protein interaction, evolution