

УДК 577.29:578.23

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА LAMP1 ЧЕЛОВЕКА ПОВЫШАЕТ ПРОДУКЦИЮ ВИРУСОВ SARS-CoV-1 И SARS-CoV-2 В ТРАНСГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ НА ОСНОВЕ Vero

© 2022 г. А. А. Дольский^а, И. В. Грищенко^а, С. А. Боднев^а, А. А. Назаренко^а, А. М. Смирнова^а, А. К. Матвеева^а, Л. Е. Бульчев^а, А. С. Овчинникова^а, Т. В. Трегубчак^а, А. В. Зайковская^а, И. Р. Иматдинов^а, О. В. Пьянков^а, Е. В. Гаврилова^а, Р. А. Максютлов^а, Д. В. Юдкин^а, *

^аГосударственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий, Кольцово, Новосибирская область, 630559 Россия

*e-mail: yudkin_dv@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 22.11.2021 г.

После доработки 13.12.2021 г.

Принята к публикации 13.12.2021 г.

Coronaviridae – семейство вирусов с одноцепочечной РНК (оцРНК). Некоторые из них вызывают серьезные инфекционные заболевания у человека. Например, коронавирус-1 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-1) и коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) стали причиной вспышек с высокими показателями смертности в 2002–2003 гг. и 2012 году соответственно. Новая коронавирусная инфекция, COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, появилась в 2019 году в городе Ухань (Китай) и уже привела более чем к 5 млн смертей по всему миру. Проникновение SARS-CoV-2 внутрь клетки происходит за счет взаимодействия вирусного белка шипа (S) с белком на поверхности клетки – ангиотензинконвертирующим ферментом-2 (ACE2). В инфицированных клетках сборка вируса происходит в эндосомах, отделяющихся от аппарата Гольджи. Высвобождаются вирусные частицы посредством экзоцитоза. Одним из возможных участников этого процесса считается ассоциированный с лизосомами мембранный белок-1 (LAMP1). Нами созданы трансгенные клеточные линии на основе клеток Vero с повышенной экспрессией гена *LAMP1* человека, проанализирована их чувствительность к заражению и репликативная активность SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2. Обнаружено повышение продукции обоих вирусов в трансгенных клетках по сравнению с исходной клеточной культурой, особенно при заражении клеток в присутствии трипсина. На основании полученных данных можно предположить, что LAMP1 способствует репликации SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 за счет усиления экзоцитоза.

Ключевые слова: SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, LAMP1, COVID-19, Vero, трансгенные клетки

DOI: 10.31857/S0026898422030053

Коронавирусы (CoV) относятся к семейству Coronaviridae отряда Nidovirales. Это вирусы, содержащие одноцепочечную плюс-цепь РНК (оцРНК), некоторые из них вызывают серьезные респираторные и кишечные инфекции у человека и животных [1]. В XX веке представители этого семейства стали причиной двух вспышек серьезных заболеваний человека: тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) в 2002–2003 гг. и ближневосточного респираторного синдрома (MERS) в 2012 году – и продолжающейся уже третий год пандемии коронавирусного инфекционного заболевания COVID-19. В первом случае был идентифицирован коронавирус, получивший название SARS-CoV (по современной терминологии SARS-CoV-1), а в 2012 году – MERS-CoV. В ре-

зультате этих вспышек в общей сложности погибло 1398 человек [2]. В конце декабря 2019 года в городе Ухань (Китай) появился новый вид коронавируса – SARS-CoV-2, – который стал причиной пандемии COVID-19 [3], быстро распространившейся по всему миру и продолжающейся до сих пор. На сегодняшний день зарегистрировано более 5 млн летальных исходов, вызванных COVID-19 (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>, данные на 08.12.2021).

Геном коронавируса представляет собой (+)оцРНК размером примерно 30 тыс.н. с 5'-кепом и 3'-поли(А)-хвостом. Геномная РНК кодирует полипротеины и служит матрицей для синтеза субгеномной РНК. Анализ последовательно-

сти генома SARS-CoV-2 выявил высокое сходство с геномами других инфекционных агентов из рода *Betacoronavirus*: bat-SARS-like (SL) ZC45, bat-SL ZXC21, SARS-CoV-1 и MERS-CoV [4]. Вероятным природным резервуаром этого патогена считаются летучие мыши и пальмовые цвететты. Проникновение вируса в клетки опосредовано связыванием гликопротеина шипа (S), находящегося на поверхности вириона, с его рецептором на хозяйской клетке. В качестве основного клеточного рецептора SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 идентифицирован ангиотензинконвертирующий фермент-2 (ACE2). Во взаимодействии с клеточным рецептором вовлечен рецепторсвязывающий домен (RBD) S-белка. Уже показано, что SARS-CoV-2 распознает ACE2 некоторых видов животных [1, 5].

Кроме того, показано, что SARS-CoV-2 использует сериновую протеазу TMPRSS2 для праймирования S-белка при проникновении в клетку, а механизм этого процесса аналогичен таковому для SARS-CoV-1 [6, 7]. Сообщалось, что RBD SARS-CoV-2 обладает более сильным сродством к ACE2 по сравнению с SARS-CoV-1 [8]. Протеолитическая активация S-белка – один из важнейших этапов жизненного цикла коронавируса. В дополнение к праймированию посредством TMPRSS2 S-белок может расщепляться также протеазами хозяина (катепсин, фурин, трипсин) по различным сайтам. В случае заражения клеток линий Vero или Vero E6 в лабораторных условиях добавление трипсина приводило к такому же эффекту, как и в присутствии катепсина [9].

Стандартной клеточной линией для вирусологических исследований, в том числе для культивирования и изучения коронавирусов, считается линия Vero, полученная из клеток почки африканской зеленой марышки. К важным характеристикам этих клеток относится их неспособность продуцировать интерферон – важный компонент клеточного иммунного ответа [10]. Часто используют линию Vero E6, которая представляет собой клон-вариант культуры Vero с контактным ингибированием – торможением деления клеточной массы при контакте с соседними клетками. Ранее показано, что SARS-CoV-1 вызывает литическую инфекцию при заражении ряда клеточных культур, включая Vero и Vero E6. Так, через 12 ч после заражения клеток Vero E6 средняя инфекционная доза (CCID₅₀/мл) вируса составляла 5.2×10^3 [11, 12].

С помощью электронной микроскопии показано, что вирусные частицы SARS-CoV-1 прикрепляются к поверхности клеток Vero E6 и через 7 ч после инфицирования в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи появляются вирусные нуклеокапсиды, заключенные в эндосомы. В пузырьках аппарата Гольджи

происходит гликозилирование вирусных белков S, M (мембранный белок) и E (белок оболочки), что необходимо для корректной сборки вирусных частиц, а также сама сборка [13]. Заключительная стадия инфекционного цикла – перенос лизосом, содержащих вирусные частицы, на клеточную мембрану и их высвобождение посредством экзоцитоза. Ранее обнаружена колокализация аксессуарного белка ORF6 SARS-CoV-1 с белком LAMP1 в инфицированных клетках Vero E6 [14]. LAMP1 – ассоциированный с лизосомами мембранный белок, который участвует в экзоцитозе [15]. Известно, что гликопротеин (GP) вируса Ласса после проникновения вирионов в клетку связывается с белком LAMP1 [16].

Мы предположили, что увеличение количества LAMP1 в клетке приведет к усилению экзоцитоза, что вызовет повышение продукции вирусов SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 инфицированными клетками. С целью проверить эту гипотезу мы создали трансгенные клеточные линии на основе культуры Vero, экспрессирующие ген *LAMP1* человека, и оценили продукцию обоих вирусов в полученных трансгенных линиях и исходной клеточной культуре. В результате проведенного анализа обнаружены различия в продукции вирусов в зависимости от экспрессии *LAMP1* и присутствия/отсутствия трипсина, использованного в качестве сериновой протеазы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение и клонирование открытой рамки считывания (ORF) гена *LAMP1*. РНК выделяли из клеток HEK293A (Клеточное хранилище ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, Россия) с помощью реактива TRIzol (“Thermo Fisher Scientific”, США). Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью обратной транскриптазы RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (“Thermo Fisher Scientific”) с использованием специфичного праймера к последовательности ORF *LAMP1*: 5'-GTGCAC-CAGGCTAGATAGTCTG-3' – по следующей программе: снижение температуры с 75 до 55°C (1.5°C/5 с); 3 мин при 55°C и 1 ч при 42°C. Полученную кДНК использовали для амплификации ORF. Реакцию проводили с использованием праймеров: 5'-TAAGCAGAATTTCGCCTCGCGCCATG-GCGGC-3' и 5'-TAAGCAGTCTGACGTCGAC-CAGGCTAGATAGTCTGGT-3' – по следующей программе: 11 циклов (3 мин при 94°C, 50 с при 94°C, 1 мин при 56°C, 14 мин при 68°C), 32 цикла (50 с при 94°C, 10 мин 15 с при 61°C) и 10 мин при 68°C.

Синтезированную последовательность секвенировали по Сэнгеру и клонировали под контроль промотора цитомегаловируса (CMV) в плазмиду, полученную из pSBi-GP (#60511, “Addgene”,

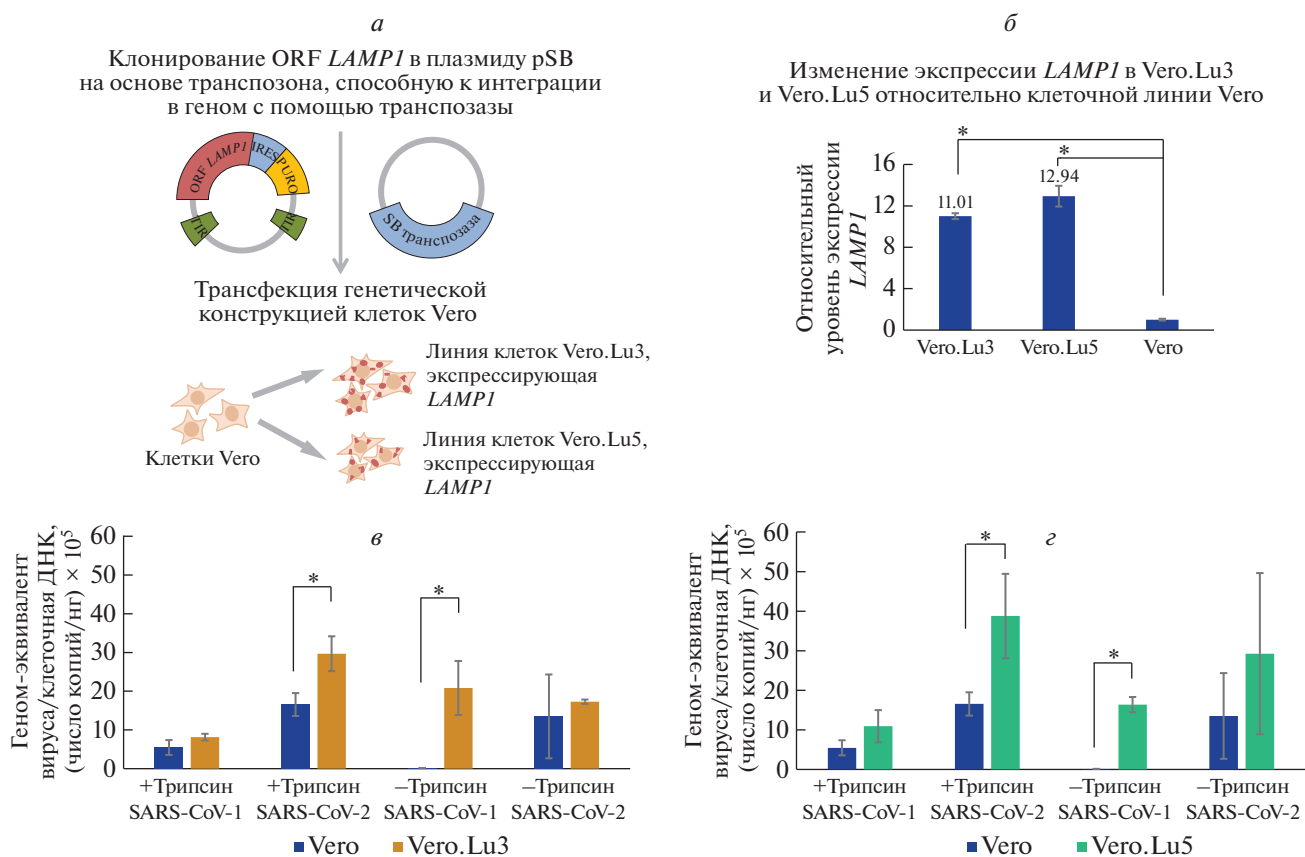


Рис. 1. Схема получения трансгенных клеточных линий и их заражение коронавирусами. Схема конструкций для получения трансгенных клеточных линий Vero.Lu3 и Vero.Lu5 (а) и экспрессия в них гена *LAMP1* (б). Анализ числа геном-эквивалентов вирусов SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 на клеточный геном клеток Vero и трансгенных линий Vero.Lu3 (в) и Vero.Lu5 (г) через 48 ч после заражения в присутствии (+) и в отсутствие (-) трипсина. **p* < 0.05.

США). Последовательность IRES с последующим геном пуromицин-*N*-ацетилтрансферазы клонировали после рамки считывания *LAMP1*. Далее клетки Vero (Клеточное хранилище ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, Россия) трансфицировали с помощью реагента Lipofectamine 3000 (“Thermo Fisher Scientific”) собранной гено-инженерной конструкцией и плазмидой, содержащей транспозон pCMV (CAT) T7-SB100 (#34879, “Addgene”). Стабильные трансформанты отбирали с помощью селекции на среде DMEM/F12, содержащей антибиотик пуromицин (10 мкг/мл), в течение одной недели с последующим культивированием в среде с пуromицином (5 мкг/мл) в течение 6 недель. Экспрессию *LAMP1* в трансгенной клеточной культуре оценивали методом ПЦР в реальном времени с использованием набора BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (“Биолабмикс”, Россия) и праймеров: 5'-AACTCATGAGCTGGACGCTG-3' и 5'-CTCCTGTG-GAAAAGAGAACAC-3' – к кДНК, полученной с помощью набора OT-M-MuLV-RH (“Биолабмикс”) и вырожденных праймеров. Результаты

нормализовали по экспрессии гена домашнего хозяйства гипоксантинфосфорибозилтрансферазы-1 (*HPRT1*).

Эксперимент по анализу уровня экспрессии мРНК *LAMP1* в клеточной линии Vero проведен в трех технических и четырех биологических повторах. Исходные данные обрабатывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [17]. Графические результаты представлены как средние значения биологических повторов со стандартными отклонениями (SD). Статистические различия между клеточными линиями Vero.Lu3, Vero.Lu5 и Vero определяли методом дисперсионного анализа ANOVA. Достоверность различий оценивали с использованием HSD-теста значимости Тьюки. Различия считали достоверными при значении *p* < 0.05.

Заражение клеточных культур вирусами SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2. Работы с живыми вирусами SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 проводили в соответствии с утвержденными Санитарно-эпидемиологическими правилами работы с патогенами II группы биобезопасности ([МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 3 2022](https://www.rosпотребнадzor.ru/documents/details.php?ELE-</p>
</div>
<div data-bbox=)

MENT_ID=3552). Клетки высевали в лунки 24-луночного планшета (10^5 клеток/лунка) и инкубировали до достижения 90%-ной конfluence. В экспериментах, предполагающих обработку монослоя клеток трипсином, к 1 мл культуральной среды DMEM/F12 (“Биолот”, Россия), содержащей антибиотики, добавляли трипсин (до 4 мкг/мл), обработанный тозилфенилаланилхлорметилкетон (ТРСК) (“Sigma-Aldrich”, США), и инкубировали в течение 25 мин при комнатной температуре. В экспериментах, не предусматривающих присутствия трипсина, клетки инкубировали в тех же условиях, но без трипсина. В каждую лунку 24-луночного планшета добавляли 100 мкл среды DMEM/F12, содержащей 4.6 I_g ФОЕ/мл (ФОЕ – фокусобразующие единицы) вирусных частиц SARS-CoV-1 (штамм Urbani, Erasmus University Medical Center, Rotterdam; GenBank Acc. No. AY278741.1) или SARS-CoV-2 (штамм SARS-CoV-2/human/AUS/VIC01/2020, GenBank Acc. No. MT007544.1) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Планшет промывали бессывороточной средой Игла (MEM). В планшеты, предназначенные для культивирования клеточной культуры в присутствии трипсина, добавляли 1 мл раствора трипсина в DMEM/F12 (2 мкг/мл). В планшет, где культивирование происходило без трипсина, добавляли только среду DMEM/F12. Планшеты инкубировали в течение 48 ч при 37°C и 5% CO₂. Для выделения вирусного генетического материала планшеты трижды замораживали и оттаивали с последующим лизисом с помощью набора РИБО-преп (“AmpliSens”, Россия). Каждый эксперимент проводили в трех биологических повторах.

Для определения количества вируса в монослое клеток и культуральной среде по отдельности среду собирали, центрифугировали 5 мин при 1 000 g и замораживали для последующего лизиса, как описано выше. К монослою добавляли свежую среду, после чего лизировали.

ПЦР в реальном времени для определения геном-эквивалентов вируса. Число геном-эквивалентов SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 измеряли с помощью диагностического набора для выявления SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР с флуоресцентными зондами Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG (ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, Россия) согласно рекомендациям производителя. Результаты нормировали относительно плазмидной ДНК pJet1.2_SARS, которая содержала фрагмент вирусного генома (последовательность 28670–28826 по штамму MN997409.1). Количество геномной ДНК клеток Vero измеряли с помощью ПЦР в реальном времени методом SYBR Green с использованием реагентов BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (“Биолабмикс”) с использованием

праймеров *vero_chr11-F* (5'-TCCTATGACGGG-GGCTGTTA-3') и *vero_chr11-R* (5'-GGCCCAA-GAGGTCGAATTGT-3'). Поскольку кариотип клеточной линии Vero вариабелен, для амплификации был выбран фрагмент хромосомы 11 (chr11:6570784–6570896), для которого показана стабильность числа копий на геном клетки [18]. Число копий генома определяли с помощью калибровочной кривой путем разбавления геномной ДНК, выделенной из клеток Vero, с известной концентрацией. Для исследования количества вируса на одну клетку использовали следующую формулу:

$$x = \frac{a}{b},$$

где a – общее число эквивалентов вирусного генома, b – общее количество геномной ДНК клеток Vero в каждом образце. Для определения статистической значимости полученных отличий между клеточными культурами использовали три биологических и три технических повтора. Нормальность распределения определяли по тесту Шапиро–Уилка. Для определения статистической значимости полученных различий между клеточными культурами использовали t -критерий Стьюдента для независимых выборок с нормальным распределением. Значения считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Интеграция последовательности LAMP1 в геном клеток Vero

Открытую рамку считывания *LAMP1* амплифицировали с кДНК, полученной из клеток HEK-293A, и клонировали в плазмидную конструкцию на основе транспозона Sleeping Beauty. Стандартную клеточную линию Vero трансфицировали полученной генно-инженерной конструкцией путем липофекции и отбирали стабильные трансформанты путем селекции на пурамицине. Таким образом получили две трансгенные клеточные линии Vero.Lu3 и Vero.Lu5. Экспрессию открытой рамки считывания *LAMP1* оценивали методом ПЦР в реальном времени. В клеточных линиях Vero.Lu3 и Vero.Lu5 обнаружено соответственно 11.01- и 12.94-кратное увеличение экспрессии гена интереса по сравнению с исходной клеточной линией Vero. Различия в уровне экспрессии достоверны при сравнении как Vero.Lu3 и Vero.Lu5, так и относительно исходной клеточной линии Vero ($p < 0.05$). Таким образом, обе трансгенные клеточные линии подходили для дальнейших экспериментов (рис. 1а и 1б).

Репликация вирусной РНК в трансгенных клеточных культурах

Трансгенные клеточные культуры заражали вирусами SARS-CoV-1 или SARS-CoV-2. Инфицированные клетки инкубировали в двух условиях: в присутствии трипсина и без него — по протоколу, описанному ранее [19, 20]. Образцы, содержащие вирусный и клеточный геномный материал, собирали через 48 ч [21]. Определяли число геном-эквивалентов вируса относительно модельной плазмиды, содержащей фрагмент вирусного генома SARS-CoV-1. Результаты представляли в виде числа геном-эквивалентов вируса в образце и числа геном-эквивалентов вируса на единицу массы геномной ДНК клеток Vero. Обнаружено увеличение продукции SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 в клетках Vero.Lu3 и Vero.Lu5 по сравнению с клетками Vero (рис. 1в и 1г соответственно). Достоверная разница в продукции вируса между клетками Vero и трансгенными клетками была более очевидной и значимой в присутствии трипсина в питательной среде при заражении ($p < 0.05$). Так, в клеточных линиях Vero.Lu3 и Vero.Lu5 наблюдали соответственно 5- и 6-кратное увеличение продукции SARS-CoV-1 по сравнению с исходными клетками (рис. 1в и 1г). Для SARS-CoV-2 различия были еще более выражены: продукция вируса увеличилась в 1 236 и 362 раз соответственно. Пересчет числа геном-эквивалентов вируса с поправкой на геномные эквиваленты клеток Vero внес лишь незначительные изменения. В отсутствие трипсина продукция SARS-CoV-1 в трансгенных клетках повышалась всего в 1.3–3.0 раза, а SARS-CoV-2 практически не отличалась от таковой в исходной линии. Преобразование в клеточные геномы привело к аналогичным профилям. Однако все различия в отсутствие трипсина не были достоверными.

Также показано, что через 48 ч после заражения без трипсина количество вируса в монослое клеток выше, чем в питательной среде в 1.6 раза в клетках Vero.Lu3, в 1.4 раза в клетках Vero.Lu5 и в 1.3 раза в исходной линии Vero. При заражении с трипсином эти значения равны 1.5, 1.5 и 1.4 соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе работы исследована продукция вирусов SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 в трансгенных клетках Vero, экспрессирующих ген *LAMP1* человека. Проанализировано число геном-эквивалентов вируса, а также число геном-эквивалентов вируса, нормированных на геномный эквивалент клеток Vero. Установленные различия в профилях вирусной продукции между трансгенными линиями и исходными клетками были статистически значимыми. В экспериментах по заражению ис-

пользовали равное число клеток и равное число вирусных частиц. Однако коронавирусы проявляют цитопатическое действие, поэтому может наблюдаться понижение продукции вируса из-за гибели монослоя клеток. Обнаружены различия в продукции вирусных частиц при заражении клеток в присутствии трипсина и без него. Значимая разница выявлена между исходной клеточной культурой Vero и трансгенными линиями клеток, экспрессирующими *LAMP1*, в присутствии трипсина. Ранее показано, что трипсин способствует процессингу и активации S-белка путем его гидролиза с образованием двух субъединиц — S1 и S2. Активированный белок взаимодействует с ACE2 и вирус проникает в клетку [22]. Известно, что зрелые вирионы коронавируса выходят из клетки через 12 ч после заражения [11, 12], что может приводить к вторичному заражению клеточной культуры и увеличению продукции вируса.

Нами показано, что повышенная экспрессия *LAMP1* приводит к увеличению продукции исследованных коронавирусов в обеих линиях трансгенных клеток Vero. Следует заметить, что в исходной клеточной линии Vero продукция SARS-CoV-2 была выше, чем SARS-CoV-1, что может быть связано с его повышенной вирулентностью. Что касается белка *LAMP1*, то его важнейшая функция — регуляция экзоцитоза лизосом [15]. Ранее сообщалось об участии *LAMP1* в жизненном цикле вирусов, использующих эндосомы для проникновения в клетку. Так, этот белок увеличивает общую эффективность заражения клеток вирусом Ласса [23]. *LAMP1* позволяет вирусным частицам выйти из эндоцитарного пути до того, как они столкнутся с более кислой протеолитической средой, что приводит к сохранению жизнеспособности большего числа вирионов.

В проведенном исследовании нами показано повышение продукции вирусов SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 в клетках Vero со сверхэкспрессией гена *LAMP1*. Также через 48 ч после заражения обнаружено повышенное количество вируса в клетках относительно его содержания в культуральной среде в трансгенных линиях по сравнению с исходной. На основании полученных данных можно предполагать, что белок *LAMP1* вовлечен в жизненный цикл вирусов SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2, и рассматривать его в качестве потенциальной мишени для терапии коронавирусной инфекции.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cui J., Li F., Shi Z.L. (2019) Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 181–192.
- De Wit E., Van Doremalen N., Falzarano D., Munster V.J. (2016) SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 523–534.
- Wu D., Wu T., Liu Q., Yang Z. (2020) The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. *Int. J. Infect. Dis.* **94**, 44–48.
- Chen Y., Liu Q., Guo D. (2020) Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.* **92**, 418–423.
- Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R.S., Li F. (2020) Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.* **94**, e00127–20.
- Gierer S., Bertram S., Kaup F., Wrensch F., Heurich A., Kramer-Kuhl A., Welsch K., Winkler M., Meyer B., Drosten C., Dittmer U., von Hahn T., Simmons G., Hofmann H., Pöhlmann S. (2013) The spike protein of the emerging *Betacoronavirus* EMC uses a novel coronavirus receptor for entry, can be activated by TMPRSS2, and is targeted by neutralizing antibodies. *J. Virol.* **87**, 5502–5511.
- Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T.S., Herrler G., Wu N.H., Nitsche A., Müller M.A., Drosten C., Pöhlmann S. (2020) SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. **181**, 271–280.e8.
- Tai W., He L., Zhang X., Pu J., Voronin D., Jiang S., Zhou Y., Du L. (2020) Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell. Mol. Immunol.* **17**, 613–620.
- Millet J.K., Whittaker G.R. (2012) Host cell proteases: critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res.* **202**, 120–134.
- Desmyter J., Melnick J.L., Rawls W.E. (1968) Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J. Virol.* **2**, 955–961.
- Mossel E.C., Huang C., Narayanan K., Makino S., Tesh R.B., Peters C.J. (2005) Exogenous ACE2 expression allows refractory cell lines to support severe acute respiratory syndrome coronavirus replication. *J. Virol.* **79**, 3846–3850.
- Keyaerts E., Vijgen L., Maes P., Neyts J., Van Ranst M. (2005) Growth kinetics of SARS-coronavirus in Vero E6 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 1147–1151.
- Qinfen Z., Jinming C., Xiaojun H., Huanying Z., Jicheng H., Ling F., Kunpeng L., Jingqiang Z. (2004) The life cycle of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *J. Med. Virol.* **73**, 332–337.
- Gunalan V., Mirazimi A., Tan Y.J. (2011) A putative diacidic motif in the SARS-CoV ORF6 protein influences its subcellular localization and suppression of expression of co-transfected expression constructs. *BMC Res. Notes.* **4**, 446.
- Yogalingam G., Bonten E.J., van de Vlekkert D., Hu H., Moshiah S., Connell S.A., D’Azzo A. (2008) Neuraminidase 1 is a negative regulator of lysosomal exocytosis. *Dev. Cell.* **15**, 74–86.
- Jae L.T., Raaben M., Herbert A.S., Kuehne A.I., Wirchnianski A.S., Soh T.K., Stubbs S.H., Janssen H., Damme M., Saftig P., Whelan S.P., Dye J.M., Brummelkamp T.R. (2014) Lassa virus entry requires a trigger-induced receptor switch. *Science.* **344**, 1506–1510.
- Chang S., Chen W., Yang J. (2009) Another formula for calculating the gene change rate in real-time RT-PCR. *Mol. Biol. Rep.* **36**, 2165–2168.
- Osada N., Kohara A., Yamaji T., Hirayama N., Kasai F., Sekizuka T., Kuroda M., Hanada K. (2014) The genome landscape of the African green monkey kidney-derived Vero cell line. *DNA Res.* **21**, 673–683.
- Simmons G., Rennekamp A.J., Bates P. (2006) Proteolysis of SARS-associated coronavirus spike glycoprotein. *Adv. Exp. Med. Biol.* **581**, 235–240. https://doi.org/10.1007/978-0-387-33012-9_39
- Harcourt J., Tamin A., Lu X., Kamili S., Sakthivel S.K., Murray J., Queen K., Tao Y., Paden C.R., Zhang J., Li Y., Uehara A., Wang H., Goldsmith C., Bullock H.A., Wang L., Whitaker B., Lynch B., Gautam R., Schindewolf C., Lokugamage K.G., Scharton D., Plante J.A., Mirchandani D., Widen S.G., Narayanan K., Makino S., Ksiazek T.G., Plante K.S., Weaver S.C., Lindstrom S., Tong S., Menachery V.D., Thornburg N.J. (2020) Isolation and characterization of SARS-CoV-2 from the first US COVID-19 patient. *bioRxiv*. 2020.03.02.972935. <https://doi.org/10.1101/2020.03.02.972935>
- Lokugamage K.G., Hage A., de Vries M., Valero-Jimenez A.M., Schindewolf C., Dittmann M., Rajsbbaum R., M., Menachery V.D. (2020) Type I interferon susceptibility distinguishes SARS-CoV-2 from SARS-CoV. *J. Virol.* **94**(23), e01410-20.
- Xia S., Lan Q., Su S., Wang X., Xu W., Liu Z., Zhu Y., Wang Q., Lu L., Jiang S. (2020) The role of furin cleavage site in SARS-CoV-2 spike protein-mediated membrane fusion in the presence or absence of trypsin. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, 92. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0184-0>
- Hulseberg C.E., Fénéant L., Szymańska K.M., White J.M. (2018) Lamp1 increases the efficiency of Lassa virus infection by promoting fusion in less acidic endosomal compartments. *mBio.* **9**(1), e01818-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01818-17>

INCREASED *LAMP1* EXPRESSION ENHANCES SARS-CoV-1 AND SARS-CoV-2 PRODUCTION IN Vero-DERIVED TRANSGENIC CELL LINES

A. A. Dolskiy¹, I. V. Grishchenko¹, S. A. Bodnev¹, A. A. Nazarenko¹, A. M. Smirnova¹,
A. K. Matveeva¹, L. E. Bulychev¹, A. S. Ovchinnikova¹, T. V. Tregubchak¹,
A. V. Zaykovskaya¹, I. R. Imatdinov¹, O. V. Pyankov¹, E. V. Gavrilova¹,
R. A. Maksyutov¹, and D. V. Yudkin^{1,*}

¹State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor, World-Class Genomic Research Center for Biological Safety and Technological Independence, Federal Scientific and Technical Program on the Development of Genetic Technologies, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia

*e-mail: yudkin_dv@vector.nsc.ru

Coronaviridae is a family of viruses with single-stranded RNA that could cause diseases with high mortality rates. SARS-CoV-1 and MERS-CoV appeared in 2002–2003 and 2012, respectively. A novel coronavirus, SARS-CoV-2, emerged in 2019 in Wuhan (China) and has caused more than 5 million of deaths in worldwide. SARS-CoV-1 entry into the cell is due to the interaction of the viral spike (S) protein and the cell protein angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). After infection, virus assembly occurs in Golgi apparatus-derived vesicles during exocytosis. One of the possible participants in this process is LAMP1 protein. We established transgenic Vero cell lines with increased expression of human *LAMP1* gene and evaluated SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 production. An increase in the production of both viruses in the *LAMP1*-expressing cells compared with Vero cells was observed, especially in the presence of trypsin during infection. On the base results obtained one supposes that LAMP1 promote SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 production due to enhanced exocytosis.

Keywords: SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, LAMP1, COVID-19, Vero, transgenic cells