

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ БЕЛКОВ  
КОРОНАВИРУСОВ**  
(Обзор литературы)

Юлдашев Насирджан Мухамеджанович

Ташкентский педиатрический медицинский институт, Республика Узбекистан, г. Ташкент

✓ **Резюме**

*В данной работе проведён анализ научной литературы по мембраносвязанным белкам коронавирусов. В работе рассмотрены только три основных белков мембраны коронавирусов – белок M, E и S. Рассмотрены вопросы модификации этих белков путём гликозилирования и пальмитоилированием. Обсуждена роль модификаций в сборке вирионов и вирулентности. Сделан вывод о важности изучения мембранных белков коронавирусов для разработки эффективной вакцины против них.*

*Ключевые слова: коронавирусы, M белок, E белок, S белок, гликозилирование, пальмитоилирование.*

**KORONAVIRUS MEMBRANASI BILAN BOGLANGAN OQILLARINING MOLEKULAR  
BIOLOGIYASI**  
(Adabiyot sharhi)

Yuldashev Nasirjan Muxamedjanovich

Toshkent pediatriya tibbiyot instituti, O'zbekiston Respublikasi, Toshkent

✓ **Rezyume**

*Ushbu ish koronaviruslarning membrana bilan bog'langan oqsillari bo'yicha ilmiy adabiyotlarni tahlil qiladi. Ishda koronavirus membranasining faqat uchta asosiy oqsili - M, E va S oqsillari ko'rib chiqiladi. Bu oqsillarni glikozillanish va palmitillanish yo'li bilan modifikatsiyalash masalalari ko'rib chiqildi. Virion birikmasi va virulentlikdagi modifikatsiyalarning roli muhokama qilinadi. Koronaviruslarga qarshi samarali vaksina yaratish uchun ularning membrana oqsillarini o'rganish muhim degan xulosaga keldi.*

*Kalit so'zlar: koronaviruslar, M oqsili, E oqsili, S oqsili, glikozillanish, palmitillanish.*

**MOLECULAR BIOLOGY OF MEMBRANE-BINDED PROTEINS OF  
CORONAVIRUSES**  
(Literature review)

Nasirjan Mukhamedjanovich Yuldashev

Tashkent Pediatric Medical Institute, Republic of Uzbekistan, Tashkent;

✓ **Resume**

*In this paper, we analyze the scientific literature on membrane-bound proteins of coronaviruses. Only three main proteins of the coronavirus membrane — protein M, E, and S — were examined in the paper. Modification of these proteins by glycosylation and palmitoylation was examined. The role of modifications in the assembly of virions and virulence is discussed. The conclusion is drawn on the importance of studying the membrane proteins of coronaviruses to develop an effective vaccine against them.*

*Key words: coronaviruses, M protein, E protein, S protein, glycosylation, palmitoylation.*

### Актуальность

По определению вирусы – «внеклеточные формы жизни, способные проникать в определённые живые клетки и размножаться только внутри этих клеток» [1]. Они поражают все типы живых организмов – растений, животных и даже бактерий. По классификации Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) на состояние 2018 года вирусы делятся на 6 классов, 14 отрядов, 7 подотрядов, 150 семейств, 79 подсемейств, 1019 родов и 59 подродов. Вся классификация содержит 5560 вида разных вирусов. В то же время существует ещё более 3000 не классифицированных вирусов [2]. В декабре 2019 года в китайском городе Ухань произошла вспышка эпидемии, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2. Вирус вызывает коронавирусную инфекцию COVID-19. Заболевание может протекать в форме острой респираторной вирусной инфекции лёгкого течения [3, 4], так и в тяжёлой форме [5]. Осложнениями COVID-19 могут быть вирусная пневмония, влекущая за собой острый респираторный дистресс-синдром дыхательную недостаточность с риском смерти. 11 марта 2020 года ВОЗ признал COVID-19 пандемией. К 25 апрелю 2020 года COVID-19 был зарегистрирован в 210 стран мира и число заболевших превысило 2,84 млн. человек. Из них погибло более 199 000 человек. К 14 декабря 2020 года во всём мире количество заражённых равнялось 72772344 человек, а количество умерших составило 1621184 человека. Эти цифры постоянно увеличиваются. Как уже указали выше, COVID-19 был вызван вирусом SARS-CoV-2.

Данный вирус является представителем порядка Nidovirales, семейства Coronaviridae, рода Betacoronavirus и подрода Sarbecovirus.

Вирусы семейства Coronaviridae – это оболочечные, РНК содержащие вирусы. Семейство содержит 40 вирусов, и они объединены в 2 подсемейства: Letovirinae и Orthocoronavirinae. Название этого семейства связано со строением вируса – его шиповидные отростки напоминают солнечную корону (рис. 1) [6].

Структура SARS-CoV-2, в принципе, соответствует характерной структуре вирусов семейства Coronaviridae: на электронных микрофотографиях – это крупные плеоморфные сферические частицы, имеющие на поверхности выступы, выглядящие как корона [8]. Размер вирусных частиц находится в диапазоне 80–90 нм.

Оболочка вируса состоит из липидного бислоя и на нём находятся М (membrane – мембранные), Е (envelope – оболочечные) и S (spike – шиповые) белки (рис. 2) [9].

**Белок М.** Белок М – это трансмембранный гликопротеин типа III (т.е. у них пептидная часть составляет основу молекулы). Так как этот белок является самым часто встречающимся в бислоевой мембране, то он и является структурообразующим белком. Белок М состоит приблизительно из 230 аминокислот. Он имеет 5 доменов: короткий N-концевой эктодомен (находится снаружи), три гидрофобные ТМ-домены (трансмембранные домены) и большой С-концевой эндодомен (находится внутри капсулы) [9, 11] (рис. 3, А).

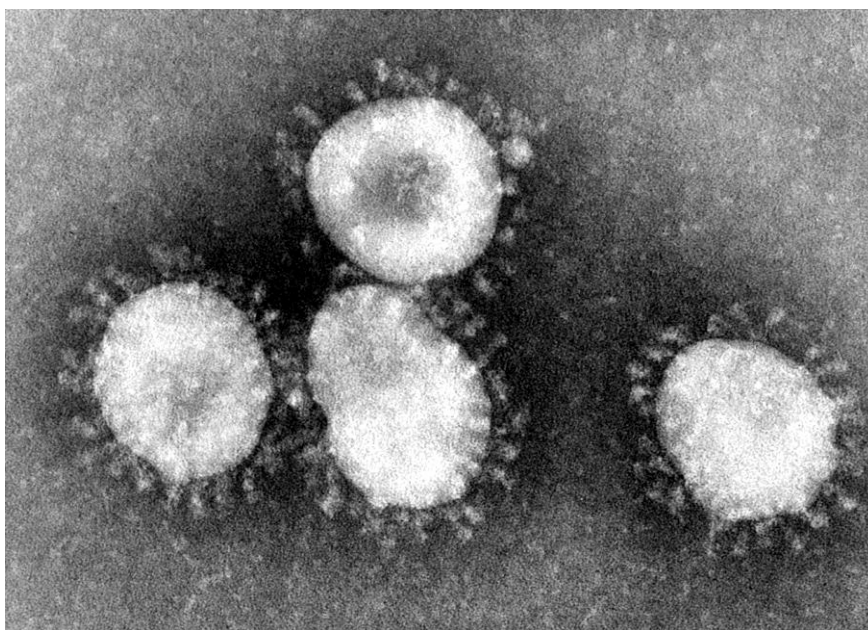


Рис. 1. Коронавирус под микроскопом [по 7].

Для М белков вирусов CoV (коронавирусы) характерно гликозирование: N-связанное гликозирование встречается у вирусов  $\alpha$ - и  $\delta$ -CoV, а O-связанное – у  $\beta$ -CoV [13, 14]. Исследование, проведённое на химерных М белках, показало не влияния типа

гликозирования на сборку вируса [15]. У SARS-CoV N-концевой домен М белка гликозирован [16, 17]. М Белок SARS-CoV содержит один сайт N-гликозирования в N4 [18, 19].

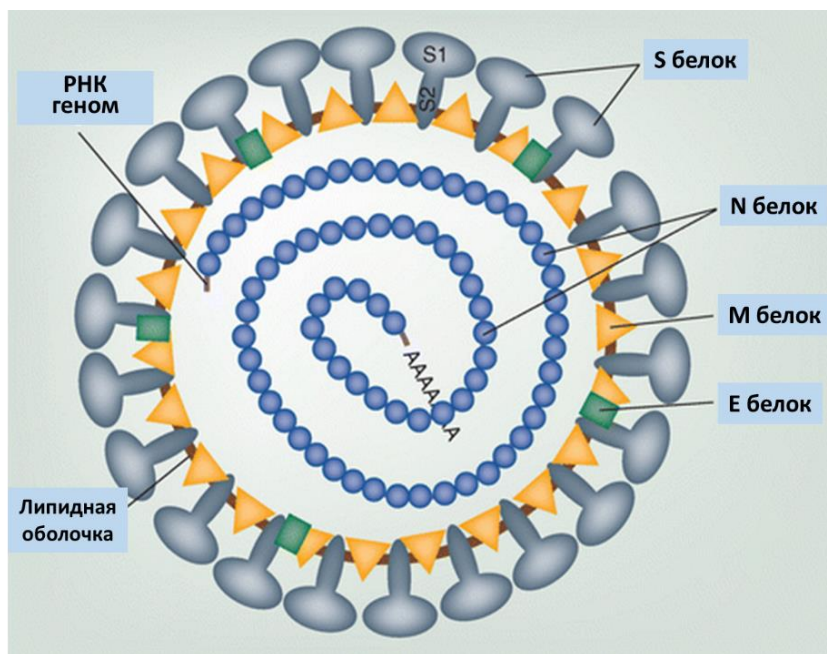


Рис. 2. Схематическое изображение коронавируса [по 10].

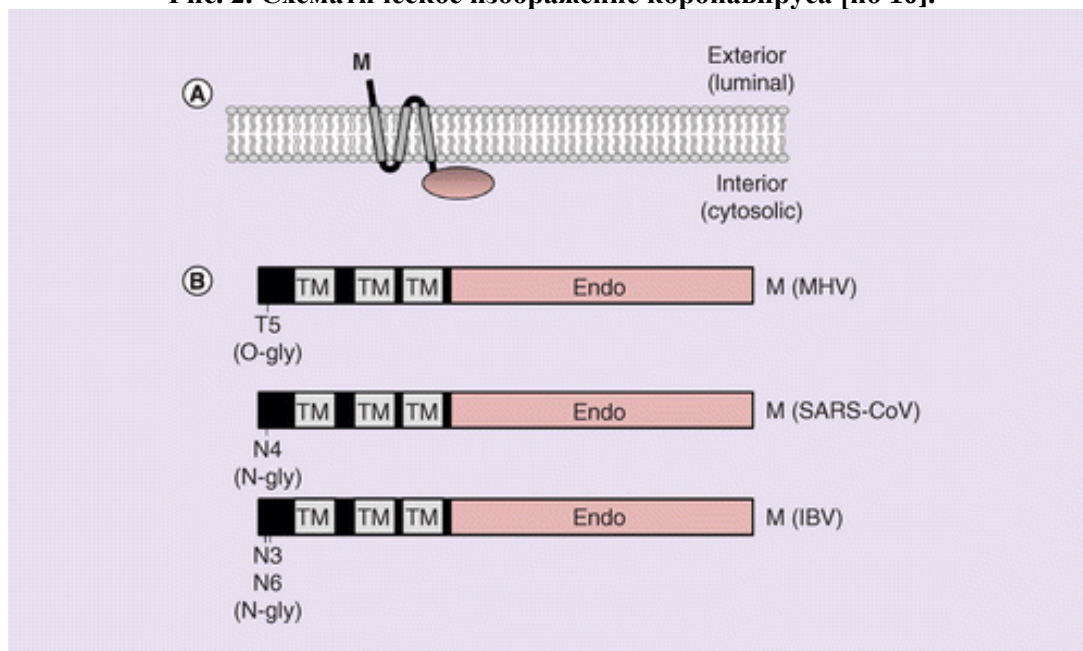


Рис. 3. Схематическое изображение топологии белка М (А) и места гликозирования у коронавирусов – MHV (Mouse hepatitis virus – вирус гепатита мышей), SARS-CoV (Severe acute respiratory syndrome coronavirus – коронавирус острого тяжёлого респираторного синдрома) и IBV (Infectious bronchitis virus – вирус инфекционного бронхита) (В) [по 12].

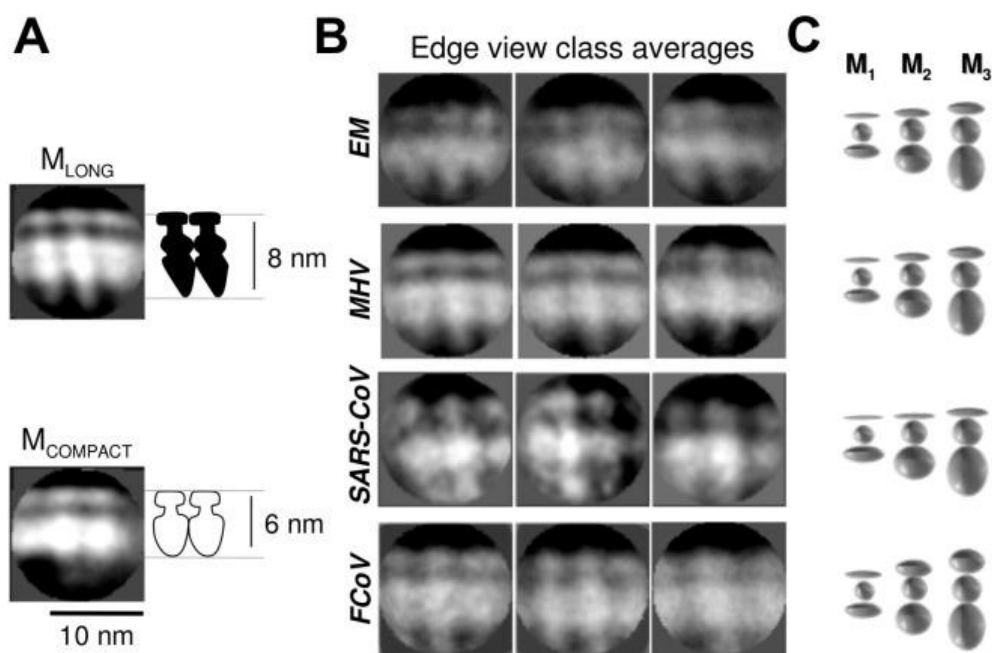
Endo – эндодомен; N-gly – N-гликозирования;  
O-gly – O-гликозирования; TM – трансмембранный домен.

Гликозилирование белка М SARS-CoV поддерживает функционально активную конформацию и, вероятно, имеет значение антигенного характера [20, 21]. При сборке вириона белок М взаимодействует с другими М белками и в то же время с другими белками мембраны – белком Е и S, а также с нуклеокапсидным белком N [22, 23, 24]. Белок М в вирионе присутствует в виде димера и представлен в виде двух конформаций: длинной ( $M_{LONG}$ ) – длина 8 нм и компактной ( $M_{COMPACT}$ ) – длина 6 нм (рис. 4, А) [25, 26].

**Белок Е.** Е белок оболочки коронавируса – это гидрофобный интегральный мембранный белок, имеющий от 76 до 109 аминокислотных остатков и молекулярную массу 8–12 кДа. Он

имеет 3 домена: N-концевой короткий эктодомен, длинный трансмембранный домен, имеющий  $\alpha$ -спиральную конфигурацию и С-концевой гидрофильный эндодомен. У вируса SARS-CoV Е белок имеет две топологии: малую и большую. При малой топологии Е белок состоит из N-концевого короткого эктодомена, двух трансмембранных доменов и С-концевой эктодомена (рис. 5, А).

Белок Е обычно встречается в качестве минорного компонента практически во всех группах CoV [27, 28]. Он может образовывать пентамерные структуры, проявляющие активность ионных каналов [29, 30], которые называются виropоринами [31, 32].



**Рис. 4. Микрофотографии высокого разрешения мембран коронавирусов – MHV, SARS-CoV и FCoV (Feline coronavirus – коронавирус кошек) с М белком [по 26]. Контрастная окраска, разрешение 17 Å;**

**А – две конформации М белка; В – примеры упаковки М белка у разных вирусов; С – двумерные проекции М-эктодомена, трансмембранного домена и эндодомена в виде эллипсоидов.**

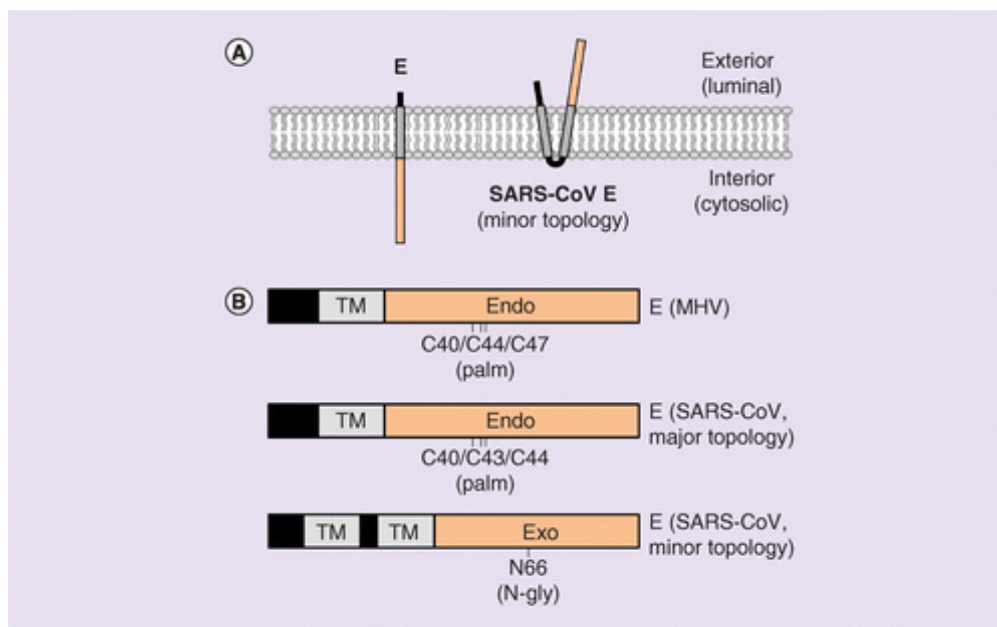
Виропорины – вирусные белки с активностью ионных каналов. К ним, кроме белка Е, относятся белки 3а и 8а. Вирус SARS-CoV кодирует три виropорина: белки 3а, Е и 8а (большинства других CoV кодируют два виropорина). Белок Е, так и белок 3а, может связывать более 400 клеточных белков. Исследования С. Castaño-Rodriguez et al. (2018) показали, что белки Е и 3а необходимы для максимальной репликации SARS-CoV и вирулентности [33]. Следовательно, вирусные виropорины являются подходящими

мишенями для противовирусной терапии и для мутаций в аттенуированных (живых) вакцинах против SARS-CoV.

Модификация Е белка коронавирусов идёт через гликозилирования и пальмитоилирования. Пальмитоилирование идёт по трём остаткам цистеина (Cys) [34]: для вируса MHV-CoV – это Cys находящиеся на 40-ой, 44-ой и 47-ой позициях, а для SARS-CoV – это Cys находящиеся на 40-ой, 43-ой и 44-ой позициях (рис. 5, В). Белок Е имеет роль в сборке и высвобождении вируса [35]. Белок

Е также взаимодействует с белком М [15, 36]. Считается, что именно пальмитоилирование белка Е вируса МНВ способствует его стабильности и биологической активности во время сборки зрелых вирионов [23]. Однако исследование Y-T. Tseng с соавторами (2014) показало, что пальмитоилирование белка Е у белком М. Роль гликозилирования белка Е вируса SARS-CoV ещё предстоит изучить.

вируса SARS-CoV не обязательно для сборки вирионов [37]. Е белок вируса SARS-CoV имеет два N-связанных сайта гликозилирования – N48 и N66. По-видимому, гликозилирование необходимо для взаимодействия белка Е с



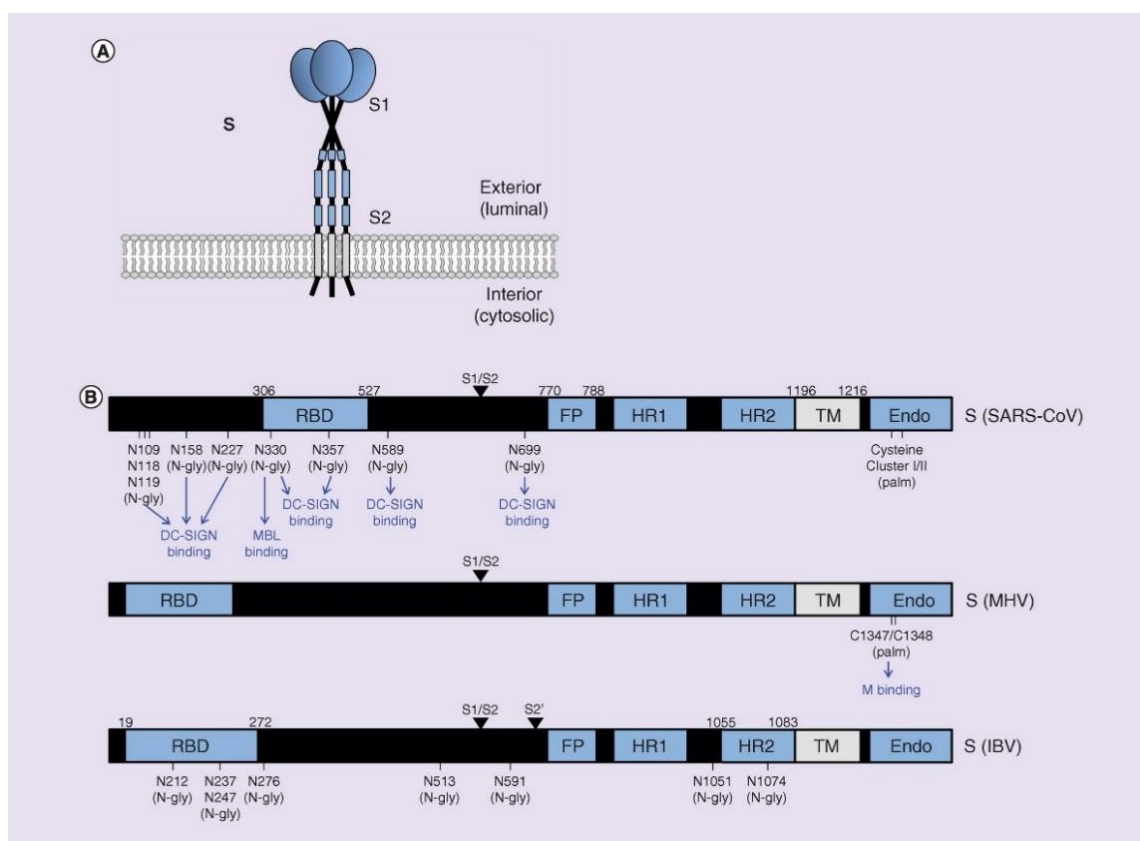
**Рис. 5. Схематическое изображение топологии белка Е (А) и места пальмитоилирования и гликозилирования у коронавирусов – МНВ и большой и малой топологии SARS-CoV (В) [по 12].**

**Endo** – эндодомен; **N-gly** – N-гликозилирование; **Palm** – пальмитоилирование; **TM** – трансмембранный домен; **Exo** – экзодомен.

**Белок S.** Белок S – это самый крупный структурный белок коронавируса. Именно S белок CoV позволяет слиянию между вирусными мембранами и мембранами клеток инфицируемого организма, что и является решающим этапом при инфекции оболочечного вируса [38, 39]. Этот трансмембранный белок имеет большой N-концевой эктодомен, один трансмембранный домен и короткий C-концевой эндодомен (рис. 6, А) [9, 40]. Белок S имеет два функциональных субъединицы – S1 и S2 примерно одинакового размера [41, 42].

S1 субъединица, по сути, головка белка S в N-концевом домене, эта часть белка имеет домен связывания с рецептором клеток

хозяина. S2 домен – это ствол белка S, который состоит из пептида слияния, далее двух областей семикратных повторов – HR1 и HR2, трансмембранного домена (TM) и богатого цистеином цитозольного хвоста [43]. Субъединицы отщепляются от S белка протеазами (катепсины и трансмембранные протеазы серина 2) клеток-хозяев [44]. S белок также модифицируется гликозилированием и пальмитоилированием (рис. 6, В). Эктодомен S белка коронавируса модифицируется N-связанным гликозилированием и образованием дисульфидных связей, а остатки цистеина в цитозольном хвосте модифицируются пальмитоилированием [45, 46, 47].



**Рис. 6. Схематическое изображение топологии белка S (A) и места пальмитоилирования и гликозилирования у коронавирусов – SARS-CoV, MHV и IBV (B) [по 12].**

**Endo – эндодомен; FP – связывающий пептид; HR – гептадные повторы; RBD – рецептор связывающий домен; TM – трансмембранный домен; N-gly – N-гликозилирование; Palm – пальмитилирование.**

Дисульфидное связывание способствует складыванию S белка коронавирусов. Так как эту связь можно разрывать путём окисления, D. Lavillette с соавторами (2006) было изучено чувствительность S1 домена S белка SARS-CoV. Результаты показали невысокий уровень чувствительности к окислительно-восстановительному состоянию S1 домена S белка SARS-CoV [48].

N-сцепленное гликозилирование S белка коронавируса MHV описано ещё в 1980-х годах [45]. Далее было показано N-связанное гликозилирование и для S белков вирусов – IBV [49], TGEV (porcine transmissible gastroenteritis coronavirus – свинной трансмиссивный гастроэнтеритный коронавирус) [50, 51], BCoV (bovine coronavirus – коронавирус крупного рогатого скота) [52]. С помощью метода масс-спектрометрии была показана структура N-связанных гликанов на S белке SARS-CoV. В его состав входят гликаны с высоким

содержанием маннозы, гибридные и сложные гликаны с или без N-ацетилгалактозамина (GalNAc) и фукозным ядром [53]. По данным O. Krokhin с соавт. (2003) в S белке SARS-CoV только 12 сайтов были гликозилированы [54]. Вообще, возможных мест гликозилирования у белка S довольно много. Однако исследования показывают, что в этих местах гликозилирование может и отсутствовать из-за огромного количества белка S, продуцируемого во время инфекции, а также ограниченных возможностей ферментов гликозилирования клеток хозяина [55]. Имеется предположение, что только гликозилирование в определённых критических сайтах, может иметь особое значение в функциональности белка S. В то же время, N-связанное гликозилирование вносит значительный вклад в конформацию S белка коронавируса, что существенно влияет на его связывание с рецептором и антигенность. Так, имеются данные о том, что связывание

нейтрализующих IBV антител зависит от гликозилирования S белка этого вируса [56]. Важность гликозилирования для связывания с рецептором и антигенности также была показана для S белков коронавирусов BCoV [57], TGEV [58], а также SARS-CoV [59]. Эти факты свидетельствуют о том, что N-связанное гликозилирование может играть важную роль в формировании нативной структуры белка коронавируса S, влияя тем самым на его антигенность. Показано также, что S белок SARS-CoV во время своего созревания в эндоплазматическом ретикулуме связывается с шапероном – калнексином [60]. Важность гликозилирования S белка также доказывает то, что мутации в N-связанном сайте гликозилирования N212 или N276 вируса IBV нарушают функционирование белка S, и, следовательно, вирулентность этого вируса [55]. Однако не во всех случаях антигенность зависит от гликозилирования S белка. Так это показано для S белка коронавируса TGEV [61], S1 эпитопа S белка SARS CoV [62]. В то же время N-связанное гликозилирование S белка SARS-CoV, хотя и не влияет на его связывание с клеточным рецептором ACE2, оно все же может способствовать эффективному прикреплению вирионов к клеткам-хозяевам. Так, было показано, что лектин DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) типа C облегчает проникновение в клетку SARS-CoV [63, 64, 65]. Исследованиями D.P. Han с соавторами (2007) показано, что семь сайтов гликозилирования (N109, N118, N119, N158, N227, N589 и N699) S белка SARS-CoV являются критическими для проникновения вируса, опосредованного DC-SIGN и L-SIGN [66]. N-связанное гликозилирование также может способствовать активации врожденного иммунного ответа в клетках, инфицированных коронавирусом. Так, предварительная обработка TGEV-инфицированных клеток растительным лектином – конканавалином А до воздействия моноклеарных клеток периферической крови свиньи приводила к дозозависимому снижению индукции IFN- $\alpha$ . Более того, ингибирование N-связанного гликозилирования туникамицином или

удаление N-связанных гликанов с помощью PNGase F (Peptide:N-glycosidase F) снижало индуцированную TGEV продукцию IFN- $\alpha$  [67]. Исходя из этих данных можно сделать вывод, что N-связанные гликаны на S белке коронавируса могут представлять собой паттерн, распознаваемый рецепторами распознавания паттернов хозяина, которые и активируют нижестоящий противовирусный врожденный иммунный ответ.

Таким образом, влияние гликозилирования S-белка на иммунный ответ является сложным, оно может варьироваться в зависимости от конкретного коронавируса и хозяина.

Пальмитоилирование S белка коронавируса, также, как и его гликозилирование, было первоначально идентифицировано в клетках, инфицированных MHV-A59 [68]. E.B. Thorp с соавторами (2006) показал, что ингибирование пальмитоилацилтрансферазы снижало пальмитоилирование S белка MHV, что приводило к значительному снижению вирулентности MHV [69]. У мутантов вируса MHV, лишённых пальмитоилированных цистеинов у S белка, также наблюдалось снижение вирулентности [70].

Как указывалось, цитоплазматическая часть S белка SARS-CoV содержит четыре богатых цистеином кластера. Цистеины I и II кластера модифицированы пальмитоилированием. Имеется предположение, что пальмитоилирование в эндодомене может потребоваться для проявления активности S белка SARS-CoV [71]. В 2010 году C.E. McBride и C.E. Machamer используя непальмитоилированный по S белку мутантный вирус SARS-CoV, показали необходимость пальмитоилирование S белка SARS-CoV для слияния их клетками [72]. Примечательно то, что под влиянием оксида азота (NO) или его производных наблюдалось снижение пальмитоилирования S белка SARS CoV, что повлияло на его связывание с родственным рецептором ACE2 (Angiotensin-converting enzyme 2 – ангиотензинпревращающий фермент 2) [73].

**Таблица.**

**Посттрансляционные модификации основных мембраносвязанных белков коронавируса и связанные с ними предполагаемые функции**

| Белок    | Модификация        | Предполагаемая функция                          | Вирусы                     |
|----------|--------------------|-------------------------------------------------|----------------------------|
| <b>М</b> | О-гликозилирование | Индукция интерферона типа I                     | MHV                        |
|          | N-гликозилирование | Фолдинг и трафикинг белка М                     | SARS-CoV                   |
| <b>Е</b> | N-гликозилирование | Образование двух различных мембранных топологий | SARS-CoV                   |
|          | Пальмитоилирование | Сборка вириона и вирулентность                  | MHV                        |
|          |                    | Стабильность белка Е и трафикинг                | MHV                        |
| <b>С</b> | Дисульфидные связи | Фолдинг белка и тримеризация                    | MHV                        |
|          | N-гликозилирование | Образование нейтрализующих эпитопов             | TGEV; BCoV; SARS-CoV; IBV; |
|          |                    | Участие в мембранном синтезе                    | IBV                        |
|          |                    | Лектин-опосредованное прикрепление вириона      | SARS-CoV                   |
|          |                    | Активация врождённого иммунитета                | TGEV                       |
|          | Пальмитоилирование | Трафикинг и фолдинг белка S                     | MHV; SARS-CoV;             |
|          |                    | Сборка и вирулентность                          | MHV; TGEV;                 |
|          |                    | Взаимодействие между S и М белками              | MHV                        |

### Заключение

Следовательно, вышеизложенные свидетельства о важности модификации мембраносвязанных белков коронавирусов для полноценного функционирования вирусной частицы. В таблице приведены виды модификации основных мембраносвязанных белков и их значение в функционировании этих белков.

Таким образом, основными мембраносвязанными белками являются мембранные белки М, Е и S. Кроме этих белков в коронавирусах имеются также неструктурные белки (nonstructural proteins) – Nsp4, Nsp9, Nsp16 и целый ряд вспомогательных белков, таких как HE, За, 8ab, 3b. Все они необходимы для нормального функционирования вирусной частицы. Представленные в данной работе мембраносвязанные белки имеют большое значение для прикрепления вирусной частицы к клетке, в проникновение в клетку, а также в сборке вирусных частиц в клетке. Поэтому эти белки представляют большой интерес, так как изменяя их конформацию можно получить вирусные частицы с малой вирулентностью, что откроет путь к разработке эффективных вакцин против них. С другой стороны, зная строение этих белков, можно создать новые препараты, имеющие тропность к

определённым сайтам этих белковых молекул, что приведёт к нарушению воспроизводимости вирусной частицы.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Biologicheskii entsiklopedicheskiy slovar' / Gl. red. M.S. Gilyarov; Redkol.: A.A. Bayev, G.G. Vinberg, G.A. Zavarzin i dr. – М.: Sov. Entsiklopediya, 1986. – 831 s.
2. King A.M.Q., Lefkowitz E., Adams M.J., Carstens E.B. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. – Elsevier, 2011. – P. 6. – ISBN 0-12-384684-6.136
3. David L. Heymann, Nahoko Shindo. COVID-19: what is next for public health? // The Lancet. – Elsevier, 2020. – 13 February. – ISSN 1474-547X 0140-6736, 1474-547X. – doi:10.1016/S0140-6736(20)30374-3.
4. Profilaktika, diagnostika i lecheniye novoy koronavirusnoy infektsii (COVID-19). Vremennyye metodicheskiye rekomendatsii. Ministerstvo zdavookhraneniya Rossiyskoy Federatsii. (3 marta 2020). [https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-\(ncov\)-infection-is-suspected](https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-(ncov)-infection-is-suspected)
5. Atlas po meditsinskoy mikrobiologii, virusologii i immunologii: Uchebnoye

- posobiye dlya studentov meditsinskikh vuzov / pod red. A.A. Vorob'yova, A.S. Bykova. – M.: Meditsinskoye informatsionnoye agentstvo, 2003. – S. 121. – ISBN 5-89481-136-8.
6. Content Providers(s): CDC/Dr. Fred Murphy - This media comes from the Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL), with identification number #4814, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=822112>.
  7. Goldsmith C.S., Tatti K.M., Ksiazek T.G., et al. Ultrastructural characterization of SARS coronavirus. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10(2):320–326. doi:10.3201/eid1002.030913
  8. Masters P.S. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66, 193–292 (2006);
  9. Entedar A.J. Alsaadi, Ian M.J. Membrane binding proteins of coronaviruses // *Future virology.* – vol. 14, № 4. <https://doi.org/10.2217/fvl-2018-0144>
  10. Wang J., Fang S., Xiao H., Chen B., Tam J.P., Liu D.X. Interaction of the coronavirus infectious bronchitis virus membrane protein with  $\beta$ -actin and its implication in virion assembly and budding. *PLoS ONE* 4(3), e4908 (2009).
  11. To Sing Fung & Ding Xiang Liu Post-translational modifications of coronavirus proteins: roles and function *FUTURE VIROLOGY VOLUME 13, ISSUE 6 / JUNE 2018* 405–430
  12. de Haan C.A., Roestenberg P., de Wit M. et al. Structural requirements for O-glycosylation of the mouse hepatitis virus membrane protein. *J. Biol. Chem.* 273(45), 29905–29914 (1998).
  13. Oostra M., de Haan C.A., de Groot R.J., Rottier P.J. Glycosylation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus triple-spanning membrane proteins 3a and M. *J. Virol.* 80(5), 2326–2336 (2006).
  14. Kuo L., Hurst-Hess K.R., Koetzner C.A., Masters P.S. Analyses of coronavirus assembly interactions with interspecies membrane and nucleocapsid protein chimeras. *J. Virol.* 90(9), 4357–4368 (2016).
  15. Holmes K.V., Doller E.W., Sturman L.S. Tunicamycin resistant glycosylation of coronavirus glycoprotein: demonstration of a novel type of viral glycoprotein. *Virology* 115(2), 334–344 (1981).
  16. Stern D.F., Sefton B.M. Coronavirus proteins: structure and function of the oligosaccharides of the avian infectious bronchitis virus glycoproteins. *J. Virol.* 44(3), 804–812 (1982).
  17. Hu Y., Wen J., Tang L. et al. The M protein of SARS-CoV: basic structural and immunological properties. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 1(2), 118–130 (2003).
  18. Voss D., Kern A., Traggiai E. et al. Characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus membrane protein. *FEBS Lett.* 580(3), 968–973 (2006).
  19. Braakman I., van Anken E. Folding of viral envelope glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *Traffic* 1(7), 533–539 (2000).
  20. de Haan C.A., de Wit M., Kuo L. et al. The glycosylation status of the murine hepatitis coronavirus M protein affects the interferogenic capacity of the virus in vitro and its ability to replicate in the liver but not the brain. *Virology* 312(2), 395–406 (2003).
  21. Arndt A.L., Larson B.J., Hogue B.G. A conserved domain in the coronavirus membrane protein tail is important for virus assembly. *J. Virol.* 84 (21), 11418–11428 (2010).
  22. Boscarino J.A., Logan H.L., Lacny J.J., Gallagher T.M. Envelope protein palmitoylations are crucial for murine coronavirus assembly. *J. Virol.* 82(6), 2989–2999 (2008).
  23. Kuo L., Masters P.S. Genetic evidence for a structural interaction between the carboxy termini of the membrane and nucleocapsid proteins of mouse hepatitis virus. *J. Virol.* 76(10), 4987–4999 (2002)
  24. Neuman B.W., Buchmeier M.J. Supramolecular Architecture of the Coronavirus Particle. *Adv Virus Res.* 2016; 96 : 1–27. doi:10.1016/bs.aivir.2016.08.005
  25. Neuman B.W., Kiss G., Kunding A.H. et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J. Struct. Biol.* 174(1), 11–22 (2011)
  26. Torres J., Maheswari U., Parthasarathy K., Ng L., Liu D.X., Gong X. Conductance and amantadine binding of a pore formed by a lysine-flanked transmembrane domain of SARS coronavirus envelope protein. *Protein Sci.* 16(9), 2065–2071 (2007).
  27. Wilson L., Gage P., Ewart G. Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication. *Virology* 353(2), 294–306 (2006).
  28. Torres J., Parthasarathy K., Lin X., Saravanan R., Kukol A., Liu D.X. Model of a putative pore: the pentameric  $\alpha$ -helical bundle of SARS coronavirus E protein in

- lipid bilayers. *Biophys. J.* 91(3), 938–947 (2006).
29. To J., Surya W., Fung T.S. et al. Channel-inactivating mutations and their revertant mutants in the envelope protein of infectious bronchitis virus. *J. Virol.* 91(5), e02158-16 (2017).
  30. Madan V., Garcia M. de J., Sanz M.A., Carrasco L. Viroporin activity of murine hepatitis virus E protein. *FEBS Lett.* 579(17), 3607–3612 (2005).
  31. Ye Y., Hogue B.G. Role of the coronavirus E viroporin protein transmembrane domain in virus assembly. *J. Virol.* 81(7), 3597–3607 (2007).
  32. Castano-Rodriguez C., Honrubia J.M., Gutierrez-Alvarez J. et al. Role of severe acute respiratory syndrome coronavirus viroporins E, 3a, and 8a in replication and pathogenesis. *MBio* 9(3), e02325–17 (2018).
  33. Liao Y., Yuan Q., Torres J., Tam J.P., Liu D.X. Biochemical and functional characterization of the membrane association and membrane permeabilizing activity of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. *Virology* 349(2), 264–275 (2006).
  34. Vennema H., Godeke G.J., Rossen J.W. et al. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J.* 15(8), 2020–2028 (1996).
  35. Chen S.C., Lo S.Y., Ma H.C., Li H.C. Expression and membrane integration of SARS-CoV E protein and its interaction with M protein. *Virus Genes* 38(3), 365–371 (2009).
  36. Tseng Y-T., Wang S-M., Huang K-J., Wang C-T. SARS-CoV envelope protein palmitoylation or nucleocapsid association is not required for promoting virus-like particle production. *J. Biomed. Sci.* 21, 34 (2014).
  37. Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 4(6), 1011–1033 (2012).
  38. Sieczkarski S.B., Whittaker G.R. Dissecting virus entry via endocytosis. *J. Gen. Virol.* 83(Pt 7), 1535–1545 (2002).
  39. Shen S., Law Y., Liu D. A single amino acid mutation in the spike protein of coronavirus infectious bronchitis virus hampers its maturation and incorporation into virions at the nonpermissive temperature. *Virology* 326(2), 288–298 (2004).
  40. Bosch B., Rottier P. Nidovirus entry into cells. In: *Nidoviruses*. ASM Press, DC, USA, 157–178 (2008).
  41. Yamada Y., Liu D.X. Proteolytic activation of the spike protein at a novel RRRR/S motif is implicated in furin-dependent entry, syncytium formation, and infectivity of coronavirus infectious bronchitis virus in cultured cells. *J. Virol.* 83(17), 8744–8758 (2009).
  42. Yamada Y., Liu X.B., Fang S.G., Tay F.P.L., Liu D.X. Acquisition of cell–cell fusion activity by amino acid substitutions in spike protein determines the infectivity of a coronavirus in cultured cells. *PLoS ONE* 4(7), e6130 (2009).
  43. Shirato K., Kawase M., Matsuyama S. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection mediated by the transmembrane serine protease TMPRSS2. *J. Virol.* 87(23), 12552–12561 (2013).
  44. Niemann H., Boschek B., Evans D., Rosing M., Tamura T., Klenk H.D. Post-translational glycosylation of coronavirus glycoprotein E1: inhibition by monensin. *EMBO J.* 1(12), 1499–1504 (1982).
  45. Opstelten D.J., de Groote P., Horzinek M.C., Vennema H., Rottier P.J. Disulfide bonds in folding and transport of mouse hepatitis coronavirus glycoproteins. *J. Virol.* 67(12), 7394–7401 (1993).
  46. van Berlo M.F., van den Brink W.J., Horzinek M.C., van der Zeijst B.A. Fatty acid acylation of viral proteins in murine hepatitis virus-infected cells. Brief report. *Arch. Virol.* 95(1–2), 123–128 (1987).
  47. Lavillette D., Barbouche R., Yao Y. et al. Significant redox insensitivity of the functions of the SARS-CoV spike glycoprotein: comparison with HIV envelope. *J. Biol. Chem.* 281(14), 9200–9204 (2006).
  48. Cavanagh D. Coronavirus IBV glycopolypeptides: size of their polypeptide moieties and nature of their oligosaccharides. *J. Gen. Virol.* 64 (Pt 5), 1187–1191 (1983).
  49. Garwes D.J., Bountiff L., Millson G.C., Elleman C.J. Defective replication of porcine transmissible gastroenteritis virus in a continuous cell line. *Adv. Exp. Med. Biol.* 173, 79–93 (1984).
  50. Jacobs L., van der Zeijst B.A., Horzinek M.C. Characterization and translation of transmissible gastroenteritis virus mRNAs. *J. Virol.* 57(3), 1010–1015 (1986).

51. Deregt D., Sabara M., Babiuk L.A. Structural proteins of bovine coronavirus and their intracellular processing. *J. Gen. Virol.* 68 (Pt 11), 2863–2877 (1987).
52. Ritchie G., Harvey D.J., Feldmann F. et al. Identification of N-linked carbohydrates from severe acute respiratory syndrome (SARS) spike glycoprotein. *Virology* 399(2), 257–269 (2010).
53. Krokhn O., Li Y., Andonov A. et al. Mass spectrometric characterization of proteins from the SARS virus: a preliminary report. *Mol. Cell. Proteomics* 2(5), 346–356 (2003).
54. Zheng J., Yamada Y., Fung T.S., Huang M., Chia R., Liu D.X. Identification of N-linked glycosylation sites in the spike protein and their functional impact on the replication and infectivity of coronavirus infectious bronchitis virus in cell culture. *Virology* 513, 65–74 (2018).
55. Koch G., Kant A. Binding of antibodies that strongly neutralise infectious bronchitis virus is dependent on the glycosylation of the viral peplomer protein. *Adv. Exp. Med. Biol.* 276, 143–150 (1990).
56. Yoo D., Parker M.D., Babiuk L.A. Analysis of the S spike (peplomer) glycoprotein of bovine coronavirus synthesized in insect cells. *Virology* 179(1), 121–128 (1990).
57. Delmas B., Laude H. Carbohydrate-induced conformational changes strongly modulate the antigenicity of coronavirus TGEV glycoproteins S and M. *Virus Res.* 20(2), 107–120 (1991).
58. Song H.C., Seo M-Y., Stadler K. et al. Synthesis and characterization of a native, oligomeric form of recombinant severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein. *J. Virol.* 78(19), 10328–10335 (2004).
59. Fukushi M., Yoshinaka Y., Matsuoka Y. et al. Monitoring S protein maturation in the endoplasmic reticulum by calnexin is important for the infectivity of severe acute respiratory syndrome-coronavirus. *J. Virol.* 86(21), 11745–11753 (2012).
60. Godet M., Rasschaert D., Laude H. Processing and antigenicity of entire and anchor-free spike glycoprotein S of coronavirus TGEV expressed by recombinant baculovirus. *Virology* 185(2), 732–740 (1991).
61. Sui J., Li W., Murakami A. et al. Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101(8), 2536–2541 (2004).
62. Marzi A., Gramberg T., Simmons G. et al. DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 78(21), 12090–12095 (2004).
63. Shih Y-P., Chen C-Y., Liu S-J. et al. Identifying epitopes responsible for neutralizing antibody and DC-SIGN binding on the spike glycoprotein of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 80(21), 10315–10324 (2006).
64. Yang Z-Y., Huang Y., Ganesh L. et al. pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN. *J. Virol.* 78(11), 5642–5650 (2004).
65. Han D.P., Lohani M., Cho M.W. Specific asparagine-linked glycosylation sites are critical for DC-SIGN-and L-SIGN-mediated severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *J. Virol.* 81(21), 12029–12039 (2007).
66. Charley B., Lavenant L., Delmas B. Glycosylation is required for coronavirus TGEV to induce an efficient production of IFN alpha by blood mononuclear cells. *Scand. J. Immunol.* 33(4), 435–440 (1991).
67. van Berlo M.F., van den Brink W.J., Horzinek M.C., van der Zeijst B.A. Fatty acid acylation of viral proteins in murine hepatitis virus-infected cells. Brief report. *Arch. Virol.* 95(1–2), 123–128 (1987).
68. Thorp E.B., Boscarino J.A., Logan H.L., Goletz J.T., Gallagher T.M. Palmitoylations on murine coronavirus spike proteins are essential for virion assembly and infectivity. *J. Virol.* 80(3), 1280–1289 (2006).
69. Shulla A., Gallagher T. Role of spike protein endodomains in regulating coronavirus entry. *J. Biol. Chem.* 284(47), 32725–32734 (2009).
70. Petit C.M., Chouljenko V.N., Iyer A. et al. Palmitoylation of the cysteine-rich endodomain of the SARS-coronavirus spike glycoprotein is important for spike-mediated cell fusion. *Virology* 360(2), 264–274 (2007).
71. McBride C.E., Machamer C.E. Palmitoylation of SARS-CoV S protein is necessary for partitioning into detergent-resistant membranes and cell-cell fusion but not interaction with M protein. *Virology* 405(1), 139–148 (2010).
72. Akerström S., Gunalan V., Keng CT, Tan Y-J, Mirazimi A. Dual effect of nitric oxide on SARS-CoV replication: viral RNA production and palmitoylation of the S protein are affected. *Virology* 395(1), 1–9 (2009).

Поступила 09.11.2021