

НАУЧНАЯ СЕССИЯ ОБЩЕГО СОБРАНИЯ ЧЛЕНОВ РАН
“РОЛЬ НАУКИ В ПРЕОДОЛЕНИИ ПАНДЕМИЙ
И ПОСТКРИЗИСНОМ РАЗВИТИИ ОБЩЕСТВА”

МЕХАНИЗМЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА
КОРОНАВИРУСОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ
ДЛЯ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СРЕДСТВ

© 2022 г. С. К. Ююкина^{a,b,*}, Д. О. Жарков^{a,b,**}

^a Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

^b Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*E-mail: s.iuiukina@g.nsu.ru

**E-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 11.02.2022 г.

После доработки 25.02.2022 г.

Принята к публикации 14.03.2022 г.

Пандемия COVID-19 вызвала необходимость создания противовирусных препаратов, активных против коронавируса SARS-CoV-2. Одна из широко используемых стратегий борьбы с вирусными инфекциями состоит в использовании модифицированных нуклеозидных аналогов, ингибирующих репликацию вирусов путём включения в растущую цепь ДНК или РНК, что позволяет останавливать её синтез. Сложность применения такого метода лечения в случае с SARS-CoV-2 связана с тем, что коронавирусы обладают эффективным механизмом поддержания стабильности генома. Центральным его элементом служит белок nsr14, который отличается экзонуклеазной активностью, благодаря чему с 3'-конца растущей цепи РНК удаляются неправильно включённые и неканонические нуклеотиды. В качестве потенциальных мишеней для антикоронавирусной терапии рассматриваются ингибиторы экзонуклеазы nsr14 и нуклеозидные аналоги, устойчивые к её действию.

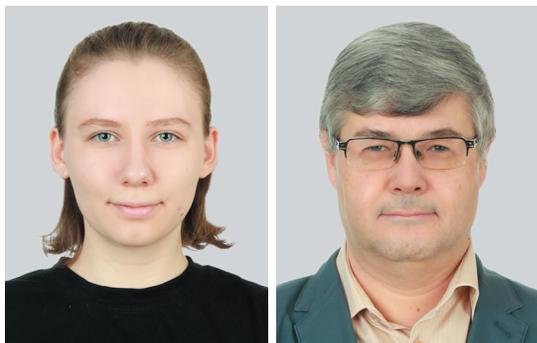
Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, нуклеозидные ингибиторы, репликация, стабильность генома, РНК-зависимая РНК-полимераза, корректирующая экзонуклеаза.

DOI: 10.31857/S0869587322080175

За всю историю своего существования человечество неоднократно сталкивалось с опасными вирусами, вызывающими серьёзные заболева-

ния. Продолжающаяся пандемия COVID-19, вызванная распространением коронавируса SARS-CoV-2, повлекла за собой глобальный кризис в области здравоохранения. Несмотря на успехи иммунопрофилактики, количество заболевших продолжает расти. Поэтому возникла острая необходимость в создании противовирусных препаратов, облегчающих течение коронавирусной инфекции и предотвращающих развитие осложнений.

Согласно последней версии классификации Международного комитета по таксономии вирусов [1], коронавирусы относятся к подсемейству Orthocoronavirinae семейства Coronaviridae порядка Nidovirales. Это подсемейство состоит из четырёх родов – альфа-, бета-, гамма- и дельтакоронавирусы; представители первых двух родов в основном поражают млекопитающих, а вирусы последних двух родов – птиц. Высокопатогенные бетакоронавирусы SARS-CoV, SARS-CoV-2 и MERS-CoV вызывают у человека тяжёлые респираторные синдромы, в то время как остальные че-



ЮЮКИНА София Константиновна — инженер лаборатории геномной и белковой инженерии ИХБФМ СО РАН. ЖАРКОВ Дмитрий Олегович — член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией геномной и белковой инженерии ИХБФМ СО РАН.



Рис. 1. Схема организации генома SARS-CoV-2

тыре встречающихся в человеческой популяции коронавируса (альфакоронавирусы HCoV-NL63 и HCoV-229E и бетакоронавирусы HCoV-OC43 и HCoV-NKU1) обычно вызывают лишь относительно лёгкие заболевания верхних дыхательных путей, хотя у младенцев, детей младшего возраста и пожилых людей инфекция может протекать гораздо тяжелее [2].

Исследования геномных последовательностей показывают, что все коронавирусы человека изначально имели в качестве природных хозяев диких млекопитающих: SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV, HCoV-NL63 и HCoV-229E, вероятнее всего, перешли к человеку от летучих мышей, а HCoV-OC43 и HKU1 — от грызунов [2, 3]. Помимо вирусов человека, к важным и сравнительно хорошо изученным представителям коронавирусов относятся вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней и некоторые другие вирусы, поражающие сельскохозяйственных животных и птиц, вирус энтерита/инфекционного перитонита кошек и вирус мышинного гепатита (MHV), который часто используется как безопасная лабораторная модель биологии коронавирусов. В отличие от видоспецифичного взаимодействия вируса с поверхностными рецепторами заражаемых клеток и с иммунной системой организма, процессы реализации генетической информации внутри клетки у всех коронавирусов практически идентичны, и современное состояние знаний о репликации коронавирусов основано в основном на изучении MHV, SARS-CoV и SARS-CoV-2.

ОРГАНИЗАЦИЯ И РЕПЛИКАЦИЯ ГЕНОМА КОРОНАВИРУСОВ

Геном коронавирусов представляет собой одноцепочечную полицистронную (+)-РНК длиной 26–32 т. п. н., кодирующую 14 перекрывающихся открытых рамок считывания [4, 5]. Геномная РНК содержит кэп на 5'-конце, поли(А)-хвост на 3'-конце и короткие 5'- и 3'-нетранслируемые области, образующие шпильки с регуляторными функциями. Две большие рамки считывания — ORF1a и ORF1b, занимающие вместе приблизительно две трети генома, транслируются с образованием двух полипротеинов: pp1a и образующегося при сдвиге рамки считывания на один нуклеотид pp1ab [6]. Они в свою очередь расщепляются на 16 неструктурных белков (nsp) кодируемыми

ORF1a протеазами: химотрипсин-подобной протеазой nsp5 и папаин-подобной протеазой nsp3. Помимо протеазной активности, неструктурные белки также участвуют в модификации внутренней среды клетки-хозяина, закрепляют комплексы репликации вируса на субклеточных структурах и управляют процессами репликации, транскрипции и процессинга РНК. Оставшаяся треть генома содержит гены вирусных структурных белков шипов, оболочки, мембраны и нуклеокапсида, а также включает в себя несколько ORF, кодирующих дополнительные белки (рис. 1).

Как и у других вирусов с (+)-одноцепочечной РНК, репликация генома коронавирусов начинается с синтеза (–)-цепи РНК, которая далее копируется с образованием новых молекул (+)-РНК. Главную роль в репликации играет вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза (RDRP) — белок nsp12 [7, 8]. Репликация вируса происходит в цитоплазме инфицированных клеток и начинается, когда комплекс RDRP с рядом других неструктурных белков (репликативно-транскрипционный комплекс, RTC) связывается с 3'-концом (+)-РНК. Этот процесс стимулируется вторичными структурами 3'-нетранслируемой области РНК [9]. RTC связывается с модифицированными мембранами, происходящими из эндоплазматического ретикулаума клетки-хозяина, образуя при этом фабрики вирусной репликации [10]. Закрепление RTC на мембранах обеспечивается трансмембранным доменом nsp3 вместе с трансмембранными белками nsp4 и nsp6. Помимо RDRP, в состав центральной части RTC входят РНК-геликаза nsp13, факторы процессивности nsp7 и nsp8 и белки nsp10 и nsp14 [9, 11–13]. Белок nsp13 может раскручивать двуцепочечную РНК в направлении 5' → 3', в результате чего образуется одноцепочечная матрица для синтеза РНК. Активность nsp13 увеличивается за счёт прямого белок-белкового взаимодействия с nsp12, что позволяет предположить, что эффективность синтеза вирусной РНК повышается, когда эти два белка взаимодействуют в функциональном RTC.

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ НУКЛЕОЗИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ

Действие многих терапевтических аналогов пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов и азотистых оснований базируется на их способности

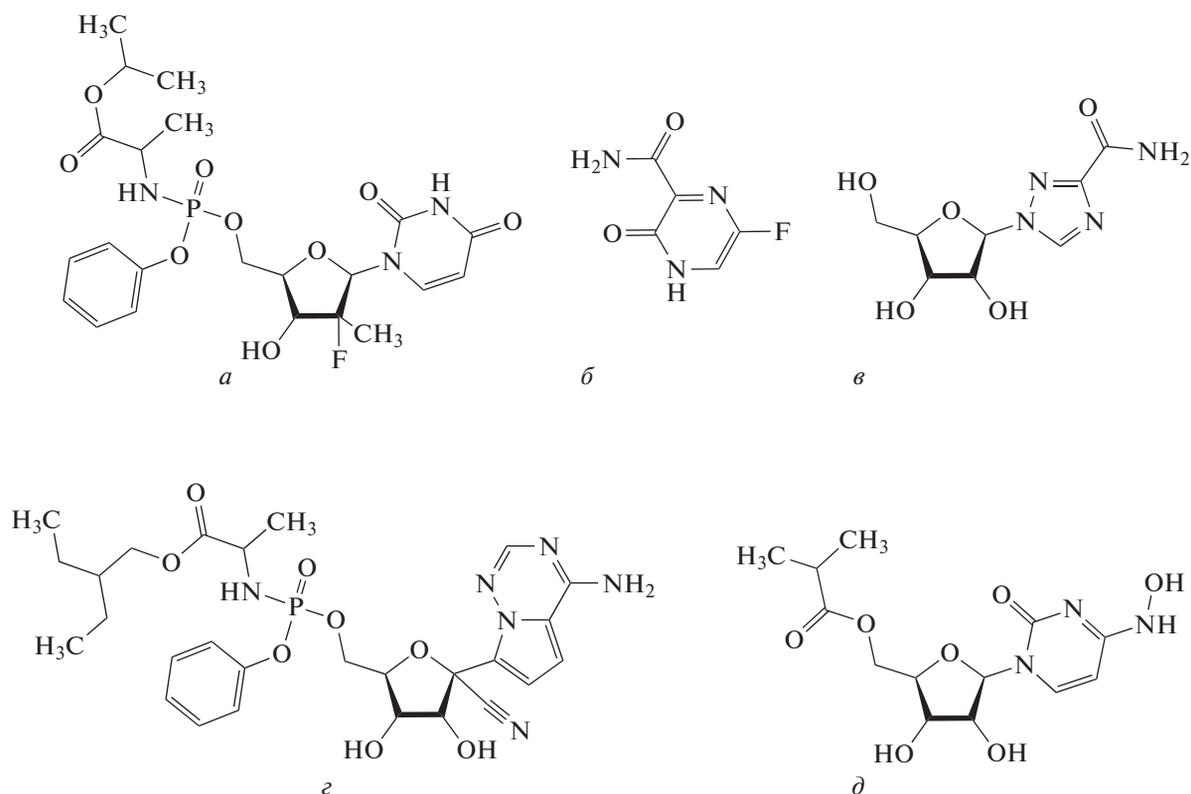


Рис. 2. Структура некоторых нуклеозидных ингибиторов RDRP: софосбувир (а), фавипиравир (б), рибавирин (в), ремдесивир (д) и молнупиравир (д)

метаболизироваться в клетке до рибо- и дезоксирибонуклеозидтрифосфатных производных и включаться в ДНК и РНК. Соединения этого класса широко применяются в качестве противоопухолевых и иммуносупрессорных лекарств, а также противовирусных агентов. Включаясь в геномную ДНК или РНК, эти модифицированные нуклеотиды искажают её структуру или вызывают обрыв синтезируемой цепи. Они также зачастую ингибируют репликативные полимеразы, конкурируя с каноническими dNTP и NTP за активный центр фермента. Например, аналог dG ацикловир применяется для борьбы с инфекциями, вызываемыми герпесвирусами – простым и генитальным герпесом, опоясывающим лишаём, тяжёлыми формами ветряной оспы. Попадая в заражённую клетку, ацикловир фосфорилируется вирусной тимидинкиназой, а затем превращается в трифосфат под действием клеточных нуклеотидкиназ. После включения остатка ацикловира в растущую цепь ДНК вирусная ДНК-полимераза связывает следующий dNTP, но не может синтезировать фосфодиэфирную связь из-за отсутствия 3'-ОН-группы в ацикловири, и происходит обрыв растущей цепи. Более того, вирусная ДНК-полимераза обладает очень высоким сродством к такому модифицированному 3'-концу и образует с ним своего рода тупиковый комплекс,

из которого высвобождается очень медленно. Большое число нуклеозидных ингибиторов РНК-зависимой ДНК-полимеразы (ревертазы) – азидотимидин, ламивудин, адефовир, энтекавир и т.д. – разработано для терапии, направленной на вирус иммунодефицита человека и вирус гепатита В.

Для вирусов, которые содержат РНК-геном и реплицируют его с помощью RDRP, существует не так много нуклеозидных ингибиторов (рис. 2). Софосбувир, употребляемый в терапии гепатита С, представляет собой аналог уридина. Фавипиравир, проявляющий комбинированные матричные свойства А и Г, одобрен в некоторых странах для лечения гриппа и COVID-19 (в России – только при COVID-19). Рибавирин также действует на многие РНК-вирусы, ингибируя RDRP и одновременно подавляя активность ферментов, кэпирующих 5'-конец вирусной РНК.

Два известных нуклеозидных ингибитора, активные в отношении коронавируса, отличаются от упомянутых выше соединений по механизму действия. Ремдесивир, аналог аденозина, разрабатывался как противовирусное средство широкого спектра действия, успешно применялся в экспериментальной терапии геморрагических лихорадок Эбола и Марбург, а в 2020 г. получил одобрение для терапии COVID-19. После активации

ции в клетках ремдесивир включается в растущую цепь РНК, но синтез сразу после этого не обрывается. После остатка ремдесивира RDRP включает ещё три нуклеотида, смещаясь на один шаг по матрице после каждого включения. После этого нитрильная группа при С1' молекулы ремдесивира входит в столкновение с остатком Ser861 RDRP, и реакция останавливается [14–16]. Нуклеозидный аналог молнупиравир, одобренный для терапии COVID-19 в конце 2021 г., вообще не вызывает обрыва цепи и после активации включается в вирусную РНК с высокой эффективностью [17, 18]. Однако, поскольку в качестве азотистого основания в молекуле молнупиравира содержится N^4 -гидроксицитозин, в разных таутомерных формах легко образующий пары с А и Г, в геноме вируса очень быстро накапливается множество инактивирующих мутаций. Летальным уровнем мутагенеза также частично обусловлена противовирусная активность фавипиравира [19].

КОРРЕКЦИЯ ОШИБОК РЕПЛИКАЦИИ – МЕХАНИЗМ ОБЕСПЕЧЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА

Репликация вирусов с РНК-геномами обычно сопровождается высоким уровнем ошибок RDRP, что приводит к их существованию в виде популяций геномных мутантов, или квазивидов [20, 21]. Низкая репликативная точность позволяет вирусам с РНК-геномами адаптироваться к различным условиям среды за счёт давления отбора, однако она также увеличивает вероятность летальных мутаций. Это приводит к необходимости баланса между квазивидовым разнообразием и репликативной стабильностью [22, 23]. У корона-вирусов, которые обладают самым длинным геномом из всех РНК-содержащих вирусов, точность репликации гораздо более критична.

Концепция экзонуклеолитической коррекции ошибочно включённых нуклеотидов (proofreading) как общего свойства любых репликативных комплексов была окончательно сформулирована в 1980-х годах на основании биохимических и генетических данных для ряда ДНК-полимераз бактерий и бактериофагов [24, 25]. Многие полипептиды, выполняющие функцию ДНК-полимераз, обладают также 3' → 5'-экзонуклеазной активностью, более специфичной для неспаренных 3'-концевых нуклеотидов, и внесение инактивирующих аминокислотных замен в соответствующие области белка приводит к резкому повышению общего уровня мутагенеза. Наиболее изученными в этом плане до сих пор остаются фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* и ДНК-полимеразы бактериофагов T7 и RB69, для которых показано существование отдельного 3' → 5'-экзонуклеазного домена в структуре полимеразы и

подробно исследована кинетика включения соответствующих и не соответствующих матрице dNMP, переноса конца праймера с неверно включённым dNMP в экзонуклеазный центр и гидролиза его фосфодиэфирной связи. В целом коррекция ошибок полимеразы с участием специфичной 3' → 5'-экзонуклеазной активности оказывается на 5–6 порядков эффективнее, чем пирофосфоролиз того же ошибочно включённого нуклеотида.

Расширение списка изученных ДНК-полимераз и систем репликации показало, что во многих случаях корректирующая активность принадлежит не самой ДНК-полимеразе (точнее, не тому полипептиду, в котором локализована полимеразная активность), а отдельному полипептиду. В каких-то случаях, например для ϵ -субъединицы ДНК-полимеразы III *E. coli* (DnaQ или MutD), он может входить в состав прочного репликативного комплекса. В других репликативных системах корректирующие экзонуклеазы существуют как отдельные ферменты или факультативные субъединицы репликативного комплекса и часто выполняют в клетке дополнительные функции. Так, у человека корректирующие функции могут выполнять 3' → 5'-экзонуклеазы TREX1 и TREX2 [26] и экзо/эндонуклеаза APEX1 [27, 28]. При этом в одной системе репликации ДНК-полимеразы с корректирующей активностью могут сосуществовать с отдельными 3' → 5'-экзонуклеазами, что наблюдается, в частности, у млекопитающих, поскольку ДНК-полимеразы δ и ϵ сами обладают способностью корректировать ошибки [29]. Помимо неправильно включённых канонических нуклеотидов, корректирующие экзонуклеазные активности удаляют из ДНК и многие 3'-концевые остатки нуклеозидных ингибиторов [30–34]; также недавно обнаружено участие в этом процессе экзонуклеаз репарации ДНК CtIP и MRE11 из пути негомологичного воссоединения концов двуцепочечных разрывов [35].

В отличие от систем репликации бактериофагов, бактерий и эукариот, о возможности коррекции ошибок у вирусов, поражающих клетки высших эукариот, включая человека, известно очень мало. У ряда ДНК-содержащих вирусов (аденовирусы, герпесвирусы, ортопоксвирусы) ДНК-полимеразы обладают собственной корректирующей активностью [36–39], но об участии отдельных 3' → 5'-экзонуклеаз в их репликации сведений нет. Относительно вирусов с РНК-геномом преобладало мнение, что системы коррекции по ходу репликации у них отсутствуют, а сама репликация должна балансировать в довольно узком диапазоне точности между рождением высокого генетического квазивидового разнообразия, важного для адаптации к изменяющейся среде обитания, и летальным мутагенезом [20, 21, 40]. Крайне высокие темпы мутаций зафиксированы для РНК-содержащих вирусов с принципиально

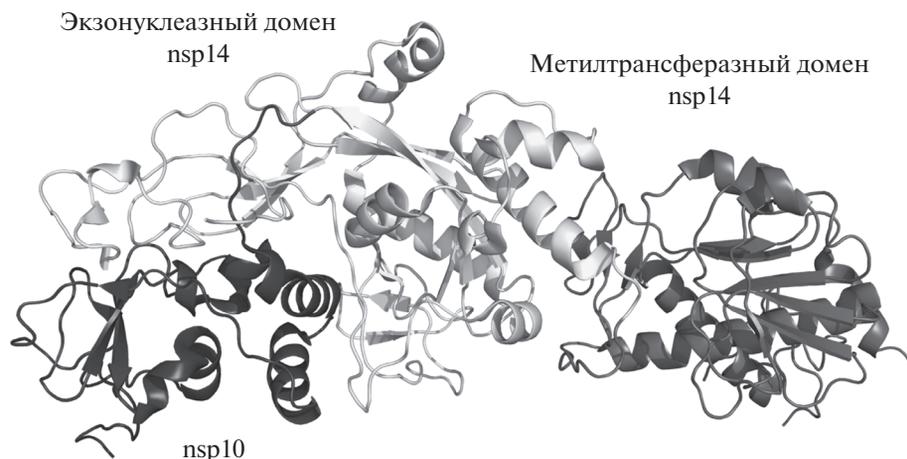


Рис. 3. Структура комплекса nsp14/nsp10 SARS-CoV (номер 5C8U в базе данных Protein Data Bank [63])

разными жизненными циклами — ВИЧ, полиовируса и вируса гриппа [41–45]. Для коронавирусов, однако, наблюдаемый уровень мутагенеза оказывается гораздо ниже, чем у других вирусов с РНК-геномом [46].

ЭКЗОНУКЛЕАЗА NSP14 КОРОНАВИРУСОВ

Хотя точность включения нуклеотидов RDRP коронавирусов выше, чем полимеразы других РНК-содержащих вирусов [47], она не может обеспечить наблюдаемый низкий уровень мутагенеза. В 2006 г. было обнаружено, что у SARS-CoV неструктурный белок nsp14 (в литературе также можно встретить название ExoN), входящий в состав RTC, представляет собой 3' → 5'-экзонуклеазу, принадлежащую к тому же суперсемейству DnaQ, что и ε-субъединица ДНК-полимеразы III и белки TREX человека, и необходимую для репликации вируса [48]. Активность nsp14 зависит от присутствия ионов двухвалентных металлов и гидролизует с 3'-конца одноцепочечную РНК и неспаренные нуклеотиды двуцепочечной РНК [48, 49]. У MHV инактивация экзонуклеазной функции nsp14 снижает жизнеспособность вируса в клеточной культуре и патогенность у мышей [50–52] и вызывает резкое повышение частоты мутаций при репликации [53, 54]. Аналогичные последствия наблюдаются в модели вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней [55]. Экзонуклеазная активность nsp14 стимулируется малым вирусным неструктурным белком nsp10 [49, 56, 57], однако *in vitro* nsp14 способен функционировать и в виде изолированного рекомбинантного белка, произведённого в *E. coli* [48].

Помимо своей экзонуклеазной функции, белок nsp14 обладает активностью гуанин-*N7*-метилтрансферазы и инициирует процесс кэпирования вирусных мРНК [58, 59]. Интересно, что, несмотр-

я на физическое разделение центров двух активностей, наличие экзонуклеазного домена (даже каталитически неактивного) необходимо для проявления метилтрансферазной функции [58, 60]. Предполагается, что метилтрансферазная функция и кэпирование важны для предотвращения клеточного интерференового ответа на появление коронавируса РНК, однако данные о необходимости для этого экзонуклеазной активности в настоящее время противоречивы [55, 61, 62].

Установленная в 2015 г. методом рентгеноструктурного анализа пространственная структура комплекса nsp14/nsp10 SARS-CoV [63] (рис. 3) выявила некоторые уникальные особенности экзонуклеазной функции nsp14. Хотя общая структура экзонуклеазного домена сходна со структурами других экзонуклеаз семейства DnaQ, включая каталитический мотив DEEDh, белок nsp14 дополнительно несёт два цинковых пальца типа Cys₃His и Cys₂His₂, важных для его активности. Экзонуклеазный и метилтрансферазный домен соединены линкером, не имеющим выраженной вторичной структуры. Белок nsp10 связан с экзонуклеазным доменом nsp14 и не образует контактов с метилтрансферазным доменом. В 2018 г. была опубликована ещё одна структура этого же комплекса [64] со значительно отличающимся взаимным расположением экзонуклеазного и метилтрансферазного доменов, что свидетельствует о значительной гибкости междоменного линкера и конформационном полиморфизме nsp14. В отсутствие nsp10 каталитический экзонуклеазный центр частично дезорганизован, что объясняет уменьшение активности изолированного белка nsp14.

В 2021 г. были опубликованы и депонированы несколько структур гетеродимера nsp14/nsp10 SARS-CoV-2, установленных методами рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микро-

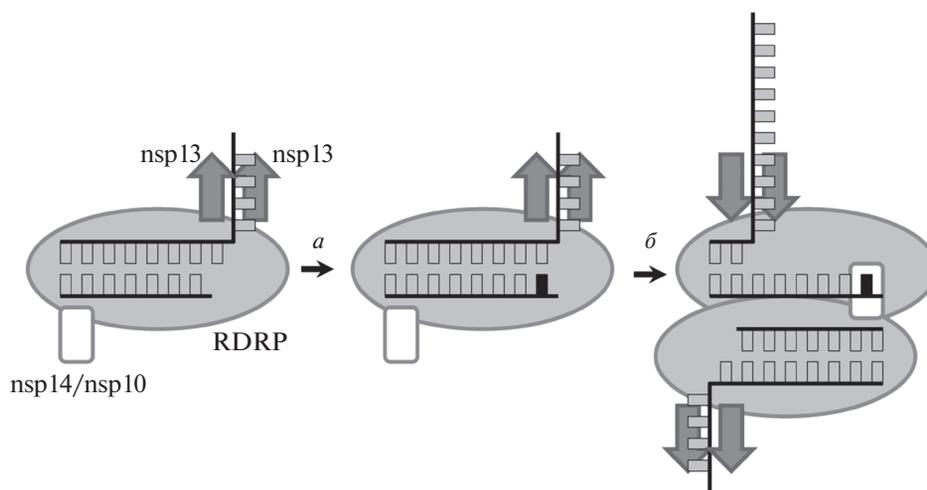


Рис. 4. Схема реализации корректирующей активности nsp14/nsp10 в димере RTC (по [69]). При включении неверного нуклеотида (а) происходит смена полярности движения геликазы nsp13, возвращение RDRP на 6 позиций назад и попадание 3'-концевого нуклеотида в активный центр nsp14 на другом комплексе RTC (б)

скопии [65–67]. В частности, впервые была получена структура nsp14/nsp10 в комплексе с субстратной РНК, что позволило проанализировать структурные аспекты механизма реакции гидролиза фосфодиэфирной связи [66]. Фермент выворачивает неспаренный 3'-концевой рибонуклеотид в свой активный центр и внедряет на его место остаток Phe146, образующий стэкинг-взаимодействия с предпоследним азотистым основанием РНК-праймера. В отличие от многих РНКаз, гидролиз фосфодиэфирной связи ферментом nsp14 протекает без вовлечения гидроксильной группы в положении 2'. Активный центр содержит два хорошо координированных двухвалентных катиона, один из которых активирует молекулу воды для нуклеофильной атаки на атом фосфора, а другой стабилизирует уходящую группу О3'.

КОРРЕКТИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ NSP14 В СОСТАВЕ РЕПЛИКАТИВНО-ТРАНСКРИПЦИОННОГО КОМПЛЕКСА

Структура связанного с РНК RTC SARS-CoV-2, установленная в 2021 г. методом криоэлектронной микроскопии [68, 69], даёт самую подробную на сегодняшний день картину репликации коронавируса. Наиболее полный из исследованных комплексов содержит матричную и праймерную цепи РНК и имеет стехиометрию белковых субъединиц 1 молекула nsp12 (RDRP) : 1 nsp7 : 2 nsp8 (факторы процессивности) : 2 nsp13 (РНК-геликаза) : 1 nsp14 : 1 nsp10 : 1 nsp9 (белок, связывающий одноцепочечную РНК). При этом полный комплекс существует в виде димера, образованного за счёт взаимодействия нескольких субъединиц между собой. Удаление nsp14/nsp10 ведёт к переходу RTC в мономерное состояние, органи-

зация которого совместима с реакциями полимеризации РНК и экзипирования.

В полном RTC активный центр экзонуклеазного домена nsp14 находится на значительном расстоянии от конца РНК-праймера (~80 Å), что делает невозможным взаимодействие между ними внутри одного мономера RTC. Авторы работы [69] предложили модель (рис. 4), в которой для проявления экзонуклеазной активности необходима димерная организация RTC и “возврат” RDRP примерно на 6 нуклеотидов назад, для которого необходима геликазная активность nsp13. При этом конец РНК-праймера в составе одного мономера RTC оказывается в пределах досягаемости экзонуклеазной субъединицы в составе другого мономера, что делает возможным гидролиз одного или нескольких 3'-концевых нуклеотидов. Такой механизм мог бы объяснить необходимость nsp14 для устойчивости коронавируса к ремдесивиру, который вызывает терминацию синтеза цепи не сразу после включения, а уже после достройки нескольких звеньев РНК [70, 71]. С другой стороны, описанная выше структура изолированного комплекса nsp14/nsp10/РНК имеет совершенно другой характер взаимодействий с РНК, а димерная организация RTC *in vivo* пока не подтверждена. Возможно, что, помимо исследованных комплексов, RTC может существовать и в других архитектурах с более удобным доступом nsp14 к РНК-праймеру.

КОРРЕКТИРУЮЩАЯ ЭКЗОНУКЛЕАЗА КОРОНАВИРУСОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ

Важность nsp14 для избежания мутагенеза при репликации коронавируса поставила вопрос о

том, насколько этот белок может вносить вклад в защиту вируса от нуклеозидных ингибиторов. МНВ и SARS-CoV, лишённые экзонуклеазной активности nsp14, гиперчувствительны к 5-фторурацилу, азациитидину и рибавирину, причём чувствительность к 5-фторурацилу сопровождается в таких штаммах летальным уровнем мутагенеза [47, 57, 72]. Нарушение взаимодействия между nsp14 и вспомогательным белком nsp10 вызывает сходные последствия [57]. Долговременное пассирование экзонуклеазно-дефицитных вирусов вызывает появление компенсаторных мутаций в RDRP, увеличивающих её точность и снижающих чувствительность к нуклеотидным ингибиторам, однако спектр таких мутаций очень ограничен [73, 74]. Дефицит корректирующей активности nsp14 также вызывает гиперчувствительность к ремдесивиру [70]. Эти наблюдения подчёркивают потенциальную ценность ингибиторов коронавирусной экзорибонуклеазы и нуклеозидных терминаторов синтеза РНК, устойчивых к отщеплению этим ферментом. В настоящее время единственным, во многом случайно реализованным примером такого подхода служит молнупиравир [75, 76], однако его использование осложнено заметной мутагенностью этого соединения для клеток человека.

В литературе описано несколько недавних попыток *in silico* и *in vitro* скрининга низкомолекулярных соединений ненуклеозидного характера, ингибирующих экзонуклеазную или метилтрансферазную функцию белка nsp14 [77–81]. Однако отсутствуют сообщения о поиске новых нуклеозидных ингибиторов, не удаляемых экзонуклеазой. Знания о механизме действия фермента nsp14, опирающиеся на структурные данные, могут дать основу для рационального дизайна таких соединений.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование поддержано грантом РФФИ № 20-04-60433.

ЛИТЕРАТУРА

1. Walker P.J., Siddell S.G., Lefkowitz E.J. et al. Changes to virus taxonomy and to the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2021) // Arch. Virol. 2021. V. 166. № 9. P. 2633–2648.
2. Su S., Wong G., Shi W. et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses // Trends Microbiol. 2016. V. 24. № 6. P. 490–502.
3. Miranda C., Silva V., Igrejas G., Poeta P. Genomic evolution of the human and animal coronavirus diseases // Mol. Biol. Rep. 2021. V. 48. № 9. P. 6645–6653.
4. Brian D.A., Baric R.S. Coronavirus genome structure and replication // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2005. V. 287. P. 1–30.
5. Fehr A.R., Perlman S. Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis // Methods Mol. Biol. 2015. V. 1282. P. 1–23.
6. Dos Ramos F., Carrasco M., Doyle T., Brierley I. Programmed –1 ribosomal frameshifting in the SARS coronavirus // Biochem. Soc. Trans. 2004. V. 32. № 6. P. 1081–1083.
7. Hillen H.S. Structure and function of SARS-CoV-2 polymerase // Curr. Opin. Virol. 2021. V. 48. P. 82–90.
8. Jiang Y., Yin W., Xu H.E. RNA-dependent RNA polymerase: Structure, mechanism, and drug discovery for COVID-19 // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2021. V. 538. P. 47–53.
9. Sola I., Almazán F., Zúñiga S., Enjuanes L. Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses // Annu. Rev. Virol. 2015. V. 2. P. 265–288.
10. Snijder E.J., Limpens R.W.A.L., de Wilde A.H. et al. A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis // PLoS Biol. 2020. V. 18. № 6. e3000715.
11. von Brunn A., Teepe C., Simpson J.C. et al. Analysis of intraviral protein-protein interactions of the SARS coronavirus ORFeme // PLoS ONE. 2007. V. 2. № 5. e459.
12. Pan J.A., Peng X., Gao Y. et al. Genome-wide analysis of protein-protein interactions and involvement of viral proteins in SARS-CoV replication // PLoS ONE. 2008. V. 3. № 10. e3299.
13. Subissi L., Posthuma C.C., Collet A. et al. One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities // Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 2014. V. 111. № 37. P. E3900–E3909.
14. Gordon C.J., Tchesnokov E.P., Feng J.Y. et al. The antiviral compound remdesivir potently inhibits RNA-dependent RNA polymerase from Middle East respiratory syndrome coronavirus // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. № 15. P. 4773–4779.
15. Gordon C.J., Tchesnokov E.P., Woolner E. et al. Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. № 20. P. 6785–6797.
16. Kokic G., Hillen H.S., Tegunov D. et al. Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir // Nat. Commun. 2021. V. 12. 279.
17. Gordon C.J., Tchesnokov E.P., Schinazi R.F., Götte M. Molnupiravir promotes SARS-CoV-2 mutagenesis via the RNA template // J. Biol. Chem. 2021. V. 297. № 1. 100770.
18. Kabinger F., Stiller C., Schmitzová J. et al. Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis // Nat. Struct. Mol. Biol. 2021. V. 28. № 9. P. 740–746.

19. Shannon A., Selisko B., Le N.-T.-T. et al. Rapid incorporation of Favipiravir by the fast and permissive viral RNA polymerase complex results in SARS-CoV-2 lethal mutagenesis // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. 4682.
20. Domingo E., Holland J.J. RNA virus mutations and fitness for survival // *Annu. Rev. Microbiol.* 1997. V. 51. P. 151–178.
21. Bordería A.V., Rozen-Gagnon K., Vignuzzi M. Fidelity variants and RNA quasispecies // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2016. V. 392. P. 303–322.
22. Denison M.R., Graham R.L., Donaldson E.F. et al. Coronaviruses: An RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity // *RNA Biol.* 2011. V. 8. № 2. P. 270–279.
23. Smith E.C., Denison M.R. Implications of altered replication fidelity on the evolution and pathogenesis of coronaviruses // *Curr. Opin. Virol.* 2012. V. 2. № 5. P. 519–524.
24. Johnson K.A. Conformational coupling in DNA polymerase fidelity // *Annu. Rev. Biochem.* 1993. V. 62. P. 685–713.
25. Kunkel T.A., Bebenek K. DNA replication fidelity // *Annu. Rev. Biochem.* 2000. V. 69. P. 497–529.
26. Mazur D.J., Perrino F.W. Identification and expression of the TREX1 and TREX2 cDNA sequences encoding mammalian 3' → 5' exonucleases // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 28. P. 19655–19660.
27. Chou K.-M., Cheng Y.-C. An exonucleolytic activity of human apurinic/aprimidinic endonuclease on 3'-mismatched DNA // *Nature.* 2002. V. 415. № 6872. P. 655–659.
28. Chou K.-M., Cheng Y.-C. The exonuclease activity of human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1): Biochemical properties and inhibition by the natural dinucleotide Gp₄G // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 20. P. 18289–18296.
29. Albertson T.M., Ogawa M., Bugni J.M. et al. DNA polymerase ε and δ proofreading suppress discrete mutator and cancer phenotypes in mice // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2009. V. 106. № 40. P. 17101–17104.
30. Chou K.-M., Kukhanova M., Cheng Y.-C. A novel action of human apurinic/aprimidinic endonuclease: Excision of L-configuration deoxyribonucleoside analogs from the 3' termini of DNA // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 40. P. 31009–31015.
31. Hanes J.W., Johnson K.A. Exonuclease removal of dideoxycytidine (zalcitabine) by the human mitochondrial DNA polymerase // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. V. 52. № 1. P. 253–258.
32. Lam W., Park S.-Y., Leung C.-H., Cheng Y.-C. Apurinic/aprimidinic endonuclease-1 protein level is associated with the cytotoxicity of L-configuration deoxycytidine analogs (troxacitabine and β-L-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-5-fluorocytidine) but not D-configuration deoxycytidine analogs (gemcitabine and β-D-arabinofuranosylcytosine) // *Mol. Pharmacol.* 2006. V. 69. № 5. P. 1607–1614.
33. Chen H., Beardsley G.P., Coen D.M. Mechanism of ganciclovir-induced chain termination revealed by resistant viral polymerase mutants with reduced exonuclease activity // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2014. V. 111. № 49. P. 17462–17467.
34. Tsuda M., Terada K., Ooka M. et al. The dominant role of proofreading exonuclease activity of replicative polymerase ε in cellular tolerance to cytarabine (Ara-C) // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 20. P. 33457–33474.
35. Mohiuddin M., Rahman M.M., Sale J.E., Pearson C.E. CtIP-BRCA1 complex and MRE11 maintain replication forks in the presence of chain terminating nucleoside analogs // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. № 6. P. 2966–2980.
36. King A.J., Teertstra W.R., van der Vliet P.C. et al. Processive proofreading by the adenovirus DNA polymerase. Association with the priming protein reduces exonucleolytic degradation // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. № 9. P. 1745–1752.
37. Gammon D.B., Evans D.H. The 3'-to-5' exonuclease activity of vaccinia virus DNA polymerase is essential and plays a role in promoting virus genetic recombination // *J. Virol.* 2009. V. 83. № 9. P. 4236–4250.
38. Tian W., Hwang Y.T., Lu Q., Hwang C.B.C. Finger domain mutation affects enzyme activity, DNA replication efficiency, and fidelity of an exonuclease-deficient DNA polymerase of herpes simplex virus type 1 // *J. Virol.* 2009. V. 83. № 14. P. 7194–7201.
39. Lawler J.L., Coen D.M. HSV-1 DNA polymerase 3'-5' exonuclease-deficient mutant D368A exhibits severely reduced viral DNA synthesis and polymerase expression // *J. Gen. Virol.* 2018. V. 99. № 10. P. 1432–1437.
40. Tsukiyama-Kohara K., Kohara M. Hepatitis C virus: Viral quasispecies and genotypes // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 1. 23.
41. Jorba J., Campagnoli R., De L., Kew O. Calibration of multiple poliovirus molecular clocks covering an extended evolutionary range // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 9. P. 4429–4440.
42. Abram M.E., Ferris A.L., Shao W. et al. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication // *J. Virol.* 2010. V. 84. № 19. P. 9864–9878.
43. Dapp M.J., Heineman R.H., Mansky L.M. Interrelationship between HIV-1 fitness and mutation rate // *J. Mol. Biol.* 2013. V. 425. № 1. P. 41–53.
44. Cheung P.P.-H., Rogozin I.B., Choy K.-T. et al. Comparative mutational analyses of influenza A viruses // *RNA.* 2015. V. 21. № 1. P. 36–47.
45. Pauly M.D., Procaro M.C., Lauring A.S. A novel twelve class fluctuation test reveals higher than expected mutation rates for influenza A viruses // *Elife.* 2017. V. 6. e26437.
46. Smith E.C., Sexton N.R., Denison M.R. Thinking outside the triangle: Replication fidelity of the largest RNA viruses // *Annu. Rev. Virol.* 2014. V. 1. P. 111–132.
47. Sexton N.R., Smith E.C., Blanc H. et al. Homology-based identification of a mutation in the coronavirus

- RNA-dependent RNA polymerase that confers resistance to multiple mutagens // *J. Virol.* 2016. V. 90. № 16. P. 7415–7428.
48. *Minskaia E., Hertzog T., Gorbalenya A.E. et al.* Discovery of an RNA virus 3' → 5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2006. V. 103. № 13. P. 5108–5113.
 49. *Bouvet M., Imbert I., Subissi L. et al.* RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2012. V. 109. № 24. P. 9372–9377.
 50. *Sawicki S.G., Sawicki D.L., Younker D. et al.* Functional and genetic analysis of coronavirus replicase-transcriptase proteins // *PLoS Pathog.* 2005. V. 1. № 4. e39.
 51. *Sperry S.M., Kazi L., Graham R.L. et al.* Single-amino-acid substitutions in open reading frame (ORF) 1b-nsp14 and ORF 2a proteins of the coronavirus mouse hepatitis virus are attenuating in mice // *J. Virol.* 2005. V. 79. № 6. P. 3391–3400.
 52. *Eckerle L.D., Brockway S.M., Sperry S.M. et al.* Effects of mutagenesis of murine hepatitis virus nsp1 and nsp14 on replication in culture // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006. V. 581. P. 55–60.
 53. *Eckerle L.D., Lu X., Sperry S.M. et al.* R. High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exoribonuclease mutants // *J. Virol.* 2007. V. 81. № 22. P. 12135–12144.
 54. *Eckerle L.D., Becker M.M., Halpin R.A. et al.* Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing // *PLoS Pathog.* 2010. V. 6. № 5. e1000896.
 55. *Becares M., Pascual-Iglesias A., Nogales A. et al.* Mutagenesis of coronavirus nsp14 reveals its potential role in modulation of the innate immune response // *J. Virol.* 2016. V. 90. № 11. P. 5399–5414.
 56. *Bouvet M., Lugari A., Posthuma C.C. et al.* Coronavirus Nsp10, a critical co-factor for activation of multiple replicative enzymes // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. № 37. P. 25783–25796.
 57. *Smith E.C., Case J.B., Blanc H. et al.* Mutations in coronavirus nonstructural protein 10 decrease virus replication fidelity // *J. Virol.* 2015. V. 89. № 12. P. 6418–6426.
 58. *Chen Y., Cai H., Pan J.A. et al.* Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2009. V. 106. № 9. P. 3484–3489.
 59. *Bouvet M., Debarnot C., Imbert I. et al.* In vitro reconstitution of SARS-coronavirus mRNA cap methylation // *PLoS Pathog.* 2010. V. 6. № 4. e1000863.
 60. *Chen Y., Tao J., Sun Y. et al.* Structure-function analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA cap guanine-N7-methyltransferase // *J. Virol.* 2013. V. 87. № 11. P. 6296–6305.
 61. *Case J.B., Ashbrook A.W., Dermody T.S., Denison M.R.* Mutagenesis of S-adenosyl-L-methionine-binding residues in coronavirus nsp14 N7-methyltransferase demonstrates differing requirements for genome translation and resistance to innate immunity // *J. Virol.* 2016. V. 90. № 16. P. 7248–7256.
 62. *Case J.B., Li Y., Elliott R. et al.* Murine hepatitis virus nsp14 exoribonuclease activity is required for resistance to innate immunity // *J. Virol.* 2018. V. 92. № 1. e01531-17.
 63. *Ma Y., Wu L., Shaw N. et al.* Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14–nsp10 complex // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2015. V. 112. № 30. P. 9436–9441.
 64. *Ferron F., Subissi L., Silveira De Morais A.T. et al.* Structural and molecular basis of mismatch correction and ribavirin excision from coronavirus RNA // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2018. V. 115. № 2. P. E162–E171.
 65. *Lin S., Chen H., Chen Z. et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 nsp10 bound to nsp14-ExoN domain reveals an exoribonuclease with both structural and functional integrity // *Nucleic Acids Res.* 2021. V. 49. № 9. P. 5382–5392.
 66. *Liu C., Shi W., Becker S.T. et al.* Structural basis of mismatch recognition by a SARS-CoV-2 proofreading enzyme // *Science.* 2021. V. 373. № 6559. P. 1142–1146.
 67. *Moeller N.H., Shi K., Demir Ö. et al.* Structure and dynamics of SARS-CoV-2 proofreading exoribonuclease ExoN // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2022. V. 119. № 9. e2106379119.
 68. *Yan L., Ge J., Zheng L. et al.* Cryo-EM structure of an extended SARS-CoV-2 replication and transcription complex reveals an intermediate state in cap synthesis // *Cell.* 2021. V. 184. № 1. P. 184–193.e10.
 69. *Yan L., Yang Y., Li M. et al.* Coupling of N7-methyltransferase and 3'-5' exoribonuclease with SARS-CoV-2 polymerase reveals mechanisms for capping and proofreading // *Cell.* 2021. V. 184. № 13. P. 3474–3485.e11.
 70. *Agostini M.L., Andres E.L., Sims A.C. et al.* Coronavirus susceptibility to the antiviral remdesivir (GS-5734) is mediated by the viral polymerase and the proofreading exoribonuclease // *MBio.* 2018. V. 9. № 2. e00221-18.
 71. *Shannon A., Le N.T.-T., Selisko B. et al.* Remdesivir and SARS-CoV-2: Structural requirements at both nsp12 RdRp and nsp14 Exonuclease active-sites // *Antiviral Res.* 2020. V. 178. 104793.
 72. *Smith E.C., Blanc H., Surdel M. C. et al.* Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: Evidence for proofreading and potential therapeutics // *PLoS Pathog.* 2013. V. 9. № 8. e1003565.
 73. *Graepel K.W., Lu X., Case J.B. et al.* Proofreading-deficient coronaviruses adapt for increased fitness over long-term passage without reversion of exoribonuclease-inactivating mutations // *MBio.* 2017. V. 8. № 6. e01503-17.
 74. *Graepel K.W., Agostini M.L., Lu X. et al.* Fitness barriers limit reversion of a proofreading-deficient coronavirus // *J. Virol.* 2019. V. 93. № 20. e00711-19.

75. *Agostini M.L., Pruijssers A.J., Chappell J.D. et al.* Small-molecule antiviral β -D- N^4 -hydroxycytidine inhibits a proofreading-intact coronavirus with a high genetic barrier to resistance // *J. Virol.* 2019. V. 93. № 24. e01348-19.
76. *Sheahan T.P., Sims A.C., Zhou S. et al.* An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice // *Sci. Transl. Med.* 2020. V. 12. № 541. eabb5883.
77. *Canal B., McClure A.W., Curran J.F. et al.* Identifying SARS-CoV-2 antiviral compounds by screening for small molecule inhibitors of nsp14/nsp10 exoribonuclease // *Biochem. J.* 2021. V. 478. № 13. P. 2445–2464.
78. *Khater S., Kumar P., Dasgupta N. et al.* Combining SARS-CoV-2 proofreading exonuclease and RNA-dependent RNA polymerase inhibitors as a strategy to combat COVID-19: A high-throughput *in silico* screening // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. 647693.
79. *Narayanan N., Nair D.T.* Ritonavir may inhibit exoribonuclease activity of nsp14 from the SARS-CoV-2 virus and potentiate the activity of chain terminating drugs // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 168. P. 272–278.
80. *Kozielski F., Sele C., Talibov V.O. et al.* Identification of fragments binding to SARS-CoV-2 nsp10 reveals ligand-binding sites in conserved interfaces between nsp10 and nsp14/nsp16 // *RSC Chem. Biol.* 2022. V. 3. № 1. P. 44–55.
81. *Rona G., Zeke A., Miwatani-Minter B., Vries M.D. et al.* The NSP14/NSP10 RNA repair complex as a pan-coronavirus therapeutic target // *Cell Death Differ.* 2022. V. 29. № 2. P. 285–292.