

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Репликационно-транскрипционный комплекс коронавирусов: функции индивидуальных вирусных неструктурных субъединиц, свойства и архитектура их комплексов

Е.А. Мищенко , В.А. Иванисенко

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
 elmish@bionet.nsc.ru

Аннотация. Коронавирусы относятся к семейству Coronaviridae подсемейства Orthocoronavirinae и представляют собой оболочечные (+) РНК-вирусы с необычно длинным геномом. В настоящее время часто идентифицируются, вызывая продолжающуюся пандемию во всем мире, коронавирусы Severe Acute respiratory syndrome CoV (SARS-CoV), Middle East respiratory syndrome CoV (MERS-CoV) и новый коронавирус (2019-nCoV, SARS-CoV-2). Для сдерживания быстро распространяющейся, острой и часто тяжело протекающей инфекции широко применяются прошедшие клинические испытания вакцины, однако эффективных лекарств по-прежнему нет. Геномы SARS-CoV-2 и SARS-CoV идентичны на ~80 %, а SARS-CoV-2 и MERS-CoV – на ~50 %. Это свидетельствует об общих механизмах патогенеза коронавирусов и одних и тех же потенциальных терапевтических мишенях. Ферменты и эффекторные белки, входящие в состав репликационно-транскрипционного комплекса (РТК) коронавирусов, кодируются весьма крупным геном репликазы и представляют собой перспективные мишени действия потенциальных эффективных лекарств. Эти мишени включают папаин- и 3С-подобные цистеиновые протеиназы, осуществляющие процессинг двух больших вирусных полипротеинов, РНК-зависимую РНК-полимеразу, РНК-хеликазу, ферменты, модифицирующие вирусный геном, ферменты, обладающие 3'-5'-экзорибонуклеазной и уридилат-специфичной эндонуклеазной активностью, а также важные эффекторные белки. В настоящее время изучение сложных молекулярных механизмов сборки и функционирования РТК находится на пике изучения. Обзор посвящен актуальным и современным исследованиям свойств индивидуальных неструктурных субъединиц РТК и их комплексов и включает изучение структур индивидуальных субъединиц РТК коронавирусов, доменной организации субъединиц и их функций, белок-белковых взаимодействий, свойств и архитектуры комплексов субъединиц, влияния мутаций, а также выявления мутаций, влияющих на жизнеспособность вируса в клеточной культуре.

Ключевые слова: неструктурные белки коронавирусов (CoVs); субъединицы репликазы CoVs; репликационно-транскрипционный комплекс CoVs; архитектура комплексов неструктурных белков CoVs.

Для цитирования: Мищенко Е.А., Иванисенко В.А. Репликационно-транскрипционный комплекс коронавирусов: функции индивидуальных вирусных неструктурных субъединиц, свойства и архитектура их комплексов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(2):121-127. DOI 10.18699/VJGB-22-15

Replication-transcription complex of coronaviruses: functions of individual viral non-structural subunits, properties and architecture of their complexes

E.L. Mishchenko , V.A. Ivanisenko

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
 elmish@bionet.nsc.ru

Abstract. Coronaviruses (CoVs) belong to the subfamily Orthocoronavirinae of the family Coronaviridae. CoVs are enveloped (+) RNA viruses with unusually long genomes. Severe acute respiratory syndrome CoV (SARS-CoV), Middle East respiratory syndrome CoV (MERS-CoV), and the novel coronavirus (2019-nCoV, SARS-CoV-2) have been identified as causing global pandemics. Clinically tested vaccines are widely used to control rapidly spreading, acute, and often severe infections; however, effective drugs are still not available. The genomes of SARS-CoV-2 and SARS-CoV are approximately 80 % identical, while the genomes of SARS-CoV-2 and MERS-CoV are approximately 50 % identical. This indicates that there may be common mechanisms of coronavirus pathogenesis and, therefore, potential therapeutic targets for each virus may be the same. The enzymes and effector proteins that make up the replication-transcription complex (RTC) of coronaviruses are encoded by a large replicase gene. These enzymes and effector proteins represent promising targets for potential therapeutic drugs. The enzyme targets include papain- and 3C-like cysteine proteinases that process two large viral polyproteins, RNA-dependent RNA polymerase, RNA helicase, viral genome-modifying enzymes, and enzymes with 3'-5' exoribonuclease or uridylylate-specific endonuclease activity.

Currently, there are many studies investigating the complex molecular mechanisms involved in the assembly and function of the RTC. This review will encompass current, modern studies on the properties and complexes of individual non-structural subunits of the RTC, the structures of individual coronavirus RTC subunits, domain organization and functions of subunits, protein-protein interactions, properties and architectures of subunit complexes, the effect of mutations, and the identification of mutations affecting the viability of the virus in cell culture.

Key words: non-structural proteins CoVs; subunits of replicase CoVs; replication-transcription complex of CoVs; architecture of non-structural protein complexes CoVs.

For citation: Mishchenko E.L., Ivanisenko V.A. Replication-transcription complex of coronaviruses: functions of individual viral non-structural subunits, properties and architecture of their complexes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(2):121-127. DOI 10.18699/VJGB-22-15

Введение

Новая коронавирусная инфекция внезапно распространилась по всему миру, часто вызывая тяжелые респираторные, кишечные и системные заболевания. Коронавирусы (CoVs) относятся к семейству Coronaviridae подсемейства Orthocoronavirinae, которое разделяется на α -, β -, γ - и δ -коронавирусы. Severe Acute respiratory syndrome CoV (SARS-CoV), Middle East respiratory syndrome CoV (MERS-CoV), новый коронавирус (2019-nCoV, SARS-CoV-2), вирус гепатита мышей (MHV), бычий коронавирус (BCoV) относятся к β -коронавирусам (Malik et al., 2020). Коронавирусы представляют собой оболочечные вирусы с необычно длинным одноцепочечным (+) РНК-геномом (26–32 тыс. оснований). Геном SARS-CoV-2 близок к геному SARS-CoV (идентичность последовательности ~80 %), геномы SARS-CoV-2 и MERS-CoV менее близки (идентичность последовательности ~50 %) (Lu et al., 2020). Известно, что структура и функции белков сохраняются даже при 30 % уровне идентичности их аминокислотных последовательностей (Rost, 1999). Это свидетельствует об общих механизмах патогенеза CoVs и одних и тех же потенциальных терапевтических мишенях. 5'-проксимальные районы геномов CoVs включают кэп, 5'-нетранслируемый район (UTR) и довольно протяженный (включающий 2/3 генома) ген репликазы, кодирующий 16 неструктурных белков. 3'-области геномов CoVs кодируют структурные белки (S – спайковый, E – поверхностный, M – мембранный, N – нуклеокапсид), вспомогательные белки, количество которых варьирует у разных коронавирусов, а также 3'-UTR и поли(А)-тракт.

Репликационно-транскрипционный комплекс (РТК) CoVs представляет собой сложный ансамбль вирусных и, вероятно, клеточных белков, нарабатывающий (+) РНК-геном, а также набор субгеномных РНК CoVs в инфицированных клетках. Ген репликазы CoVs имеет две перекрывающиеся открытые рамки считывания, ORF1a и ORF1b, которые кодируют вирусные компоненты РТК. Экспрессия гена ведет к образованию полипротеина pp1a, кодируемого ORF1a, а рибосомальный сдвиг рамки на –1 перед кодоном терминации трансляции ORF1a и переключение на ORF1b приводят к полипротеину pp1ab, являющемуся продолжением pp1a. Полипротеины pp1a и pp1ab подвергаются процессингу, осуществляемому двумя вирусными цистеиновыми протеиназами, папаин-подобной протеиназой PL^{pro} и 3С-подобной протеиназой 3CL^{pro} (M^{pro}), с выходом промежуточных предшественников и 16 зрелых высококонсервативных неструктурных белков

(nsp), способных ассоциировать между собой и являющихся субъединицами РТК. Полипротеин pp1a включает белки nsp1–nsp11, а полипротеин pp1ab – все белки pp1a, а также nsp12–nsp16 (Naqvi et al., 2020).

Структурные и функциональные свойства консервативных неструктурных субъединиц РТК и их комплексов

Молекулярные механизмы сборки и функционирования РТК не изучены. Однако структурные и функциональные свойства консервативных неструктурных субъединиц РТК и их комплексов находятся сейчас на пике исследований и чрезвычайно важны для идентификации ключевых мишеней действия эффективных лекарств против коронавирусов:

nsp1 взаимодействует с 40S-субъединицей рибосом и подавляет инициацию трансляции хозяйских белков, в том числе факторов интерферонного ответа. Взаимодействие nsp1 с рибосомами ведет также к деградации хозяйских РНК. Таким образом, nsp1 подавляет клеточные защитные антивирусные механизмы (Kamitani et al., 2006; Narayanan et al., 2008);

nsp2 не входит в состав РТК в клеточной культуре. Но отсутствие nsp2 в клетках, инфицированных делеционными мутантами MHV Δ nsp2 или SARS-CoV Δ nsp2, снижает наработку вируса и вирусной РНК (Graham et al., 2005);

nsp3 и **nsp5** – протеиназы, осуществляющие процессинг полипротеинов pp1a и pp1ab с выходом индивидуальных компонент РТК. Домен(ы) папаин-подобной цистеиновой протеиназы (PL^{pro}) nsp3 осуществляют процессинг N-проксимальных районов pp1a и pp1ab. MHV nsp3 имеет два таких домена – PL1^{pro} (PL1P) и PL2^{pro} (PL2P). Домен PL1^{pro} расщепляет сайты nsp1/nsp2 и nsp2/nsp3, а домен PL2^{pro} – сайт nsp3/nsp4 (Hughes et al., 1995; Kanjanahaluethai et al., 2000). SARS-CoV nsp3 имеет единственный PL2^{pro} (PLP)-домен, расщепляющий все три сайта, nsp1/nsp2, nsp2/nsp3 и nsp3/nsp4 (Thiel et al., 2003). SARS-CoV PLP является антагонистом внутриклеточного иммунного ответа. Так, домен PLP блокирует активацию транскрипционных факторов IRF3 и NF- κ B, индуцирующих экспрессию IFN(I) и антивирусных генов, путем непосредственного ингибирования IKK α - и TBK1-киназ, которые активируют IRF3, а также посредством стабилизации I κ B α – ингибитора NF- κ B (Frieman et al., 2009). Домен PLP также эффективно гидролизует элементы убиквитина и продукта интерферон-стимулирующего гена 15 убиквитин-подобного белка, блокируя тем самым клеточный механизм посттрансляционного убиквитинирования и

усиливая вирусную репликацию (Daczowski et al., 2017). Однако nsp3 стабилизирует хозяйскую E3 убиквитинлигазу RCHY1 через взаимодействие своих SUD- и PL^{pro}-доменов с RCHY1 и активирует RCHY1-опосредованную деградацию p53-эффективного клеточного ингибитора репликации SARS-CoV (Ma-Lauer et al., 2016). SARS-CoV nsp3 взаимодействует с nsp5, nsp6, nsp12, nsp13, nsp14 и nsp16 в дрожжевой двугибридной (Y2H) системе и, вероятно, служит каркасом для сборки РТК (Imbert et al., 2008).

Протеиназа nsp5 является 3С-подобной цистеиновой протеиназой (3CL^{pro}, M^{pro}). Протеиназа M^{pro} играет ключевую роль в процессинге полипротеинов pp1a/1ab, расщепляя центральный и С-проксимальный районы pp1ab в 11 высококонсервативных сайтах с выходом зрелых белков nsp4–nsp16 (Ziebuhr et al., 2000; Thiel et al., 2003; Goyal B., Goyal D., 2020). Протеиназа M^{pro} активна только в виде димера. Самовыщепление MERS-CoV M^{pro} в nsp4/nsp5- и nsp5/nsp6-сайтах происходит в результате лиганд-индуцированного образования «незрелого димера» при сближении доменов III M^{pro} в составе двух полипротеинов (Tomar et al., 2015). Структурный анализ комплексов SARS-CoV-2 M^{pro} с известными противовирусными ингибиторами Восерпревир (пептидомиметик NS3/4A протеазы вируса гепатита С) и GC376 (ингибитор репликации CoVs) выявил взаимодействия между M^{pro} и данными ингибиторами на атомном уровне. Эти исследования важны для оптимизации и дизайна эффективных лекарств в борьбе с коронавирусами (Fu et al., 2020);

nsp6 взаимодействует с nsp2, nsp8, nsp9 в Y2H-системе (Brunn et al., 2007). Шесть из предсказанных гидрофобных доменов MHV nsp6 и SARS-CoV nsp6 являются трансмембранными доменами (Oostra et al., 2008). MHV nsp6 и SARS-CoV nsp6 локализованы в мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭР), индуцируют образование аутофагосом от мембран ЭР и активируют аутофагию (Cottam et al., 2011). Котрансфекция nsp3, nsp4 и nsp6, содержащих трансмембранные домены, индуцирует изменение внутренних мембран хозяйской клетки с образованием двухмембранных везикул, подобных везикулам, индуцированным SARS-CoV (Angelini et al., 2013);

nsp7 и **nsp8** взаимодействуют между собой. SARS-CoV nsp7 и nsp8 кокристаллизуются с образованием гексадекамерного суперкомплекса nsp7/8. Сборка суперкомплекса включает образование двух разных nsp7/8 гетеродимеров, D1 и D2, различающихся конформацией nsp8. Каждый из D1 и D2 димеризуется с образованием гетеротетрамеров T1 и T2, а взаимодействие двух T1 и двух T2 в порядке T1–T2–T1'–T2' с замыканием кольца через взаимодействие T1–T2' приводит к полной конструкции суперкомплекса с уникальной архитектурой: 16 молекул (8 молекул nsp7 и 8 – nsp8 тесно взаимодействуют друг с другом, образуя полую цилиндрическую структуру, в которой сосуществуют две конформации nsp8. Положительный заряд внутреннего канала цилиндра, а также его диаметр (30 Å) указывают на способность суперкомплекса nsp7/8 окружать и взаимодействовать с двуцепочечной РНК (дцРНК) (Zhai et al., 2005). Гексадекамерный суперкомплекс SARS-CoV nsp7/8 образуется также в растворе при эквимольном nsp7:nsp8 отношении (Zhai et al., 2005; Velthuis et al., 2012).

В растворе гексадекамер SARS-CoV nsp8/7 ассоциирует с дцРНК (Kd ~1.2 мкМ). Ассоциацию nsp8/7 с дцРНК обеспечивает nsp8, тогда как nsp7 ее усиливает (Velthuis et al., 2012). Индивидуальный SARS-CoV nsp8 обладает праймер-независимой РНК-зависимой РНК-полимеразной (RdRp) активностью и иницируется с низкой точностью синтез *de novo* коротких (менее 6 нуклеотидов) комплементарных олигомеров (праймеров) на матрицах одноцепочечных РНК (оцРНК) (Imbert et al., 2006). SARS-CoV nsp8 и nsp8/7 комплексы обладают также праймер-зависимой RdRp-активностью (Velthuis et al., 2012). FCoV (кошачий коронавирус) nsp7/8-комплекс представляет собой 2:1 гетеротример, состоящий из двух молекул nsp7 и одной молекулы nsp8 без образования полой структуры как в кристаллическом виде, так и в растворе. FCoV nsp7/8 обладает праймер-независимой RdRp-активностью (Xiao et al., 2012);

nsp9 является оцРНК-связывающим белком (Egloff et al., 2004; Miknis et al., 2009). В экспериментах *in vitro* в растворе обнаружены как мономерная, так и димерная формы PDCoV (свиной δ-коронавирус) nsp9 и PEDV (вирус свиной эпидемической диареи, относящийся к α-коронавирусам) nsp9 (Zeng et al., 2018), а также димерная форма SARS-CoV nsp9 (Miknis et al., 2009). Исследование кристаллических структур SARS-CoV nsp9 (Egloff et al., 2004; Miknis et al., 2009), PDCoV nsp9 и PEDV nsp9 (Zeng et al., 2018) выявило димерные формы nsp9. Мономер SARS-CoV nsp9 характеризуется новой структурой среди белков репликативных комплексов РНКовых вирусов, особенностью которой сходны со структурами олигосахарид/олигонуклеотид-связывающих белков (Egloff et al., 2004). Мутации, влияющие на димеризацию SARS-CoV nsp9, ослабляют взаимодействие этого белка с оцРНК и летальны для репликации SARS-CoV в клеточной культуре (Miknis et al., 2009);

nsp10 с микромолярной аффинностью взаимодействует с дцРНК, дцДНК и оцРНК (Joseph et al., 2006). Исследования кристаллической структуры SARS-CoV nsp10 показали, что структура мономера включает два цинковых пальца и является новой среди структур белков с цинковыми пальцами. Идентифицированы мотивы цинк-связывающих последовательностей nsp10. Двенадцать идентичных мономеров образуют уникальную сферическую додекамерную архитектуру, которая, предположительно, может быть функциональной формой nsp10 (Joseph et al., 2006; Su et al., 2006). С помощью двугибридного анализа в клетках млекопитающих выявлены взаимодействия SARS-CoV nsp10 с nsp14 и nsp16 (Pan et al., 2008);

nsp11 представляет собой короткий пептид, появляющийся в результате расщепления полипротеина pp1a протеиназой 3CL^{pro}/M^{pro} в сайте nsp10/nsp11. Пептид nsp11 кодирован областью геномной РНК, где происходит трансляционный сдвиг рамки считывания (смена ORF1a на ORF1b), который дает начало белкам 12nsp–nsp16 в более длинном, чем pp1a, полипротеине pp1ab. SARS-CoV-2 nsp11 включает всего 13 аминокислотных остатков и имеет неупорядоченную конформацию, динамика которой исследована в присутствии липидов – миметиков мембран. Мицеллы лаурилсульфата натрия вызывают

трансформацию неупорядоченной конформации nsp11 в α -спираль (Gadhav et al., 2021);

nsp14 бифункционален. N-конечный домен nsp14 обладает 3'-5'-экзорибонуклеазной активностью (ExoN), а его C-конечный домен проявляет (гуанин-N7)-метилтрансферазную активность (N7-МТаз). ExoN корректирует низкую точность синтеза комплементарной цепи вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой (RdRp) nsp12 и катализирует удаление 3'-конечных ошибочных нуклеотидов в дцРНК. N7-МТаз катализирует метилирование кэпа вирусной РНК по N7 гуанина в присутствии S-аденозилметионина (донора метильных групп). N7-МТаз имеет S-аденозилметионин-связывающий мотив, узнает кэп вирусной GpppРНК и метилирует N7 гуанина GpppРНК с образованием ⁷MeGpppРНК (кэп-0). Кэп-0 выполняет важную роль в блокировании деградации вирусной РНК 5'-3'-экзорибонуклеазами, инициации трансляции и ускользании от контроля иммунной системы (Chen et al., 2009; Tahir, 2021). Мутанты каталитического мотива MERS-CoV ExoN и SARS-CoV-2 ExoN не жизнеспособны в клеточной культуре (Ogando et al., 2020). SARS-CoV nsp10 ассоциирует с ExoN-доменом SARS-CoV nsp14, усиливая ExoN-активность nsp14 более чем в 35 раз, не влияя на N7-МТазную активность nsp14 (Bouvet et al., 2012). Структурные исследования SARS-CoV nsp10/14-комплекса показали, что одна молекула nsp10 ассоциирует с ExoN-доменом nsp14, стабилизируя и усиливая активность ExoN. Определена архитектура nsp10/14-комплекса, включающая два района контактов молекулы nsp10 с ExoN-доменом nsp14 (Ma et al., 2015);

nsp16 обладает (нуклеозид-2'О)-метилтрансферазной активностью (2'О-МТаз). 2'О-МТаз узнает кэп-0 вирусной РНК и катализирует перенос метильной группы с S-аденозилметионина на 2'ОН группу рибозы первого после N7-метилованного гуанина нуклеотида с образованием ⁷MeGpppN₂'OMe-RNA (превращение кэп-0 в кэп-1). SARS-CoV nsp10 ассоциирует с nsp16 и стимулирует 2'О-МТазную активность nsp16 (Bouvet et al., 2010). Картирование с помощью мутагенеза поверхностных аминокислотных остатков SARS-CoV nsp10, вовлеченных во взаимодействие nsp10 с nsp14 и структурный анализ nsp10/16-комплекса, выявили перекрытие поверхностей nsp10, взаимодействующих с nsp14 и nsp16. Nsp10 может служить платформой, рекрутирующей nsp14 или nsp16 к РТК, стимулируя ExoN-активность nsp14 или 2'О-МТазную активность nsp16, и быть важным регулятором РТК. Идентифицированы мутации, нарушающие nsp10–nsp14 и nsp10–nsp16 взаимодействия. Некоторые из них приводят к нежизнеспособному фенотипу вируса в клеточной культуре (Bouvet et al., 2014);

nsp12 (RdRp) катализирует синтез комплементарных цепей РНК на (+) и (–) матрицах вирусной РНК и представляет собой ключевой фермент РТК. CoVs nsp12 инициирует *de novo* с 3'-конца вирусного генома синтез полноразмерной (–) цепи РНК, а также субгеномных (–) РНК-транскриптов, имеющих 3'-концы разной длины. В свою очередь, полноразмерные (–) а также субгеномные (–) цепи РНК служат матрицами для синтеза нового РНК-генома, а также субгеномных (+) РНК-транскриптов. Субгеномные (+) РНК важны для экспрессии структурных

и вспомогательных белков, кодируемых генами 3'-проксимальной области вирусного генома, не доступными для рибосом, транслирующих вирусный геном (Pasternak et al., 2006). Полноразмерный рекомбинантный SARS-CoV nsp12 ассоциирует с короткими (длиной 20–30 нуклеотидов) дцРНК и оцРНК (Kd 0.13 и 0.1 мкМ соответственно), а также инициирует праймер-зависимый синтез РНК как на гомо-, так и гетерополимерных РНК-матрицах аналогичной длины (Velthuis et al., 2010). Однако рекомбинантный SARS-CoV nsp12 практически не ассоциирует с праймер-матрицей, имитирующей 3'-конечные UTR SARS-CoV-генома, и не проявляет RdRp-активность на данной праймер-матрице (Subissi et al., 2014).

Методом криоэлектронной микроскопии определена структура мономера CoV-19 nsp12, которая включает нидовирус-специфичный N-концевой домен RdRp-ассоциированной нуклеотидилтрансферазы (NiRAN), интерфейсный домен и C-концевой RdRp-домен. C-концевой RdRp-домен имеет консервативную среди семейства вирусных полимераз архитектуру, подобную правой руке, которая включает три субдомена: пальцев, ладони и большого пальца. Активный центр сформирован консервативными мотивами аминокислотных остатков, локализованными в субдомene ладони. Определены мотивы канала входа нуклеотидтрифосфатов, входа праймер-матрицы и выхода образующейся цепи РНК, которые сходятся в центральной полости, где эти мотивы осуществляют матрично-зависимый синтез РНК (Gao et al., 2020).

Ассоциация nsp7/8-комплекса с nsp12 приводит к образованию nsp7/8/12-комплекса, обладающего высокой РНК-связывающей способностью, полимеразной активностью и процессивностью: этот комплекс способен инициировать *de novo* синтез РНК на матрице 3'-UTR-района SARS CoV генома с элонгацией РНК-продукта более 300 нуклеотидов. Для осуществления nsp7/8/12-комплексом процессивного синтеза РНК три аминокислотных остатка nsp7 (K7, H36, N37) и один аминокислотный остаток nsp8 (K58) необходимы для взаимодействия nsp7/8/12 с РНК-матрицей, а четыре аминокислотных остатка nsp8 (D99, P116, P183, R190) вовлечены во взаимодействие с nsp12 (Subissi et al., 2014). Более того, nsp7/8/12 способен ассоциировать с nsp14 с образованием уникального мультикомплекса nsp7/8/12/14. Этот ансамбль неструктурных белков обладает высокой РНК-полимеразной активностью, а также активностью, вовлеченной в 5'-РНК-кэпинг, но практически не обладает ExoN-активностью (Subissi et al., 2014). Методом криоэлектронной микроскопии определена структура CoV-19 и SARS-CoV nsp12/7/8-комплексов. Эти комплексы, включающие мономеры nsp12, nsp8 и гетеродимер nsp7/nsp8, имеют подобную архитектуру: nsp8-1 взаимодействует с субдоменом пальцев RdRp, а субъединицы nsp7 и nsp8-2 – с субдоменом большого пальца RdRp (Gao et al., 2020);

nsp13 обладает хеликазной и нуклеозидтрифосфатазной (НТРаза) активностью; взаимодействует с nsp7, nsp8 и nsp12 в Y2H-системе (Brunn et al., 2007; Pan et al., 2008). Определена кристаллическая структура MERS-CoV nsp13. Эта структура включает N-конечный цинк-связывающий домен (ZBD), богатый Cys/His-остатками, координирующими три иона цинка, а также C-конечные хеликазные

RecA1- и RecA2-домены, содержащие параллельные β -цепи (Hao et al., 2017). nsp13-хеликаза разделяет цепи дцРНК и дцДНК со свисающими (длиной 5–20 нуклеотидов) 5'-концами. При этом nsp13 взаимодействует с одноцепочечным 5'-концом частичного дуплекса нуклеиновых кислот обоих типов и раскручивает его в 5'–3'-направлении, используя энергию гидролиза 5'-дезоксидрибонуклеотидтрифосфатов (Ivanov et al., 2004; Adedeji et al., 2012, 2016). РНК-5'-трифосфатазная активность nsp13 катализирует отщепление γ -фосфата от 5'-концевого нуклеотида РНК и, возможно, вовлечена в экпирование вирусных РНК (Ivanov et al., 2004). Исследования SARS-CoV nsp13 показали, что раскручивание дуплексов ДНК происходит дискретными интервалами длиной ~9.3 пар оснований (п. о.) со скоростью 30 интервалов/с, т. е. скорость раскручивания дуплексов ДНК ~280 п. о./с.

Хеликазная активность nsp13 усиливается в ~2 раза при взаимодействии nsp13 с nsp12, что позволяет предполагать взаимодействие этих белков в функциональных РТК (Adedeji et al., 2012). При взаимодействии SARS-CoV-2 nsp13 с РТК, включающим nsp7/2nsp8/nsp12: РНК, образуются стабильные комплексы 2nsp13-РТК (67 %), nsp13-РТК (20 %), а также димер (2nsp13-РТК)₂ (13 %). С помощью электронной криомикроскопии определена архитектура доминирующего комплекса 2nsp13-РТК, которая включает взаимодействие ZBD первой молекулы nsp13 с N-концом nsp8b и субдоменом большого пальца nsp12, а также взаимодействие ZBD второй молекулы nsp13 с N-концом nsp8a. При этом каталитический RecA1 хеликазный домен первой молекулы nsp13 фиксирован против nsp7 и головы nsp8b (Chen et al., 2020);

nsp15 – нидовирусная уридилат-специфичная эндорибонуклеаза (NendoU), расщепляет РНК по 3'-уридилату в неспаренных, одноцепочечных и петлевых районах (Bhardwaj et al., 2006; Zhang et al., 2018). Кристаллические структуры SARS-CoV-2, SARS- и MERS-CoVs nsp15 гомологичны и представляют собой функционально активные гексамеры, образованные димеризацией тримеров. Каждый из протомеров гексамера включает три домена: N-конечный, средний и C-конечный каталитический NendoU-домен. При сборке тримера N-конечный домен одного протомера упакован в щель между центральным и C-конечными доменами соседнего протомера. При сборке гексамера N-конечные домены протомеров двух тримеров упакованы «спина к спине» и находятся в центре гексамерной структуры, в то время как C-конечные домены, содержащие активные центры, расположены вовне, в вершинах клеверного листа. Такая архитектура обеспечивает nsp15 шестью функционально активными центрами (Zhang et al., 2018; Kim et al., 2020).

Содержание уридилата в РНК, Mn^{+2} и в меньшей степени Mg^{+2} увеличивает аффинность nsp15 к РНК. Гексамерная структура SARS-CoV и MERS-CoV nsp15 критична для взаимодействия с субстратом и каталитической активности: исследование серии мутантов этого белка в моно-, три- и гексамерной формах выявило для мономеров и тримеров как слабое взаимодействие с РНК (rU_{16-20}), так и низкую каталитическую активность по сравнению с гексамерами, а также nsp15 дикого типа (Bhardwaj et al., 2006; Zhang et al., 2018). Более того, nsp8, а также

комплекс nsp7/nsp8 взаимодействуют с MERS-CoV nsp15, усиливая связывающую способность гексамера nsp15 к РНК и его каталитическую активность (Zhang et al., 2018). NendoU-активность nsp15 является антагонистом IFN-индуцированного антивирусного ответа клетки, а также стимулирует инициацию трансляции вирусной РНК (Deng et al., 2018, 2019).

Для CoVs характерно большое количество неструктурных субъединиц и их комплексов в составе РТК. Важной особенностью является также то, что некоторые субъединицы имеют домены, обладающие разной ферментативной активностью (nsp14, EхoN и N7-МТазная активность; nsp13, хеликазная и нуклеозидтрифосфатазная активность). Неструктурные белки CoVs имеют как универсальный для (+) РНК-вирусов набор активностей: протеиназную, РНК-зависимую РНК-полимеразную (nsp12), РНК-хеликазную (nsp13), так и редкие и даже уникальные домены, вовлеченные в мРНК-экпинг, экп-модификацию (nsp14, nsp16), регулирующие надежность репликации РНК-генома и обладающие 3'–5'-экзорибонуклеазной активностью (nsp14), а также уридилат-специфичной эндонуклеазной активностью (nsp15). Многие белки служат кофакторами для важнейших ферментов (nsp7, nsp8, nsp10), а также влияют на клеточные процессы, в частности подавляют антивирусный клеточный ответ (nsp1, nsp3, nsp6, nsp15). Структуры nsp9 и nsp10 – новые среди структур белков репликативных комплексов РНК-вирусов. Субъединицы CoVs и их комплексы имеют сложную архитектуру. Так, nsp7 и nsp8 образуют функциональный уникальный гексадекамерный суперкомплекс, nsp10 включает 12 идентичных субъединиц, а nsp15 представляет собой функционально активный гексамер. Сложная архитектура РТК определена на модели 2 nsp13/2 nsp8/1 nsp7/1 nsp12.

Заключение

Отсутствие эффективных лекарств против новой коронавирусной инфекции является вызовом нашего времени. РТК CoVs реплицирует (+) РНК-геном CoVs и определяет наработку вируса в инфицированных клетках с помощью пока неизученных молекулярных механизмов. Большие усилия исследователей направлены на создание структурно-функциональной сети взаимодействий протеома CoVs, а также его взаимодействий с хозяйской клеткой, которая представляла бы масштабную панель терапевтических мишеней. Определение структур индивидуальных неструктурных субъединиц РТК и их комплексов, идентификация ключевых взаимодействующих аминокислотных остатков и типов связей между ними позволяют осуществить дизайн селективных и эффективных ингибиторов. Исследования с помощью биохимических методов, а также мутационный анализ дают возможность выявлять факторы, влияющие на эффективность наработки вирусного РНК-генома и вируса в инфицированной клетке, множественные эффекты вирусных белков на хозяйскую клетку и потенциальные ключевые мишени действия лекарств.

Список литературы / References

Adedeji A.O., Lazarus H. Biochemical characterization of Middle East respiratory syndrome coronavirus helicase. *mSphere*. 2016;1(5): e00235-16. DOI 10.1128/mSphere.00235-16.

- Adedeji A.O., Marchand B., Velthuis A.J.W., Snijder E.J., Weiss S., Eoff R.L., Singh K., Sarafianos S.G. Mechanism of nucleic acid unwinding by SARS-CoV helicase. *PLoS One*. 2012;7(5):e36521. DOI 10.1371/journal.pone.0036521.
- Angelini M.M., Akhlaghpour M., Neuman B.W., Buchmeier M.J. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *mBio*. 2013; 4(4):e00524-13. DOI 10.1128/mBio.00524-13.
- Bhardwaj K., Sun J., Holzenburg A., Guarino L.A., Kao C.C. RNA recognition and cleavage by the SARS coronavirus endoribonuclease. *J. Mol. Biol.* 2006;361(2):243-256. DOI 10.1016/j.jmb.2006.06.021.
- Bouvet M., Debarnot C., Imbert I., Selisko B., Snijder E.J., Canard B., Decroly E. *In vitro* reconstitution of SARS-coronavirus mRNA cap methylation. *PLoS Pathog.* 2010;6(4):e1000863. DOI 10.1371/journal.ppat.1000863.
- Bouvet M., Imbert I., Buisson L., Gluais L., Canard B., Decroly E. RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109(24):9372-9377. DOI 10.1073/pnas.1201130109.
- Bouvet M., Lugari A., Posthuma C.C., Zevenhoven J.C., Bernard S., Betzi S., Imbert I., Canard B., Guillemot J.-C., Lécine P., Pfefferle S., Drosten C., Snijder E.J., Decroly E., Morelli X. Coronavirus Nsp10, a critical co-factor for activation of multiple replicative enzymes. *J. Biol. Chem.* 2014;289(37):25783-25796. DOI 10.1074/jbc.M114.577353.
- Brunn A., Teepe C., Simpson J.C., Pepperkok R., Friedel C.C., Zimmer R., Roberts R., Baric R., Haas J. Analysis of intraviral protein-protein interactions of the SARS coronavirus ORFome. *PLoS One*. 2007;2(5):e459. DOI 10.1371/journal.pone.0000459.
- Chen J., Malone B., Llewellyn E., Grasso M., Shelton P.M.M., Olinares P.D.B., Maruthi K., Eng E.T., Vatandaslar H., Chait B.T., Kapoor T.M., Darst S.A., Campbell E.A. Structural basis for helicase-polymerase coupling in the SARS-CoV-2 replication-transcription complex. *Cell*. 2020;182(6):1560-1573.e13. DOI 10.1016/j.cell.2020.07.033.
- Chen Y., Cai H., Pan J., Xiang N., Tien P., Ahola T., Guo D. Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009;106(9):3484-3489. DOI 10.1073/pnas.0808790106.
- Cottam E.M., Maier H.J., Manifava M., Vaux L.C., Chandra-Schoenfelder P., Gemer W., Britton P., Ktistakis N.T., Wileman T. Coronavirus nsp6 proteins generate autophagosomes from the endoplasmic reticulum via an omegaosome intermediate. *Autophagy*. 2011;7(11):1335-1347. DOI 10.4161/auto.7.11.16642.
- Daczkowski C.M., Dzimianski J.V., Clasman J.R., Goodwin O., Mesecar A.D., Pegan S.D. Structural insights into the interaction of coronavirus papain-like proteases and interferon-stimulated gene product 15 from different species. *J. Mol. Biol.* 2017;429(11):1661-1683. DOI 10.1016/j.jmb.2017.04.011.
- Deng X., Baker S.C. An "Old" protein with a new story: Coronavirus endoribonuclease is important for evading host antiviral defenses. *Virology*. 2018;517:157-163. DOI 10.1016/j.virol.2017.12.024.
- Deng X., Geelen A., Buckley A.C., O'Brien A., Pillatzki A., Lager K.M., Faaberg K.S., Baker S.C. Coronavirus endoribonuclease activity in porcine epidemic diarrhea virus suppresses type I and type III interferon responses. *J. Virol.* 2019;93(8):e02000-18. DOI 10.1128/JVI.02000-18.
- Egloff M.-P., Ferron F., Campanacci V., Longhi S., Rancurel C., Dutarte H., Snijder E.J., Gorbalenya A.E., Cambillau C., Canard B. The severe acute respiratory syndrome-coronavirus replicative protein nsp9 is a single-stranded RNA-binding subunit unique in the RNA virus world. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004;101(11):3792-3796. DOI 10.1073/pnas.0307877101.
- Frieman M., Ratia K., Johnston R.E., Mesecar A.D., Baric R.S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like protease ubiquitin-like domain and catalytic domain regulate antagonism of IRF3 and NF-kappaB signaling. *J. Virol.* 2009;83(13):6689-6705. DOI 10.1128/JVI.02220-08.
- Fu L., Ye F., Feng Y., Yu F., Wang Q., Wu Y., Zhao C., Sun H., Huang B., Niu P., Song H., Shi Y., Li X., Tan W., Qi J., Gao G.F. Both Beceprevir and GC376 efficaciously inhibit SARS-CoV-2 by targeting its main protease. *Nat. Commun.* 2020;11(1):4417. DOI 10.1038/s41467-020-18233-x.
- Gadhve K., Kumar P., Kumar A., Bhardwaj T., Garg N., Giri R. Conformational dynamics of 13 amino acids long NSP11 of SARS-CoV-2 under membrane mimetics and different solvent conditions. *Microb. Pathog.* 2021;158:105041. DOI 10.1016/j.micpath.2021.105041.
- Gao Y., Yan L., Huang Y., Liu F., Zhao Y., Cao L., Wang T., Sun Q., Ming Z., Zhang L., Ge J., Zheng L., Zhang Y., Wang H., Zhu Y., Zhu C., Hu T., Hua T., Zhang B., Yang X., Li J., Yang H., Liu Z., Xu W., Guddat L.W., Wang Q., Lou Z., Rao Z. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science*. 2020;368(6492):779-782. DOI 10.1126/science.abb7498.
- Goyal B., Goyal D. Targeting the dimerization of the main protease of coronaviruses: a potential broad-spectrum therapeutic strategy. *ACS Comb. Sci.* 2020;22(6):297-305. DOI 10.1021/acscombsci.0c00058.
- Graham R.L., Sims A.C., Brockway S.M., Baric R.S., Denison M.R. The nsp2 replicase proteins of murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus are dispensable for viral replication. *J. Virol.* 2005;79(21):13399-13411. DOI 10.1128/JVI.79.21.13399-13411.2005.
- Hao W., Wojdyla J.A., Zhao R., Han R., Das R., Zlatev I., Manoharan M., Wang M., Cui S. Crystal structure of Middle East respiratory syndrome coronavirus helicase. *PLoS Pathog.* 2017;13(6):e1006474. DOI 10.1371/journal.ppat.1006474.
- Hughes S.A., Bonilla P.J., Weiss S.R. Identification of the murine coronavirus p28 cleavage site. *J. Virol.* 1995;69(2):809-813. DOI 10.1128/JVI.69.2.809-813.1995.
- Imbert I., Guillemot J.-C., Bourhis J.-M., Bussetta C., Coutard B., Egloff M.-P., Ferron F., Gorbalenya A.E., Canard B. A second, non-canonical RNA-dependent RNA polymerase in SARS coronavirus. *EMBO J.* 2006;25(20):4933-4942. DOI 10.1038/sj.emboj.7601368.
- Imbert I., Snijder E.J., Dimitrova M., Guillemot J.-C., Lécine P., Canard B. The SARS-Coronavirus PLnc domain of nsp3 as a replication/transcription scaffolding protein. *Virus Res.* 2008;133(2):136-148. DOI 10.1016/j.virusres.2007.11.017.
- Ivanov K.A., Thiel V., Dobbe J.C., Meer Y., Snijder E.J., Ziebuhr J. Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J. Virol.* 2004;78(11):5619-5632. DOI 10.1128/JVI.78.11.5619-5632.2004.
- Joseph J.S., Saikatendu K.S., Subramanian V., Neuman B.W., Brooun A., Griffith M., Moy K., Yadav M.K., Velasquez J., Buchmeier M.J., Stevens R.C., Kuhn P. Crystal structure of nonstructural protein 10 from the severe acute respiratory syndrome coronavirus reveals a novel fold with two zinc-binding motifs. *J. Virol.* 2006;80(16):7894-7901. DOI 10.1128/JVI.00467-06.
- Kamitani W., Narayanan K., Huang C., Lokugamage K., Ikegami T., Ito N., Kubo H., Makino S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 protein suppresses host gene expression by promoting host mRNA degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103(34):12885-12890. DOI 10.1073/pnas.0603144103.
- Kanjanahaluethai A., Baker S.C. Identification of mouse hepatitis virus papain-like proteinase 2 activity. *J. Virol.* 2000;74(17):7911-7921. DOI 10.1128/jvi.74.17.7911-7921.2000.
- Kim Y., Jedrzejczak R., Maltseva N.I., Wilamowski M., Endres M., Godzik A., Michalska K., Joachimiak A. Crystal structure of Nsp15 endoribonuclease NendoU from SARS-CoV-2. *Protein Sci.* 2020; 29(7):1596-1605. DOI 10.1002/pro.3873.
- Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W.J., Wang D., Xu W., Holmes E.C., Gao G.F., Wu G., Chen W., Shi W., Tan W. Genomic characterisation and

- epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395(10224):565-574. DOI 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
- Ma Y., Wu L., Shaw N., Gao Y., Wang J., Sun Y., Lou Z., Yan L., Zhang R., Rao Z. Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14–nsp10 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015;112(30):9436-9441. DOI 10.1073/pnas.1508686112.
- Ma-Lauer Y., Carbajo-Lozoya J., Hein M.Y., Müller M.A., Deng W., Lei J., Meyer B., Kusov Y., von Brunn B., Bairad D.R., Hünten S., Drosten C., Hermeking H., Leonhardt H., Mann M., Hilgenfeld R., von Brunn A. p53 down-regulates SARS coronavirus replication and is targeted by the SARS-unique domain and PL^{pro} via E3 ubiquitin ligase RCHY1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016;113(35):E5192-E5201. DOI 10.1073/pnas.1603435113.
- Malik Y.S., Sircar S., Bhat S., Sharun K., Dhama K., Dadar M., Tiwari R., Chaicumpa W. Emerging novel coronavirus (2019-nCoV) – current scenario, evolutionary perspective based on genome analysis and recent developments. *Vet. Q.* 2020;40(1):68-76. DOI 10.1080/01652176.2020.1727993.
- Miknis Z.J., Donaldson E.F., Umland T.C., Rimmer R.A., Baric R.S., Schultz L.W. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp9 dimerization is essential for efficient viral growth. *J. Virol.* 2009; 83(7):3007-3018. DOI 10.1128/JVI.01505-08.
- Naqvi A.A.T., Fatima K., Mohammad T., Fatima U., Singh I.K., Singh A., Atif S.M., Hariprasad G., Hasan G.M., Hassan M.I. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020;1866(10):165878. DOI 10.1016/j.bbadis.2020.165878.
- Narayanan K., Huang C., Lokugamage K., Kamitani W., Ikegami T., Tseng C.-T.K., Makino S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 suppresses host gene expression, including that of type I interferon, in infected cells. *J. Virol.* 2008;82(9):4471-4479. DOI 10.1128/JVI.02472-07.
- Ogando N.S., Zevenhoven-Dobbe J.C., Meer Y., Bredenbeek P.J., Posthuma C.C., Snijder E.J. The enzymatic activity of the nsp14 exoribonuclease is critical for replication of MERS-CoV and SARS-CoV-2. *J. Virol.* 2020;94(23):e01246-20. DOI 10.1128/JVI.01246-20.
- Oostra M., Hagemeyer M.C., Gent M., Bekker C.P.J., Lintelo E.G., Rottier P.J.M., Haan C.A.M. Topology and membrane anchoring of the coronavirus replication complex: not all hydrophobic domains of nsp3 and nsp6 are membrane spanning. *J. Virol.* 2008;82(24):12392-12405. DOI 10.1128/JVI.01219-08.
- Pan J., Peng X., Gao Y., Li Z., Lu X., Chen Y., Ishaq M., Liu D., Dediego M.L., Enjuanes L., Guo D. Genome-wide analysis of protein-protein interactions and involvement of viral proteins in SARS-CoV replication. *PLoS One*. 2008;3(10):e3299. DOI 10.1371/journal.pone.0003299.
- Pasternak A.O., Spaan W.J.M., Snijder E.J. Nidovirus transcription: how to make sense...? *J. Gen. Virol.* 2006;87(6):1403-1421. DOI 10.1099/vir.0.81611-0.
- Rost B. Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng.* 1999;12(2):85-94. DOI 10.1093/protein/12.2.85.
- Su D., Lou Z., Sun F., Zhai Y., Yang H., Zhang R., Joachimiak A., Zhang X.C., Bartlam M., Rao Z. Dodecamer structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10. *J. Virol.* 2006;80(16):7902-7908. DOI 10.1128/JVI.00483-06.
- Subissi L., Posthuma C.C., Collet A., Zevenhoven-Dobbe J.C., Gorbalenya A.E., Decroly E., Snijder E.J., Canard B., Imbert I. One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111(37):E3900-E3909. DOI 10.1073/pnas.1323705111.
- Tahir M. Coronavirus genomic nsp14-ExoN, structure, role, mechanism, and potential application as a drug target. *J. Med. Virol.* 2021; 93(7):4258-4264. DOI 10.1002/jmv.27009.
- Thiel V., Ivanov K.A., Putics Á., Hertzog T., Schelle B., Bayer S., Weißbrich B., Snijder E.J., Rabenau H., Doerr H.W., Gorbalenya A.E., Ziebuhr J. Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J. Gen. Virol.* 2003;84(9):2305-2315. DOI 10.1099/vir.0.19424-0.
- Tomar S., Johnston M.L., John S.E.St., Osswald H.L., Nyalapatla P.R., Paul L.N., Ghosh A.K., Denison M.R., Mesecar A.D. Ligand-induced dimerization of Middle East respiratory syndrome (MERS) coronavirus nsp5 protease (3CLpro): implications for nsp5 regulation and the development of antivirals. *J. Biol. Chem.* 2015;290(32):19403-19422. DOI 10.1074/jbc.M115.651463.
- Velthuis A.J.W., Arnold J.J., Cameron C.E., Worm S.H.E., Snijder E.J. The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(1):203-214. DOI 10.1093/nar/gkp904.
- Velthuis A.J.W., Worm S.H.E., Snijder E.J. The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both *de novo* initiation and primer extension. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(4):1737-1747. DOI 10.1093/nar/gkr893.
- Xiao Y., Ma Q., Restle T., Shang W., Svergun D.I., Ponnusamy R., Sczakiel G., Hilgenfeld R. Nonstructural proteins 7 and 8 of feline coronavirus form a 2:1 heterotrimer that exhibits primer-independent RNA polymerase activity. *J. Virol.* 2012;86(8):4444-4454. DOI 10.1128/JVI.06635-11.
- Zeng Z., Deng F., Shi K., Ye G., Wang G., Fang L., Xiao S., Fu Z., Peng G. Dimerization of coronavirus nsp9 with diverse modes enhances its nucleic acid binding affinity. *J. Virol.* 2018;92(17):e00692-18. DOI 10.1128/JVI.00692-18.
- Zhai Y., Sun F., Li X., Pang H., Xu X., Bartlam M., Rao Z. Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7–nsp8 hexadecamer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005;12(11):980-986. DOI 10.1038/nsmb999.
- Zhang L., Li L., Yan L., Ming Z., Jia Z., Lou Z., Rao Z. Structural and biochemical characterization of endoribonuclease nsp15 encoded by Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 2018; 92(22):e00893-18. DOI 10.1128/JVI.00893-18.
- Ziebuhr J., Snijder E.J., Gorbalenya A.E. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(4):853-879. DOI 10.1099/0022-1317-81-4-853.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта № FWNR-2022-0020.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 07.10.2021. После доработки 24.11.2021. Принята к публикации 25.11.2021.