

KORONAWIRUSY – JAK INTERAKCJE KILKU BIAŁEK ZMIENIŁY NASZE POSTRZEGANIE ŚWIATA

Jolanta Bratosiewicz-Wąsik^{1*}, Tomasz J. Wąsik²

¹Katedra i Zakład Biofarmacji, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

²Katedra i Zakład Mikrobiologii i Wirusologii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Wpłynęło w lutym, zaakceptowano w maju 2021 r.

Streszczenie: Koronawirus 2 ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-2 – Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) jest trzecim po koronawirusie ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV – Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus) i koronawirusie środkowo-wschodniego zespołu oddechowego (MERS-CoV – Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus), koronawirusem, który w XXI wieku pokonał barierę międzygatunkową wywołując u człowieka ciężkie schorzenie określane jako COVID-19 (coronavirus disease-19). Praca niniejsza prezentuje najnowsze informacje na temat biologii koronawirusów, co ma pomóc w zrozumieniu wielu zagadnień związanych z zakaźnością SARS-CoV-2 i patogenezą COVID-19 oraz usystematyzować najnowsze informacje dotyczące tych zagadnień. Na wstępie przedstawiono podstawowe informacje dotyczące taksonomii, budowy i replikacji koronawirusów stanowiące podstawę dla dalszych rozważań. Następnie wyjaśniono zjawiska molekularne umożliwiające koronawirusom pokonanie bariery międzygatunkowej. Dalsza część pracy poświęcona została mechanizmom oddziaływania pomiędzy koronawirusami i receptorami komórkowymi stanowiącymi czynnik warunkujący tropizm gatunkowy i tkankowy oraz przebieg kliniczny zakażenia. Szczególną uwagę poświęcono receptorom komórkowym, peptydazie dwupeptydylowej IV oraz konwertazie angiotensyny typu 2, oddziałującym z białkiem S koronawirusów oraz proteazom komórkowym zaangażowanym w proteolizę białka S. Czynniki te determinują wejście wirusa do komórki oraz jego replikację i każda nawet niewielka zmiana jakościowa lub ilościowa w ekspresji tych czynników może mieć wpływ na przebieg zakażenia. W pracy omówiono również mechanizmy odpowiedzi układu odpornościowego na zakażenie koronawirusami istotne w patogenezie COVID-19.

1. Wprowadzenie. 2. Patogeneza i patofizjologia COVID-19. 3. Charakterystyka koronawirusów. 3.1. Systematyka. 3.2. Morfologia. 3.3. Białko S. 3.4. Replikacja. 4. Jak koronawirusy pokonują barierę międzygatunkową? 5. Receptory komórkowe dla koronawirusów. 5.1. Peptydaza dwupeptydylowa IV. 5.2. Konwertaza angiotensyny typ 2. 6. Procesowanie proteolityczne białka S. 7. Mechanizmy immunopatogenezy indukowanej zakażeniem SARS-CoV-2. 7.1. Burza cytokinowa. 7.2. Wymyczenie i zmniejszenie liczby limfocytów. 7.3. Wzrost liczby neutrofilów. 7.4. Wzmocnienie zależne od przeciwciał. 8. Podsumowanie

CORONAVIRUSES – HOW PROTEIN INTERACTIONS CHANGED OUR PERCEPTION OF THE WORLD

Abstract: The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the third, following SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus) and Middle East Respiratory Syndrome-CoV (MERS), zoonotic coronavirus that has crossed the species barrier in XXI century resulting in the development of serious human infection termed COVID-19 (coronavirus disease-19). However, there are still many unanswered questions about its transmissibility and pathogenesis, what impelled us to gather the most recent facts about the nature of coronaviruses. At first we introduced the basic information about coronavirus taxonomy, structure, and replication process to create the basis for more advanced consideration. We also put across the molecular basis of the strategy used by coronaviruses to cross the species barrier. In the following part of this review we focused on the interactions between the virus and the receptor on the host cell, as this stage is the critical process determining the species and tissue tropism, as well as clinical course of infection. The special attention was paid to the cellular receptors interaction with S protein of different CoVs (dipeptidyl peptidase IV and angiotensin-converting enzyme 2) as well as the cellular proteases involved in proteolysis of this protein. These factors determine the virus entry and replication, thus even the fine quantitative or qualitative difference in their expression may be crucial for outcome of infection. We also considered the host immune response and viral evasion mechanisms which would be helpful to understand COVID-19 pathogenesis. We wish the information provided by this review may be helpful to understand virus biology and to develop efficient therapeutic and preventive strategies.

1. Introduction. 2. Pathogenesis and pathophysiology of COVID-19. 3. Nature of coronavirus. 3.1. Taxonomy. 3.2. Morphology. 3.3. S protein. 3.4. Replication. 4. How can coronaviruses cross the species barrier? 5. Cellular receptors for coronaviruses. 5.1. Dipeptidyl peptidase IV. 5.2. Angiotensin-converting enzyme 2. 6. Spike protein cleavage. 7. Mechanisms of immunopathogenesis induced by SARS-CoV-2. 7.1. Cytokine storm. 7.2. Depletion and exhaustion of lymphocytes. 7.3. Increased neutrophils. 7.4. Antibody-dependent enhancement. 8. Summary

Słowa kluczowe: ACE2, COVID-19, DPP4, koronawirus

Keywords: ACE2, COVID-19, DPP4, coronavirus

* Autor korespondencyjny: Jolanta Bratosiewicz-Wąsik, Katedra i Zakład Biofarmacji, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec; tel. +48 32 364 1242; e-mail: jbrat@sum.edu.pl

1. Wprowadzenie

Na przełomie 2019 i 2020 roku uwaga mieszkańców całego świata skierowana została na nowego koronawirusa nazwanego SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) wywołującego epidemię zapalenia płuc COVID-19 (COroNaVirus Disease 19), który pojawił się w prowincji Wuhan w centralnych Chinach. W niedługim czasie wirus opanował ludność całego świata i w marcu 2020 roku Światowa Organizacja Zdrowia ogłosiła COVID-19 pandemią. SARS-CoV-2 jest trzecim w XXI wieku koronawirusem pochodzenia odzwierzęcego, który pokonał barierę międzygatunkową wywołując zakażenie człowieka o ciężkim przebiegu. Koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV – Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus) zaatakował w latach 2002–2003 w prowincji Guangdong w Chinach zakażając 8 096 osób i doprowadził do śmierci 774 osób osiągając współczynnik śmiertelności wynoszący 9,5% [93]. W 2012 roku w Arabii Saudyjskiej zaatakował koronawirus środkowo-wschodniego zespołu oddechowego (MERS-CoV – Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) odznaczający się wysokim, sięgającym 34% współczynnikiem śmiertelności, bowiem spośród 2 494 osób zakażonych zmarło 858 pacjentów. Po mającym miejsce w 2014 roku szczyście epidemii, MERS-CoV pozostał w krajach środkowego wschodu, przede wszystkim w Arabii Saudyjskiej, wywołując kilkaset przypadków zachorowań rocznie [92]. Ostatnio w regionie Wuhan pojawił się kolejny wirus nazwany koronawirusem 2 ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-2 – Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) wywołujący ciężkie schorzenie układu oddechowego określone jako COVID-19. Do dnia 16 lutego 2021 roku COVID-19 potwierdzono u 108 822 960 osób, zmarło 2 403 641 zakażonych w 235 krajach świata [97].

Wszystkie trzy wspomniane schorzenia są skutkiem zakażenia wirusami pochodzenia odzwierzęcego. Dane epidemiologiczne, genetyczne i filogenetyczne wskazują, że ich źródłem są nietoperze, z których na człowieka przeniesione zostały przez zwierzęta domowe, takie jak krowy, świnie, czy wielbłądy. Ponadto badania immunologiczne i molekularne wykazały, że dzięki zwierzęta takie jak łaskuny palmowe i jenoty sprzedawane na tzw. mokrych targach w Azji są rezerwuarem pośrednim koronawirusów [34].

Poza wspomnianymi SARS-CoV, MERS-CoV i SARS-CoV-2, człowiek zakaża się również innymi koronawirusami (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 i HCoV-HKU1) odpowiedzialnymi za rozwój infekcji górnych dróg oddechowych o łagodnym lub umiarkowanie nasilonym przebiegu u osób immunokompetentnych. Natomiast u osób o obniżonej odporności

zakażenie może przybierać postać ciężką. Badania genetyczne dowiodły, że od zwierząt pochodzą następujące koronawirusy: od gryzoni HCoV-OC43 i HCoV-HKU1, a od nietoperzy HCoV-229E i HCoV-NL63 [26, 82].

2. Patogeneza i patofizjologia COVID-19

Podobnie jak inne koronawirusy wywołujące zakażenia układu oddechowego SARS-CoV-2 przenoszony jest głównie drogą kropelkową. Możliwa, choć nieudowodniona, jest również transmisja drogą fekalno-oralną, gdyż u pacjentów, u których występują wymioty i biegunka, RNA wirusa wykrywany jest w kale [37]. Zakażenie może przebiegać w formie bezobjawowej, z objawami o średnim nasileniu, a w 20% przypadków przebieg zakażenia jest na tyle ciężki, że wymaga hospitalizacji. Śmiertelność w skali świata wynosi około 2,2% i różni się w regionach w zależności od systemu opieki zdrowotnej.

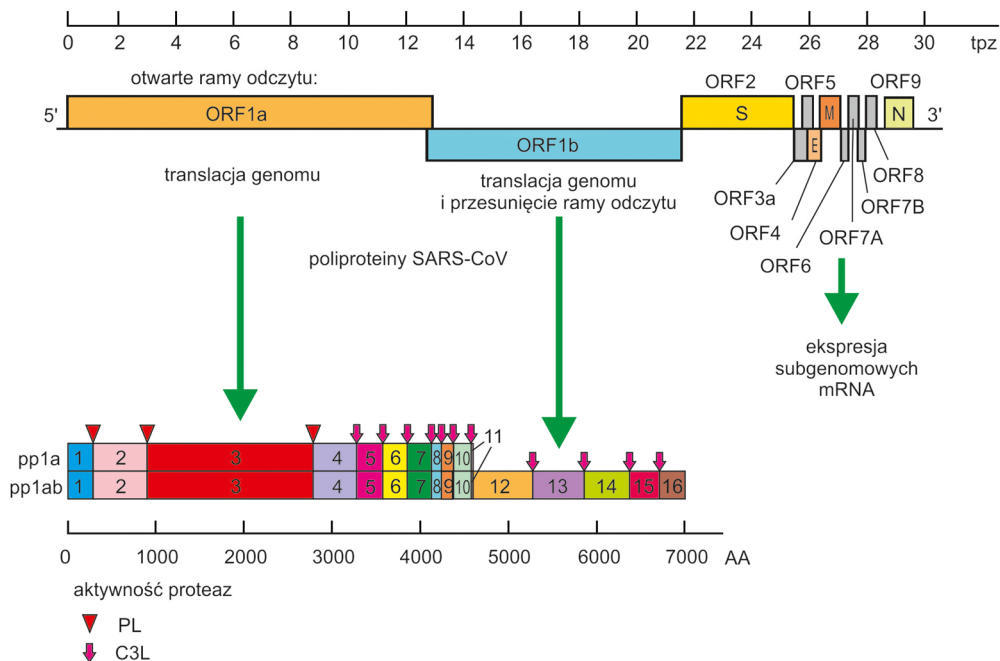
Średni okres inkubacji poprzedzający wystąpienie objawów zakażenia wynosi 4–5 dni, średni czas trwania okresu objawowego wynosi 11 dni, natomiast od momentu wystąpienia objawów do zgonu upływa średnio 14 dni [35, 51, 57]. Najczęściej występującymi objawami zakażenia SARS-CoV-2 są gorączka sięgająca 38,5°C i suchy kaszel, rzadziej pojawiają się trudności w oddychaniu, bóle stawowo-mięśniowe, bóle i zwroty głowy, zaburzenia smaku i węchu, biegunka, nudności i wymioty [10, 35]. W ciężkim przebiegu COVID-19 około 8–9 dnia od wystąpienia objawów dochodzi do rozwoju zespołu ostrej niewydolności oddechowej (ARDS – acute respiratory distress syndrome) [40].

Nasilenie objawów zakażenia SARS-CoV-2 jest wynikiem nie tyle bezpośredniego cytolitycznego działania wirusa, ile odpowiedzi organizmu gospodarza na zakażenie. Szacunki wskazują, że w około 70% przypadków śmierć spowodowana jest zespołem ostrej niewydolności oddechowej. Następujące w odpowiedzi na zakażenie wydzielanie przez komórki efektorowe układu immunologicznego cytokin może przyjmować gwałtowną postać nazwaną burzą cytokinową prowadzącą do sepsy i stanowiąc przyczynę około 28% zgonów pacjentów z COVID-19 [103].

3. Charakterystyka koronawirusów

3.1. Systematyka

Zgodnie z danymi Międzynarodowego Komitetu Taksonomii Wirusów koronawirusy należą do podrodziny *Orthocoronavirinae* w rodzinie *Coronaviridae* w rzędzie *Nidovirales*. Porównanie sekwencji genomu przeprowadzone w podrodzinnie *Orthocoronavirinae*



Ryc. 1. Schemat genomu koronawirusów

Na 5' końcu genomu znajdują się dwie otwarte ramy odczytu (ORF – ang. Open Reading Frame) ORF1a i ORF1b kodujące polipeptyny pp1a i pp1ab rozcinane na 16 lub rzadziej na 15 białek niestrukturalnych tworzących kompleks replikacyjno-transkrypcyjny (RTC). Otwarte ramy odczytu od 3' końca kodują białka strukturalne i regulatorowe: białko kolca (S), ORF3A, białko osłonki (E), białko błonowe (M), ORF5, ORF6, ORF7A, ORF7B, ORF8 i białko nukleokapsydu (N). Dolny panel przedstawia procesowanie proteolityczne polipeptydów pp1a i pp1ab. Liczby przy segmentach polipeptydów odpowiadają numerowi białka niestrukturalnego; funkcja poszczególnych białek opisana jest w Tabeli I.

pozwoiliło na wyodrębnienie w niej czterech rodzajów: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* i *Deltacoronavirus*. Wszystkie trzy koronawirusy atakujące dolne drogi oddechowe i wywołujące ciężki przebieg choroby (SARS-CoV, MERS-CoV i SARS-CoV-2) oraz wirusy HCoV-OC43 i HCoV-HKU1 należą do rodzaju *Betacoronavirus*, podczas gdy wirusy HCoV-229E i HCoV-NL63 zaliczone zostały do rodzaju *Alphacoronavirus* [46].

3.2. Morfologia

Koronawirusy są wirusami osłonkowymi, których genom stanowi niesegmentowany jednoniciowy RNA o dodatniej polarności liczący od 26 do 32 tysięcy nukleotydów [11, 35]. W 5'-końcowej części genomu wyróżnić można dwie zachodzące na siebie otwarte ramy odczytu (ORF – open reading frame) ORF1a i ORF1b kodujące 15 lub 16 białek niestrukturalnych, natomiast w części 3'-końcowej znajdują się geny kodujące białka strukturalne: białko nukleokapsydu (N – nucleocapside), białko osłonkowe (E – envelope), białko błonowe (M – membrane) oraz glikoproteinę kolca (S – spike), oraz geny kodujące białka regulatorowe (ryc. 1) [24, 77]. Genomowy RNA oraz fosforylowane białko N tworzą helikalny nukleokapsyd otoczony dwuwarstwą fosfolipidową. W osłonce zakotwiczone są dwa rodzaje glikoprotein tworzących tzw. kolce: homotrimer glikoproteiny S występujący u wszystkich koro-

nawirusów oraz hemaglutynina-esteraza obecna tylko u niektórych beta-CoV. Podczas procesu replikacji glikoproteina S rozcinana jest przez proteazę komórkową na dwa peptydy, S1 odpowiedzialny za wiązanie receptora komórkowego i S2 formujący trzon cząsteczki [1]. Pozostałe dwa białka strukturalne, czyli białko błonowe (M) i osłonkowe (E) odpowiedzialne są za składanie potomnych cząstek wirusa i wirulencję i są związane z dwuwarstwą fosfolipidową [2, 24, 61, 68, 70].

3.3. Białko S

Szczególną uwagę zwrócić należy na białko S, pełni ono bowiem kluczową rolę w cyklu replikacyjnym koronawirusów, wiąże się z receptorem na powierzchni komórki docelowej warunkując tropizm wirusa oraz uczestniczy w procesie fuzji pomiędzy osłonką wirusa i błoną komórkową lub endosomu. W N-końcowej części białka S znajduje się sekwencja sygnałowa kierująca białko do retikulum endoplazmatycznego. Dalsza część białka S dzielona jest na N-końcową podjednostkę S1 zawierającą domenę wiążącą receptor (RBD – receptor binding domain) oraz podjednostkę S2, w obrębie której wyróżnić można peptyd odpowiedzialny za fuzję (FP – fusion peptide), wewnętrzny peptyd odpowiedzialny za fuzję (IFP – internal fusion peptide), motywy powtórzeń siedmioaminokwasowych 1/2 (HP1/2 – heptad repeat 1/2) oraz domenę śródbłonową

(TM – transmembrane domain) [36]. W obrębie białka S znajdują się dwa miejsca cięcia proteolitycznego, cięcie w obrębie pierwszego miejsca zlokalizowanego pomiędzy podjednostkami S1 i S2 (miejsce S1/S2) określane jest „priming”, natomiast drugie, znajdujące się w N-końcowej części domeny FP (miejsce S2’), rozcinane jest w procesie określonym jako „triggering”. „Priming” pozwala cząsteczce S na przyjęcie konformacji umożliwiającej domenie RBD na związanie się z receptorem, natomiast „triggering” pomaga obniżyć barierę energetyczną fuzji z błoną komórkową lub endosomu. W proteolizie białka S uczestniczyć może kilka enzymów komórkowych. Białko S może podlegać działaniu zależnej od pH proteazy cysteinowej katepsyny L, transmembranowej proteazy serynowej 2 (TMPRSS2 – transmembrane serine protease 2) oraz innej proteazy serynowej – furyny. Enzymy te w komórce występują w różnej lokalizacji determinując miejsce fuzji osłonki wirusa z błoną komórki. TMPRSS2 jest zlokalizowana na powierzchni komórki i pozwala na fuzję osłonki z błoną komórkową, podczas gdy katepsyna L występuje w endosomach i rozcina białko S dopiero po tym, jak cząstka wirusowa znajdzie się w pęcherzyku, co pozwala na fuzję pomiędzy osłonką a błoną endosomu [5, 38]. Przebieg kaskady cięć proteolitycznych białka S koronawirusów warunkuje ich tropizm. Dla przykładu wydajne rozcinanie S1/S2 MERS-CoV odbywa się wkrótce po uformowaniu potomnych cząstek wirusa jeszcze w komórkach, w których zachodzi replikacja, co pozwala na równie wydajne cięcie S2’ natychmiast po związaniu wirusa z komórką docelową i umożliwia fuzję osłonki z błoną komórkową. Jednak niektóre warianty MERS-CoV oraz inne koronawirusy, procesy proteolityczne białka S rozpoczynają dopiero na powierzchni komórki, co opóźnia przeprowadzenie drugiego cięcia do etapu endosomalnego, a tym samym pozwala na fuzję osłonki z błoną endosomu. Znajomość procesów proteolitycznych umożliwiających zakażenie komórki docelowej pozwala przewidywać tropizm wirusa, patogenzę zakażeń oraz opracować strategię postępowania terapeutycznego [72].

Białko S SARS-CoV-2 ze względu na to, że zawiera epitopy immunodominujące i jest celem przeciwko któremu skierowane są przeciwciała neutralizujące zostało wybrane do skonstruowania szczepionki. W opracowaniu szczepionek mających stymulować odpowiedź immunologiczną przeciwko białku S wykorzystywane są różne strategie, między innymi syntetyczne lub rekombinowane polipeptydy (szczepionki podjednostkowe), wektory wirusowe, mRNA, DNA, wirusy atenuowane [50, 54]. Ostatnio Samad i wsp. zastosowali metody immunoinformatyczne do wybrania epitopów białka S SARS-CoV-2 silnie wiążących się z receptorem TLR4 (toll-like receptor 4) i wywołujących silną odpowiedź immunologiczną na infekcję tym wirusem [76].

3.4. Replikacja

Cykl replikacyjny koronawirusów inicjowany jest przez związanie białka S wirusa z receptorem na powierzchni komórki docelowej. Interakcja białka S z receptorem staje się możliwa po jego rozcięciu na podjednostki S1 i S2 pozostające w połączeniu niekowalencyjnym. Następnie białko S podlega prowadzonemu przez proteazy komórkowe cięciu w położonym bezpośrednio przed domeną odpowiedzialną za fuzję miejscu S2’. Cięcie to powoduje zmiany konformacji białka umożliwiające przeprowadzenie fuzji osłonki wirusa z błoną komórki lub endosomu gospodarza, co w konsekwencji umożliwia uwolnienie genomu wirusa do cytoplazmy. Kolejnym etapem replikacji koronawirusa jest translacja otwartych ram odczytu ORF1a i ORF1b doprowadzająca do powstania poliprotein pp1a i pp1ab, które ulegają rozcięciu na 16 lub, rzadziej, 15 białek niestrukturalnych (tab. I, ryc. 1) [69, 71, 80, 102] tworzących kompleks replikacyjno-transkrypcyjny (RTC – replication-transcription complex) [24, 87]. Powstały kompleks odpowiedzialny jest za replikację RNA oraz transkrypcję subgenomowych RNA służących jako matryca do syntezy białek strukturalnych S, E i M wbudowywanych do retikulum endoplazmatycznego oraz białka N tworzącego wraz z RNA nukleokapsyd. Uformowany nukleokapsyd trafia do przedziału ERGIC (endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment), gdzie oddziałuje z białkiem M i uzyskuje osłonkę. Interakcje te rozpoczynają proces dojrzewania, transport w pęcherzykach i ostatecznie uwolnienie potomnych wirionów poprzez egzocytotę [19, 24, 64].

4. Jak koronawirusy pokonują barierę międzygatunkową?

Kluczowym etapem cyklu replikacyjnego koronawirusów jest rozpoznanie swoistego receptora na powierzchni komórki. Efektywne połączenie domeny wiążącej receptor białka S koronawirusa z receptorem komórkowym warunkuje wydajną replikację, a także tropizm i zakres zasięgu gatunkowego. Koronawirusy zakażające ludzi pochodzą od wirusów występujących u dziko żyjących zwierząt, głównie nietoperzy i gryzoni, a na człowieka przeniosły się przez organizmy gospodarzy pośrednich, takich jak łaskuny palmowe, jenoty czy wielbłądy jednogarbne. Pokonanie bariery międzygatunkowej przez wirusa zależy od nabycia zdolności wejścia do komórki gospodarza dzięki związaniu ze swoistym receptorem i fuzji pomiędzy osłonką wirusa i błoną komórki. Głównymi receptorami komórkowymi wykorzystywanymi przez koronawirusy człowieka są: aminopeptydaza N (APN – aminopeptidase N) rozpoznawana przez HCoV-229E, konwertaza angiotensyny typ 2 (ACE2

Tabela I
Funkcja białek koronawirusów

	Białko	Funkcja
Białka strukturalne	S	Białko kolca koronawirusów odpowiedzialne za wiązanie z receptorem komórkowym i fuzję z błoną komórkową
	E	Białko osłonki odpowiedzialne za składanie i uwalnianie cząstek potomnych
	M	Białko błonowe oddziałujące z innymi białkami wirusa w procesie składania wirionów potomnych
	N	Nukleoproteina zapewniająca ochronę genomu i jego inkorporację do wirionów potomnych; białko N wiąże się z nsp3 umożliwiając uformowanie kompleksu replikacyjno-transkrypcyjnego
Białka niestukturalne	nsp1	Hamowanie ścieżki sygnałowej IFN- β ; hamowanie translacji poprzez wiązanie i inaktywację podjednostki 40S rybosomów oraz aktywacja komórkowych endonukleaz do cięcia mRNA komórkowego
	nsp2	Wiąże się z inhibitorem 1 i 2 przez co zaburza funkcjonowanie ścieżek sygnałowych w komórce
	nsp3	Proteinaza z rodziny papain; uwalnia nsp1, nsp2 i nsp3 z poliproteiny
	nsp4	Oddziałuje z nsp3; uczestniczy w przemodelowaniu błony komórkowej umożliwiającym formowanie kompleksu replikacyjno-transkrypcyjnego
	nsp5	Proteinaza podobna do 3C; zapewnia rozcinanie poliproteiny wirusowej uwalniając przynajmniej 11 białek niestukturalnych; działa jako supresor wrodzonej odpowiedzi immunologicznej
	nsp6	Zapewnia powstawanie autofagosomów z retikulum endoplazmatycznego; zapobiega dostarczaniu przez autofagosomy elementów wirusowych do degradacji w lizosomach
	nsp7	Wraz z nsp8 działa jako kofaktor dla RNA-zależnej polimerazy RNA (nsp12)
	nsp8	Wraz z nsp7 działa jako kofaktor dla RNA-zależnej polimerazy RNA (nsp12)
	nsp9	Białko wiążące ssRNA; oddziałuje z zawierającą motyw DEAD helikazą RNA 5
	nsp10	Stymuluje aktywność nsp14 i nsp16
	nsp11	Funkcja nieznaną
	nsp12	RNA-zależna polimeraza RNA zapewniająca zarówno replikację jak i transkrypcję
	nsp13	Helikaza dsRNA; 5'-trójfosfataza; uczestniczy w tworzeniu czapeczki na 5' końcu wirusowego mRNA
	nsp14	3'-5'-egzorybonukleaza zapewniająca poprawność procesu replikacji; metylotransferaza N7-guaninowa uczestniczy w tworzeniu czapeczki na 3' końcu wirusowego mRNA
	nsp15	Endorybonukleaza rozcinająca RNA w pozycji 3' urydyny tworząc 2'-3' cykliczny fosfodiester; degraduje wirusowy dsRNA zapobiegając rozpoznaniu przez organizm gospodarza
	nsp16	2'-O-ribozylo-metylotransferaza metyluje grupę 2'-hydroksylową adeniny w czasie tworzenia czapeczki w wirusowym mRNA

– angiotensin-converting enzyme 2) używana przez wirusy SARS-CoV, SARS-CoV-2 i HCoV-NL63, oraz peptydaza dwupeptydylowa IV (DPP4 – dipeptidyl-peptidase IV) swoista dla MERS-CoV [20, 39, 61].

Nawet niewielka zmiana w obrębie RBD białka S może zmieniać jego powinowactwo do receptora. Yang i wsp. wykazali, że w wyniku dwu mutacji punktowych, S746R and N762A, w białku S wirusa nietoperzy HKU4 spokrewnionego z posiadającym obie te zmiany MERS-CoV nabywa on zdolności do rozpoznawania receptora na komórkach człowieka. Zmutowane białko S HKU4, w odróżnieniu od białka S MERS-CoV, nie podlega jednak aktywacji przez proteazy komórkowe, co uniemożliwia fuzję osłonki z błoną komórki [101]. Podobnie przeniesienie SARS-CoV z łaskuna na człowieka stało się możliwe dzięki wystąpieniu podwójnej substytucji, N479L i T487S w RBD białka S [60]. Inną możliwością zmiany tropizmu koronawirusów jest zajęcie rzadkiego zjawiska rekombinacji genetycznej powodującej wymianę całego lub części genu kodującego białko S. Przykładem takiego zjawiska jest powstanie kociego koronawirusa (FCoV – feline coronavirus) typu II.

Wirus ten pojawił się u kotów w wyniku podwójnej rekombinacji pomiędzy kocim koronawirusem typu I i psim koronawirusem (CCoV – canine coronavirus) typu II, dzięki której FCoV typu I uzyskał gen białka S od CCoV typu II. Skutkiem zmiany jest przekształcenie powodującego łagodne nieżyty jelitowe FCoV typu I w FCoV typu II wywołującego śmiertelne zapalenie otrzewnej [84].

Tropizm i patogenezę koronawirusów zależy również od obecności w białku S sekwencji rozpoznawanych swoiście przez proteazy komórkowe, co udowodniono wykazując, że wprowadzenie miejsca rozpoznawanego przez furynę do białka S wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli (IBV – infectious bronchitis virus) spowodowało znaczny wzrost jego zjadliwości [12]. Porównanie sekwencji miejsc cięcia w białku S dowiodło, że SARS-CoV-2 posiada miejsce rozpoznawane przez furynę nieobecne u innych koronawirusów tego samego kładu. Nabycie miejsca cięcia przez furynę prawdopodobnie spowodowało uzyskanie przez SARS-CoV-2 zdolności do łatwiejszego rozprzestrzeniania się wśród populacji ludzi w porównaniu do innych betakoronawirusów [16].

Po pokonaniu bariery międzygatunkowej, dzięki wysokiej zmienności mutacyjnej koronawirusów podlegającej selekcji w środowisku organizmu nowego gospodarza dochodzi do powstania wariantów wirusa o wyższej sprawności replikacyjnej i większej oporności na presję ze strony układu immunologicznego. Na początku marca 2020 roku pojawiła się nowa odmiana SARS-CoV-2 z substytucją aminokwasową D614G w białku S. Nowy wariant szybko stał się formą dominującą, co sugerowało, iż zmiana ta wpłynęła korzystnie na transmisję wirusa. Rzeczywiście, detekcja metodą poprzedzonej odwrotną transkrypcją łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym RT-PCR (real time reverse transcription-polymerase chain reaction) pozwoliła stwierdzić wyższe miano nowej odmiany wirusa w obrębie górnych dróg oddechowych. Zaproponowane wyjaśnienie mówi, iż zamiana kwasu asparaginowego na glicynę w pozycji 614 znosi możliwość tworzenia wiązania wodorowego pomiędzy protomerami białka S, co zwiększa ich elastyczność i ułatwia oddziaływanie pomiędzy protomerami. Ponadto pojawienie się zmiany może zaburzać proces glikozylacji asparaginy w pozycji 616 wpływając na najbliższy położony protomer i jego aktywność pozwalającą na fuzję osłonki [53, 105]. Ostatnie badania wskazują na jeszcze inny mechanizm wpływu mutacji D614G polegający na zwiększeniu gęstości wariantu G614 białka S na powierzchni cząstek wirusa i osłabieniu oddziaływania podjednostki S1. Badacze postulują, że połączenie pomiędzy domenami S1 i S2 jest w wariacie D614 słabsze aniżeli w odmianie z substytucją i ta niestabilność może wpływać na zaburzenie struktury błony, właściwy transport, modyfikacje potranslacyjne i wbudowywanie białka S do wirionów potomnych [104].

W listopadzie 2020 roku wykryto w Anglii w próbkach pochodzących z września wariant wirusa oznaczony B.1.1.7 posiadający wiele mutacji mających znaczenie zarówno dla sprawności replikacyjnej wirusa jak i odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Wariant ten szybko rozprzestrzenił się w Wielkiej Brytanii i przedostał się do innych krajów Europy. Najistotniejszą mutacją nowej odmiany wirusa wydaje się być substytucja N501Y leżąca w obrębie RBD i zwiększająca powinowactwo białka S do receptora ACE2. Podwójna delecja 69/70del może natomiast być istotna dla unikania odpowiedzi immunologicznej, podczas gdy zmiana P681H leży w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca rozpoznawanego przez furynę i może w związku z tym wpływać na wydajność cięcia przez ten enzym [28, 86]. Ustalono, że wariant z mutacją 501Y, ale bez delecji 69/70, który pojawił się na początku września był o około 10% bardziej zakaźny w porównaniu do wariantu 501N, natomiast zakaźność odmiany wirusa 501Y zawierającej delecję 69/70 (wariant B.1.1.7), szerzącej się od końca września wzrosła o około 75% w stosunku do wariantu 501N [58].

5. Receptory komórkowe dla koronawirusów

Patogeneza zakażeń koronawirusami jest, przynajmniej częściowo uwarunkowana lokalizacją receptorów wykorzystywanych przez te wirusy do wnikięcia do komórki. Spośród koronawirusów zakażających człowieka HCoV-229E wykorzystuje do tego celu receptor APN, HCoV-NL63, SARS-CoV i SARS-CoV-2 wiąże się z ACE2, natomiast MERS-CoV rozpoznaje DPP4. Uważa się, że zarówno struktura, jak i poziom ekspresji receptorów komórkowych są kluczowymi czynnikami organizmu gospodarza decydującymi o patogenezie i transmisji koronawirusów [20, 39].

5.1. Peptydaza dwupeptydylowa IV

Peptydaza dwupeptydylowa IV (DPP4 – dipeptidyl peptidase IV), inaczej CD26, została rozpoznana jako receptor dla MERS-CoV w 2013 roku przez Raj i wsp., którzy wyizolowali z liszaków zakażonych komórek Huh-7 DPP4 związany z RBD białka S MERS-CoV [75]. DPP4 jest białkiem transbłonowym typu II występującym w formie dimerów. Część zewnątrzkomórkowa każdego monomeru złożona jest z dwu domen, położonej bliższej błony domeny katalitycznej α/β oraz dalszej ośmioczłonowej domeny wiążącej β o konformacji przypominającej śmigło. Dzięki aktywności hydrolazy domeny α/β DPP4 odcina dipeptydy X-L-prolina lub X-L-alanina z N-końca różnych polipeptydów takich jak hormony, cytokiny, chemokiny, neuropetydy i peptydy wazoaktywne. Człon 4 i 5 struktury β -śmigła DPP4 jest rozpoznawany przez domenę rozpoznającą receptor białka S MERS-CoV [4, 67]. W cząsteczce DPP4 zidentyfikowano 11 reszt aminokwasowych kluczowych dla wiązania z RBD i wykazano, że są one wysoce konserwatywne wśród gatunków wrażliwych na zakażenie MERS-CoV, takich jak wielbłądy, króliki i naczelnne, natomiast fretki, szczury, czy myszy niewrażliwe na zakażenie MERS-CoV wykazują znaczne zróżnicowanie w obrębie reszt kluczowych dla wiązania z białkiem S. Tak więc struktura pierwszorzędowa DPP4 wyznacza grupę gatunków zwierząt będących gospodarzami dla MERS-CoV [90, 95].

Transmisja i patogeneza zakażeń MERS-CoV uwarunkowana jest zarówno przez strukturę DPP4 jak i jego tkankową lokalizację oraz poziom ekspresji. Umieszczenie występowania DPP4 decyduje o znacznie wydajniejszej transmisji MERS-CoV u wielbłądów, aniżeli u ludzi i wyjaśnia, dlaczego głównym źródłem zakażenia MERS-CoV są wielbłądy, podczas gdy transmisja między ludźmi jest znacznie rzadsza. Różnica w poziomie rozprzestrzeniania się wirusa u wielbłądów i u ludzi wynika bowiem z możliwości jego namnażania się w górnych drogach oddechowych u wielbłądów i braku takiej możliwości u ludzi. W wymazach z nosa

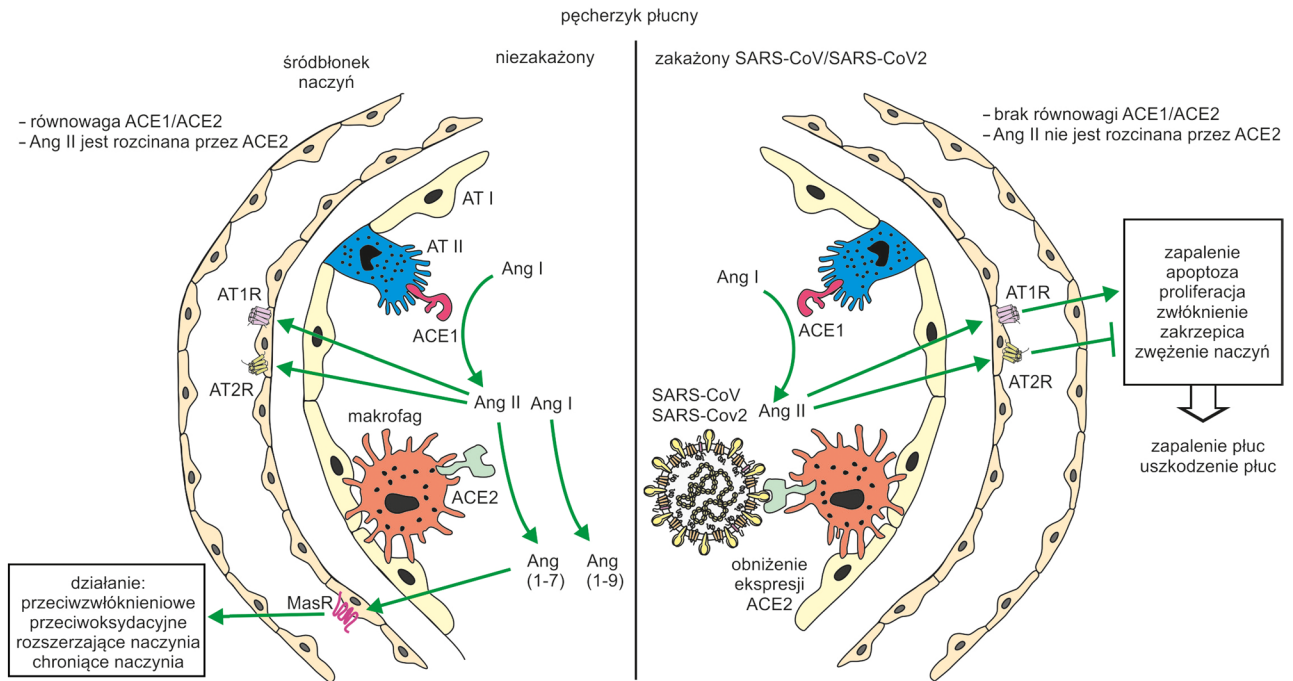
pobranych od wielbłądów, w odróżnieniu od próbek pochodzących od ludzi, wykryto stosunkowo wysoki poziom wirusa. Różnica ta wynika z faktu, że u ludzi receptor DPP4 występuje jedynie nabłonku dolnych dróg oddechowych, głównie w pneumocytach typu II, nieobecny jest natomiast w śluzówce nosa, podczas gdy u wielbłądów DPP4 jest obecny w śluzówce nosa i pozwala wirusowi replikować w tej lokalizacji [94].

Kolejną zagadką rozwiązana dzięki pracom nad udziałem DPP4 w patogenezie zakażeń MERS-CoV było wewnątrzgatunkowe zróżnicowanie przebiegu zakażenia tym wirusem. Przebieg kliniczny zakażenia MERS-CoV jest bardzo zróżnicowany, od postaci bezobjawowej aż do ciężkiego zapalenia płuc z zespołem ostrej niewydolności oddechowej, prowadzącym do śmierci [109]. Wskazuje to na istnienie czynników osobniczych decydujących o przebiegu klinicznym zakażenia MERS-CoV. Takimi czynnikami są palenie tytoniu oraz przewlekła obturacyjna choroba płuc (COPD – chronic obstructive pulmonary disease). Wykazano, że palacze oraz pacjenci z COPD są bardziej wrażliwi na zakażenie MERS-CoV, co Seys i wsp. tłumaczą wyższym poziomem ekspresji DPP4 zarówno na etapie mRNA, jak i białka w porównaniu z osobami niepalącymi i nieobarczonymi COPD [78]. 98% powierzchni płuc pokrywają pneumocyty typu I, pozostałą część natomiast pneumocyty typu II. W płucach zdrowych ludzi DPP4 występuje prawie wyłącznie na pneumocytach typu II, podczas gdy u palaczy i pacjentów z COPD dochodzi do ekspresji DPP4 w pneumocytach typu I i białko to występuje w obu tych typach komórek. Obecność receptora na pneumocytach typu I może być przyczyną zakażenia i niszczenia tych komórek przez MERS-CoV i prowadzić ostatecznie do rozległego uszkodzenia pęcherzyków płucnych [95].

Poznanie oddziaływań pomiędzy DPP4 i białkiem S MERS-CoV na poziomie molekularnym wykazało, że w bezpośredni kontakt z białkiem S wchodzi 15 aminokwasów [90]. Kleine-Weber i wsp. zadali pytanie, czy naturalnie występujące w DPP4 polimorfizmy dotyczące aminokwasów oddziałujących z białkiem S mogą wpływać na wejście wirusa do komórki. Przeprowadzona analiza wykazała, iż cztery polimorfizmy (K267E, K267N, A291P i Δ346–348) obniżają zdolność wiązania MERS-CoV, a co za tym idzie wydajność zakażenia komórek i replikacji wirusa. Tak więc fenotyp DPP4 może oddziaływać na przebieg zakażenia MERS-CoV. Wariant DPP4 z delecją Δ346–348 jest mniej wydajnie, w porównaniu do typu dzikiego białka, transportowany na powierzchnię komórki, natomiast warianty K267E i A291P DPP4 słabiej wiążą się z białkiem S. Podsumowując, naturalnie występujące w DPP4 polimorfizmy mogą utrudniać wnikanie MERS-CoV do komórki i w konsekwencji wpływać na rozwój choroby u zakażonych pacjentów [52].

5.2. Konwertaza angiotensyny typ 2

Konwertaza angiotensyny typ 2 (ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2) jest złożoną z 805 aminokwasów, glikoproteiną transmembranową typu I z zewnątrzkomórkową domeną katalityczną. ACE2 należy do rodziny M2 metaloproteaz, a zlokalizowane po zewnętrznej stronie błony komórkowej domeny katalitycznej uczestniczą w przemianach peptydów krążących zewnątrzkomórkowo. ACE2 zlokalizowany jest głównie w sercu, nerkach, jądrach, wątrobie, jelitach i endotelium naczyń krwionośnych, a w mniejszym stopniu w wielu innych organach, głównie w płucach i okężnicy, nie występuje w komórkach ośrodkowego układu nerwowego [55]. ACE2 jest elementem układu renina-angiotensyna (RAS – renin-angiotensin system), w którym ACE przekształca będącą decapeptydem angiotensynę I (AngI) w liczącą osiem reszt aminokwasowych angiotensynę II (AngII), natomiast ACE2 ma zdolność odcinania pojedynczych reszt aminokwasowych przekształcając AngI w Ang1-9, a AngII konwertując do Ang1-7. ACE2 w układzie RAS pełni funkcję negatywnego regulatora RAS, działając przeciwnie do ACE w wielu narządach takich jak serce, nerki czy płuca. W układzie oddechowym ACE, AngII i receptor typu 1 AngII (AT1R – AngII receptor type 1) są czynnikami, których działanie prowadzi do uszkodzenia płuc, podczas gdy ACE2 wpływa na płuca ochronnie [44]. Jedną z przyczyn ciężkiego przebiegu zakażenia SARS-CoV i stosunkowo wysokiej śmiertelności może być obniżona ekspresja ACE2 w płucach zakażonych pacjentów wykazana w badaniach Kuba i wsp., którzy dowiedli, że zarówno SARS-CoV, jak i rekombinowane białko S tego wirusa obniża ekspresję ACE2. Tak więc ACE2 w patogenezie zakażeń koronawirusami uczestniczy w dwojaki sposób, po pierwsze umożliwia zakażenie wrażliwych komórek, po drugie pod wpływem zakażenia jego ekspresja ulega osłabieniu, co nieuchronnie prowadzi do uszkodzenia płuc (ryc. 2) [56]. Zjawisko obniżenia poziomu ekspresji ACE2 w komórkach płuc wywołane przez SARS-CoV i HCoV-NL63 oddziałujące z tym receptorem może wyjaśniać różnice w przebiegu zakażenia wywołanego tymi wirusami. Rekombinowane białko S SARS-CoV wiąże się z ACE2 i powoduje jego uwolnienie z powierzchni komórki znacznie wydajniej aniżeli białko S wirusa HCoV-NL63 [31]. Badania strukturalne i biofizyczne wykazały natomiast, że SARS-CoV-2 wiąże się z ACE2 ze znacznie większym powinowactwem niż SARS-CoV. Te różnice w awidności wiązania do ACE2 mogą, przynajmniej częściowo, wyjaśniać łatwość, z jaką SARS-CoV-2 przenosi się między ludźmi [98]. Potwierdzenie tej hipotezy stanowią wyniki badań prowadzonych przez Chu i wsp., którzy odkryli, że SARS-CoV-2 replikuje się w tkankach płuc znacznie wydajniej niż SARS-CoV [15].



Ryc. 2. Rola ACE2 w patogenezie COVID-19

Schemat pęcherzyka płucnego w stanie fizjologicznym (panel lewy) charakteryzujący się równowagą ACE1/ACE2 oraz w czasie infekcji SARS-CoV-2 (panel prawy), gdy ekspresja receptora ACE2 ulega obniżeniu powodując zaburzenie równowagi ACE1/ACE2 i nadaktywację układu renina-angiotensyna (RAS) prowadzącą do uszkodzenia płuc. AT I, AT II – pneumocyty typu I, II; ACE1, ACE2 – enzymy typu 1, 2 konwertujące angiotensynę; MasR – receptor Mas; Ang I, II – angiotensyna I, II; AT1R, AT2R – receptor typu 1, 2 angiotensyny II.

Zaburzenie równowagi w układzie RAS poprzez związanie białka S SARS-CoV-2 z ACE2 odgrywa kluczową rolę w patogenezie COVID-19. AngII, która na skutek obniżenia ekspresji ACE2 pozostaje nieprzekształcona do Ang1-7, zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych płuc, co prowadzi do obrzęków płuc, a także stymuluje makrofagi i inne komórki układu odpornościowego do produkcji cytokin prozapalnych, których wzmożona produkcja, tzw. „burza cytokinowa” prowadzi do uszkodzenia płuc oraz niewydolności wielonarządowej kończącej się śmiercią [3, 45, 100].

Badania dotyczące wielu innych wirusów wykazały, że istnienie wariantów allelicznych receptora gospodarza warunkuje wydajność wiązania wirusa, przez co modyfikuje stopień oporności komórki na zakażenie danym wirusem. Dlatego przeprowadzono liczne badania mające określić, czy warianty genetyczne ACE2 mogą determinować przebieg zakażenia SARS-CoV i SARS-CoV-2. Zidentyfikowano niewiele polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w regionach kodujących ACE2 człowieka, ponadto w większości z nich częstość występowania polimorficznego allela wynosi poniżej 5%. Porównanie częstości występowania polimorficznych alleli regionów kodujących i niekodujących ACE2 pomiędzy grupą osób zakażonych SARS-CoV i grupą kontrolną nie potwierdziły istnienia ich związku z wrażliwością na rozwój zakażenia wśród populacji chińskiej i wietnamskiej [14, 48].

Z drugiej strony, utworzone modele polimorficznych wariantów ACE2 obejmujących miejsca zaangażowane w oddziaływanie z RBD białka S koronawirusa pozwoliły obserwować wpływ zmian strukturalnych ACE2 na oddziaływanie międzycząsteczkowe z białkiem S SARS-CoV-2. W badaniach tych odnotowano, że allele ACE2 rs73635825 (S19P) i rs143936283 (E329G) wykazują zróżnicowaną zdolność do oddziaływań z wirusowym białkiem S, co wskazuje na wpływ wariantów polimorficznych ACE2 na potencjalną oporność przeciw SARS-CoV-2 [43]. Jednakże rzeczywiste znaczenie tych polimorfizmów trudno ustalić ze względu na ich rzadkie występowanie oszacowane na 3.3×10^{-3} dla rs73635825 w populacji afrykańskiej oraz 6.51×10^{-5} dla rs143936283 w populacji europejskiej [49].

Zhao i wsp. stosując technikę sekwencjonowania RNA pojedynczej komórki wykazali, że głównymi komórkami syntetyzującymi ACE2 są pneumocyty typu II i, co szczególnie interesujące, w komórkach tych wykryto również ekspresję wielu innych białek zapewniających replikację i transmisję wirusa. Innymi komórkami, w których stwierdzono syntezę, choć na niższym poziomie, ACE2 są pneumocyty typu I, fibroblasty, komórki nabłonka oddechowego, komórki śródbłonna oraz makrofagi. Podwójna rola jaką pełni ACE2, który z jednej strony działa ochronnie w osi ACE2 – Ang1-7 – receptor Mas, a z drugiej strony stanowi kluczowy czynnik dla wejścia wirusa do komórek, sprawia, że

zarówno wzrost, jak i obniżenie poziomu jego ekspresji w układzie oddechowym może wpływać na rozwój zakażenia i nasilenie przebiegu choroby. Co ciekawe, mimo tego że *loci* genu kodującego ACE2 znajduje się na chromosomie X, u mężczyzn stwierdzono wyższy poziom i szerszą dystrybucję ekspresji ACE2 w porównaniu do kobiet, czym badacze wyjaśniali większy odsetek zakażeń SARS-CoV-2 u mężczyzn [107]. Badania przeprowadzone na większą skalę nie wykazały jednak istotnych różnic w poziomie ekspresji ACE2 w płucach pomiędzy grupami różniącymi się wiekiem (>60 vs <60 r.ż.), płcią i pochodzeniem etnicznym (rasa kaukaska i azjatycka) [7]. Do innych wniosków prowadzą wyniki badań Xie i wsp., którzy ustalili, że poziom ekspresji ACE2 w płucach szczurów zmniejsza się wraz z ich wiekiem i spadek ten jest znaczniejszy u samców, co w połączeniu z działaniem SARS-CoV-2 zmniejszającym ekspresję tego receptora może tłumaczyć wynikający z niedostatku czynnika ochronnego cięższy przebieg zakażenia u osób starszych [99]. Bardziej wrażliwi na rozwój zakażenia SARS-CoV-2 mogą być również palacze, jako że w ich płucach ekspresja ACE2 jest bardziej nasilona, aniżeli u osób niepalących [6, 7]. Rzeczywiście, w płucach ludzi i gryzoni zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji ACE2 w stopniu skorelowanym z liczbą wypalanych papierosów. Ekspresję ACE2 wykazano ponadto w różnych typach komórek wyściełających drogi oddechowe, między innymi w komórkach kubkowych, oskrzelikowych komórkach egzokrynnych i pneumocytach typu II. Długotrwała ekspozycja na dym papierosowy wyzwała reakcję ochronną polegającą na ekspansji wydzielających śluz komórek kubkowych i wzroście ekspresji ACE2 [79]. Fu i wsp., którzy wykryli wysoki poziom ACE2 w jądrach, układzie sercowo-naczyniowym oraz układzie pokarmowym, dostrzegli jeszcze jeden aspekt swoistej dla narządów dystrybucji ekspresji tego białka. Sugerują oni, że SARS-CoV-2 może nie tylko atakować płuca, ale także inne narządy, szczególnie jądra, co może prowadzić do ich uszkodzenia i zaburzenia rozwoju płciowego chłopców i bezpłodności dorosłych [27].

6. Procesowanie proteolityczne białka S

Kluczowym dla tropizmu komórkowego, narządowego, czy gatunkowego jest, poza rozpoznaniem receptora na powierzchni komórki docelowej, proteolityczne procesowanie białka S prowadzące do fuzji osłonki wirusa z błoną komórkową/endosomu. Jak wspomniano w części Charakterystyka koronawirusów, białko S składa się z dwóch funkcjonalnych podjednostek: S1 odpowiedzialnej za wiązanie z receptorem komórkowym oraz S2 zapewniającej fuzję błon wirusa i komórki umożliwiającej wnikięcie cząstki wirusa do

cytoplazmy. Białko S zawiera dwa miejsca cięcia. Pierwsze zlokalizowane jest pomiędzy podjednostkami S1 i S2 (miejsce S1/S2), natomiast drugie poprzedza pierwszy peptyd fuzyjny (miejsce S2') w podjednostce S2. Tak więc wyposażenie komórki w swoiście działające proteazy warunkuje tropizm koronawirusów [42]. W proteolizie białka S SARS-CoV i SARS-CoV-2 uczestniczy proteaza TMPRSS2, a jej inhibitory blokują wejście tych wirusów do komórki [39].

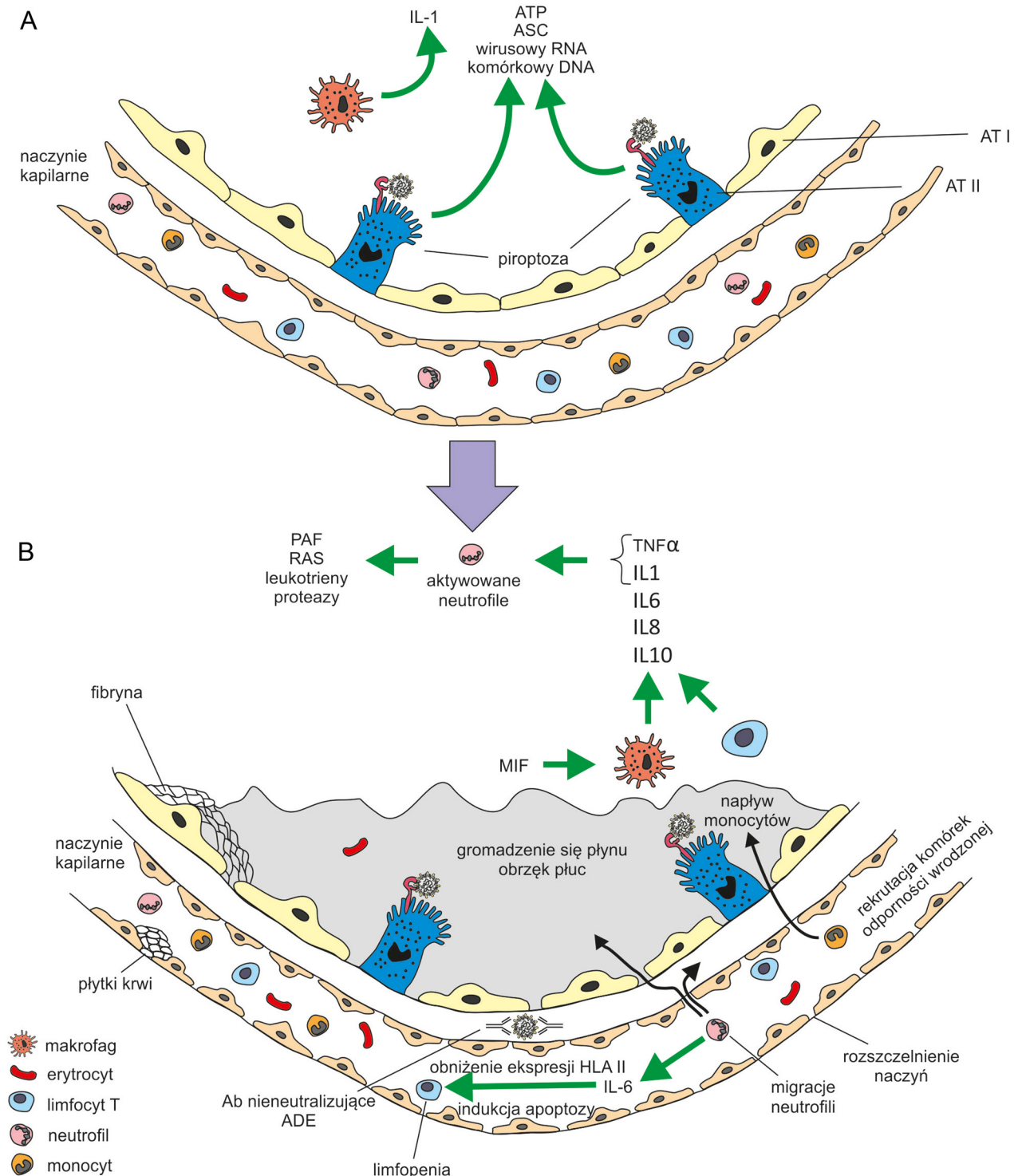
Badania immunohistochemiczne pozwoliły wykryć ekspresję TMPRSS2 przede wszystkim na nabłonku oskrzeli, a także na pneumocytach typu II i makrofagach płucnych, nie ujawniły natomiast obecności tej proteazy na pneumocytach typu I [32, 81]. Ciekawe spostrzeżenie dotyczy obecności polimorfizmu pojedynczego nukleotydu związanej z wyższym poziomem ekspresji TMPRSS2 i przez to zwiększającej wrażliwość pacjentów na rozwój zakażenia wirusem grypy typu A. TMPRSS2 jest bowiem kluczowym czynnikiem aktywującym hemaglutyninę tego wirusa wymaganą do fuzji jego osłonki z błoną komórkową [13]. Poziom ekspresji TMPRSS2 jest regulowany przez androgeny, co może być związane z różnicami w ciężkości przebiegu zakażenia wirusami zależnymi od tej proteazy obserwowanymi u kobiet i mężczyzn [81]. Ekspresja TMPRSS2 w pneumocytach typu II jest dodatnio skorelowana z obecnością androgenów i receptorów androgenów w tych komórkach i może wyjaśniać związane z płcią różnice w przebiegu zakażenia SARS-CoV-2 [88].

7. Mechanizmy immunopatogenezy indukowanej zakażeniem SARS-CoV-2

Znaczna część pacjentów z COVID-19 we wczesnym etapie zakażenia wykazuje objawy o niewielkim lub średnim nasileniu, natomiast w późniejszym etapie u części chorych może wystąpić gwałtowny rozwój choroby z zespołem ostrej niewydolności oddechowej i niewydolnością wielonarządową. Poznanie zmian patologicznych w płucach prowadzących do śmierci oraz wyjaśnienie mechanizmów leżących u podstaw zaburzeń w działaniu układu odpornościowego chorych z COVID-19 jest istotny dla opracowania skutecznych strategii terapeutycznych. Proponuje się 4 potencjalne mechanizmy wywołanych przez SARS-CoV-2 zmian w funkcjonowaniu układu immunologicznego (ryc. 3).

7.1. Burza cytokinowa

Rozpoznanie zakażenia przez układ odpornościowy wrodzony prowadzi do wydzielania kluczowych czynników, jakimi są interferony typu I/III. SARS-CoV-2 angażuje receptory rozpoznające wzorce (PRR – pattern recognition receptors) należące do dwóch rodzin:



Ryc. 3. Schemat zjawisk immunopatologicznych w pęcherzyku płucnym podczas zakażenia SARS-CoV-2

Zakażone pneumocyty są źródłem wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniem komórek takich jak ATP, ASC – apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (caspase activation and recruitment domain), wirusowy RNA, komórkowy DNA rozpoznawanych przez komórki nabłonkowe i makrofagi płucne wydzielające cytokiny prozapalne i chemokiny odpowiedzialne za rekrutację monocytów, makrofagów i limfocytów T w miejsce infekcji, co prowadzi do dalszego rozwoju reakcji zapalnej. Nadprodukcja i nadmierne wydzielanie cytokin prozapalnych prowadzi do akumulacji komórek układu odpornościowego i ostatecznie do zniszczenia tkanki płuc. Dodatkowo przeciwciała nieneutralizujące mogą przyczynić się do procesu wzmacniania zależnego od przeciwciał (ADE) prowadzącego do nasilenia uszkodzenia płuc.

receptory RIG-I-podobne (RLR – RIG-I-like receptors) oraz receptory Toll-podobne (TLR – toll-like receptors) rozpoznające dwuniciowy i jednociowy RNA wirusów i inicjujące szlaki sygnałowe prowadzące do wydzielania

cytokin prozapalnych (m.in. IFN typu I, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-18). W wyniku uwolnienia cytokin dochodzi do przekazania sygnału do komórek śródbłonna, które umożliwiają przepływ chemokin do krwi i rekruta-

cję komórek efektorowych odporności wrodzonej do miejsca zakażenia. Zaangażowane komórki NK, monocyty i neutrofile oddziałują ze śródbłonkiem, opuszczają krwioobieg i migrują do miejsca zakażenia, gdzie uaktywniane są mechanizmy prowadzące do zabicia zakażonych komórek oraz wytworzenia antygenowo-swoistej odpowiedzi odporności nabytej. Wydzielane w odpowiednim czasie i właściwym miejscu interferony uznawane są za najefektywniej działający czynnik ograniczający zakażenie CoVs [9]. Śródbłonowe białka indukowane przez IFN (IFITM – interferon-inducible transmembrane proteins) mogą zaburzać proces fuzji, w którym uczestniczy białko S [41]. W późniejszej fazie zakażenia IFN typu I może stać się czynnikiem patogennym, np. poprzez zwiększanie ekspresji ACE2 na powierzchni komórek nabłonka oddechowego [108] lub organizację odpowiedzi zapalnej odpowiedzialnej za zmiany patologiczne o podłożu immunologicznym [47]. SARS-CoV-2, podobnie jak inne koronawirusy, wykształcił różne mechanizmy hamowania indukcji i przekazywania sygnału szlaku IFN. Potwierdzeniem tego zjawiska jest występowanie znacznego zaburzenia szlaku IFN u pacjentów z ciężkim przebiegiem COVID-19 przy jednoczesnej aktywności procesów prozapalnych prowadzących do zmian patologicznych (wydzielanie cytokin prozapalnych). SARS-CoV-2 szczególnie wydajnie indukuje wydzielanie IL-6 i IL-8, np. poprzez hamowanie przy udziale nsp10 endogennego represora NF-κB (NKRF – NF-κB-repressing factor) [62].

Gwałtowny wzrost syntezy cytokin jest zjawiskiem udokumentowanym w ciężkim przebiegu COVID-19 [40; 63]. U pacjentów z najcięższym przebiegiem COVID-19 synteza cytokin takich jak IL-1β, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, G-CSF (granulocyte colony stimulating factor; czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów), GM-CSF (granulocyte/macrophage colony stimulating factor; czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów), IP-10 (IFN-γ-inducible protein 10; białko indukowane przez interferon gamma), MCP1 (monocyte chemoattractant protein-1; białko chemotaktyczne dla monocytów), MIP-1α (macrophage inflammatory protein-1 alpha; białko zapalne makrofagów), IFN-γ, TNF-α osiąga ekstremalnie wysoki poziom, co jest określone jako „burza cytokinowa”. U chorych z łagodniejszą formą zakażenia wzrost poziomu wydzielania cytokin przebiega na zdecydowanie niższym poziomie [40].

7.2. Wyniszczenie i zmniejszenie liczebności limfocytów

Do dysfunkcji i redukcji liczby limfocytów doprowadzić może kilka mechanizmów. Wykazano, że SARS-CoV-2 może zakażać limfocyty i makrofagi dzięki ekspresji receptora ACE2 mającej miejsce szczególnie

na limfocytach T. Zdolność do zakażenia zarówno limfocytów T jak i makrofagów jest kluczowym mechanizmem patogenezы SARS-CoV [73]. Wykazano, że SARS-CoV-2 zakaża limfocyty pomocnicze Th CD4⁺, ale nie cytotoksyczne Tc CD8⁺ i jest wykrywany w limfocytach Th we krwi oraz w popłuczynach pęcherzykowo-oskrzelowych. W procesie wejścia wirusa do Th CD4⁺ istotną rolę odgrywa oddziaływanie białka S z cząsteczką CD4 oraz wymagany jest udział ACE2 i TMPRSS2. W zakażonych przez SARS-CoV-2 limfocytach wzrasta poziom syntezy IL-10 w stopniu skorelowanym z nasileniem choroby. Zjawisko to może wyjaśniać słabą odpowiedź ze strony układu odporności wrodzonej, gdyż IL-10 jest czynnikiem hamującym ekspresję cytokin prozapalnych [17]. Również Diao i wsp. wnioskuje, iż w obniżeniu liczby i osłabieniu aktywności limfocytów Th uczestniczy TNF-α, IL-10 i IL-6 [21]. Ponadto szczególnie ważne wydaje się być oddziaływanie IL-6 poprzez obniżenie ekspresji HLA klasy II na monocytach CD14⁺ oraz limfocytach B [30, 96]. Spadek liczby cząsteczek HLA u pacjentów z COVID-19 może powodować zaburzenie zdolności do prawidłowej odpowiedzi limfocytów Th ze względu na ograniczenie możliwości prezentacji antygeny przez TCR. W takich warunkach limfocyty Th ulegają apoptozie. Masowe niszczenie limfocytów związane z wysokim poziomem ekspresji IL-6 oraz indukcję apoptozy zależnej od Fas odnotowano w czasie autopsji pacjentów z COVID-19 [25]. W badaniach sekcyjnych narządów chorych zmarłych z powodu ciężkiego przebiegu COVID-19 ujawniono bezpośrednie niszczenie narządów limfatycznych, atrofię śledziony i nekrozę węzłów chłonnych, wywołwane przez SARS-CoV-2 prowadzące do limfopenii [8, 59]. Innym jeszcze mechanizmem wyjaśniającym zjawisko limfopenii u chorych z ciężką postacią COVID-19 jest wzrost poziomu kwasu mlekowego we krwi, co może hamować proliferację aktywowanych limfocytów T [83]. Kolejną przyczyną wyczerpania limfocytów T jest ich długotrwała nadmierna aktywacja. W limfocytach Th CD4⁺ i Tc CD8⁺ izolowanych z krwi pacjentów z ciężkim przebiegiem COVID-19 wykryto wzrost poziomu PD-1 (programmed cell death protein 1), TIM-3 (mucin domain-containing protein 3) i ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif), markerów świadczących o ich wyczerpaniu, przy równocześnie obniżonym poziomie ekspresji stimulatora CD28 [18].

7.3. Wzrost liczebności neutrofilii

U pacjentów z COVID-19 stwierdza się podwyższony poziom neutrofilii [74]. Neutrofile indukowane są przez pojawienie się drobnoustrojów i mogą prowadzić do ich zniszczenia poprzez tworzenie aktywnych form tlenu, degranulację, wydzielanie czynników

przeciwdrobnoustrojowych, ale również poprzez formowanie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs – neutrophil extracellular traps). Zaburzenie poziomu czynników wydzielanych przez neutrofile może prowadzić do uszkodzenia tkanek, co znalazło potwierdzenie w badaniach, w których w surowicy chorych z ciężkim przebiegiem zakażenia SARS-CoV-2 wykazano podwyższony poziom DNA pozakomórkowego, mieloperoksydazy-DNA (MPO-DNA – myeloperoxidase-DNA), i cytrulinowanych histonów H3 (Cit-H3 – citrullinated histone H3) będących markerami związanymi z NET [110].

7.4. Wzmocnienie zależne od przeciwciał

Zjawisko zależnego od przeciwciał wzmocnienia zakażenia wirusowego (ADE – antibody-dependent enhancement) jest związane z udziałem wcześniej istniejących przeciwciał nieneutralizujących ułatwiających wejście wirusa do komórki i jego replikację. Udział ADE w patogenezie zakażeń wykazano dla SARS-CoV, który poprzez oddziaływanie receptorów FcR z fragmentami Fc przeciwciał związanych z wirusem może zakażać i zmieniać funkcjonowanie makrofagów prowadząc do hiperstymulacji układu odpornościowego i uszkodzenia płuc [65] oraz MERS-CoV, którego białko S po połączeniu z przeciwciałami ulega przekształceniu ułatwiającemu zakażenie komórek posiadających na powierzchni receptor dla Fc [22, 89].

Powstaje pytanie, czy obecność przeciwciał nieneutralizujących może pogarszać przebieg zakażenia SARS-CoV-2. Wiadomo, że w zakażeniu SARS-CoV powstają przeciwciała przeciwko różnym epitopom białka S działające albo ochronnie, albo wzmacniające zakażenie tym wirusem u makaków. Przeciwciała skierowane przeciwko epitopowi S579-603 silnie pogłębiały uszkodzenie płuc u makaków [91]. U myszy szczepionych czterema różnymi szczepionkami przeciwko SARS-CoV po zakażeniu odnotowano niższy poziom wirusa w porównaniu do kontroli, ale w odróżnieniu od kontroli w płucach zwierząt poddanych przed zakażeniem szczepieniu wykazano obecność zmian histopatologicznych z naciekaniami eozynofili [85].

Dotychczas przeprowadzone badania, obejmujące niewielką grupę pacjentów, nie wykazały nasilenia objawów zakażenia SARS-CoV-2 po zastosowaniu osocza ozdrowieńców [23]. Efektu ADE nie odnotowano także po zastosowaniu inaktywowanych szczepów SARS-CoV-2 użytych do szczepienia myszy, szczurów i zwierząt z rzędu naczelnych [29]. Możliwość udziału przeciwciał w patogenezie COVID-19 pozostaje jednak tematem zasługującym na zwrócenie szczególnej uwagi ze względu na trzy zjawiska obserwowane w przebiegu pandemii SARS-CoV-2. Po pierwsze, występujący najczęściej bezobjawowy przebieg zakażenia u dzieci,

co może być związane z brakiem wcześniejszego kontaktu z koronawirusami i brakiem przeciwciał mogących krzyżowo reagować z SARS-CoV-2. Po drugie, wczesne pojawianie się przeciwciał IgG u części pacjentów, u których serokonwersja IgG występowała przed IgM lub jednocześnie z IgM. Po trzecie dodatnia korelacja między wysokim poziomem przeciwciał, a niezależnym od wieku, płci i występowania innych schorzeń złym rokowaniem przebiegu choroby. Wyjaśnieniem tych obserwacji może być obecność przeciwciał powstałych po wcześniejszym kontakcie z koronawirusami powodującymi przeziębienia i wywołującymi zależne od przeciwciał wzmocnienie przebiegu zakażenia SARS-CoV-2 [66, 106].

8. Podsumowanie

Po raz trzeci w ciągu XXI wieku koronawirusy pokonały barierę międzygatunkową atakując człowieka. Pandemia ta spowodowała paraliż nie tylko systemu opieki zdrowotnej, ale wielu innych dziedzin na całym świecie. Konieczne jest szczegółowe poznanie mechanizmów cyklu replikacyjnego koronawirusów oraz ich interakcji z białkami gospodarza, co może pozwolić na opracowanie skutecznych działań terapeutycznych i prewencyjnych w stosunku do tych do niedawna uważanych za stosunkowo nieszkodliwych wirusów. Z drugiej strony, również ważne jest poznanie czynników osobniczych uczestniczących w replikacji koronawirusów oraz pojawiających się w odpowiedzi na zakażenie, gdyż nawet niewielkie zmiany jakościowe lub ilościowe związane ze zmianą poziomu ich ekspresji mogą okazać się kluczowe dla przebiegu choroby.

Podziękowania

Podziękowania dla dr. n. med. Piotra Kruszyńskiego za pomoc w przygotowaniu rycin.

Praca została sfinansowana ze środków Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach przyznanych w ramach projektu o numerze KNW-1-058/N/9/I.

Piśmiennictwo

1. Belouzard S., Chu V.C., Whittaker G.R.: Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5871–5876 (2009)
2. Beniac D.R., Andonov A., Grudski E., Booth T.F.: Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 751–752 (2006)
3. Bernstein K.E., Khan Z., Giani J.F., Cao D.Y., Bernstein E.A., Shen X.Z.: Angiotensin-converting enzyme in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Nephrol.* **14**, 325–336 (2018)
4. Boonacker E., Van Noorden C.J.: The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur. J. Cell Biol.* **82**, 53–73 (2003)

5. Burkard C., Verheije M.H., Wicht O., van Kasteren S.I., van Kuppeveld F.J., Haagmans B.L., Pelkmans L., Rottier P.J., Bosch B.J., de Haan C.A.: Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. *PLoS Pathog.* **10**, e1004502(2014)
6. Cai G., Bossé Y., Xiao F., Kheradmand F., Amos C.I.: Tobacco Smoking Increases the Lung Gene Expression of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **201**, 1557–1559 (2020)
7. Cai G.: Bulk and single-cell transcriptomics identify tobacco-use disparity in lung gene expression of ACE2, the receptor of 2019-nCoV. *medRxiv*, DOI: 10.1101/2020.02.05.20020107 (2020)
8. Cao X.: COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 269–270 (2020)
9. Channappanavar R., Fehr A.R., Zheng J., Wohlford-Lenane C., Abrahante J.E., Mack M., Sompallae R., McCray P.B. Jr, Meyerholz D.K., Perlman S.: IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes. *J. Clin. Invest.* **129**, 3625–3639 (2019)
10. Chen N., Zhang L. i wsp.: Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, **395**, 507–513 (2020)
11. Chen Y., Liu Q., Guo D.: Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.* **92**, 418–423 (2020)
12. Cheng J., Zhao Y., Xu G., Zhang K., Jia W., Sun Y., Zhao J., Xue J., Hu Y., Zhang G.: The S2 Subunit of QX-type Infectious Bronchitis Coronavirus Spike Protein Is an Essential Determinant of Neurotropism. *Viruses*, **11**, 972 (2019)
13. Cheng Z., Yuen K.Y. i wsp.: Identification of TMPRSS2 as a susceptibility gene for severe 2009 pandemic A(H1N1) influenza and A(H7N9) influenza. *J. Infect. Dis.* **212**, 1214–1221 (2015)
14. Chiu R.W., Lo Y.M. i wsp.: ACE2 gene polymorphisms do not affect outcome of severe acute respiratory syndrome. *Clin. Chem.* **50**, 1683–1686 (2004)
15. Chu H., Yuen K.Y. i wsp.: Comparative Replication and Immune Activation Profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in Human Lungs: An Ex Vivo Study With Implications for the Pathogenesis of COVID-19. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 1400–1409 (2020)
16. Coutard B., Valle C., de Lamballerie X., Canard B., Seidah N.G., Decroly E.: The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* **176**, 104742 (2020)
17. Davanzo G.G., Farias A.S. i wsp.: SARS-CoV-2 Uses CD4 to Infect T Helper Lymphocytes. *medRxiv*, DOI: 10.1101/2020.09.25.20200329 (2020)
18. de Candia P., Prattichizzo F., Garavelli S., Matarese G.: T Cells: Warriors of SARS-CoV-2 Infection. *Trends Immunol.* **42**, 18–30 (2021)
19. de Haan C.A., Rottier P.J.: Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **64**, 165–230 (2005)
20. de Wilde A.H., Snijder E.J., Kikkert M., van Hemert M.J.: Host Factors in Coronavirus Replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **419**, 1–42 (2018)
21. Diao B., Chen Y. i wsp.: Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* **11**, 827 (2020)
22. Du L., Zhou Y. i wsp.: A conformation-dependent neutralizing monoclonal antibody specifically targeting receptor-binding domain in Middle East respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J. Virol.* **88**, 704570–704553 (2014)
23. Duan K., Yang X. i wsp.: Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 9490–9496 (2020)
24. Fehr A.R., Perlman S.: Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol. Biol.* **1282**, 1–23 (2015)
25. Feng Z., Chen Y. i wsp.: The Novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Directly Decimates Human Spleens and Lymph Nodes. *medRxiv*, DOI: 10.1101/2020.03.27.20045427 (2020)
26. Forni D., Cagliani R., Clerici M.: Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends Microbiol.* **25**, 35–48 (2017)
27. Fu J., Zhou B., Zhang L., Balaji K.S., Wei C., Liu X., Chen H., Peng J., Fu J.: Expressions and significances of the angiotensin-converting enzyme 2 gene, the receptor of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Mol. Biol. Rep.* **47**, 4383–4392 (2020)
28. Galloway S.E., Dugan V.G. i wsp.: Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage – United States, December 29, 2020–January 12, 2021. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **70**, 95–99 (2021)
29. Gao Q., Qin C. i wsp.: Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science*, **369**, 77–81 (2020)
30. Giamarellos-Bourboulis E.J., Koutsoukou A. i wsp.: Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host Microbe*, **27**, 992–1000 (2020)
31. Glowacka I., Pöhlmann S. i wsp.: Differential downregulation of ACE2 by the spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus NL63. *J. Virol.* **84**, 1198–1205 (2010)
32. Glowacka I., Pöhlmann S. i wsp.: Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *J. Virol.* **85**, 4122–4134 (2011)
33. Gorbalenya A.E., Enjuanes L., Ziebuhr J., Snijder E.J.: Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res.* **117**, 17–37 (2006)
34. Gralinski L.E., Menachery V.D.: Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*, **12**, 135 (2020)
35. Guan W.J., Zhong N.S. i wsp.: China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1708–1720 (2020)
36. Heald-Sargent T., Gallagher T.: Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses*, **4**, 557–580 (2012)
37. Hindson J.: COVID-19: faecal-oral transmission? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 259 (2020)
38. Hoffmann M., Hofmann-Winkler H., Pöhlmann S.: Priming Time: How Cellular Proteases Arm Coronavirus Spike Proteins (w) Activation of Viruses by Host Proteases, red. Böttcher-Friebertshäuser E., Garten W., Klenk H.D., Springer International Publishing AG, part of Springer Nature, 2018, s. 71–98
39. Hoffmann M., Pöhlmann S. i wsp.: SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, **181**, 271–280 (2020)
40. Huang C., Cao B. i wsp.: Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, **395**, 497–506 (2020)
41. Huang I.C., Farzan M. i wsp.: Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLoS Pathog.* **7**, e1001258 (2011)
42. Hulswit R.J.G., de Haan C.A.M., Bosch B.-J.: Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. *Adv. Virus Res.* **96**, 29–57 (2016)
43. Hussain M., Jabeen N., Raza F., Shabbir S., Baig A.A., Amanullah A., Aziz B.: Structural variations in human ACE2 may influence its binding with SARS-CoV-2 spike protein. *J. Med. Virol.* **92**, 1580–1586 (2020)
44. Imai Y., Kuba K., Ohto-Nakanishi T., Penninger J.M.: Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in disease pathogenesis. *Circ. J.* **74**, 405–410 (2010)

45. Imai Y., Penninger J.M. i wsp.: Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*, **436**, 112–116 (2005)
46. International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://talk.ictvonline.org> (17.02.2021)
47. Israelow B., Iwasaki A. i wsp.: Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling. *J. Exp. Med.* **217**, e20201241 (2020)
48. Itoyama S., Sasazuki T. i wsp.: Identification of an alternative 5'-untranslated exon and new polymorphisms of angiotensin-converting enzyme 2 gene: lack of association with SARS in the Vietnamese population. *Am. J. Med. Genet. A*, **136**, 52–57 (2005)
49. Karczewski K.J., MacArthur D.G. i wsp.: The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*, **581**, 434–443 (2020)
50. Kaur S.P., Gupta V.: COVID-19 Vaccine: A comprehensive status report. *Virus Res.* **288**, 198114 (2020)
51. Khalaf K., Papp N., Chou J.T., Hana D., Mackiewicz A., Kaczmarek M.: SARS-CoV-2: Pathogenesis, and Advancements in Diagnostics and Treatment. *Front. Immunol.* **11**, 570927 (2020)
52. Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Prokscha A., Naim H.Y., Müller M.A., Drosten C., Pöhlmann S., Hoffmann M.: Polymorphisms in dipeptidyl peptidase 4 reduce host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 155–168 (2020)
53. Korber B., Montefiori D.C. i wsp.: Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*, **182**, 812–827 (2020)
54. Krammer F.: SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*, **586**, 516–527 (2020)
55. Kuba K., Imai Y., Ohto-Nakanishi T., Penninger J.M.: Trilogy of ACE2: a peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters. *Pharmacol. Ther.* **128**, 119–128 (2010)
56. Kuba K., Penninger J.M. i wsp.: A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat. Med.* **11**, 875–879 (2005)
57. Lauer S.A., Grantz K.H., Bi Q., Jones F.K., Zheng Q., Meredith H.R., Azman A.S., Reich N.G., Lessler J.: The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann. Intern. Med.* **172**, 577–582 (2020)
58. Leung K., Shum M.H., Leung G.M., Lam T.T., Wu J.T.: Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020. *Euro. Surveill.* **26**, 2002106 (2021)
59. Li D., Chen Y., Liu H., Jia Y., Li F., Wang W., Wu J., Wan Z., Cao Y., Zeng R.: Immune dysfunction leads to mortality and organ injury in patients with COVID-19 in China: insights from ERS-COVID-19 study. *Signal Transduct. Target Ther.* **5**, 62 (2020)
60. Li F.: Structural analysis of major species barriers between humans and palm civets for severe acute respiratory syndrome coronavirus infections. *J. Virol.* **82**, 6984–6991 (2008)
61. Li G., Fan Y., Lai Y., Han T., Li Z., Zhou P., Pan P., Wang W., Hu D., Liu X., Zhang Q., Wu J.: Coronavirus infections and immune responses. *J. Med. Virol.* **92**, 424–432 (2020)
62. Li J., Liang Q. i wsp.: Virus-Host Interactome and Proteomic Survey Reveal Potential Virulence Factors Influencing SARS-CoV-2 Pathogenesis. *Med.* **2**, 99–112 (2021)
63. Li X., Zhang W. i wsp.: Immune characteristics distinguish patients with severe disease associated with SARS-CoV-2. *Immunol Res.* **68**, 398–404 (2020)
64. Lim Y.X., Ng Y.L., Tam J.P., Liu D.X.: Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions. *Diseases*, **4**, 26 (2016)
65. Liu L., Chen Z. i wsp.: Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. *JCI Insight*, **4**, e123158 (2019)
66. Long Q.X., Huang A.L. i wsp.: Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 845–848 (2020)
67. Lu G., Gao G.F. i wsp.: Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26. *Nature*, **500**, 227–231 (2013)
68. Nal B.: Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. *J. Gen. Virol.* **86**, 1423–1434 (2005)
69. Narayanan K., Ramirez S.I., Lokugamage K.G., Makino S.: Coronavirus nonstructural protein 1: Common and distinct functions in the regulation of host and viral gene expression. *Virus Res.* **202**, 89–100 (2015)
70. Neuman B.W., Buchmeier M.J. i wsp.: A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J. Struct. Biol.* **174**, 11–22 (2011)
71. Neuman B.W., Buchmeier M.J.: Supramolecular Architecture of the Coronavirus Particle. *Adv. Virus Res.* **96**, 1–27 (2016)
72. Park J.E., Li K., Barlan A., Fehr A.R., Perlman S., McCray P.B. Jr, Gallagher T.: Proteolytic processing of Middle East respiratory syndrome coronavirus spikes expands virus tropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 12262–12267 (2016)
73. Perlman S., Dandekar A.A.: Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 917–927 (2005)
74. Qin C., Tian D.S. i wsp.: Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 62–768 (2020)
75. Raj V.S., Haagmans B.L. i wsp.: Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*, **495**, 251–254 (2013)
76. Samad A., Ahammad F., Nain Z., Alam R., Imon R.R., Hasan M., Rahman M.S.: Designing a multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2: an immunoinformatics approach. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1–17 (2020)
77. Sawicki S.G., Sawicki D.L., Siddell S.G.: A contemporary view of coronavirus transcription. *J. Virol.* **81**, 20–29 (2007)
78. Seys L.J.M., Widagdo W., Verhamme F.M., Kleinjan A., Janssens W., Joos G.F., Bracke K.R., Haagmans B.L., Brusselle G.G.: DPP4, the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Receptor, is Upregulated in Lungs of Smokers and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. *Clin. Infect. Dis.* **66**, 45–53 (2018)
79. Smith J.C., Sausville E.L., Girish V., Yuan M.L., Vasudevan A., John K.M., Sheltzer J.M.: Cigarette Smoke Exposure and Inflammatory Signaling Increase the Expression of the SARS-CoV-2 Receptor ACE2 in the Respiratory Tract. *Dev. Cell*, **53**, 514–529 (2020)
80. Snijder E.J., Decroly E., Ziebuhr J.: The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. *Adv. Virus Res.* **96**, 59–126 (2016)
81. Stopsack K.H., Mucci L.A., Antonarakis E.S., Nelson P.S., Kantoff P.W.: TMPRSS2 and COVID-19: Serendipity or Opportunity for Intervention? *Cancer Discov.* **10**, 779–782 (2020)
82. Su S., Wong G., Shi W.: Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* **24**, 490–502 (2016)
83. Tan L., Wang Q., Zhang D., Ding J., Huang Q., Tang Y.Q., Wang Q., Miao H.: Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct. Target Ther.* **5**, 33 (2020)
84. Terada Y., Matsui N., Noguchi K., Kuwata R., Shimoda H., Soma T., Mochizuki M., Maeda K.: Emergence of pathogenic

- coronaviruses in cats by homologous recombination between feline and canine coronaviruses. *PLoS One*, **9**, e106534 (2014)
85. Tseng C.T., Sbrana E., Iwata-Yoshikawa N., Newman P.C., Garron T., Atmar R.L., Peters C.J., Couch R.B.: Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus. *PLoS One*, **7**, e35421 (2012)
 86. Volz E., Ferguson N.M. i wsp.: Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in England: Insights from linking epidemiological and genetic data. *medRxiv*, 2020.12.30, 20249034
 87. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D.: Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, **181**, 281–292 (2020)
 88. Wambier C.G., Goren A., Vaño-Galván S., Ramos P.M., Ossimetha A., Nau G., Herrera S., McCoy J.: Androgen sensitivity gateway to COVID-19 disease severity. *Drug Dev. Res.* **81**, 771–776 (2020)
 89. Wan Y., Li F. i wsp.: Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry. *J. Virol.* **94**, e02015–19 (2020)
 90. Wang N., Wang X. i wsp.: Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Res.* **23**, 986–993 (2013)
 91. Wang Q., Liu G. i wsp.: Immunodominant SARS Coronavirus Epitopes in Humans Elicited both Enhancing and Neutralizing Effects on Infection in Non-human Primates. *ACS Infect. Dis.* **2**, 361–376 (2016)
 92. WHO. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). November, 2019, <http://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/> (17.02.2021)
 93. WHO. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. Dec 31, 2003, https://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/ (17.02.2021)
 94. Widagdo W., Haagmans B. i wsp.: Differential Expression of the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Receptor in the Upper Respiratory Tracts of Humans and Dromedary Camels. *J. Virol.* **90**, 4838–4842 (2016)
 95. Widagdo W., Sooksawasdi Na Ayudhya S., Hundie G.B., Haagmans B.L.: Host Determinants of MERS-CoV Transmission and Pathogenesis. *Viruses*, **11**, 280 (2019)
 96. Wilk A.J., Blish C.A. i wsp.: A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 1070–1076 (2020)
 97. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) Weekly Epidemiological Update. <https://covid19.who.int/> (17.02.2021)
 98. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.L., Abiona O., Graham B.S., McLellan J.S.: Cryo-EM Structure of the 2019-nCoV Spike in the Prefusion Conformation. *Science*, **367**, 1260–1263 (2020)
 99. Xie X., Chen J., Wang X., Zhang F., Liu Y.: Age- and gender-related difference of ACE2 expression in rat lung. *Life Sci.* **78**, 2166–2171 (2006)
 100. Xu Z., Wang F.S. i wsp.: Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* **8**, 420–422 (2020)
 101. Yang Y., Liu C., Du L., Jiang S., Shi Z., Baric R.S., Li F.: Two Mutations Were Critical for Bat-to-Human Transmission of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J. Virol.* **89**, 9119–9123 (2015)
 102. Yoshimoto F.K.: The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. *Protein J.* **39**, 198–216 (2020)
 103. Zhang B., Zhou X., Qiu Y., Song Y., Feng F., Feng J., Song Q., Jia Q., Wang J.: Clinical characteristics of 82 cases of death from COVID-19. *PLoS One*, **15**, e0235458 (2020)
 104. Zhang L., Choe H. i wsp.: SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *Nat. Commun.* **11**, 6013 (2020)
 105. Zhang L., Jackson C.B., Mou H., Ojha A., Rangarajan E.S., Izard T., Farzan M., Choe H. The D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces S1 shedding and increases infectivity. *bioRxiv* [Preprint], 2020.06.12, 148726
 106. Zhao J., Zhang Z. i wsp.: Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 2027–2034 (2020)
 107. Zhao Y., Zhao Z., Wang Y., Zhou Y., Ma Y., Zuo W.: Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **202**, 756–759 (2020)
 108. Ziegler C.G.K., Ordovas-Montanes J. i wsp.: SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell*, **181**, 1016–1035 (2020)
 109. Zumla A., Hui D.S., Perlman S.: Middle East respiratory syndrome. *Lancet*, **3**, 60454–60458 (2015)
 110. Zuo Y., Knight J.S. i wsp.: Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight.* **5**, e138999 (2020)