

Az új típusú koronavírus nanobiofizikája

Kiss Bálint, Kis Zoltán, Pályi Bernadett, Kellermayer Miklós

NANOBIOPHYSICS OF NEW TYPE CORONAVIRUS

A Covid-19-pandémia végigsöpört az egész világon, soha nem látott megterhelést okozva egészségügyi rendszereinkben, és kihívások elé állította a biomedicinális kutatást, hogy a járványra mielőbb megfelelő válaszokat adjunk. A modern „egy partikulum” biofizikai módszerek különleges bepillantást engednek a járvány okozója, a SARS-CoV-2 tulajdonságaiba. A vírus tüskefehérjékből álló koronaszerű réteget hordoz a felületén, melyeknek fontos szerepet tulajdonítunk a fertőzés folyamatában. Atomi erőmikroszkóp segítségével sikerült feltárunk a natív virionok topográfiai szerkezetét és mechanikai tulajdonságait. A tüskefehérjék, rugalmasságuk és mozgékonyaságuk révén, dinamikus felületet alkotnak. A virionok meglepően ellenállóak a mechanikai összenyomással szemben, és szerkezetük képes helyreállni a mechanikai behatást követően. A vírus globális szerkezete ellenáll a hőhatásnak, de a hőmérséklet fokozásával a tüskefehérjék disszociálódnak a felületről. A SARS-CoV-2 mechanikai és dinamikai sajátosságai hozzájárulnak fertőző képességéhez. Az alkalmazott „egy partikulum” biofizikai módszerek fontos szerepet játszhatnak az egyre gyakoribbá váló vírusfertőzések megértésében és legyőzésében.

The Covid-19 pandemic has swept across the world, causing a never seen burden on our health care systems and challenging biomedical research to give appropriate answers to the epidemic. Modern, one-particle biophysical methods ensure special insight to the characteristics of the cause of the epidemic, the SARS-CoV-2. The virus carries a crown-like layer of spike proteins, which plays a fundamental role in the process of infection. The topography structure and mechanical characteristics of native virions have been determined by atomic force microscopy. Spike proteins form a dynamic surface due to their flexibility and motility. Virions are surprisingly resistant to mechanical compression, and their structure is able to recover after mechanical perturbation. The global structure of the virus is resistant to heat effect, but spike proteins dissociate from the surface with higher temperatures. The mechanical and dynamic characteristics of SARS-CoV-2 contribute to its virulence. The applied one-particle biophysical methods play an important role in understanding and fighting with the more common virus infections.

Covid-19, atomi erőmikroszkópia, nanoindentáció, erőspektroszkópia, mechanikai ellenálló képesség, hőstabilitás

COVID-19, atomic force microscopy, nanoindentation, force spectroscopy, mechanical resilience, thermal stability

KISS Bálint PhD: Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet/Department of Biophysics and Radiation Biology, Semmelweis University, Budapest
 KIS Zoltán: Nemzeti Népegészségügyi Központ, Nemzeti Biobiztonsági Laboratórium, Semmelweis Egyetem, Orvosi Mikrobiológiai Intézet/National Biosafety Laboratory, National Public Health Center, Department of Medical Microbiology, Semmelweis University, Budapest
 PÁLYI Bernadett: Nemzeti Népegészségügyi Központ, Nemzeti Biobiztonsági Laboratórium/National Biosafety Laboratory, National Public Health Center, Budapest
 prof. dr. KELLERMAYER Miklós (levelező szerző/correspondent): Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Magyar Molekuláris Medicina Kiválósági Központ (HCEMM)/Department of Biophysics and Radiation Biology, Semmelweis University, Hungarian Centre of Excellence in Molecular Medicine, European Molecular Biology Laboratories Teaming Consortium; H-1094 Budapest, Tűzoltó u. 37–47.
 E-mail: kellermayer.miklos@med.semmelweis-univ.hu

Érkezett: 2022. január 20. Elfogadva: 2022. január 22.

<https://doi.org/10.33616/lam.32.013>

Az új típusú koronavírus (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2), amely a Covid-19-világjárvány okozója (1, 2), egyszálú RNS-t tartalmazó burkos vírus, felületén koronaszerű tüskefehérjékkel, melyeknek fontos szerepet tulajdonítunk a fertőzés folyamatában (3–7). A tüskefehérjék szerkezetéről a közelmúltban több tanulmány is született, fehérjekristályokon (5, 8–10), vagy fixált és fagyasztott vírusrészecskéken történt mérésekkel (11–13). Ezek alapján felmerült a tüskefehérjék szárának rugalmassága (11, 12). A nagy felbontású krio-elektron-tomográfiás megfigyelések arra utalnak, hogy a vírus belsejében elhelyezkedő ribonukleoprotein (RNP) kosárszerű egységekbe rendeződhet (13). Mindazonáltal a natív SARS-CoV-2 felületi dinamikája és mechanikai tulajdonságai távolról sem ismertek. Vizsgálatainkban atomi erőmikroszkópia (AFM) és molekuláris erőspektroszkópia (14–16) segítségével vizsgáltuk natív, ellenanyaggal működésbe hozott felületen immobilizált egyedi SARS-CoV-2-virionok topográfiai szerkezetét és nanomechanikai tulajdonságait. Eredményeink arra utalnak, hogy a SARS-CoV-2 tüskefehérjei rendkívül dinamikusak, a virion meglepően lágy és egyúttal mechanikailag és termikusan is ellenálló.

Anyag és módszer

Minta-előkészítés

A SARS-CoV-2-vírusmintát egy igazolt magyarországi Covid-19-beteg otolaringeális váladékából izoláltuk, VeroE6 sejtekben történő kétszeri passzálassal. Az inokulációt követő negyedik napon a vírust tartalmazó közeget dekantáltuk, majd a makroszkopikus törmelékot centrifugálással ($3000 \times g$) távolítottuk el. A vírusmintát ultracentrifugálással ($70,000 \times g$, 1,5 óra, 4°C) koncentráltuk. A pelletet szérumentes, alacsony fehérjetartalmú közegben szuszpendáltuk (VP-SFM, Gibco, ThermoFisher Scientific). A vírus elkülönítésének minden lépése BSL-3 biztonsági fokozatú laboratóriumban történt.

Atomik erőmikroszkópia

A vírusmintát polilizinnel, glutáraldehiddel és anti-tüskefehérjével (#abx376478, Abbexa Ltd., Cambridge, UK) működésbe hozott csillámfelületre vittük fel, majd az AFM (Cypher ES, AsylumResearch, Santa Barbara, CA, USA) zárt pásztázó egységébe helyeztük, BSL-3 laborkörnyelmények között. A minta felületéről szilícium-

nitrid rugólapkával (BL-AC40TS, Olympus Corporation, Japán), rezonáns üzemmódú pásztázással (15, 17), illetve gyors erőterképező módszerrel (18) készítettünk képeket. A vírusok hőkezelésére a tárgyasztal hőmérsékletét a kívánt értékre állítottuk (19). Erőmérésekhez az AFM-rugólapkát termikus módszerrel állítottuk be (20).

Az adatok elemzése

A vírusokról alkotott képeket az AFM-készülék vezérlő programja segítségével helyesbítettük és elemeztük (AR16, IgorPro 6.37, Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA), a részecskeanalízis módszerével.

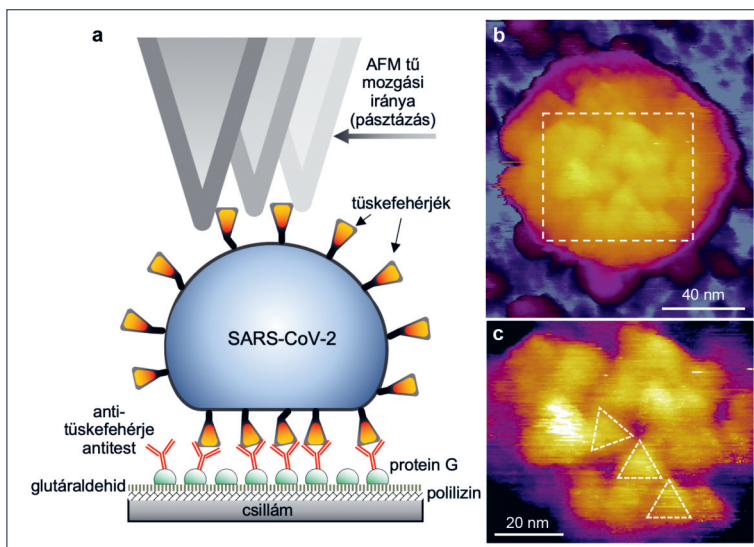
Eredmények és megbeszélés

A SARS-CoV-2-vírusrészecskék topográfiai szerkezetét atomi erőmikroszkóppal (AFM) vizsgáltuk (1. ábra). Glutáraldehiddel fixált virionok egyenetlen, dudoros felületet mutattak (1b ábra). A vírusok átlagos centrális magassága, amely a virion átmérőjével korrelál, 62 nm -nek ($\pm 8 \text{ nm}$, SD) adódott. Ez a magasság kisebb, mint a krio-elektronmikroszkópos mérésekben tapasztaltak (11–13), ami arra utal, hogy a vírusok kiterülnek a felületre. A dudoros felület kitérkedéseit a SARS-CoV-2 tüskefehérjével azonosítottuk (S-fehérje-trimer, 1b, c ábra) a korábbi topográfiai mérések (21, 22), és a nemrégiben megjelent krio-elektronmikroszkópos eredmények (11, 12) alapján. Nagy felbontású (5 \AA pixelméret) AFM-képeken a tüskefehérjék jellegzetes háromszögletű geometriája is azonosítható volt (1c ábra). Az S-fehérje-trimer pozicionális, flexurális és rotációs rendezetlenséget mutattak. Átlagos magasságuk 13 nm -nek ($\pm 5 \text{ nm}$, SD) adódott. A közöttük mért átlagos szomszéd-szomszéd távolság ($21 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm}$, SD) és a viriongeometria alapján, továbbá feltételezve, hogy az S-fehérje-trimer egyenletesen oszlanak el a vírus felületén, kiszámítható az egyetlen SARS-CoV-2-virion felületét borító tüskék átlagos száma, ami esetünkben 61-nek adódott. Ez a szám meghaladja a krio-elektronmikroszkópos mérések alapján számított értékeket (24, 26), és arra utal, hogy a tüskefehérjeszám változókéony, és ezt a számot a vírus biológiai érése során lezajló molekuláris folyamatok határozzák meg (23). A méréseinkben tapasztalt flexurális rendezetlenség alátámasztja a krio-elektronmikroszkópos megfigyeléseket (11–13), és a tüskefehérjék rugalmas természetére utal. Az elhelyezkedési és rotációs rendezetlenség az

S-fehérje-trimer vírusburokban való mobilitására utal.

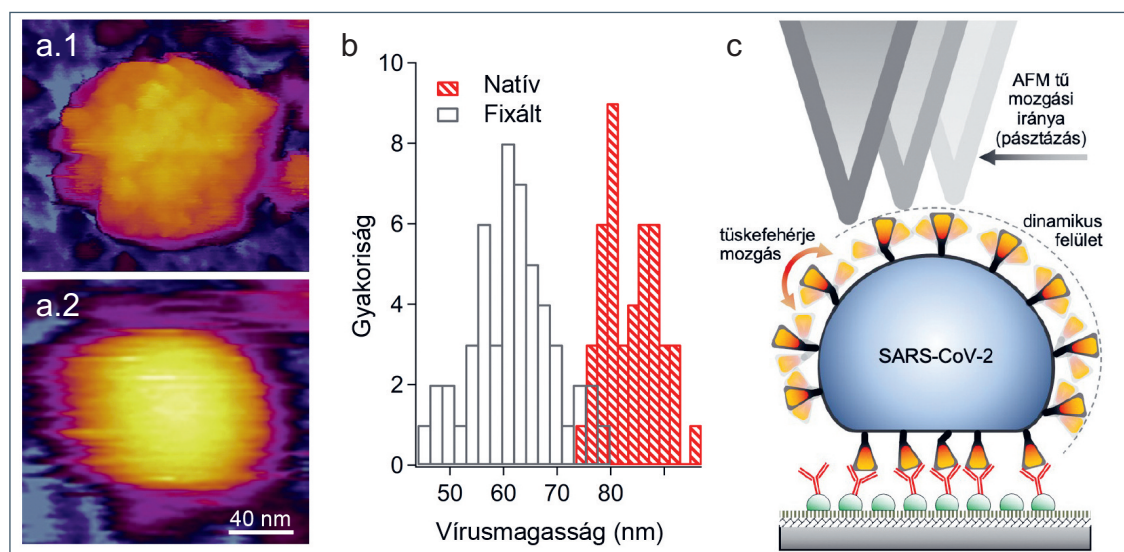
Annak érdekében, hogy a kémiai fixálás határait elkerüljük és feltárjuk a SARS-CoV-2-virionok felületi dinamikáját, az AFM-méréseket natív, fixálatlan vírusokon végeztük (2. ábra). Meglepetésünkre a virionok felületén nem látunk dudorokat és kitüremkedéseket, a felület teljesen sima volt (2a.1 ábra). A natív vírusok átlagos centrális magassága 83 nm-nek (± 7 nm, SD) bizonyult, ami szignifikánsan nagyobb, mint a fixált virionoké (2b ábra). A felület elmosódott megjelenését és a méret látszólagos növekedését mintavételezési problémával magyarázzuk, miszerint a tüskefehérjék mozgási sebessége meghaladja az AFM-tű pásztázó mozgását. Ezáltal a natív virionon egy látszólag megnövelt dinamikus felület jelentkezik (2c ábra). A tüskefehérjék mobilitásának hátterében a receptorkötő domén (RBD-) trimerek gyors diffúziós mozgása állhat. Feltételezzük, hogy a tüskefehérjék dinamikája hozzájárul a receptorkereséshez a megfertőzött sejt felületén. Ez azt is megmagyarázza, hogy a tüskék relatíve alacsony felületi sűrűsége ellenére (~60 SARS-CoV-2 vs. ~350 influenza A) (24) a SARS-CoV-2 legalább annyira fertőzőképes, mint az influenzavírus (25).

A SARS-CoV-2-virionok mechanikai tulajdonságait nanoindentációval jellemeztük (3. ábra) úgy, hogy az AFM-tűvel felülről benyomtuk a vírust, és közben a mechanikai erőt a vertikális távolság függvényében regisztráltuk. Meglepetésünkre, a többszöri (akár 100 egymást

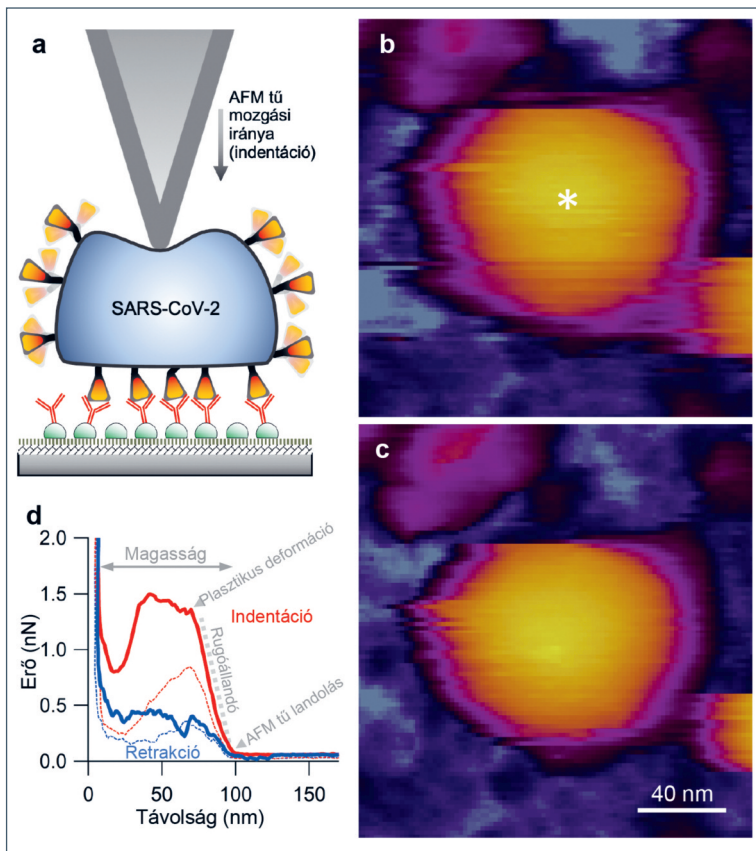


1. ábra. 5% glutaraldehyddel fixált SARS-CoV-2-virion topográfiai szerkezete. a. A szubsztrátfelületre specifikusan kikötött vírusrészecskék atomi erőmikroszkópos (AFM-) pásztázásának sematikus ábrája. b. Egy SARS-CoV-2-virion nagy felbontású, magasságkontrasztú AFM-képe. A szaggatott vonallal határolt területről nagyobb nagyítású felvételt mutatunk be a c. ábrán. c. A SARS-CoV-2-virion-felület AFM-képe. A szaggatott vonallal határolt segédháromszögek a tüskefehérjék háromszög alakú felületét határolják

követő) nanomechanikai manipuláció ellenére, a virionban nem keletkezett irreverzibilis szerkezeti változás (3b, c ábra) annak ellenére, hogy egy-egy indentáció során a vírust faltól falig összenyomtuk (3d ábra). Az indentáció első fázisában lineáris erőválaszt tapasztaltunk, mely-



2. ábra. A natív, fixálatlan SARS-CoV-2 vírus topográfiai analízise. a.1. Kontroll, fixált SARS-CoV-2-virion. a.2. Natív, fixálatlan SARS-CoV-2-virion. b. A fixált és natív SARS-CoV-2-virionok magasságeloszlásának összehasonlítása. A fixált vírusok átlagos magassága 62 ± 8 nm (\pm SD), ezzel szemben szemben a natív vírusoké 83 ± 7 nm (\pm SD). c. A natív SARS-CoV-2-virionok nagyobb topográfiai magasságának sémás magyarázata. A virion felületén gyors mozgást végző tüskefehérjék egy látszólagos, dinamikus felületet alakítanak ki

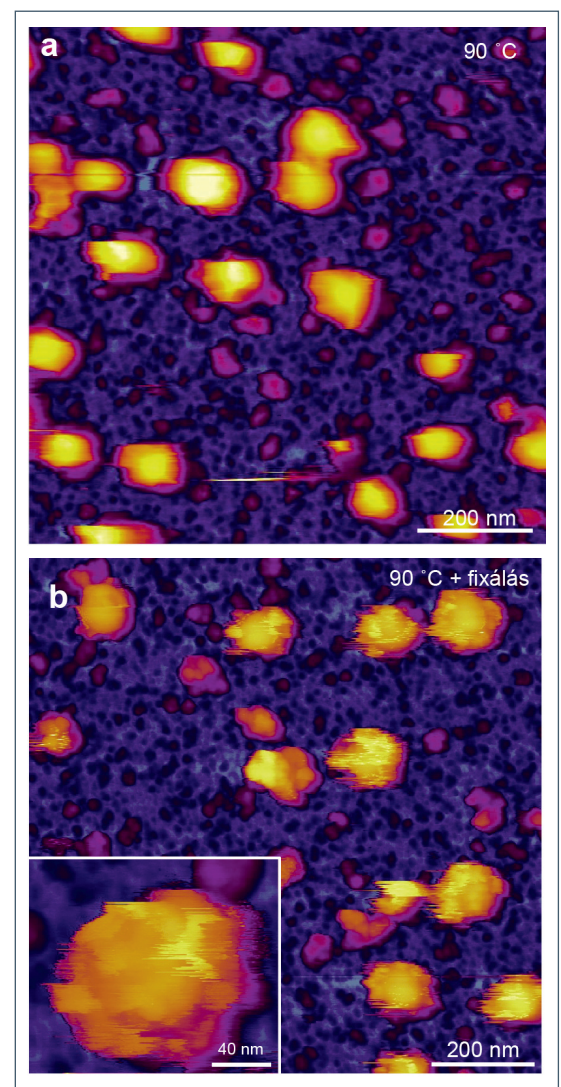


3. ábra. A natív SARS-CoV-2 vírus nanomechanikai elemzése. *a.* Az AFM-mel történő nanoindentációs kísérlet sematikus ábrázolása. *b.* Egy natív SARS-CoV-2-virion AFM-képe a nanoindentáció előtt. A csillag a nanoindentáció helyét jelöli. *c.* A virion AFM-képe 100, egymást követő nanoindentációs kísérletet követően. Jól látható, hogy a vírus szerkezetében nem alakult ki irreverzibilis változás. *d.* A SARS-CoV-2-virion nanomechanikai erőgörbéje, erő versus távolság függvényben. A vastag vörös folytonos vonal az első indentáció során, míg a vastag kék folytonos vonal az első indentációt követő retrakció során mért adatpontokat mutatja. A vékony szaggatott vonallal jelölt erőgörbék a századik indentáció-retrakció mechanikai ciklus során mért adatokat mutatják. Az indentációs erőgörbe kezdeti, lineáris szakaszának meredeksége a SARS-CoV-2-virion rugóállandóját adja meg. A lineáris erőválasz megtörése a plasztikus deformáció felléptét jelenti

nek meredekségéből megkaptuk a virion rugóállandóját ($13 \text{ pN/nm} \pm 5 \text{ pN/nm}$, SD). Az alacsony rugóállandó alapján a SARS-CoV-2 az eddig vizsgált leglágyabb vírus (26, 27). A virion rugóállandó valamivel kisebb az influenzavírus lipidburkánál (28), ami arra utal, hogy a SARS-CoV-2 rugalmasságát a membranózus burok dominálja, és a ribonukleoprotein (RNP) nem, vagy alig járul hozzá a vírus globális mechanikai tulajdonságaihoz. Más vírusokkal ellentétben (14, 29), a plasztikus deformáció küszöbét meghaladva, az erő nem esett nullára, ami arra utal, hogy a virion nem esett szét a nagyfokú nanoindentáció ellenére. Feltehetően a plasztikus deformáció során a kosárszerű RNP-részecskék

(13) átrendeződnek. Az AFM-tű visszahúzása során több száz pN erő keletkezett, ami arra utal, hogy az RNP-részecskék mechanikai erő ellenében képesek voltak visszarendeződni. Az indentáció/retrakció mechanikai ciklus végére a virion mérete teljesen helyreállt. Az átlagos mechanikai virionmagasság 94 nm -nek ($\pm 10 \text{ nm}$, SD) adódott, ami összevethető a topográfiai adatokkal. Összességében a SARS-CoV-2-virion mechanikailag meglepően stabil, összenyomható és ellenálló.

A SARS-CoV-2 hőstabilitását úgy mértük, hogy 10-10 perces magas hőmérsékletű ($60 \text{ }^\circ\text{C}$,



4. ábra. Hőkezelés hatása a SARS-CoV-2 vírusra. *a.* 10 perces, $90 \text{ }^\circ\text{C}$ -on történt kezelést követő visszahűtés után készített AFM-felvétel. Jól látható, hogy a virionok globális szerkezete (alak, méret) megtartott. *b.* A hőkezelés után 5%-os glutaraldehiddel való kémiai fixálás hatása a SARS-CoV-2 vírus szerkezetére. Jóllehet a virionok megtartották globális szerkezetüket, a felületükről nagyrészt eltűntek a tüskefehérjék

80 °C, 90 °C) kezelést alkalmaztunk. A 90 °C-os kezelés hatását a 4a ábra mutatja. Meglepetésünkre a virionok a 90 °C-os kezelést követően is jelen voltak. A virionátmérő valamelyest megnövekedett (60 °C: 83 ± 12 nm, 80 °C: 88 ± 11 nm, 90 °C: 90 ± 9 nm), de a globális virionszerkezet megőrződött. A tüskefehérjék jelenlétét és szerkezeti állapotát glutaraldehyd-fixálás után vizsgáltuk (4b ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a hőkezelés hatására a tüskefehérjék nagyrészt eltűntek a virion felületéről. Összességében a SARS-CoV-2 meglepően nagy hőstabilitással rendelkezik, ami megmagyarázza az aeroszolban és a felületeken észlelt stabilitását (30), ugyanakkor a tüskefehérjékben végbemenő termikusan indukált szerkezeti változások állhatnak a termikus inaktivációjuk hátterében.

Összegzés

A SARS-CoV-2 igen dinamikus és szerkezetiileg lágy vírus, meglepő mechanikai és termikus stabilitással. A tüskefehérjék dinamikája fontos szerepet játszhat a nagy fertőzőképességben, egyúttal a mechanikai öngyógyító tulajdonságuk arra utal, hogy a SARS-CoV-2 a környezeti körülmé-

nyek széles skálájához alkalmazkodhat. Az itt felhasznált „egy molekula” biofizikai módszerek (16) fontosak lehetnek a vírusfertőzés mechanizmusainak feltárásában és az antivirális eljárások kidolgozásában.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetünket fejezzük ki Drabbant Mónikának és Tordai Hedvignek a kísérleti előkészítő munkáért és közreműködésükért a mérésekben, továbbá Herényi Leventének az elméleti megbeszélésekért és a kézirat kritikus átolvasásáért. Kísérleteinket a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (OTKA K124966; Nemzeti Szívprogram NVKP-16-1-2016-0017; Tématerületi Kiválósági Program; Nemzeti Bionikai Program ED_17-1-2017-0009) és az Innovációs és Technológiai Minisztérium Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (FIKP) Semmelweis Egyetem Terápiás tématerületi programja támogatta. A kutatás részben a HCEMM (Hungarian Center of Excellence in Molecular Medicine) támogatásával készült (EU H2020 grant agreement No 739593). Az Innovációs és Technológiai Minisztérium Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs alapjából ÚNKP-21-3-II-SE-36 pályázati számon támogatásában részesült Kiss Bálint.

Irodalom

- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020;382(8):727-33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
- Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020;579(7798):270-3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Kruger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 2020;181(2):271-280e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* 2020;581(7807):221-4. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>
- Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 2020;181(2):281-292e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Wang Q, Zhang Y, Wu L, Niu S, Song C, Zhang Z, et al. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell* 2020;181(4):894-904e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.045>
- Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science* 2020;369(6501):330-3. <https://doi.org/10.1126/science.abb9983>
- Henderson R, Edwards RJ, Mansouri K, Janowska K, Stalls V, Gobeil SMC, et al. Controlling the SARS-CoV-2 spike glycoprotein conformation. *Nat Struct Mol Biol* 27, 925-933 (2020). <https://doi.org/10.1101/2020.05.18.102087>
- McCallum M, Walls AC, Bowen JE, Corti D, Veesler D. Structure-guided covalent stabilization of coronavirus spike glycoprotein trimers in the closed conformation. *Nat Struct Mol Biol* 2020;27(10):942-9. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0483-8>
- Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 2020;367(6483):1260-3. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
- Ke Z, Oton J, Qu K, Cortese M, Zila V, McKeane L, et al. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature* 2020;588(7838):498-502. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2665-2>
- Turonova B, Sikora M, Schurmann C, Hagen WJH, Welsch S, Blanc FEC, et al. In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges. *Science* 2020;370(6513):203-8. <https://doi.org/10.1126/science.abd5223>
- Yao H, Song Y, Chen Y, Wu N, Xu J, Sun C, et al. Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus. *Cell* 2020;183(3):730-738e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.018>
- de Pablo PJ, Schaap IAT. Atomic Force Microscopy of Viruses. *Adv Exp Med Biol* 2019;1215:159-79. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14741-9_8
- Kellermayer MSZ, Voros Z, Csik G, Herényi L. Forced phage uncorking: viral DNA ejection triggered by a mechanically sensitive switch. *Nanoscale* 2018;10(4):1898-904. <https://doi.org/10.1039/C7NR05897G>
- Kiss B, Mudra D, Torok G, Martonfalvi Z, Csik G, Herényi L, Kellermayer M. Single-particle virology. *Biophys Rev* 2020;12(5):1141-54. <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00747-9>
- Voros Z, Csik G, Herényi L, Kellermayer MS. Stepwise re-

- versible nanomechanical buckling in a viral capsid. *Nano-scale* 2017;9(3):1136-43.
<https://doi.org/10.1039/C6NR06598H>
18. Moreno-Herrero F, Perez M, Baro AM, Avila J. Characterization by atomic force microscopy of Alzheimer paired helical filaments under physiological conditions. *Biophys J* 2004;86(1 Pt 1):517-25.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74130-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74130-2)
 19. Voros Z, Csik G, Herenyi L, Kellermayer M. Temperature-Dependent Nanomechanics and Topography of Bacteriophage T7. *J Virol* 2018;92(20):e01236-18.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01236-18>
 20. Hutter JL, Bechhoefer J. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev Sci Instrum* 1993;64(7):1868-73.
<https://doi.org/10.1063/1.1143970>
 21. Ng ML, Lee JW, Leong ML, Ling AE, Tan HC, Ooi EE. Topographic changes in SARS coronavirus-infected cells at late stages of infection. *Emerg Infect Dis* 2004;10(11):1907-14.
<https://doi.org/10.3201/eid1011.040195>
 22. Lin S, Lee CK, Lee SY, Kao CL, Lin CW, Wang AB, et al. Surface ultrastructure of SARS coronavirus revealed by atomic force microscopy. *Cell Microbiol* 2005;7(12):1763-70.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00593.x>
 23. V'Kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 19, 155–170 (2021).
<https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
 24. Harris A, Cardone G, Winkler, DC, Heymann, JB, Brecher M, White JM, Steven C. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(50):19123-7.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0607614103>
 25. Petersen E, Koopmans M, Go U, Hamer DH, Petrosillo N, Castelli F, et al. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *The Lancet Infectious Diseases* 2020;20(9):e238-e244.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30484-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30484-9)
 26. Cieplak M, Robbins MO. Nanoindentation of 35 virus capsids in a molecular model: relating mechanical properties to structure. *PLoS One* 2013;8(6):e63640.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063640>
 27. Mateu MG. Mechanical properties of viruses analyzed by atomic force microscopy: a virological perspective. *Virus Res* 2012;168(1-2):1-22.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.06.008>
 28. Li S, Eghiaian F, Sieben C, Herrmann A, Schaap IAT. Bending and puncturing the influenza lipid envelope. *Biophys J* 2011;100(3):637-45.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.12.3701>
 29. de Pablo PJ. Atomic force microscopy of virus shells. *Semin Cell Dev Biol* 2018;73:199-208.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.039>
 30. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med* 2020;382(16):1564-7.
<https://doi.org/10.1056/NEJMc2004973>