Wirus SARS-CoV-2: pochodzenie, budowa i cykl replikacyjny

Katarzyna Kuczyńska¹, Jolanta B. Zawilska¹, Julia Badura², Bartłomiej Strehl²

¹Zakład Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska ²Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi (student), Polska

Farmacja Polska, ISSN 0014-8261 (print); ISSN 2544-8552 (on-line)

Adres do korespondencji

Jolanta B. Zawilska, Zakład Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Muszyńskiego 1, 90–151 Łódź, Polska; e-mail: jolanta.zawilska@umed.lodz.pl

Źródła finansowania

Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Grant No. 503/3-011-01/503-31-002-19.

Konflikt interesów Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2021.03.09 **Zaakceptowano:** 2021.03.30 **Opublikowano on-line:** 2021.04.08

DOI 10.32383/farmpol/135222

ORCID

Katarzyna Kuczyńska (ORCID id: 0000-0003-3103-5874) Jolanta Barbara Zawilska (ORCID id: 0000-0002-3696-2389) Julia Badura (ORCID id: 0000-0001-8360-1490) Bartłomiej Strehl (ORCID id: 0000-0003-3531-2736)

Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

To jest artykuł o otwartym dostępie, na licencji CC BY NC 😳 🔅 https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

SARS-CoV-2 virus: origin, structure and replication cycle

In December 2019, a novel highly pathogenic coronavirus SARS-CoV-2, which can be transmitted from person to person, was discovered in patients with infectious respiratory disease in Wuhan, Hubei Province, China. The disease, now known as the 2019 coronavirus disease (COVID-19), has spread rapidly around the world causing a pandemic. This survey presents basic information on the structure and replication cycle of SARS-CoV-2. Fundamental discoveries in genetics and molecular biology of the virus paved the way to design and development of molecules that would act as potential therapeutic agents for COVID-19. The virus belongs to the β -coronavirus 2B lineage. Comparison of the SARS-CoV-2 genome sequence and other available β -coronavirus genomes suggests that it may have evolved naturally from the RaTG13 bat strain of coronaviruses. The virus has a positivesense single-stranded RNA that acts as mRNA following cellular entry and is completely dependent on the translation machinery of the host cell. The genomic RNA of SARS-CoV-2 comprises 14 open reading frames (ORFs). Two main ORFs, ORF1a and ORF1b, encompass two-thirds of the genome and are translated to polyproteins pp1a and pp1ab, respectively. These polyproteins are processed by viral proteases (papain-like protease and chymotrypsin-like protease), to produce 16 nonstructural proteins (Nsp). The remaining one-third of the genome encodes four major structural proteins: spike (S), membrane (M), envelope (E) and nucleocapsid (N), and seven accessory proteins. SARS-CoV-2 infects human cells by binding to its receptor, i.e. angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) at the cell surface through the receptor binding domain of its S protein. Following the entry into the host cell, the genetic material is released into the cytoplasm, and the synthesis of viral proteins necessary for the further process of replication and translation takes place. After mature virus particles are formed, they travel in Golgi vesicles to the host cell membrane where they are released into extracellular space by exocytosis. With the continued spread of SARS-CoV-2 around the world, thousands of mutations have been identified, some of which have relatively high incidences. The following proteins exhibited the highest mutation density: N, S, Nsp2, Nsp3, Nsp5, Nsp6, Nsp7, Nsp12, Nsp13, Orf3 and Orf8.

Tom 77 · nr 3 · 2021

The changes in SARS–CoV–2 proteins caused by mutations can not only affect virus transmission, pathogenesis, and immunogenicity, but also give rise to false negative diagnoses and drug resistance.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, angiotensin-converting enzyme 2, genome, proteome, S protein, mutations.

© Farm Pol, 2021, 77 (3): 143-149

Wstęp

Trzy wysoce patogenne koronawirusy przenoszone ze zwierząt na ludzi, SARS-CoV (ang. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus), MERS-CoV (ang. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) i SARS-CoV-2 (ang. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2), powodują ciężki ostry zespół oddechowy. Pierwszy koronawirus z tej grupy, SARS-CoV, pojawił się w Guangdong w południowych Chinach pod koniec 2002 r., a następnie swoim zasięgiem objął ponad 30 krajów. Śmiertelność w ponad 8000 przypadków infekcji wyniosła ok. 10% [1]. Od 2004 r. nie wykryto SARS-CoV u ludzi, co może sugerować wygaśnięcie epidemii. W 2012 r. w krajach Bliskiego Wschodu pojawił się inny wysoce zjadliwy wirus, MERS-CoV. Po raz pierwszy wykryto go u pacjenta z Arabii Saudyjskiej [2]. U ludzi MERS--CoV wywołuje ciężkie zapalenie płuc i niewydolność nerek, ze śmiertelnością ~30% [3]. W grudniu 2019 r., w Wuhan w chińskiej prowincji Hubei, u pacjentów z zakaźną chorobą układu oddechowego wykryto SARS-CoV-2, który może przenosić się z człowieka na człowieka [4]. Choroba, obecnie nazywana chorobą koronawirusową 2019



Figure 1. Structure of the SARS-CoV-2 virus.

144

(COVID-19), szybko rozprzestrzeniła się na cały świat wywołując pandemię.

Budowa wirusa SARS-CoV-2

Analizy bioinformatyczne wykazały, że SARS--CoV-2 posiada cechy typowe dla rodziny koronawirusów. Należy on do linii β-koronawirusów 2B [5]. Wirus SARS-CoV-2, podobnie jak pozostałe koronawirusy, jest wirusem otoczkowym i ma kształt kulisty lub owalny; jego średnica wynosi ~ 80-120 nm [5]. Już w styczniu 2020 r. poznano sekwencję genomową SARS-CoV-2 (NCBI Reference Sequence: NC_045512) [6]. Badania genomu SARS-CoV-2 wykazały, że jest on w około 79% zgodny z genomem SARS-CoV i w 52% z genomem MERS-CoV [7]. Porównanie sekwencji genomu SARS-CoV-2 i innych dostępnych genomów β-koronawirusów wskazuje na najbliższy związek SARS-CoV-2 z nietoperzowym szczepem koronawirusa BatCov RaTG13 (96% podobieństwa). Przypuszcza się zatem, że SARS-CoV-2 mógł naturalnie wyewoluować ze szczepu wirusa RaTG13 przenoszonego przez nietoperze [8].

Genom SARS-CoV-2 tworzy liniowy jednoniciowy RNA (ang. single strand RNA, ssRNA) o dodatniej polarności zawierający 29891 nukleotydów, które kodują 9860 aminokwasów. RNA o dodatniej polarności może działać jako informacyjny RNA, a zatem może być bezpośrednio tłumaczony na białka wirusowe przez rybosomy komórki gospodarza. Region 5'UTR genomu składa się z 265 nukleotydów, natomiast 3'UTR z 358 nukleotydów. Genom SARS-CoV-2 koduje syntezę 4 głównych białek strukturalnych, 16 białek niestrukturalnych (ang. non-structural proteins; Nsp), które biorą udział w procesie replikacji wirusa oraz 7 białek pomocniczych, które uczestniczą w interakcjach wirusa z komórką gospodarza. Do grupy białek strukturalnych należą [9, 10] (rycina 1):

- ufosforylowane białko nukleokapsydu (ang. nucleocapsid; N) zbudowane z 419 reszt aminokwasowych. Odpowiada ono za upakowanie genomu wirusa w helikarny rybonukleokapsyd oraz uczestniczy w modyfikacji procesów komórkowych i replikacji wirusa. Jest białkiem wysoce immunogennym, produkowanym w dużych ilościach w czasie infekcji;
- białko błonowe (ang. membrane; M) główne białko macierzy wirusa zbudowane z 222 reszt aminokwasowych. Białko M wchodzi w interakcję homotypową i heterotypową (z innymi białkami strukturalnymi). Interakcje te odrywają kluczową rolę w pączkowaniu błony. Białko M oddziałuje z białkiem S, aby zatrzymać wirusa w kompleksie siateczka śródplazmatyczna

 aparat Golgiego, gdzie nowe wiriony są składane, a następnie uwalniane przez pęcherzyki wydzielnicze. Nagromadzenie się dużych ilości białek wirusowych podczas infekcji SARS--CoV-2 może spowodować przeciążenie siateczki śródplazmatycznej. Dochodzi wówczas do aktywacji kaskady złożonych procesów biochemicznych, które prowadzą do śmierci komórki [11];

- białko osłonki (ang. envelope; E) najmniejsze z białek strukturalnych (75 reszt aminokwasowych) odpowiedzialne m.in. za formowanie wirionów [11]. Modyfikuje ono błonę komórki gospodarza tworząc w niej pory, co pozwala na wydostanie się wirionu z zainfekowanej komórki. Brak tego białka znacznie zmniejsza miano wirusa [12]. Uważa się, że za zjadliwość wirusa odpowiada przede wszystkim białko E, które uczestniczy w indukcji procesu uwalniania czynników prozapalnych;
- monotrimeryczne białko powierzchniowe w kształcie kolców (ang. spike; S). Białko S, zbudowane z 1273 reszt aminokwasowych, należy do I klasy transbłonowych glikoprotein. Jego obecność wykazano we wszystkich rodzajach ludzkich koronawirusów, a także w wirusie HIV, grypy, Ebola i paramyksowirusach. Sekwencja tego białka jest w około 77% identyczna z sekwencją białka S wirusa SARS-CoV. W białku S wyróżniamy trzy obszary: krótki odcinek transbłonowy kotwiczący białko S w osłonce i łączący ze sobą krótki "ogon" z dużą zewnatrzbłonowa glikozylowana ektodomena, kształtem przypominającą nierozkwitłe, wysuszone pąki drzewa goździkowego. Białka S są promieniście rozmieszczone na powierzchni wirusa, co sprawia, że na obrazie spod mikroskopu elektronowego przypomina on koronę. W podjednostce S1 występują dwie domeny: domena odpowiedzialna za wiązanie do receptora (ang. receptor binding domain; RBD) i N-końcowa domena galektyno-podobna (ang. N-terminal galectin like domain; S-NTD), która stabilizuje podjednostkę S2 w konformacji przedfuzyjnej.

Białka M, E i S są glikoproteinami i tworzą otoczkę wirusa. Glikozylacja białka S zabezpiecza specyficzne epitopy na powierzchni wirusa przed atakiem przeciwciał gospodarza [13].

Cykl replikacyjny wirusa SARS-CoV-2

W cyklu replikacyjnym wirusa wyróżniamy kilka etapów: przyłączenie się do receptora na powierzchni komórki gospodarza i wniknięcie do jej wnętrza, translację wirusowej replikazy, transkrypcję i replikację genomu, translację białek, uformowanie wirionu i jego uwolnienie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [9, 14].

Na wstępnym etapie zakażania komórki białko S ulega proteolitycznemu rozszczepieniu na dwie funkcjonalnie odmienne podjednostki: S1 ("głowę") i S2 ("trzon"). W procesie tym mogą uczestniczyć różne enzymy gospodarza: transbłonowa proteaza serynowa typu 2 (ang. transmembrane protease serine 2; TMPRSS2), TMPRSS4, furyna, katepsyna, trypsyna lub trypsyno--podobna proteaza dróg oddechowych człowieka [15-18]. Podjednostka S1 odpowiada za przyłączenie się wirusa do "receptora" na powierzchni komórki gospodarza, natomiast S2 za fuzję z błoną komórki gospodarza. W podjednostce S1 występuje domena wiązania z receptorem (RBD) o masie ~22 kDa. RBD stale przekształca się pomiędzy przedfuzyjną pozycją stojącą ("otwartą"), która wiąże się do receptora, a pofuzyjną konfiguracją leżącą ("zamkniętą"), przy czym ta ostatnia odgrywa kluczową rolę w neutralizacji przeciwciał. Dzięki badaniom z wykorzystaniem techniki mikroskopii krioelektronowej poznaliśmy przedfuzyjną strukturę RDB [13, 19], natomiast pofuzyjna konfiguracja tej domeny pozostaje nieznana. Podjednostka S2 zawiera peptyd fuzyjny (ang. fusion peptide; FP) [20, 21], zbudowany w β-koronawirusach głównie z hydrofobowych aminokwasów - glicyny lub alaniny [22], oraz dwie powtarzalne sekwencje heptapeptydu (HR1 i HR2). W wyniku rozrywania przez FP i łączenia dwuwarstwy lipidowej błony komórkowej dochodzi do zlewania sie lipidów osłonki wirusowej z lipidami błony komórkowej. Zwinięte regiony HR mają postać a-helis z hydrofobowymi wypustkami ułatwiającymi dalszą integrację wirusa z komórką gospodarza [20, 21].

Głównym receptorem dla SARS-CoV-2 jest enzym – konwertaza angiotensyny typu 2 (ang. angiotensin-converting enzyme 2; ACE2) [23]. Powinowactwo białka S SARS-CoV-2 do ACE2 człowieka jest od 10 do 20 razy wyższe niż w przypadku SARS-CoV, co może tłumaczyć wysoką inwazyjność wirusa i szybkie rozprzestrzenianie się COVID-19 [19]. SARS-CoV-2 może także wykorzystywać alternatywne drogi wnikania do komórki: lektyny CD209L i CD147 [24, 25]. Fragment RBM (ang. receptor binding motif), element składowy domeny RBD w podjednostce S1, wchodzi w interakcję z domeną peptydazową (ang. peptidase domain) ACE2 [21, 26]. Podczas wiązania S1 do receptora, podjednostka S2 ulega drugiemu cięciu proteolitycznemu. Proces ten zachodzi przy udziale transbłonowej proteazy serynowej typu 2 i prowadzi do wieloetapowej zmiany konformacyjnej S2 [16, 17] ze stanu przedfuzyjnego do pofuzyjnego stabilnej struktury w kształcie hantli o strukturze

Tom 77 · nr 3 · 2021 ----

146

wiązki złożonej z sześciu spiral pozwalającej na zakotwiczenie się w błonie komórki gospodarza [9]. Proteolityczne modyfikacje kompleksu białek S1 – ACE2 uważa się za krytyczny etap wnikania wirusa, ponieważ mesylan kamostatu, inhibitor TMPRSS2, blokuje wejście SARS-CoV-2 do komórek nabłonka [16]. TMPRSS2 rozszczepia również ACE2, co może ułatwiać wnikanie SARS-CoV-2 do komórek gospodarza [27]. Koekspresja ACE2 i TMPRRS2 w pęcherzykach płucnych wskazuje na kluczową rolę układu oddechowego w patogenezie COVID-19 [28].

Uwolniony z S2 peptyd fuzyjny wnika do błony komórki gospodarza i uruchamia proces fuzji. Przedostawanie się wirusów z otoczką do komórek odbywa się dwoma głównymi szlakami: niektóre wirusy dostarczają swoje genomy do cytozolu po fuzji ich otoczek z błoną plazmatyczną na powierzchni komórki, podczas gdy inne wykorzystują mechanizm endocytarny komórki. SARS-CoV-2 wnika do komórki gospodarza głównie na drodze endocytozy zależnej od klatryny [14]. Endocytowane wiriony ulegają aktywacji w endosomie. Zmniejszenie pH endosomów umożliwia fuzję błony pęcherzyków endosomalnych z osłonką wirusa i uwolnienie do cytoplazmy materiału genetycznego wirusa. W procesie tym uczestniczy endosomalna proteaza cysteinowa – katepsyna L [14, 29].

Genom SARS-CoV-2 tworzy jednoniciowy RNA, który ze względu na dodatnią polarność jest RNA informacyjnym. Wkrótce po wniknięciu do komórki, bezpośrednio z niego odbywa się translacja białek wirusowych przy udziale rybosomów komórki gospodarza. Genomowy RNA wirusa składa się z 14 otwartych ramek odczytu (ang. open reading frames; ORFs). Pierwsze 2/3 wirusowego RNA od strony 5' zajmuje gen 1, w którym wyróżniamy dwie otwarte ramki odczytu: ORF1a i ORF1b (rycina 2). W pierwszym etapie translacji (+)ss-RNA powstają dwa polipeptydy: pp1a i pp1ab. Dwie proteazy cysteinowe: proteaza papaino-podobna (PL2pro – niestrukturalne białko 3; Nsp3) i proteaza podobna do chemotrypsyny 3 (3CLpro/Mpro;



Rycina 2. Schemat struktury genomu wirusa SARS-CoV-2. Kolor niebieski – geny kodujące białka niestrukturalne (Nsp), kolor czerwony – geny białek strukturalnych (S – kolców, E – otoczki, M – błony, N – nukleokapsydu), kolor zielony – geny białek pomocniczych. pp1a – polipeptyd 1a, pp1ab – polipeptyd 1ab, PL2pro – proteaza papaino-podobna, 3CLpro – proteaza podobna do chemotrypsyny 3, RdRp – zależna od RNA polimeraza RNA. S1 i S2 – podjednostki białka kolców, NTD – N-końcowy fragment S1, RBD – domena wiązania z receptorem, RBM – motyw wiązania z receptorem, FP – peptyd fuzyjny, H1 i H2 – powtarzalne sekwencje heptapeptydu.

Figure 2. Genome organization of the SARS-CoV-2 virus. Blue – genes encoding nonstructural proteins (Nsp), red – genes for structural proteins (S – spike, E – envelope, M – membrane, N – nucleocapsid), green – genes for accessory proteins. pp1a – polypeptide 1a, pp1ab – polypeptide 1ab, PL2pro – papain-like protease, 3CLpro – 3-chymotrypsin-like protease, RdRp – RNA- dependent RNA polymerase. S1 i S2 – subunits of S protein, NTD – N-terminal domain of S1, RBD – receptor binding domain, RBM – receptor binding motif, FP – fusion peptide, H1 i H2 – heptapeptide repeat domains.

Nsp5) tną polipeptydy pp1a i pp1ab na mniejsze białka niestrukturalne. Proteaza papaino-podobna odpowiada za cięcia w miejscach Nsp1|2, Nsp2|3 i Nsp3|4, w wyniku czego powstają białka Nsp1, Nsp2 i Nsp3. Białko Nsp1 zakłóca syntezę białek komórki gospodarza poprzez wiązanie się z podjednostką rybosomu 40S i endonukleolityczne rozszczepienie mRNA, a Nsp2 moduluje szlak sygnałowy przeżycia komórki gospodarza. Proteaza 3CLpro (nazywana także główną proteazą; Mpro), tnąc polipeptydy pp1a i pp1ab w 11 miejscach, uwalnia 12 białek funkcjonalnych (Nsp4-Nsp16) [9]. Nsp4 zawiera domenę transbłonową 2 (TM2) i modyfikuje błony siateczki śródplazmatycznej. Nsp5 uczestniczy w procesie replikacji poliproteiny. Nsp6 przypuszczalnie jest domeną transbłonową. Nsp9 to jednoniciowe białko wiążące RNA zaangażowane w wirulencję wirusa. Nsp10 działa jako białko szkieletowe, tworząc z Nsp14 i Nsp16 (2'-O-metylotransferazą) kompleks metylacyjny czapeczki mRNA [9, 30].

Białka niestrukturalne tworzą kompleks replikacyjno-transkrypcyjny, odpowiadający za powielenie materiału genetycznego wirusa oraz syntezę mRNA, który następnie stanowi matrycę do translacji białek strukturalnych. W wyniku reorganizacji błony komórkowej przebiegającej przy udziale białek Nsp3, Nsp4 i Nsp6, powstają specjalne pęcherzyki otoczone podwójną błoną (ang. double membrane vesicles; DMVs). Wewnątrz nich znajduje się kompleks replikacyjno-transkrypcyjny wirusa. W skład tego kompleksu wchodza następujące białka niestrukturalne: Nsp 12 - zależna od RNA polimeraza RNA (ang. RNA--dependent RNA polymerase; RdRp), Nsp7 i Nsp8, które zwiększają wydajność polimerazy, Nsp13 helikaza oraz Nsp14 z dwiema domenami: egzonukleazy i metylotransferazy guaninowej, która katalizuje proces metylacji azotu 7 guaniny na końcu 5'RNA. Kompleks replikacyjno-transkrypcyjny wirusa uczestniczy w syntezie nowego genomu i subgenomu wirusa oraz ekspresji białek strukturalnych. Dodatnio spolaryzowana nić RNA zostaje przepisana na nić o ujemnej polarności - matrycę dla syntezy nowych wirusowych genomów RNA. Należy podkreślić, że polimeraza RdRp stanowi tarczę molekularną dla leków nukleotydowych hamujących replikację wirusów [9, 14].

W skład pozostałej części genomu wchodzi RNA kodujący białka strukturalne N, M, E i S oraz białka pomocnicze: ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9 i ORF10. Orf3a jest białkiem z rodziny wiroporyn, które tworzą kanały jonowe w błonie komórki gospodarza. Orf3a uczestniczy w procesach apoptozy i uwalnianiu wirusa, ulega dimeryzacji, a sześć transbłonowych helis dimeru tworzy kanał kationowy. Kanał ten ma większą preferencję dla jonów Ca²⁺ i K⁺ niż dla Na⁺. Białko Orf3a zawiera również domenę wiążącą czynnik związany z receptorem czynnika martwicy nowotworu (ang. *Tumor necrosis factor receptorassociated factor*; TRAF), który aktywuje NF- κ B i inflamasom NLRP3. Ponadto białko to pobudza zewnątrzpochodną ścieżkę apoptotyczną zapoczątkowaną przez rozszczepienie kaspazy-8. Aktywna kaspaza-8 tnie proapoptotyczne białko BID do tBID. Białko tBID wraz z innymi białkami z rodziny Bcl-2 tworzy kanały w błonie mitochondrialnej. Dochodzi do wypływu cytochromu c z mitochondriów, tworzenia apoptosomu i aktywacji kaspazy-9 [9].

Białka niestrukturalne, pomocnicze i strukturalne wirusa SARS-CoV-2 wchodzą w interakcje z ponad 300 białkami człowieka, wpływając na różnorodne procesy biologiczne [31].

Translacja RNA kodującego białko N przebiega w cytoplazmie, natomiast dojrzałe formy białek M, E i S powstają w siateczce śródplazmatycznej szorstkiej (ang. endoplasmic reticulum; ER). Białko N otacza nowo zsyntetyzowany (+)ss-RNA; powstaje nukleokapsyd wirusa. W kolejnym etapie nukleokapsyd i dojrzałe białka strukturalne M, E i S wirionu są transportowane do dodatkowego kompartmentu - tzw. ERGIC (ang. endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment; jest to przedział pośredni zlokalizowany pomiędzy siateczką śródplazmatyczną a cysternami cis aparatu Golgiego). Po uformowaniu, dojrzałe cząstki wirusowe są przenoszone w pęcherzykach Golgiego w pobliże błony komórkowej i uwalniane na zewnątrz w procesie egzocytozy [14, 32]. Proces ten warunkowany jest obecnością białka E stanowiącego wiroporynę [9, 10].

Mutacje wirusa SARS-CoV-2

Wraz z rozprzestrzenianiem się pandemii COVID-19 pojawiają się nowe warianty SARS--CoV-2. Do września 2020 r. w genomie wirusa wykryto ponad 10 000 mutacji. Ich wpływ na właściwości wirionu pozostaje w dużej mierze nieznany. W 17 scharakteryzowanych mutantach, 20 mutacji występowało z częstotliwością ≥1%. Mutacje stwierdzono głównie w odcinkach ss--RNA kodujących białka kolców i nukleokapsydu, białka niestrukturalne Nsp2, Nsp3, Nsp5, Nsp6, Nsp7, Nsp12, Nsp13 oraz pomocnicze Orf3 i Orf8. W niektórych krajach mutacje punktowe R203K/ G204R w białku nukleokapsydu oraz Q57H w Orf3a stwierdzono w ponad 50% zbadanych wirionów SARS-CoV-2 [33]. Na poziomie genów zaobserwowano, że liczba mutacji na 100 zasad jest stosunkowo wysoka w przypadku N, ORF10, ORF6, ORF7a, ORF8 i ORF3a, co sugeruje, że geny te mogą

być bardziej podatne na mutacje w porównaniu z innymi. Spośród białek strukturalnych najmniejszą zmienność wykazywały białka M i E; sądzi się, że geny kodujące te białka są bardziej odporne na mutacje. Analizując mutacje niesynonimiczne prowadzące do zmian składu aminokwasowego białka oraz synonimiczne uważane za funkcjonalnie "ciche" i ewolucyjnie neutralne, największą liczbę mutacji niesynonimicznych stwierdzono w genie 1 (ORF1ab) i we fragmencie genu 2, który koduje syntezę białka S. W grupie białek strukturalnych najwyższą liczbę mutacji stwierdzono w przypadku białka nukleokapsydu, natomiast najczęściej występowała mutacja D614G genu białka S, obecna głównie w wariantach SARS-CoV-2 poza obszarami Chin i USA [34].

Należy podkreślić, że mutacje SARS-CoV-2 mogą wpływać nie tylko na budowę białek i cykl replikacyjny wirusa, jego zakaźność, cytotoksyczność i immunogenność, ale także prowadzić do fałszywie ujemnych wyników badań diagnostycznych oraz zmniejszenia skuteczności działania szczepionek i rozwoju lekooporności. Przykładowo, w centrum katalitycznym polimerazy RNA zależnej od RNA oraz w jego bezpośrednim sasiedztwie zidentyfikowano miejsca, które łatwo mogą ulegać mutacjom, wpływając tym samym na skuteczność działania remdesiwiru - inhibitora tego enzymu. Z uwagi na szybko pojawiające się warianty SARS-CoV-2 powstałe w wyniku mutacji, należy analizować profil mutacyjny pacjentów z dodatnim wynikiem na obecność RNA wirusa.

Podsumowanie

Obecnie znamy nie tylko pełną sekwencję genomową SARS-CoV-2, ale także mechanizm zakażania komórek gospodarza. Fundamentalne odkrycia dotyczące genetyki i biologii molekularnej wirusa utorowały drogę do intensywnych i szeroko rozwiniętych badań nad szczepionkami przeciwko SARS-CoV-2 i farmakoterapią COVID-19. Jednak należy podkreślić, że pomimo intensywnych badań wiele procesów związanych z infekcją SARS-CoV-2 nie zostało w pełni wyjaśnionych [35, 36]. Nadal dysponujemy ograniczoną wiedzą w zakresie wpływu mutacji na właściwości i funkcjonowanie poszczególnych białek wirionu. Kolejnym problemem oczekującym na wyjaśnienie jest wpływ miRNA człowieka na replikację wirusa SARS-CoV-2 i patogenezę COVID-19 [37-39].

Piśmiennictwo

 Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, Poon, Xie ZH, Chan KH, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet* 2003; 362(9393): 1353–1358. doi: 10.1016/s0140-6736(03)14630-2.

- Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. N Engl J Med. 2012; 367(19): 1814– 1820. doi: 10.1056/NEJMoa1211721.
- The WHO MERS-CoV Research Group. State of knowledge and data gaps of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS--CoV) in humans. *PLoS Curr*. 2013; 5. doi: 10.1371/currents.outbreaks.0bf719e352e7478f8ad85fa30127ddb8.
- Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet* 2020; 395(10223): 470–473. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30185-9.
- Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang SG. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infect Genet Evol.* 2020; 85: 104502. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104502.
- Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020; 579(7798): 265–269. doi: 10.1038/s41586-020– 2008-3.
- Machhi J, Herskovitz J, Senan AM, Dutta D, Nath B, Oleynikov MD, et al. The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2020; 15(3): 359–386. doi: 10.1007/s11481-020-09944-5.
- 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: 270–273. doi: 10.1038/s41586-020– 2012-7.
- Arya R, Kumari S, Pandey B, Mistry H, Bihani SC, Das A, et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. J Mol Biol. 2021; 433(2): 166725. doi: 10.1016/j.jmb.2020.11.024.
- Satarker S, Nampoothiri M. Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. Arch Med Res. 2020; 51(6): 482-491. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.05.012.
- Marian AJ. Current state of vaccine development and targeted therapies for COVID-19: impact of basic science discoveries. *Cardio*vasc Pathol. 2021; 50: 107278. doi: 10.1016/j.carpath.2020.107278.
- DeDiego ML, Alvarez E, Almazan F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, et al. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. J Virol. 2007; 81(4): 1701–1713. doi: 10.1128/JVI.01467–06.
- 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: 281–292. doi: 10.1016/j. cell.2020.02.058.
- Haque SM, Ashwaq O, Sarief A, Mohamed AKAJ. A comprehensive review about SARS-CoV-2. *Future Virol.* 2020; 15(9): 625–648. doi: 10.2217/fvl-2020-0124.
- Al-Horani RA, Kar S, Aliter KF. Potential Anti-COVID-19 Therapeutics that Block the Early Stage of the Viral Life Cycle: Structures, Mechanisms, and Clinical Trials. Int J Mol Sci. 2020; 21(15): 5224. doi: 10.3390/ijms21155224.
- Bestle D, Heindl MR, Limburg H, Van Lam van T, Pilgram O, Moulton H, et al. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life Sci Alliance* 2020; 3(9): e202000786. doi: 10.26508/lsa.202000786.
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Mol Cell*. 2020; 78(4): 779–784. doi: 10.1016/j. molcel.2020.04.022.
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 2020; 181: 271-280. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
- Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. Cryo-EM structure of the 2019– nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 2020; 367(6483):1260–1263. doi: 10.1126/science.abb2507.
- Xia S, Zhu Y, Liu M, Lan Q, Xu W, Wu Y, et al. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cell Mol Immunol.* 2020; 17: 765–767. doi: 10.1038/s41423-020-0374-2.
- Wang L, Xiang Y. Spike Glycoprotein-Mediated Entry of SARS Coronaviruses. Viruses 2020; 12(11): 1289. doi: 10.3390/v12111289.
- Ou X, Zheng W, Shan Y, Mu Z, Dominguez SR, Holmes KV, Qian Z. Identification of the fusion peptide-containing region in betacoronavirus spike glycoproteins. *J Virol.* 2016; 90(12): 5586–5600. doi: 10.1128/JVI.00015-16.
- Scialo F, Daniele A, Amato F, Pastore L, Matera MG, Cazzola M et al. ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2. *Lung* 2020; 198(6): 867–877. doi: 10.1007/s00408-020-00408-4.
- 24. Amraie R, Napoleon MA, Yin W, Berrigan J, Suder E, Zhao G, et al. CD209L/L-SIGN and CD209/DC-SIGN act as receptors

for SARS-CoV-2 and are differentially expressed in lung and kidney epithelial and endothelial cells. *bioRxiv*. 2020; 23: 2020.06.22.165803. doi: 10.1101/2020.06.22.165803.

- 25. Wang K, Chen W, Zhang Z, Deng Y, Lian JQ, Du P, et al. CD147--spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. Signal Transduct Target Ther. 2020; 5(1): 283. doi: 10.1038/s41392-020-00426-x.
- 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: 894. doi: 10.1016/j.cell.2020.03.045.
- 27. Heurich A, Hofmann-Winkler H, Gierer S, Liepold T, Jahn O, Pohlmann S. TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. J Virol. 2014; 88(2):1 293–1307. doi: 10.1128/JVI.02202-13.
- Lukassen S, Chua RL, Trefzer T, Kahn NC, Schneider MA, Muley T. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *EMBO J.* 2020; 39(10): e105114. doi: 10.15252/embj.20105114.
- Yang N, Shen HM. Targeting the Endocytic Pathway and Autophagy Process as a Novel Therapeutic Strategy in COVID-19. *Int J Biol Sci.* 2020; 16: 1724–1731. doi: 10.7150/ijbs.45498.
- 30. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020; 1866: 165878. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165878.
- Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, Xu J, Obernier K, White KM, et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature* 2020; 583 (7816): 459–468. doi: 10.1038/ s41586-020-2286-9.

- Kumar S, Nyodu R, Maurya VK, Saxena SK. Morphology, genome organization, replication, and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) 2020; 23–31. doi: 10.1007/978-981-15-4814-7.3.
- 33. Wu S, Tian C, Liu P, Guo D, Zheng W, Huang X, Zhang Y, Liu L. Effects of SARS-CoV-2 mutations on protein structures and intraviral protein-protein interactions. *J Med Virol.* 2021; 93(4): 2132-2140. doi: 10.1002/jmv.26597.
- 34. Laha S, Chakraborty J, Das S, Manna SK, Biswas S, Chatterjee R. Characterizations of SARS-CoV-2 mutational profile, spike protein stability and viral transmission. *Infect Gen Evol.* 2020; 85: 104445. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104445.
- Wong NA, Saier MH Jr. The SARS-Coronavirus Infection Cycle: A Survey of Viral Membrane Proteins, Their Functional Interactions and Pathogenesis. Int J Mol Sci. 2021; 22(3): 1308. doi: 10.3390/ ijms22031308.
- 36. Xia X. Domains and Functions of Spike Protein in Sars-Cov-2 in the Context of Vaccine Design. Viruses 2021; 13(1): 109. doi: 10.3390/ v13010109.
- Henzinger H, Barth DA, Klec C, Pichler M. Non-Coding RNAs and SARS-Related Coronaviruses. Viruses 2020; 12(12): 1374. doi: 10.3390/v12121374.
- Hosseini Rad Sm A, McLellan AD. Implications of SARS--CoV-2 Mutations for Genomic RNA Structure and Host microRNA Targeting. Int J Mol Sci. 2020; 21(13): 4807. doi: 10.3390/ ijms21134807.
- 39. Mirzaei R, Mahdavi F, Badrzadeh F, Hosseini-Fard SR, Heidary M, Jeda AS, et al. The emerging role of microRNAs in the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection. Int Immunopharmacol. 2021; 90: 107204. doi: 10.1016/j. intimp.2020.107204.