نقش اهریمنی پروتئین اسپایک در کروناویروس ها: ساختار، فعالیت و تکامل

فهیمه قوامی‌پور*[۱]، پریسا نصراللهی*[۱]، بهاره دبیرمنش[۱]، حسن جلیلی[۲] و خسرو خواجه[۱]**

[۱] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی
[۲] تهران، دانشگاه تهران، دانشکده علوم و فنون نوین، گروه مهندسی علوم زیستی

چکیده

از ابتدای قرن بیست و یکم کروناویروس‌ها با منشا حیوانی عامل چندین اپیدمی پنومونی مرگبار در انسان بوده‌اند از جمله بیماری سارس، مرس و در حال حاضر بیماری کووید-۱۹ که به صورت پاندمی در جهان شیوع پیدا کرده است. ظهور این سندرم‌های حاد تنفسی بر تهدید انتقال بین گونه ایی کروناویروس‌ها و شیوع در انسان‌ها تاکید دارد. کروناویروس‌ها حاوی یک پروتئین اسپایک (spike) (S) واقع در سطح هستند که به واسطه شناخت گیرنده و الحاق غشا، عفونت را آغاز می کنند و عامل کلیدی در اختصاصیت میزبان و انتقال بین گونه‌ایی ست. تا به امروز هیچ درمان خاص یا واکسنی علیه هیچ یک از هفت کروناویروس انسانی مورد تأیید قرار نگرفته است، و این امر ضرورت بررسی اصول حاکم بر ورود ویروس و مکانیسم انتقال بین گونه‌ای را تأکید می‌کند. در این مقاله مروری، مکانیسم عفونت مورد استفاده توسط کروناویروس‌ها با تمرکز بر روی ویژگی‌های پروتئین S، و اتصال به گیرنده آن، و همچنین تفاوت‌ها در گونه‌های مختلف و فرآیندهای پروتئازی درگیر در آغاز عفونت بررسی گردیده تا تصویر کاملی از نقش آن‌ها در چرخه تکثیر کروناویروس‌ها ارائه شود و همچنین در انتها درباره روش‌های درمانی مبتنی بر پروتئین S و گیرنده ACE2 صحبت می شود.

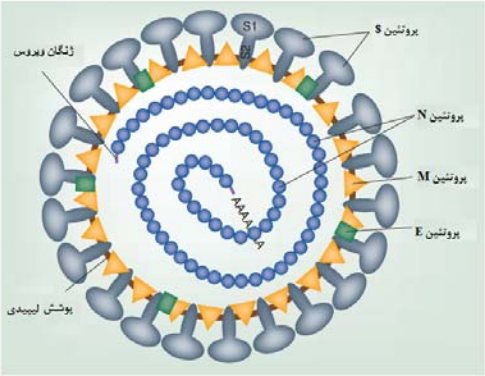
* همکاری برابر در تهیه مقاله مروری ، ** مترجم مسئول، پست الکترونیکی: khajeh@modares.ac.ir

مقدمه

کروناویروس ها (CoVs) از آغاز قرن بیست و یکم عامل شیوع پنومونی‌های مرگبار در انسان بوده‌اند. سندرم تنفسی شدید (SARS[1]) ناشی ازکروناویروس (SARS-CoV) در سال ۲۰۰۲ با با نرخ مرگ و میر ۱۰ درصد پدیدار شد و در سال ۲۰۱۲ سندرم تنفسی خاورمیانه (MERS[2]) ناشی از کروناویروس MERS-CoV در شبه جزیره عربستان با میزان مرگ و میر ۳۵ درصد ظهور کرد.SARS-CoV و MERS-CoV کروناویروس های حیوانی هستند که به ترتیب با استفاده از خفاش، گربه‌های سیوت[3] و شتر از سد بین گونه‌ایی عبور کردند و به انسان منتقل شدند. همچنین عامل بیماری فراگیر کووید-۱۹ که تمام جهان را تحت تاثیر قرار داده یک کروناویروس به نام SARS-CoV-2 بوده که به نام اختصاری nCoV -۲۰۱۹[4]نیز نامیده می‌شود (۱). این ویروس به عنوان هفتمین عضوگروه کروناویروس‌های انسانی به دنیا معرفی شد. آنالیز تبارزایی، منشاء خفاش و مورچه‌خوار پولک‌دار[5] را برای این ویروس نشان می‌دهد. خفاش‌ها به دلیل داشتن سیستم IFN [6]منحصربه فرد امکان همزیستی با ویروس‌های مختلف را دارند (۲). بررسی درخت تبارزایی مبتنی بر ژنگان[7] های کامل نشان می‌دهد که SARS-CoV-2 از نظر کل توالی ژنگان به CoV خفاش (۹۶٪)و SARS-CoVs (۷۹٪) نزدیک است و با MERS-CoVs فاصله دارد (۵).

کروناویروس های کروی، پوشش‌دار و دارای RNA تک رشته‌ای مثبت (sense)[8] هستند که می توانند هم حیوانات و هم انسان‌ها را آلوده کنند (۵). کروناویروس‌ها بر اساس ویژگی‌های ژنوتیپی و سرولوژیک به چهار جنس[9] تقسیم می شوند: آلفا، بتا، گاما و دلتاکروناویروس (۸). در میان هفت کروناویروس شناخته شده در انسان (HCoVs)، کروناویروس‌های HCoV-229E و HCoV-NL63 متعلق به جنس *آلفاکروناویروس* و HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV و MERS-CoV متعلق به جنس *بتاکروناویروس* (۸) هستند.

SARS-CoV-2 مانند SARS-CoV و MERS-CoV، به گروه بتاکروناویروس‌ها تعلق می‌گیرد (۹). سطح کروناویروس با برجستگی‌های چماقک شکل[10] تزئین شده که گلیکوپروتئین تریمری اسپایک[11] نام دارد.



شکل ۱- طرح واره‌ای از یک ذره کروناویروس که اجزای ساختاری ویروس را نشان می‌دهد (۱۲).

علاوه بر پروتئین اسپایک پروتئین‌های ساختاری دیگری به نام پروتئین M، E، و N در کروناویروس‌ها وجود دارند که طیف گسترده‌ای از عملکردها از جمله محافظت از ژنگان ویروس، مونتاژ ویروس و مهار سیستم ایمنی ذاتی سلول را انجام می‌دهند (شکل ۱) (۱۱).

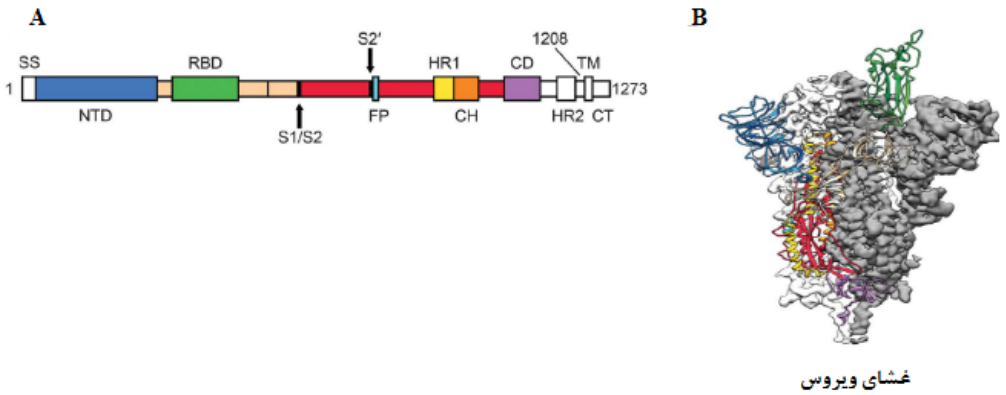
پروتئین اسپایک ویروس کرونا علاوه بر واسطه ورود ویروس، عامل مهم تعیین کننده طیف میزبان و گرایش[12] سلولی/ بافتی است (۱۳). در این بررسی، ابتدا ویژگی‌های پروتئین S، ویژگی-های اتصال به گیرنده، نقش آن در انتقال بین گونه‌ای SARS-CoV، فرآیند شکاف اولیه و گذر کانفورماسیونی پروتئین S که لازمه الحاق غشایی است معرفی شده و در انتها روش‌های درمانی ارائه شده بر پایه پروتئین S وگیرنده ACE2 ارائه می شود.

اتصال و ورود کروناویروس به سلول و الحاق غشایی

ورود ذرات ویروس به یک سلول میزبان نیاز به شناختن پروتئین های خاص سطح سلول دارد، که به عنوان گیرنده برای پروتئین S ویروس عمل می‌کنند. گیرنده‌های سلولی برای برخی از HCoVs آنزیم های سطح سلولی از جمله آمینوپپتیداز N (APN)،[13] برای کروناویروس HCoV 229E، آنزیم مبدل آنژیوتانسین ۲ (ACE2)[14] برای کروناویروس‌های HCoV-NL63 و SARS-CoV و آنزیم دی پپتیدیل پپتیداز ۴ (DPP4)[15] برای کروناویروس MERS-CoV است. ویروس SARS-CoV-2 هم مشابه ویروس SARS-CoV برای ورود به سلول میزبان از ACE2 به عنوان گیرنده سلولی استفاده می‌کند (۱۴).

[1] severe acute respiratory syndrome
[2] middle east respiratory syndrome
[3] civet
[4] *2019- novel coronavirus*
[5] *pangolin*
[6] *interferon system*
[7] genome
[8] *sense*
[9] *genera*
[10] club-like
[11] spike

[12] tropism
[13] amino-peptidase n
[14] angiotensin-converting enzyme 2
[15] dipeptidyl peptidase 4



شکل ۲- (A) طرح واره‌ای از پروتئین اسپایک (S) ویروس SARS-CoV-2. توالی سیگنال (ss)، ناحیه انتهای N، ناحیه اتصال به گیرنده (RBD)، جایگاه برش پروتئازی S1/S2، جایگاه برش پروتئازی S2' (S2')، پپتید الحاق (FP)، ناحیه تکراری هفت‌تایی ۲و۱ (HR1,HR2) و مارپیچ مرکزی (CH)، ناحیه اتصالی (CD)، ناحیه عبور از غشا (TM) و دم سیتوپلاسی (CT). فلش‌ها جایگاه‌های برش را نشان می‌دهند . **(B)** ساختار قبل‌الحاق پروتئین S ویروس SARS-CoV-2 سه ناحیه اتصال به گیرنده به رنگ سبز (نمایش ربانی)، طوسی و سفید نمایش داده شده اند. بخش‌های دیگر پروتئین S براساس رنگ‌های طرح واره‌ی A مشخص شده اند (۲۲).

پروتئین S کروناویروس‌ها عضو کلاس پروتئین الحاق ویروسی کلاس ۱[1] است که شامل ویروس آنفلوانزا، ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) و ویروس ابولا نیز هست که با اتصال به گیرنده میزبان و تغییرات کانفورماسیونی الحاق غشای ویروس با سلول را هنگام ورود تقویت می‌کنند (۱۳). پروتئین S یک پروتئین تریمری[2] است و هر مونومر از دو زیرواحد S1 و S2 تشکیل شده است (شکل ۱) که زیرواحد S1 در تشخیص گیرنده‌های سلول میزبان تخصص دارد و به طور معمول از نظر توالی بین CoV های مختلف نسبت به زیرواحد S2 متغیرتر است (۱۵). این زیرواحد دارای دو ناحیه مجزا به نام ناحیه انتهای N (NTD) و ناحیهی اتصال به گیرنده (RBD)[3] که هر دو مورد در اتصال به گیرنده‌ها نقش دارند (۱۶). NTD[4]، مسئول متصل شدن شدن به قند و گیرنده‌های قندی است، که تنها استثنای شناخته شده آن NTD بتاکروناوویروس MHV[5] [6] است که گیرنده پروتئینی CEACAM1[7] را شناسایی می‌کند (۱۷). RBD مسئول تشخیص گیرنده‌های پروتئین ACE2، APN و DPP4[8] است. در مورد تشخیص گیرنده‌های پروتئینی، NTD ممکن است با شناخت مولکول‌های قندی خاص، اتصال اولیه ویروس به سطح سلول را تسهیل کند. بنابراین میانکنش گیرنده S1 یک عامل کلیدی تعیین کننده گرایش بافت و طیف میزبان CoV ها است (۱۸).

زیرواحد S2 که بخش غشایی پروتئین S است، ماشین الحاق غشایی S2[9] برای الحاق غشا ویروس با غشای میزبان را تشکیل می‌دهد. دو جایگاه برش S1/S2 (بین دوزیرواحد) و جایگاه S2' در زیرواحد S2 قرار دارد. زیرواحد S2 شامل پپتید الحاق[10]، دو ناحیه تکراری هفت‌تایی[11] (به نام HR1 و HR2) و ناحیه گذرنده از غشا است (شکل ۲A). پروتئین S دارای دو کانفورماسیون ساختاری به نام‌های پیش‌الحاق[12] و پس‌الحاق[13] است. زیر واحد S1 با ساختار خود کانفورماسیون پیش‌الحاق پروتئین S را حفظ می‌کند و اجازه نمی‌دهد که ماشین الحاق غشایی که در زیرواحد S2 قرار دارد فعال شود. پپتید الحاق در پروتئین‌های S کروناویروس در پایین دست انتهای N از جایگاه برش S2' قرار دارد و به عنوان یک پپتید الحاق داخلی به حساب می‌آید. این پپتید الحاق یک مارپیچ کوتاه و یک حلقه را تشکیل داده، که اکثر باقیمانده[14]های آن آبگریز بوده که در داخل ساختار پیش الحاق[15] پنهان می‌شوند (شکل ۲B) (۱۹). برش توسط پروتئازهای میزبان در جایگاه برش S1/S2 پروتئین S و برش در جایگاه S2' آغازگر فعال شدن ماشین‌الحاق S2 و گذر کانفورماسیونی از وهله پیش‌الحاق به پس‌الحاق[16] می‌شود و این گذر کانفورماسیونی الحاق غشای ویروس و میزبان را باعث می‌شود (۲۰). این فرآیند به اصطلاح آغازگر به شدت به

[1] class I viral fusion protein
[2] trimeric
[3] receptor binding domain
[4] N-terminal domain
[5] mouse hepatitis virus
[6] murine hepatitis virus
[7] carcinoembryonic antigen cell-adhesion molecules
[8] dipeptidyl peptidase 4

[9] S 2 fusion machinery
[10] fusion peptide
[11] the heptad-repeat
[12] prefusion conformation
[13] postfusion conformaion
[14] residue
[15] prefusion structure
[16] pre-to postfusion transition

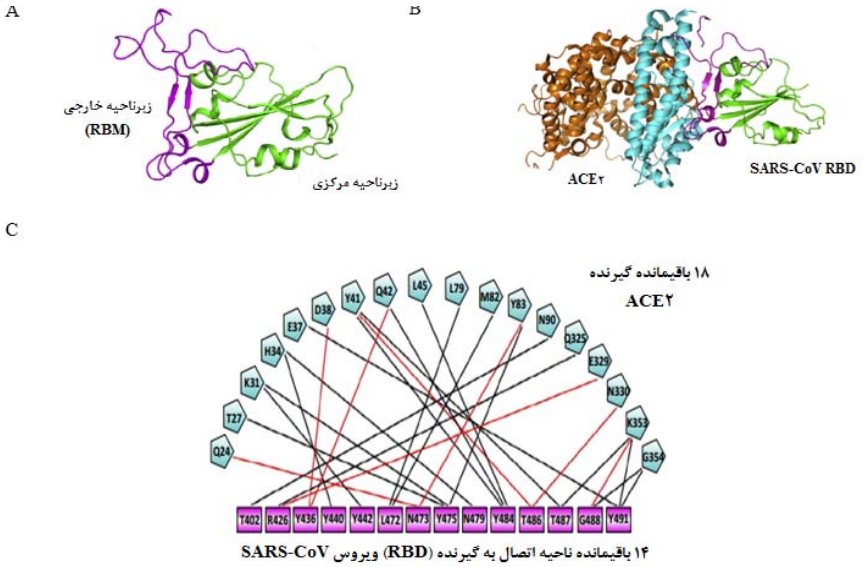
الگوهای فضایی آنزیم‌هایی وابسته است که یکی دیگر از عوامل اصلی موثر بر گرایش سلولی و مسیر ورود CoV ها است (۲۱)

بررسی‌های انجام شده شباهت توالی اسیدآمینه‌ایی پروتئینS ویروس SARS-CoV-2 و SARS-CoV را ۷۷٪ نشان می‌دهد. لذا این پروتئین در دو ویروس دارای درجه بالایی از همسانی است (۲۳). ویروس SARS-CoV-2 دارای چندین جایگزینی اسید آمینه ایی در ناحیه RBD است (۲۴).

به منظور درک نحوه گذشتن کروناویروس‌ها از سدهای بین گونه‌ای و انتقال این ویروس‌های حیوانی به انسان، شناخت زیرواحد S1 کروناویروس‌ها و واکنش‌های پروتئازی انجام شده با پروتئین S بسیار حائز اهمیت است. تحقیقات گسترده انجام شده در چند سال گذشته بر روی ویروس SARS-CoV و MERS-CoV در زمینه انتقالات بین گونه‌ایی، در شناخت بیشتر ویروس نوظهور SARS-CoV-2 بسیار کمک کننده خواهد بود. ناحیه RBD زیرواحد S1 ویروس SARS-CoV شامل یک ساختار هسته‌ای و یک زیر ناحیه ی خارجی یا موتیف RBM است (۲۵). ساختار هسته یک بتا شیت آنتی پارالل (anti-parallel beta-sheet) پنج رشته‌ای است. RBM یک سطح بیرونی کمی مقعر را برای اتصال ACE2 ارائه می‌دهد. پایه‌ی این سطح مقعر یک بتاشیت آنتی پارالل دو رشته‌ایی کوتاه و دو برآمدگی تشکیل شده توسط حلقه‌ها (لوپ) است (شکل ۳A)(۱۳). ACE2 به عنوان گیرنده ویروس SARA-CoV و همچنین ویروس جدید SARS-CoV-2 یک گلیکوپروتئین غشایی نوع I است که در انتهای N، حاوی ناحیه پیرامونی بزرگ متشکل از دو لوب مارپیچ می‌باشد (۲۵ و ۲۶). ساختار کمپلکس SARS-CoV RBD متصل شده به ACE2 نشان می‌دهد که ناحیه RBD ویروسی از طریق RBM به گیرنده ACE2 متصل می‌شود (شکل ۳B).

ناحیه اتصال بین RBM و گیرنده ACE2 شامل حداقل ۱۸ باقیمانده اسیدآمینه ای از گیرنده و ۱۴ باقیمانده از RBM ویروس است که با هم تشکیل شبکه‌ای از تماس‌های آبدوست را می‌دهند (شکل ۳C). دو باقیمانده مهم ACE2 انسانی در اتصال به ویروس، Lys31 و Lys353 هستند (۲۵).

مسیر انتقال بین گونه‌ای SARS-CoV به خوبی شناخته شده است. شواهد نشان می‌دهد که میزبان طبیعی این ویروس خفاش‌ها هستند (۲۴). در ادامه تحقیقات به دلیل اینکه گیرنده ACE2 مربوط گربه‌های سیوت و سگ های راکون (raccoon dogs) به خوبی توسط SARS-CoV شناخته می‌شوند این حیوانات به عنوان میزبان های واسط برای SARS-CoV معرفی شدند (۲۸). ACE2 موش قابلیت اتصال با SARS-CoV را داشته اما تمایل این اتصال در مقایسه با نوع انسانی بسیار کمتر است (۲۹). این امر به این دلیل است که گیرنده موش دارای جهش Lys به His در موقعیت ۳۵۳ است و بنابراین میانکنش-های ایجاد شده توسط باقیمانده لیزین دیگر وجود ندارند. ACE2 موش صحرایی نیز دارای این جهش K353H است.



شکل ۳- ویژگی‌های پروتئین اسپایک ویروس SARS-CoV. **(A)** ساختمان ناحیه‌ی اتصال به گیرنده (RBD) **(B)** ساختمان کمپلکس بین RBD ویروس و گیرنده ACE2 **(C)** میانکنش‌های باقیمانده‌ایی در ناحیه اتصال RBD و ACE2. خط‌های سیاه پیوندهای واندروالسی و قرمز پیوندهای هیدروژنی هستند (۲۷).

علاوه بر این، دارای یک جایگاه گلیکوزیلاسیون اضافی در موقعیت ۸۲ است. این بخش های قندی از اتصال RBD ویروس سارس به گیرنده موش صحرایی ممانعت به عمل می‌آورد (۲۵). بنابراین بعید به نظر می‌رسد که این دو گونه در بیماری انگلی SARS-CoV درگیر شوند.

نکته قابل توجه این است که، ۱۸ باقیمانده گیرنده ACE2 در ناحیه اتصال به ویروس، در گونه‌های مختلف دچار جهش شده‌اند که در جدول ۱ آورده شده است. با وجود این جهش‌ها، ACE2در ۹ گونه اول جدول توسط ویروس SARS-CoV شناسایی می‌شود. در مورد موش و خفاش (از نوع R. sinicush) این شناسایی با کارایی پایین انجام می‌شود و در مورد موش صحرایی و خفاش (از نوعR. pearsonii) این شناسایی توسط ویروس صورت نمی‌گیرد (۲۸).

پروتئین S در SARS-CoV برای اتصال به ACE2 به خوبی سازگار شده است. مقایسه توالی RBD از SARS-CoV جدا شده از انسان و گربه‌های سیوت شش جایگزینی باقیمانده‌ایی را نشان می‌دهد (۳۰)، از این بین سه مورد (در موقعیت های ۴۷۲، ۴۷۹، و ۴۸۷) جزو ۱۴ باقیمانده‌ی شرکت‌کننده در اتصال با ACE2 هستند.

جهش های K479N و S487T در مطالعات متعددی به عنوان مهمترین تغییرات برای سازگاری SARS-CoV RBD برای گیرنده انسانی گزارش شده است. با این دو جهش، ویروس SARS-CoV در مقایسه با ACE2 در گربه‌های سیوت محکمتر به ACE2 انسانی متصل می‌شود (۳۱). اعتقاد بر این است که این اتصال محکمتر به حذف بارهای نامطلوب و تماس های اضافی ایجاد شده توسط گروه متیل T487 در ناحیه اتصال مربوطه می‌شود (۳۲).

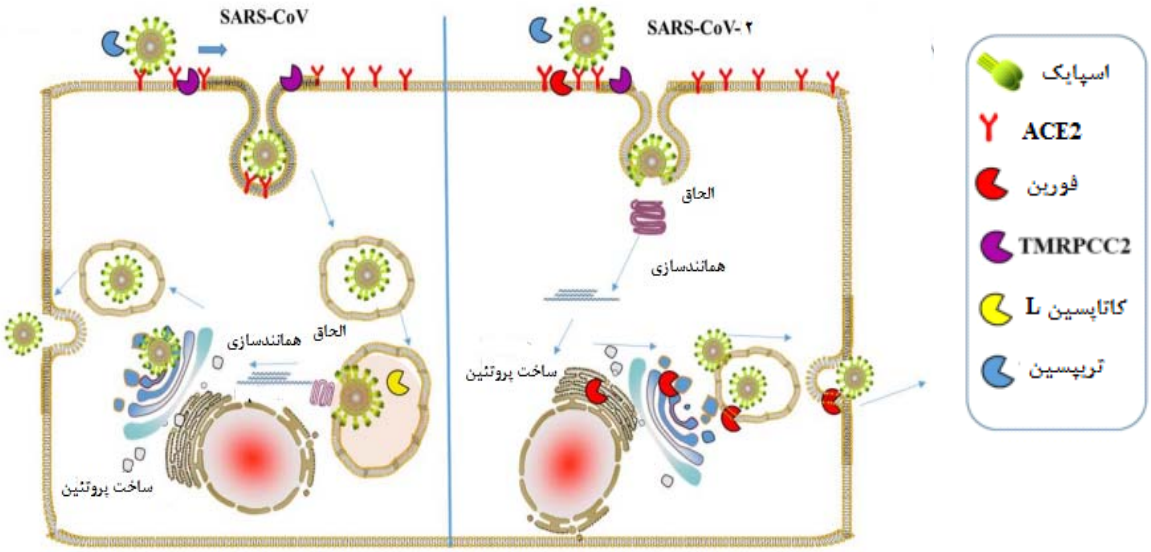
برش‌های پروتئازی توسط پروتئازهای مختلف میزبان برای فرایند الحاق غشایی ضروری اند. برش پروتئازی در جایگاه برشی S1/S2 (شکل ۲A) می تواند باعث ایجاد دو زیر واحد مرتبط به صورت غیر کووالانی شود. برش در جایگاه S1/S2 می‌تواند یا در لحظه خروج ویروس مانند ویروس MHV، MERS-CoV و SARS-CoV-2 انجام شود (۳۳)، یا به محض مواجه شدن با سلول هدف، مانند ویروس SARS-CoV اتفاق بیفتند (۳۴). این اولین رویداد برش همراه با اتصال به گیرنده میزبان، باعث ایجاد برش بعدی در محل S2’ پروتئین S کروناویروس می‌شود.

پروتئولیز در جایگاه محافظت شده دوم یعنی جایگاه برشی S2’ برای فعال سازی الحاق کلیه پروتئین های S کروناویروس ضروری است و می تواند در غشای میزبان یا در محفظه های داخل سلولی (آندوزوم) سلول هدف اتفاق بیفتد (۸ و ۱۳). در ادامه این مکانیسم برشی در مورد کروناویروس‌های مختلف شرح داده می‌شود.

در مورد ویروس MERS-CoV برش در محل S1/S2 توسط پروتئاز فورین (furin) در هنگام خروج ویروس در مسیر اگزوسیتوز باعث ایجاد ویروس با پروتئین S برش خورده می‌شود، این ویروس با پروتئین S برش خورده بعد از اتصال به گیرنده DPP4 کانفورماسیون آن سریعتر تغییر می‌کند در نتیجه جایگاه S2’ در معرض پروتئازهای میزبان (مانند (transmembrane protease) که در روی غشا یا نزدیکی آن است)

جدول ۱- مقایسه اسید آمینه‌های ACE2 در گونه‌های مختلف که توسط ناحیه RDB ویروس SARS-CoV شناسایی می‌شوند (۲۷).

جایگاه	۲۴	۲۷	۳۱	۳۴	۳۷	۳۸	۴۱	۴۲	۴۵	۷۹	۸۲	۸۳	۹۰	۳۲۵	۳۲۹	۳۳۰	۳۵۳	۳۵۴
گونه ها																		
انسان	Q	T	K	H	E	D	Y	Q	L	L	M	Y	N	Q	E	N	K	G
میمون سبز آفریقایی	Q	T	K	H	E	D	Y	Q	L	L	M	Y	N	Q	E	N	K	G
ماکاک (macaque)	Q	T	K	H	E	D	Y	Q	L	L	M	Y	N	Q	E	N	K	G
مارمست(marmoset)	Q	T	K	H	E	D	H	E	L	L	T	Y	N	Q	E	N	K	Q
همستر	Q	T	K	Q	E	D	Y	Q	L	L	N	Y	N	Q	E	N	K	G
گربه	L	T	K	H	E	E	Y	Q	L	L	T	Y	N	Q	E	N	K	G
سیوت (civet)	L	T	T	Y	Q	E	Y	Q	L	V	T	Y	D	Q	E	N	K	G
راکون	L	T	N	N	E	E	Y	Q	L	Q	T	Y	D	Q	E	N	K	G
فرت (ferret)	L	T	K	Y	E	E	Y	Q	L	H	T	Y	D	E	Q	N	K	R
موش	N	T	N	Q	E	D	Y	Q	L	T	S	F	T	Q	A	N	H	G
خفاش (R. sinicus)	R	T	E	S	E	N	Y	Q	L	L	N	Y	N	E	N	N	K	G
رت	K	S	K	Q	E	D	Y	Q	L	I	N	F	N	P	T	N	H	G
خفاش (R. pearsonii)	R	T	K	H	E	D	H	E	L	L	D	Y	N	E	N	N	K	D



شکل ۴- طرح واره ازمدل ارائه شده برای ورود ویروس SARS-CoV و SARS-CoV-2. ویروس SARS-CoV ازطریق اندوسیتوز به واسطه گیرنده وارد سلول می‌شود و به دنبال الحاق غشایی، ژنگان ویروس درون سیتوپلاسم آزاد می‌شود. پس از اتصال ویروس SARS-CoV-2 به گیرنده، الحاق غشایی با غشای سلول انجام می‌شود و ژنگان ویروس مستقیما درون سیتوپلاسم آزاد می‌شود (۳۷).

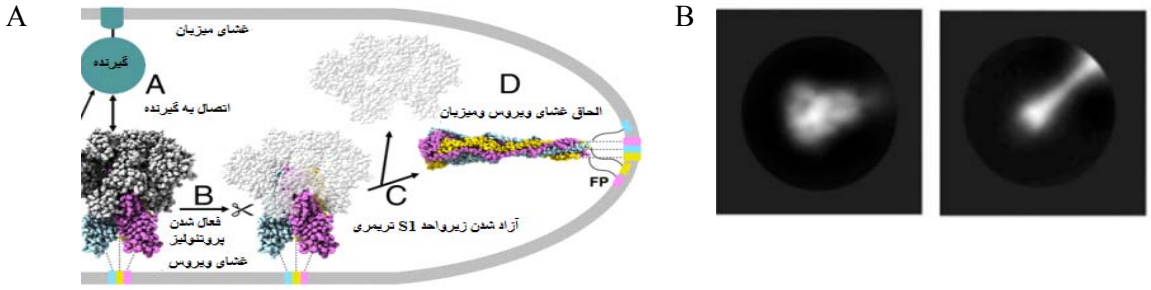
قرار می‌گیرد و به دنبال آن تغییرات کانفورماسیونی اتفاق می‌افتد که منجر به الحاق پوشش ویروس و غشای سیتوپلاسمی می‌شوند و ژنگان ویروس به طور مستقیم در سیتوپلاسم آزاد می‌شود (ورود پیش رس (early entry)).

در مورد این ویروس روش ورود دیگری هم شناسایی شده است که در آن MERS-CoV با گلیکوپروتئین S بدون برش با فورین، بعد از اتصال به گیرنده از طریق اندوزوم‌های سلول های هدف حمل می‌شود که در آن کاتپسین L یا پروتئازهای دیگر از طریق برش جایگاه های برش باعث الحاق غشای ویروس و اندوزوم می شوند و ژنگان ویروس در سیتوپلاسم میزبان آزاد می‌شود (ورود دیررس؛ late entry) (۳۵). در مورد SARS-CoV، جایگاه S1/S2 پروتئین S توسط پروتئازها در طول بسته بندی ویروس بریده نمی شود و از این رو در ویروس های بالغ دست نخورده باقی می‌ماند. جایگاه برش S1/S2 در پروتئین اسپایک SARS-CoV توسط پروتئازهای خارج سلولی (به عنوان مثال، الاستاز در مجاری تنفسی) و پروتئازهای سطح سلولی (به عنوان مثال، protease type II transmembrane serine در سطح سلول های ریه) بعد از اتصال به گیرنده ACE2 بریده می‌شود. در ادامه ویروس از طریق اندوسیتوز وارد سلول های میزبان می شود و پروتئین S آن در جایگاه S2’ توسط پروتئازهای لیزوزومی (به عنوان مثال، cathepsin l و cathepsin B پردازش می شود و الحاق غشایی بین ویروس و اندوزوم باعث رهایش ژنگان ویروس به سیتوپلاسم می‌شود (ورود دیررس) (شکل ۴).

پروتئازها به کار گرفته در این مسیر ورود به احتمال زیاد در تروپیسم ریه‌ایی SARS-CoV نقش دارند (۱۵ و ۳۳). در مورد ویروس SARS-CoV-2 برش در محل S1/S2 توسط پروتئاز فورین در هنگام خروج ویروسی در مسیر اگزوسیتوز باعث ایجاد ویروس با پروتئین S برش خورده می‌شود، این نوع ویروس با پروتئین S برش خورده بعد از اتصال به گیرنده ACE2 سریعتر کانفورماسیون‌شان تغییر می‌کند در نتیجه جایگاه S2’ در معرض پروتئازهای میزبان (مانند TMPRSS2که در روی غشا یا نزدیکی آن است) قرار می‌گیرد.

به دنبال آن تغییرات کانفورماسیونی اتفاق می‌افتد که منجر به الحاق پوشش ویروس و غشای سیتوپلاسمی می شوند و ژنگان ویروس به طور مستقیم در سیتوپلاسم آزاد می‌شود (ورود پیشرس؛ early entry) (شکل ۴) (۳۷).

اینکه چگونه این فرایندهای برشی امکان الحاق غشایی را فراهم می‌کند به این صورت است که پس از اتصال زیرواحد S1 به گیرنده مربوطه و بریده شدن جایگاه های برشی پروتئین، زیر واحدS1 جدا می‌شود. در نتیجه محدودیت های تحمیل شده بر روی زیرواحد S2 به عنوان ماشین الحاق غشایی، برداشته می-شود و ساختاری باز ایجاد می‌شود. زیرواحد S2 در این حالت یک ساختار دمبلی شکل (structure dumbbell-shaped) به خود می‌گیرد که ساختاری میله‌ای شکل (rod-like structure) در وسط و کروی (globular structure) شکل در هر دو انتها دیده می شود و ایجاد این ساختار باعث الحاق غشایی می‌شود.



شکل ۵- (A) مدل پیشنهاد شده برای ورود کروناویروس‌ها، پس از اتصال زیرواحد S1 به گیرنده مربوطه و بریده شدن جایگاه‌های برشی پروتئین، زیر واحدS1 جدا می‌شود و این فرایند باعث تغییر کانفورماسیون زیرواحد S2 می‌گردد که این تغییر عامل کلیدی الحاق غشایی است **(B)** تصویر میکروسکوپ الکترونی از حالت پیش‌الحاق و پس‌الحاق از SARS-CoV S (۳۸).

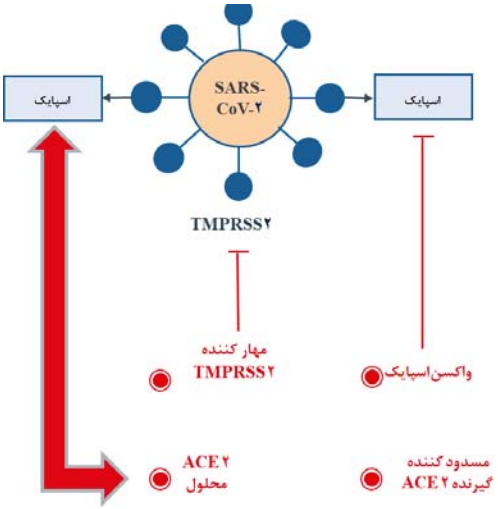
ساختار میله‌ای شکل ساختاری از دسته مارپیچ شش تایی[1] دارد که توسط بخش‌های HR 1 و HR2 [2](شکل ۲) تشکیل شده است، در حالی که ساختار کروی شکل تشکیل شده در هر دو انتها مربوط به ناحیه انتهای N تا HR1 (پپتید الحاق در این ناحیه است) و ناحیه بین بخش‌های HR1 و HR2 زیرواحد S2 است. سه تا پپتید الحاق که از انتهای N تا HR1 قرار دارند و قبلا در کانفورماسیون پیش‌الحاق پروتئین S مدفون بودند به خاطر برش در جایگاه 'S2 در کانفورماسیون پس‌الحاق پروتئین S در معرض قرار می‌گیرند و به هم متصل می‌شوند و در غشا جای می‌گیرند (شکل ۵) (۳۸).

دارو و واکسن

در حال حاضر هیچ واکسن یا داروی ضد ویروس تایید شده ایی برای SARS-CoV و SARS-CoV -2 پیدا نشده است. با توجه به نقش گیرنده ACE2 در عفونت‌زایی ویروس SARSCoV -2، چندین روش درمانی بالقوه مرتبط با ACE2 مطرح شده است.

مسیرهای درمانی شامل واکسن‌هایی برپایه پروتئین اسپایک، مهار کردن آنزیم پروتئازی TMPRSS2، مسدود کردن گیرنده سطحی ACE2 از طریق پادتن‌ها یا پپتیدهای ضد ACE2 و در آخر فرم محلول ACE2 است. فرم محلول ACE2 از طریق اتصال رقابتی به ویروس، ورود ویروس را به سلول آهسته می‌کند و بنابراین گسترش ویروس کاهش می‌یابد و در نتیجه ACE2 سطح سلولی از طریق عملکرد آنزیمی منحصر به فردش از بافت ریه محافظت می‌کند. در شکل ۶ این روش‌های درمانی به طور خلاصه آورده شده است (۳۹).

در مورد SARS-CoV یا MERS-CoV و همچنین ویروس جدید SARS-CoV-2 راهکارهای مختلف ساخت واکسن، مانند استفاده از ویروس های غیرفعال، ویروس های ضعیف زنده، واکسن‌های مبتنی بر حامل ویروسی، واکسن‌های زیرواحدی، پروتئین‌های نوترکیب و واکسن های DNA توسعه یافته‌اند، اما تاکنون فقط در حیوانات مورد ارزیابی قرار گرفته اند و تایید نشده‌اند. در این میان پروتئین S، به عنوان هدف اصلی پادتن-های خنثی‌کننده سیستم ایمنی بدن هنگام عفونت، در طراحی واکسن بسیار حائز اهمیت است (۴۰).



شکل ۶- مسیرهای درمانی پیشنهادی برای بیماری کووید ۱۹ بر پایه پروتئین اسپایک (۳۹). این مسیرها شامل طراحی واکسن برپایه پروتئین اسپایک، استفاده از مهارکننده‌های پروتئاز TMPRSS2، مسدود کردن گیرنده ACE2 و استفاده از فرم محلول پروتئین نوترکیبACE2 .

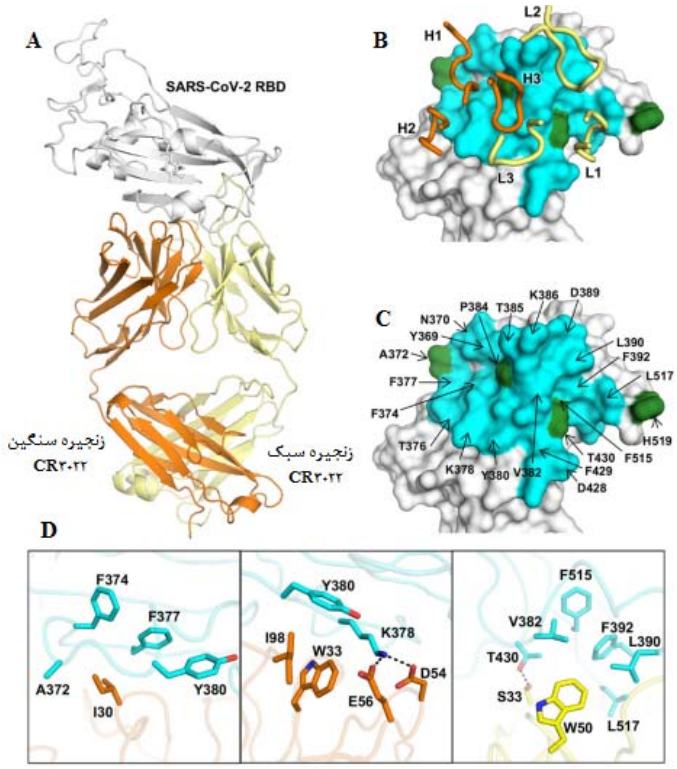
Yuan و همکارانش بعد از مشخص شدن در مطالعه‌ای دیگر پادتن خنثی‌کننده CR3022 جدا شده از بیمار بهبود یافته از سارس به ناحیه RBD پروتئین S ویروس SARS-CoV-2 متصل می‌شود، ساختار کریستالی این کمپلکس را تهیه کرده‌اند. این ساختار کریستالی امکان درک نحوه تشخیص ویروس SARS-CoV-2 توسط پادتن‌ها و کشف اپی‌توپ واکنش متقابل (a cross-

[1] six helix-bundle
[2] heptad repeat regions

reactive epitope) را فراهم می‌کند (شکل ۷). شناسایی و دست یافتن به این اپی‌توپ‌ها، نه تنها امکان طراحی واکسن علیه ویروس SARS-CoV-2 را فراهم می کند بلکه مسیر را برای شناسایی پادتن برای کروناویروس‌های دیگر در آینده هموار می‌کند (۴۱).

جمع بندی

ظهور بیماری همه گیر مرتبط با کروناویروس ها از دهه گذشته و تمرکز بر مکانیسم‌های انتقال بین گونه‌ای این ویروس‌ها، تحقیقات در مورد این ویروس‌ها را احیا کرده است. پروتئین اسپایک کروناویروس‌ها یک ماشین مولکولی چند منظوره و واسطه ورود کروناویروس به سلول های میزبان است. پروتئین اسپایک ابتدا از طریق زیر واحد S1 خود به یک گیرنده روی سطح سلول میزبان متصل می‌شود و سپس غشاهای ویروسی و میزبان را از طریق زیرواحد S2 خود الحاق می‌کند. دو ناحیه در S1 کروناویروس های مختلف، انواع گیرنده های میزبان را تشخیص می دهند و منجر به اتصال ویروس می شوند. پروتئین اسپایک در دو کانفورماسیون ساختاری مجزا، پیش الحاق و پس الحاق وجود دارد، بطوریکه انتقال از کانفورماسیون پیش‌الحاق به پس‌الحاق پروتئین باید آغاز شود تا منجر به الحاق غشا، ورود و در نهایت تکثیر ویروس شود. این بررسی بر درک ما از پروتئین اسپایک کروناویروس‌ها برای نشان دادن مبنای انتقال بین گونه متمرکز شده و به بررسی دانش فعلی در مورد ساختارها و تکامل عملکرد پروتئین‌های اسپایک کروناویروس‌ها پرداخته است که دانش آن می تواند در پیشگیری یا پیش‌بینی وقایع بعدی کمک کند و راهکارهای ممکن را برای طراحی منطقی واکسن‌ها و درمان برپایه‌ی اسپایک و ACE2 پیشنهاد دهد.



شکل ۷- (A) ساختار کریستالی ناحیه Fab پادتن CR3022 در کمپلکس با RBD ویروس SARS-CoV-2. زنجیره سنگین پادتن نارنجی، زنجیره سبک پادتن زرد و RBD ویروس طوسی روشن نمایش داده شده است. **(B و C)** باقیمانده‌های اپی‌توپی آبی (حفظ شده بین ویروس SARS-COV و SARS-COV-2) و سبز(حفظ نشده بین ویروس SARS-COV و SARS-COV-2) نمایش داده شده‌اند. حلقه-های CDR (complementarity determining region) پادتن هم نشان داده شده است. در شکل C باقیمانده‌های اپی‌توپی که در اتصال به پادتن CR3022 مهم هستند مشخص شده-اند **(D)** میانکنش‌های کلیدی بین CR3022 و RBD برجسته شده‌اند. (رنگ‌ها مشابه قسمت A و پیوندهای هیدروژنی با نقطه چین نشان داده شده است) (۴۱).

منابع

1. Lu R, Zhao X, Li J, et al (2020) Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. Lancet 395:565–574
2. Zhou P, Tachedjian M, Wynne JW, et al (2016) Contraction of the type i IFN locus and unusual constitutive expression of IFN-α in bats. Proc Natl Acad Sci U S A 113:2696–2701 . doi: 10.1073/pnas.1518240113
3. Wu A, Peng Y, Huang B, et al (2020) Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. Cell Host Microbe 27:325–328 . doi: 10.1016/j.chom.2020.02.001
4. Singhal T (2020) A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). 87:281–286
5. Lai MC (2007) Coronaviridae. Fields Virol 1305–1318
6. Adams MJ, King AMQ, Carstens EB (2013) Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). Arch Virol 158:2023–2030
7. van Regenmortel MH V, Fauquet CM, Bishop DHL, et al (2000) Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press
8. Rockett R (2010) Human coronaviruses. PCR Clin Microbiol An Aust Int Perspect 273–275 . doi: 10.1007/978-90-481-9039-3_42
9. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, et al (2020) The proximal origin of SARS-CoV-2. Nat Med 2–4 . doi: 10.1038/s41591-020-0820-9
10. Wang L, Wang Y, Ye D, Liu Q (2020) A review of the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) based on current evidence. Int J

Antimicrob Agents 105948 . doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105948
11. Carter J, Saunders V, Saunders VA (2007) Virology: principles and applications. John Wiley & Sons
12. Alsaadi EAJ, Jones IM (2019) Membrane binding proteins of coronaviruses. 14:275–286
13. Li F (2016) Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. Annu Rev Virol 3:237–261 . doi: 10.1146/annurev-virology-110615-042301
14. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al (2020) SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell 1–10 . doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052
15. Masters PS (2006) The molecular biology of coronaviruses. Adv Virus Res 66:193–292
16. Li F (2012) Evidence for a common evolutionary origin of coronavirus spike protein receptor-binding subunits. J Virol 86:2856–2858
17. Peng G, Sun D, Rajashankar KR, et al (2011) Crystal structure of mouse coronavirus receptor-binding domain complexed with its murine receptor. Proc Natl Acad Sci 108:10696–10701
18. Schwegmann-Weßels C, Herrler G (2006) Sialic acids as receptor determinants for coronaviruses. Glycoconj J 23:51–58
19. Chen Y, Rajashankar KR, Yang Y, et al (2013) Crystal Structure of the Receptor-Binding Domain from Newly Emerged Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. J Virol 87:10777–10783 . doi: 10.1128/jvi.01756-13
20. Tortorici MA, Veesler D (2019) Structural insights into coronavirus entry, 1st ed. Elsevier Inc.
21. Millet JK, Whittaker GR (2015) Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. Virus Res 202:120–134
22. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al (2020) Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. Science (80-) 367:1260–1263
23. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, et al (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature 579:270–273
24. Ge X-Y, Li J-L, Yang X-L, et al (2013) Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. Nature 503:535–538
25. Li F, Li W, Farzan M, Harrison SC (2005) Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. Science (80-) 309:1864–1868
26. Towler P, Staker B, Prasad SG, et al (2004) ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis. J Biol Chem 279:17996–18007
27. Lu G, Wang Q, Gao GF (2015) Bat-to-human: spike features determining 'host jump'of coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond. Trends Microbiol 23:468–478
28. Hou Y, Peng C, Yu M, et al (2010) Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) proteins of different bat species confer variable susceptibility to SARS-CoV entry. Arch Virol 155:1563–1569
29. Li W, Greenough TC, Moore MJ, et al (2004) Efficient replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus in mouse cells is limited by murine angiotensin-converting enzyme 2. J Virol 78:11429–11433
30. Graham RL, Baric RS (2010) Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. J Virol 84:3134–3146
31. Qu X-X, Hao P, Song X-J, et al (2005) Identification of two critical amino acid residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for its variation in zoonotic tropism transition via a double substitution strategy. J Biol Chem 280:29588–29595
32. Reguera J, Mudgal G, Santiago C, Casasnovas JM (2014) A structural view of coronavirus–receptor interactions. Virus Res 194:3–15
33. Frana MF, Behnke JN, Sturman LS, Holmes K V (1985) Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: host-dependent differences in proteolytic cleavage and cell fusion. J Virol 56:912–920
34. Shulla A, Heald-Sargent T, Subramanya G, et al (2011) A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry. J Virol 85:873–882
35. Park JE, Li K, Barlan A, et al (2016) Proteolytic processing of middle east respiratory syndrome coronavirus spikes expands virus tropism. Proc Natl Acad Sci U S A 113:12262–12267 . doi: 10.1073/pnas.1608147113
36. Li H, Wu C, Yang Y, et al (2020) Furin, a potential therapeutic target for COVID-19. ChinaXiv 202002.00062 . doi: 10.12074/202002.00062
37. Wu C, Yang Y, Liu Y, Zhang P Furin , a potential therapeutic target for COVID-19. doi 10.12074/202002.00062
38. Walls AC, Tortorici MA, Snijder J, et al (2017) Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. Proc Natl Acad Sci 114:11157–11162
39. Zhang H, Penninger JM, Li Y, et al (2020) Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. Intensive Care Med 46:586–590 . doi: 10.1007/s00134-020-05985-9
40. Sui J, Li W, Murakami A, et al (2004) Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association. Proc Natl Acad Sci 101:2536–2541
41. Yuan M, Wu NC, Zhu X, et al (2020) A highly conserved cryptic epitope in the receptor-binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. Science 0036-8075. doi 10.1126/science.abb7269

The evil role of spike in the coronaviruses: structure, function and evolution

Ghavamipour F.[1], Nasrollahi P.[1], Dabirmanesh B.[1], Jalili H.[2] and Khajeh Kh.[1]

[1] Dept. of Biochemistry, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran
[2] Dept. of Life Science Engineering, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Since the beginning of the 21st century, coronaviruses that originated from animals to human have been the cause of several deadly pneumonia epidemics including SARS, MERS disease, and now COVID-19 which has become a worldwide pandemic. The emergence of these acute respiratory syndromes emphasizes the cross-species transmission of coronaviruses and their prevalence in humans. Coronaviruses contain a surface- spike protein (S) that initiates infection by recognizing its receptor and attaching to the membrane, which is a key step in the host specificity and intergenerational transmission. To date, no specific treatment or vaccine against any of the seven human coronaviruses has been approved. This underscores the importance of exploring the mechanisms governing the virus entry and intergenerational transmission. This review article discuss the mechanism of infection used by coronaviruses by focusing on the features of the S protein and its receptor binding characteristics in different species. In addition, protease processes involved in the onset of infection was considered to provide a complete picture of their role in the coronavirus replication cycle. Finally, treatments based on the interaction of S-protein and ACE2 receptor were described.