

Uloga i struktura glikoproteina S kod virusa SARS-CoV-2

Blažević, Ivan

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:354542>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za kemiju

Ivan Blažević

**Uloga i struktura glikoproteina S kod virusa
SARS-CoV-2**

Završni rad

Split, 2020.

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za kemiju

Ivan Blažević

**Uloga i struktura glikoproteina S kod virusa
SARS-CoV-2**

Završni rad

Split, 2020.

Ovaj rad, izrađen u Splitu, pod vodstvom mentorice doc. dr. sc. Matilde Šprung, predan je na ocjenu Odjelu za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnika biologije i kemije.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za kemiju
Ruđera Boškovića 33, 21 000 Split, Hrvatska

Završni rad

Uloga i struktura glikoproteina S kod virusa SARS-CoV-2

Ivan Blažević

Nova pandemija koronavirusa koja je započela u Kini, proširila se u mnoge zemlje širom svijeta, a broj potvrđenih slučajeva se svakodnevno povećava. Koronavirus, SARS-CoV-2 uzrokuje teški akutni respiratorni sindrom, bolest poznatiju pod nazivom COVID-19. Zbog brzog širenja virusne infekcije među ljudskom populacijom te zbog velikog broja smrtnih ishoda, SARS-CoV-2 predstavlja problem globalnih razmjera. Kako bi se pronašle učinkovite metode liječenja potrebno je što bolje upoznati građu i razumijeti funkciju struktura koje se nalaze na površini ovojnice virusa. Stoga će u ovome radu, biti riječi o strukturi ovojnice virusa SARS-CoV-2 s posebnim naglaskom na glikoprotein S (engl. *spike*) kao ključnom proteinu koji posreduje ulasku virusa u stanicu domaćina. Nadalje, pojasnit će se mehanizam prepoznavanja ovog virusa i angiotenzin-konvertirajućeg enzima (engl. angiotensin converting enzyme, ACE2) koji se nalazi na membranama stanica brojnih tkiva u tijelu čovjeka. Detaljne spoznaje o načinu na koji virus ulazi u stanice domaćina te razumijevanje molekularnog mehanizma, omogućit će znanstvenicima razvoj cijepiva i/ili lijekova u borbi protiv COVID-19 pandemije.

Ključne riječi: pandemija, koronavirus, SARS-CoV-2, glikoprotein S

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu.

Rad sadrži: 22 stranice, 10 slika, 23 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: Dr. sc. Matilda Šprung, *docent*

Ocjenjivači: Dr. sc. Matilda Šprung, *docent*

Dr. sc. Viljemka Bučević Popović, *docent*

Dr. sc. Roko Vladušić, *viši predavač*

Rad prihvaćen: 18. rujan, 2020.

Basic documentation card

University of Split
Faculty of Science
Department of chemistry
Ruđera Boškovića 33, 21 000 Split, Croatia

B. Sc. Thesis

Function and structure of glycoprotein S in SARS-CoV-2 virus

Ivan Blažević

The new coronavirus pandemic, which started in China, has spread to many countries around the world, and the number of confirmed cases is increasing daily. Coronavirus, SARS-CoV-2, causes severe acute respiratory syndrome, a disease known as COVID-19. Due to the rapid spread of viral infection among the human population and due to the large number of deaths, SARS-CoV-2 is currently a major global health problem. In order to find effective methods of treatment, it is important to investigate function of structures located on the surface of the virus. Therefore, in this thesis, we will investigate the recent literature describing the structure of the SARS-CoV-2 virus envelope with special emphasis on glycoprotein S (spike) as a key element that mediates the entry of the virus into the host cell. Furthermore, the mechanism of recognition of this virus and the angiotensin-converting enzyme (ACE2) found on the cell membranes of numerous tissues in the human body will be elucidated. Detailed insights into the pathway of the virus entry into the host cells, and detailed understanding of the molecular mechanism, will allow scientists to develop vaccines and/or drugs to combat the COVID-19 pandemic.

Key words: pandemic, coronavirus, SARS-CoV-2, glycoprotein S

Thesis deposited in library of Faculty of science, University of Split

Thesis consist of: 22 pages, 10 figures, 23 references. Original language: Croatian

Supervisor: Matilda Šprung, Ph.D. Assistant professor

Reviewers: Matilda Šprung, Ph.D. Assistant professor
Viljemka Bučević Popović, Ph.D. Assistant professor
Roko Vladušić, Ph.D. Higher lecturer

Thesis accepted: September 18th, 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Cilj rada	1
2. RAZRADA TEME	2
2.1. Virusi	2
2.2. Koronavirusi	2
2.3. Taksonomija Coronaviridae te istaknute vrste koronavirusa	3
2.4. Virus SARS-CoV	4
2.5. Virus MERS-CoV	5
2.5.1. Životinje kao prirodni rezervoari i posrednici virusa SARS-CoV i MERS-CoV	5
2.6. Virus SARS-CoV-2	7
2.6.1. Potraga za prirodnim rezervoarom SARS-CoV-2	7
2.6.2. Strukturni proteini	8
2.6.3. Uloga glikoproteina S	9
2.6.4. Struktura glikoproteina S	9
2.6.5. Konformacijska promjena S2-podjedinice	11
2.6.6. Proteolitička dorada glikoproteina S	12
2.7. Receptor-vezujuća domena	12
2.7.1. Analiza sekvence glikoproteina S i receptor-vezujućih domena virusa SARS-CoV i SARS-CoV-2	13
2.7.2. Strukturna analiza receptor-vezujuće domene	13
2.7.3. Interakcija receptor-vezujuće domene (RBD) i angiotenzin-konvertirajućeg enzima 2 (ACE2)	14
2.8. Tri jedinstvene značajke SARS-CoV-2	16
2.9. Potraga za potencijalnim lijekom	16
2.9.1. Klorokin	16
2.9.2. Remdesivir	16
2.9.3. <i>De novo</i> dizajn peptida u borbi protiv bolesti COVID-19	17
3. ZAKLJUČAK	19
4. LITERATURA	20

1.UVOD

Koronavirusi obično uzrokuju respiratorne i crijevne infekcije životinja i ljudi. Smatrali su se relativno bezopasnima dok nije došlo do izbijanja teškog akutnog respiratornog sindroma (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome*, SARS) 2002. i 2003. u Kini. Desetljeće kasnije, još jedan koronavirus koji uzrokuje bliskoistočni respiratorni sindrom (engl. *Middle East Respiratory Syndrome*, MERS), izoliran je kod bolesnika s upalom pluća u zemljama Bliskog istoka. Nedavno se u Wuhanu pojavio novi koronavirus, SARS-CoV-2, koji predstavlja globalni zdravstveni problem. Osim što su ove tri vrste virusa zoonotskog podrijetla i što su u ljudsku populaciju unešeni preko životinjskog posrednog domaćina, sve tri vrste koriste posebne glikoproteine S, koji izgledaju poput šiljka, a koji posreduju pri prodiranju virusa u stanice domaćina.

1.1.Cilj rada

U ovom završnom radu dat će se općeniti osvrt o koronavirusima, SARS-CoV, MERS-CoV i SARS-CoV-2 s posebnim naglaskom na virus SARS-CoV-2. U tom smislu, naglasak će biti stavljen na strukturu njegove ovojnice i ulogu glikoproteina S (engl. *spike*). Obradit će se relevantna znanstvena literatura o interakciji ovog proteina i angiotenzin-konvertirajućeg enzima (engl. *angiotensin converting enzyme*, ACE2) na površini membrane stanica domaćina. Naposljetku, sagledat će se korisnost određenih lijekova u borbi protiv infekcije koronavirusima te ideje o novim lijekovima koji će se razviti na temelju novih spoznaja o ovom virusu.

2. RAZRADA TEME

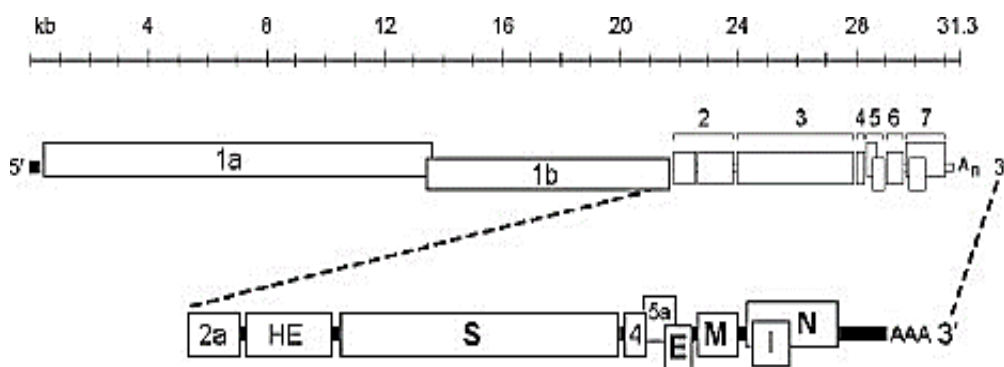
2.1. Virusi

Virusi su najmanja, najzastupljenija i visoko raznolika bića, koja su u stanju zaraziti gotovo svaki oblik života uključujući bakterije biljke i životinje. Neživući su sve dok ne dođu u doticaj s odgovarajućim živim domaćinom i dok uspješno ne zauzmu molekularnu mašineriju njegove stanice koju će iskoristiti za rast i umnažanje (Mudgal, 2014.). Virusna infekcija je složeni proces u kojem virus prepoznaje i vezuje se za stanicu, a zatim prodire u nju oslobađajući nukleinsku kiselinu (genetski materijal). Kod većine virusa prepoznavanje i pričvršćivanje za stanicu domaćina potaknuto je interakcijom virusnog sidra s ciljanim receptorima na membranama domaćina.

2.2. Koronavirusi

Koronavirusi (CoVs), iz obitelji *Coronaviridae* sadrže ovojnicu i jednolančanu molekulu RNA koja nosi genetsku informaciju. Naziv koronavirus dobili su na temelju izgleda njihovih proteinskih ovojnica koje pod elektronskim mikroskopom podsjećaju na krunu (lat. *coronu*). Naime, na površini proteinske ovojnice istaknute su pravilno poredane strukture, glikoproteina S koji podsjeća na šiljak (eng. *spike*).

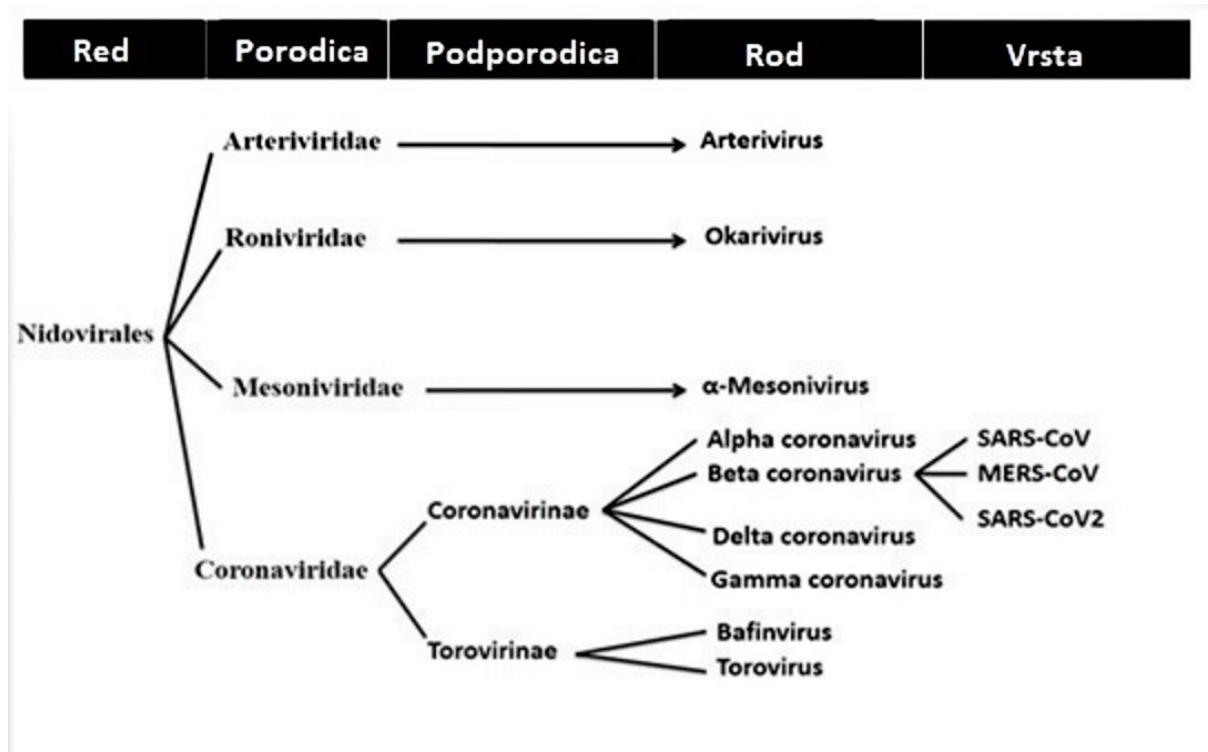
Genom koronavirusa sadrži 26-32 kb (Slika 1) tako da su koronavirusi, u klasi RNA virusa s najvećim genomom. Svi koronavirusi dijele sličnosti u organizaciji i ekspresiji njihovog genoma pri čemu je 16 regija koje kodiraju za nestrukturane proteine (nsp1 do nsp16) na 5' kraju, nakon čega slijede regije koje kodiraju za strukturne proteine: glikoprotein S (S), proteine ovojnice (E), proteine membrane (M) i nukleokapsida (N) na 3' kraju (Su i sur., 2016.).



Slika 1. Organizacija genoma koronavirusa s istaknutim strukturnim genima koji kodiraju za glikoprotein S (S), proteine ovojnice (E), proteine membrane (M) i proteine nukleokapsida (N) (preuzeto iz P. S. Masters, *Science direct*, **66** (2006) 193-292)

2.3. Taksonomija Coronaviridae te istaknute vrste koronavirusa

Porodica *Coronaviridae* zajedno s porodicama *Arteriviridae*, *Roniviridae* i *Mesoniviridae* pripada unutar reda *Nidovirales* (Slika 2). Članovi porodice *Coronavirinae* se na temelju genetskih i antigenetskih karakteristika mogu podjeljeliti u četiri roda *Alphacoronavirus* (α -Cov), *Betacoronavirus* (β -Cov), *Gamacoronavirus* (γ -Cov) i *Deltacoronavirus* (δ -Cov). Najviše pažnje u znanstvenoj zajednici ima rod β -CoV zbog filogenetskih istraživanja koja su pokazala da svi poznati koronavirusi koji uzrokuju pneumoniju kod čovjeka pripadaju upravo ovome rodu. Unutar njega nalaze se tri najpoznatije vrste koronavirusa: SARS-CoV, MERS-CoV i SARS-CoV-2 (Rehman, 2020).



Slika 1. Taksonomija koronavirusa s istaknutim redom, porodicom, potporodicom i rodovima kojima pripadaju vrste SARS-CoV, MERS-CoV i SARS-CoV-2 (preuzeto i prilagođeno iz S. U. Rehman i sur., *Pathogens* 9 (2020) 240)

2.4. Virus SARS-CoV

Prvi slučaj zaraze virusom SARS-CoV zabilježen je u provinciji Guangdong na jugu Kine u studenom 2002. godine. Bolest uzrokovana ovim virusom naziva se teški akutni respiratorni sindrom (engl. *Severe acute respiratory syndrome*, SARS). Bolest SARS krenula se širiti u veljači 2003. godine kada je zaražena osoba otputovala u Hong Kong i odsjela u hotel gdje je proširila virus na nekoliko gostiju koji su se vratili svojim rodnim zemljama (Kanada, Irska, Sjedinjene Američke Države, Vijetnam i Singapur). Retrospektivnom analizom utvrđeno je 11 slučajeva zaraze virusom SARS-CoV i to između studenog 2002. i ožujka 2003. godine. Tako je započela globalna SARS-CoV epidemija. Ukupno je zabilježeno 8437 slučajeva od kojih je 813 završilo sa smrću (Sutton i Subbarao, 2015). Pacijenti zaraženi SARS-CoV u početku osjećaju mialgiju, glavobolju, vrućicu, iscrpljenost i zimicu. S razvojem infekcije javljaju se i kasni simptomi u vidu dispneje, kašlja i respiratornih tegoba. Oko 20-30% pacijenata zahtjeva intenzivnu njegu i mehaničku ventilaciju (Ye i sur., 2020).

2.5. Virus MERS-CoV

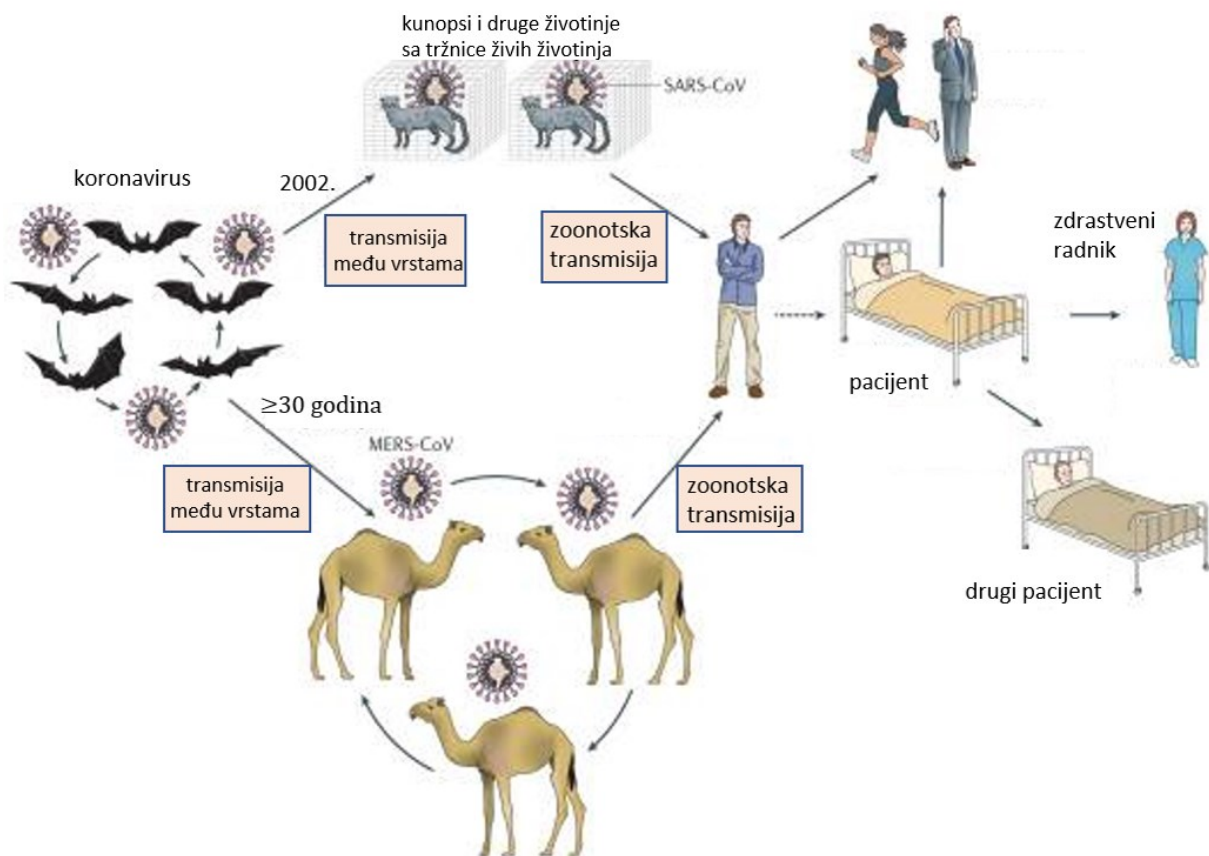
Virus MERS-CoV je po prvi put izoliran u Saudijskoj Arabiji u lipnju 2012. godine iz muškarca starog šezdeset godina koji je preminuo od komplikacija uslijed teške upale pluća u bolnici u Jeddahu. Bolest koja nastaje kao posljedica infekcije virusom MERS-CoV naziva se bliskoistočni respiratorni sindrom (engl. *Middle East Respiratory Syndrome*, MERS). Klinička slika povezana sa MERS-CoV kreće se od blagih gornjih respiratornih simptoma do teške upale pluća i akutnog zatajenja više organa. Većina zabilježenih slučajeva MERS-CoV potječu iz zemalja na Bliskom Istoku uključujući Ujedinjene Arapske Emirate, Katar, Oman, Kuvajt i Iran. Do kolovoza 2015. godine Svjetska zdravstvena organizacija zabilježila je ukupno 1401 laboratorijski potvrđenih MERS-CoV infekcija od kojih je 500 bilo povezano sa smrtnim ishodom (Omrani i sur., 2015.).

2.5.1. Životinje kao prirodni rezervoari i posrednici virusa SARS-CoV i MERS-CoV

Prva indikacija izvora SARS-CoV bila je otkrivanje virusa u larvenim uvijačima i kunopasima te otkrivanje protutijela kod kineskog tvora jazavca na tržnici živih životinja u Kini. Međutim, ove životinje bile su samo posredni domaćini virusa pošto nije bilo dokaza o njegovoj cirkulaciji među jedinkama u divljini ili uzgoju (Slika 3) (Wit i sur., 2016). Naknadnom potragom za prirodnim životinjskim domaćinom SARS-CoV otkriven je njegov srodnik SARSr-Rh-BatCoV HKU3 koji je prisutan kod šišmiša, kineskog potkovnjaka. Laboratorijska analiza pokazala je da su ti šišmiši pozitivni na SARS-CoV protutijela i testirani su pozitivni na SARSr-Rh-BatCoV HKU3. Usporedbom sekvence virusa SARSr-Rh-BatCoV HKU3 i SARS-CoV potvrđena je podudarnost od visokih 88-92%. Ova istraživanja pružila su ključne dokaze koji potvrđuju da su šišmiši prirodni domaćini humanog patogena SARS-CoV (Ye i sur., 2020).

Deve su veliki sisavci prepoznatljivi po svojim karakterističnim grbama. Postoje dvije vrste deva; dvogrba odnosno baktrijska deva (*Camelus bactrianus*) i jednogrba odnosno dromedarska deva (*Camelus dromedarius*). Dvogrbe deve naseljavaju središnju Aziju i čine oko pet posto svjetske populacije deva. S druge strane, većina dromedarskih deva se nalazi u istočnoj Africi, odakle se izvoze u zemlje Arapskog poluotoka. Saudijska Arabija, Katar, Jemen i Ujedinjeni Arapski Emirati imaju najveću populaciju dromedarskih deva. Kod njih osim što predstavljaju izvor mlijeka i mesa, dromedarske deve sudjeluju u utrkama, paradama i godišnjim festivalima. Prijenos virusa MERS-CoV na ljude vjerojatno je rezultat višestrukih zoonotskih prijenosa s dromedarskih deva (Slika 3). Konzumacija nepasteriziranog devinog

mlijeka nije neuobičajena kao ni ispijanje devinog urina za kojeg se vjeruje da ima ljekovita svojstva. Socioekonomski razvoj i brza urbanizacija doveli su do postepenog podizanja farmi deva u neposrednoj blizini većih gradova. Upravo zbog ovih razloga postoji velika mogućnosti direktnog kontakta ljudi sa devama i njihovim proizvodima što je moglo dovesti do prijenosa virusa na čovjeka (Omrani i sur., 2015). Za prijenos virusa s čovjeka na čovjeka potreban je bliski kontakt sa zaraženim osobama (Rabaan i sur., 2017.).



Slika 3. Shematski prikaz transmisije virusa MERS-CoV i SARS-CoV. Koronavirusi su s šišmiša prešli na posredne domaćine deve, odnosno kunopse pa na čovjeka (preuzeto i prilagođeno iz E. de Wit i sur., *Nat Rev Microbiol.* **8** (2016) 523-534)

2.6. Virus SARS-CoV-2

Krajem 2019. godine Wuhan, kineska provincija Hubei, postaje žarište novog zoonotskog koronavirusa SARS-CoV-2 koji je odgovoran za nastanak bolesti COVID-19. Bolest se brzo proširila izvan Kine i dosegla gotovo sve zemlje Svijeta pa je Svjetska zdravstvena organizacija 11. ožujka ove godine proglasila COVID-19 pandemijom. U trenutcima pisanja ovog rada broj oboljelih dosegao je vrtoglavih 30,2 milijuna (Johns Hopkins University, COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at John Hopkins University (JHU), <https://www.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>).

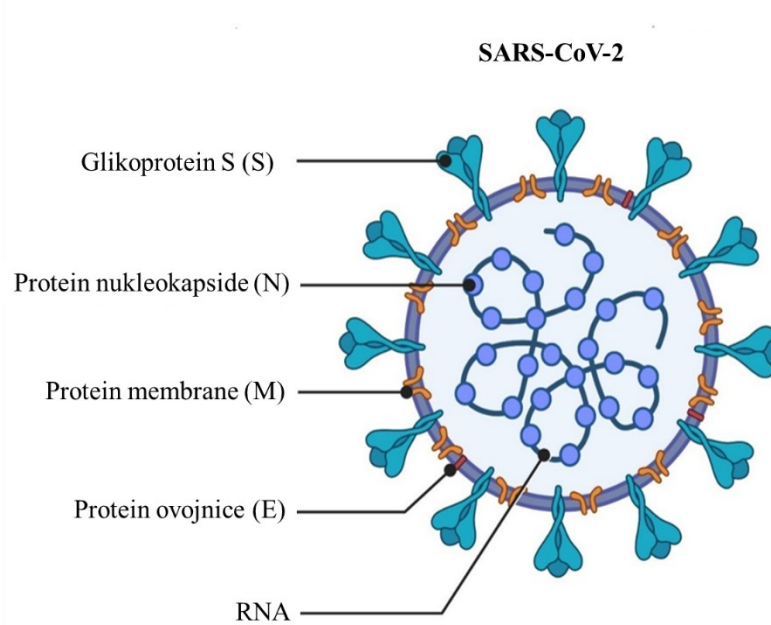
Virus kod zaraženih pacijenata izaziva tešku infekciju donjih dišnih puteva. Blaži simptomi su groznica, kašalj i dispneja dok se kod nekih pacijenata javljala i dijareja. Upala pluća je jedan od najtežih simptoma koji brzo može napredovati do akutnog respiratornog sindroma (Ye i sur., 2020). COVID-19 najviše pogađa pripadnike starije populacije i osobe koje spadaju u skupinu kroničnih bolesnika. Trenutni podatci pokazuju da je vrijeme inkubacije 1-14 dana (Ludwig i Zarbock, 2020.). U usporedbi sa SARS-CoV i MERS-CoV, SARS-CoV-2 se predstavlja kao manje patogen virus kod kojeg je efikasnost prenošenja s osobe na osobu izrazito povećana. Tome u prilog ide i činjenica da postoje ljudi koji su zaraženi virusom, ali ne pokazuju nikakve simptome bolesti (Ye i sur., 2020).

2.6.1. Potraga za prirodnim rezervoarom SARS-CoV-2

Prvi slučajevi bolesti COVID-19 povezuju se s tržnicom morskih plodova Huanan. Stoga se pretpostavlja da je posredni domaćin SARS-CoV-2 vjerojatno neka divlja životinja kojom se tamo trguje. Nekoliko nedavnih studija temeljenih na metagenomskom sekvencioniranju sugeriralo je da bi grupa ugroženih malih sisavaca poznata kao ljuskavci (*Manis javanica*) mogla sadržavati pretke β -CoV koji su srodnici SARS-CoV-2 (Ye i sur., 2020). Dok rezultati sekvencioniranja idu u prilog hipotezi da su ljuskavci posredni domaćini SARS-CoV-2 ipak za sada ne postoje izravni dokazi koji bi potvrdili hipotezu da su upravo ove životinje izvor virusa (Ye i sur., 2020).

2.6.2. Strukturni proteini

Virus SARS-CoV-2 sadrži 4 strukturna proteina : glikoprotein S koji nalikuje na šiljak (engl. *spike*) (S), protein membrane (M), protein ovojnice (E) i protein nukleokapside (N) (Slika 4). Glikoprotein S posreduje u vezanju virusa s receptorima na membrani stanica domaćina. Protein membrane (M) definira oblik virusne ovojnice. Protein E je najmanji od sva četiri strukturna proteina i sudjeluje u procesu sastavljanja i umnažanja virusa. Poznato je da proteini ovojnice djeluju i kao viroporini koji se sakupljaju u membrani domaćina i tvore proteinske pore koje su uključene u transport iona. N protein je jedini koji je vezan za virusnu RNA i također sudjeluje u procesu sastavljanja (Naqvi i sur., 2020). Uz to N protein ima ključnu ulogu prilikom replikacije RNA unutar stanice domaćina (Enayatkhani i sur., 2020 ; Lobo-Galo i sur., 2020; Sarma i sur., 2020).



Slika 4. Shematski prikaz virusa SARS-CoV-2 i njegovih strukturnih proteina. Označeni su glikoprotein S (S), protein nukleokapside (N), protein membrane (M) te protein ovojnice (E) i molekula RNA (preuzeto i prilagođeno iz Biophysical Society, BPS Blog, Coronavirus Structure, Vaccine and Therapy Development, <https://www.biophysics.org/blog/coronavirus-structure-vaccine-and-therapy-development>)

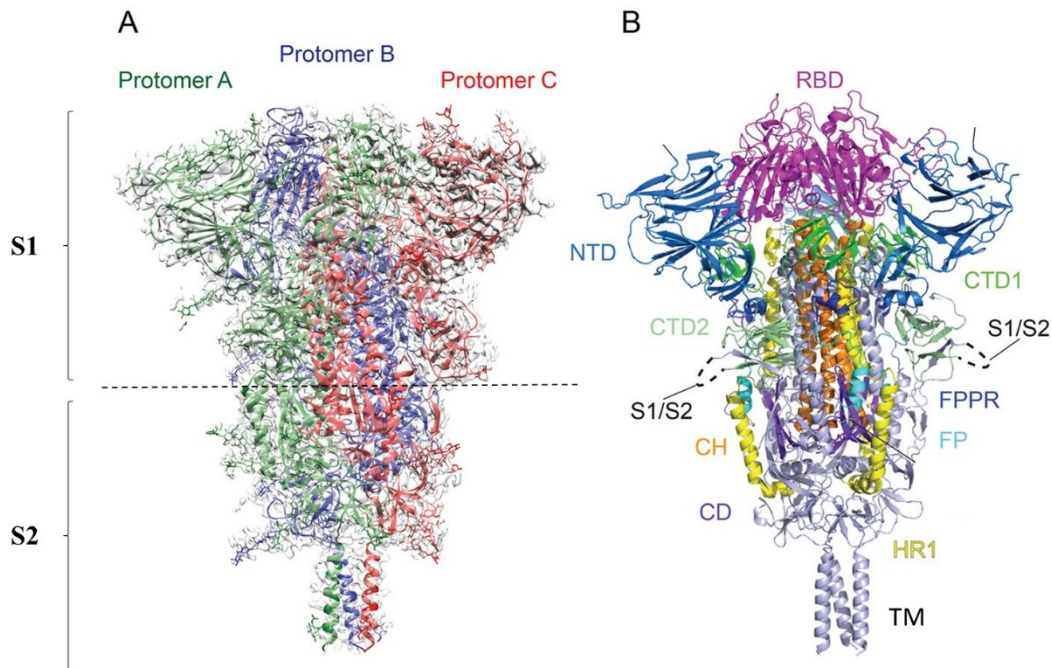
2.6.3. Uloga glikoproteina S

Ulazak koronavirusa u stanice domaćina važna je odrednica virusne infektivnosti i patogeneze. Da bi dospjeli u unutrašnjost stanice, koronavirusi se najprije vežu za specifične receptore na površini membrane. Zatim nastupa fuzija sa staničnom membranom koja rezultira stvaranjem endosoma koji se naposljetku povezuje sa lizosomalnom membranom. Iako energetski favoriziran, proces fuzije membrana ima visoku energetska barijeru koja nastaje kao posljedica repulzija među nabojima na površini membrana. Za odvijanje fuzije viralne membrane s membranom domaćina, slobodna energija potrebna za savladavanje te energetske barijere namiče se iz promjene konformacije fuzijskog proteina. Kod SARS-CoV-2 fuzijski protein je površinski usidren glikoprotein S ili protein šiljak (engl. *spike*).

2.6.4. Struktura glikoproteina S

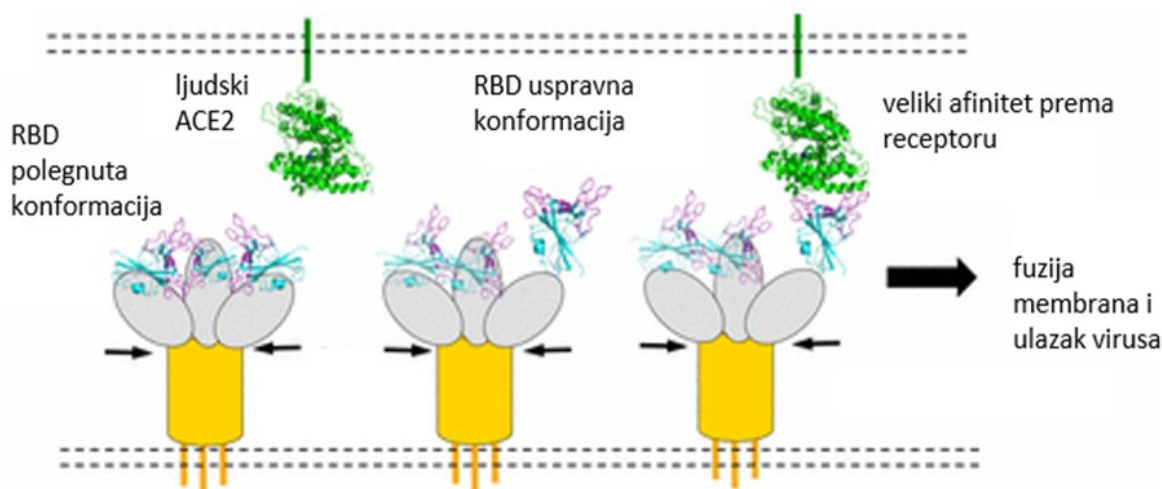
Na površini zrelih virusa, glikoprotein S je prisutan u obliku homotrimerera (Slika 5A). Površina trimera je gusto ukrašena heterogenim *N*-glikanima. Njihova uloga za sada još nije u potpunosti utvrđena, ali pretpostavlja se da sudjeluju u zaštiti virusa od imunološke reakcije (Walls i sur., 2020).

Glikoprotein S je građen od dvije velike podjedinice S1 i S2. Podjedinica S1 uključuje N-terminalnu domenu (NTD), C-terminalnu domenu 1 (CTD1) i C-terminalnu domenu 2 (CTD2) (Slika 5B). Uz spomenute domene, na S1-podjedinici smještene su i tri receptor-vezujuće domene (RBD) koje su odgovorne za prepoznavanje receptora angiotenzin-konvertirajućeg enzima 2 (ACE2) koji se nalazi na membranama stanica domaćina. Angiotenzin-konvertirajući enzim 2 služi kao receptor tj. mjesto gdje će doći do povezivanja virusne čestice sa stanicom domaćina (Shang i sur., 2020). Receptori ACE2 najviše su prisutni na membranama stanicama pneumocita u plućima, enterocitima u tankom crijevu i sekretorskim stanicama u nosu (Alsibai, 2020). Upravo je to razlog zbog čega su ova tkiva kod pacijenata koji imaju simptome bolesti COVID-19 najviše pogođena.



Slika 5. Krio-EM struktura predfuzijske konformacije glikoproteina S virusa SARS-CoV-2 (A). Prikaz homotrimera koji je građen od tri identična polipeptidna lanca. Na slici su prikazani protomer A označen zelenom bojom, protomer B označen plavom bojom i protomer C označen crvenom bojom. Potpuni prikaz glikoproteina S sa domenama (B) (preuzeto i prilagođeno iz Y. Cai i sur., *Science* (2020) doi:10.1126/science.abd4251)

Strukturne analize glikoproteina S pokazale su da se receptor-vezujuće domene (RBD) mogu naći u dva različita stanja, odnosno dvije nezavisne konformacije. Naime, RBD domene mogu se nalaziti u tzv. uspravnoj i polegnutoj konformaciji. Kada se RBD domene nalaze u uspravnoj konformaciji, omogućena je interakcija glikoproteina S sa receptorima na membrani domaćina, dok u polegnutoj konformaciji nema interakcije (Slika 6). Smatralo se da je prijelaz iz jedne u drugu konformaciju induciran neposrednom blizinom receptora na stanicama domaćina. Međutim, novija istraživanja pokazala su da receptor nije nužan za prijelaz konformacijskog stanja RBD domena glikoproteina S.



Slika 6. Strukturni prikaz mehanizma prepoznavanja receptor-vezujućih domena (RBD) virusa SARS-CoV-2 i receptora angiotenzin-konvertirajućeg enzima 2 (ACE2) na površini membrane stanice domaćina (preuzeto i prilagođeno iz J. Shang i sur., *PNAS* **117** (2020) 11727-11734)

Podjedinica S2 pričvršćena je za ovojnicu virusa, a nalazi se ispod podjedinice S1. Podjedinicu S2 čini fuzijski peptid (FP), proksimalna regija fuzijskog peptida (FPPR), transmembransko sidro (TM), centralna heliks regija (CH), vezujuća domena (CD), heliks regija 1 (HR1) i heliks regija 2 (HR2). Za provođenje drugog koraka odnosno fuzije membrana zadužena je S2 podjedinica koju sterički zaklanjaju domene podjedinice S1. Stoga se pred proces fuzije, glikoptotein S doraduje proteolizom na mjestu koje se nalazi na samoj granici podjedinica S1 i S2. Tim procesom dolazi do otpuštanja podjedinice S1 pa podjedinica S2 postaje dostupna za proces fuzije membrana. Tijekom procesa fuzije, podjedinica S2 prolazi kroz ireverzibilne konformacijske promjene (Shang i sur., 2020).

2.6.5. Konformacijska promjena S2-podjedinice

Nakon što se S1 podjedinica proteolitički odgradi, podjedinica S2 prolazi kroz velike strukturne promijene kako bi se dvije membrane, virusna i membrana domaćina, povezale. Proces fuzije membrana posredovan je strukturnim promijenama na S2-podjedinici koje zahvaćaju fuzijski peptid (FP), proksimalnu regiju fuzijskog peptida (FPPR), transmembransku regiju (TM), centralna heliks domenu (CH), vezujuću domenu (CD), HR1 i HR2.

Proksimalna regija fuzijskoga peptida (FPPR) je preko C-terminalne domene 1 (CTD1) u interakciji sa receptor-vezujućom domenom na podjedinici S1. FPPR preko CTD1 drži receptor

vezujuću domenu (RBD) u polegnutoj konformaciji s time da povremeno FPPR može napustiti svoj položaj te na taj način omogućiti prelazak RBD u uspravnu konformaciju. Prelaskom iz polegnute u uspravnu konformaciju omogućeno je uspostavljanje interakcije između RBD i ACE2 što rezultira nastankom fleksibilne proksimalne regije fuzijskog peptida koja sada razotkriva mjesto protelitičkog cijepanja. Cjepanjem se S1-podjedinica otpušta te tako nestaje strukturno ograničenje fuzijskog peptida koji potakne proces razmotavanja što dovodi do prelaska u postfuzijsku konformaciju. Glavna karakteristika postfuzijske konformacije je formiranje izdužene središnje trolančane spiralne zavojnice sačinjene od HR1 i centralne heliks regije. HR2 sa svojom N-terminalnom i C-terminalnom regijom obuhvaća središnju spiralnu zavojnicu stoga je ona dodatno ojačana duž svoje izduljene osi. Tako stabilna i rigidna struktura dovodi virusnu membranu u međusobnu blizinu sa staničnom membranom domaćina stvarajući fuzijsku poru (Cai i sur., 2020).

2.6.6. Proteolitička dorada glikoproteina S

Proteoliza na granici podjedinica S1 i S2 ključan je predkorak pri ulasku SARS-CoV-2 virusa u stanice domaćina. Stoga ne čudi što su brojna istraživanja pokušala identificirati enzim(e) koji katalizira ovaj proces.

Novija istraživanja, pokazala su da se na granici podjedinica glikoproteina S, nalazi mjesto cijepanja za furin. Furin je membranska proteaza koja se nalazi na površini stanica domaćina. Uz furin, na površini membrane domaćina postoje i druge proteaze kao što je primjerice transmembranska serinska proteza, TMPRSS2, za koju se pokazalo da također specifično prepoznaje i cijepa sponu među podjedinicama glikoproteina S. Istraživanja su pokazala da je efekt furina i TMPRSS kumulativan. To znači da je proces fuzije virusa sa stanicom domaćina to uspješniji što je izražaj ovih proteaza na membrani domaćina veći. Drugim riječima, tkiva koja eksprimiraju veće količine ovih proteaza biti će najviše pogođena infekcijom virusa SARS-CoV-2 što je upravo slučaj kod stanica tkiva respiratornog sustava (Shang i sur., 2020).

2.7. Receptor-vezujuća domena

Osobito važan strukturni element glikoproteina S je receptor-vezujuća domena (RBD). Ova domena je ona odgovorna za prepoznavanje i vezanje receptora na membrani stanica domaćina.

Poznato je da je ulazak SARS-CoV-2 posredovan interakcijom glikoproteina S s angiotenzin-konvertirajućim enzimom 2 (ACE2).

2.7.1. Analiza sekvence glikoproteina S i receptor-vezujućih domena virusa SARS-CoV i SARS-CoV-2

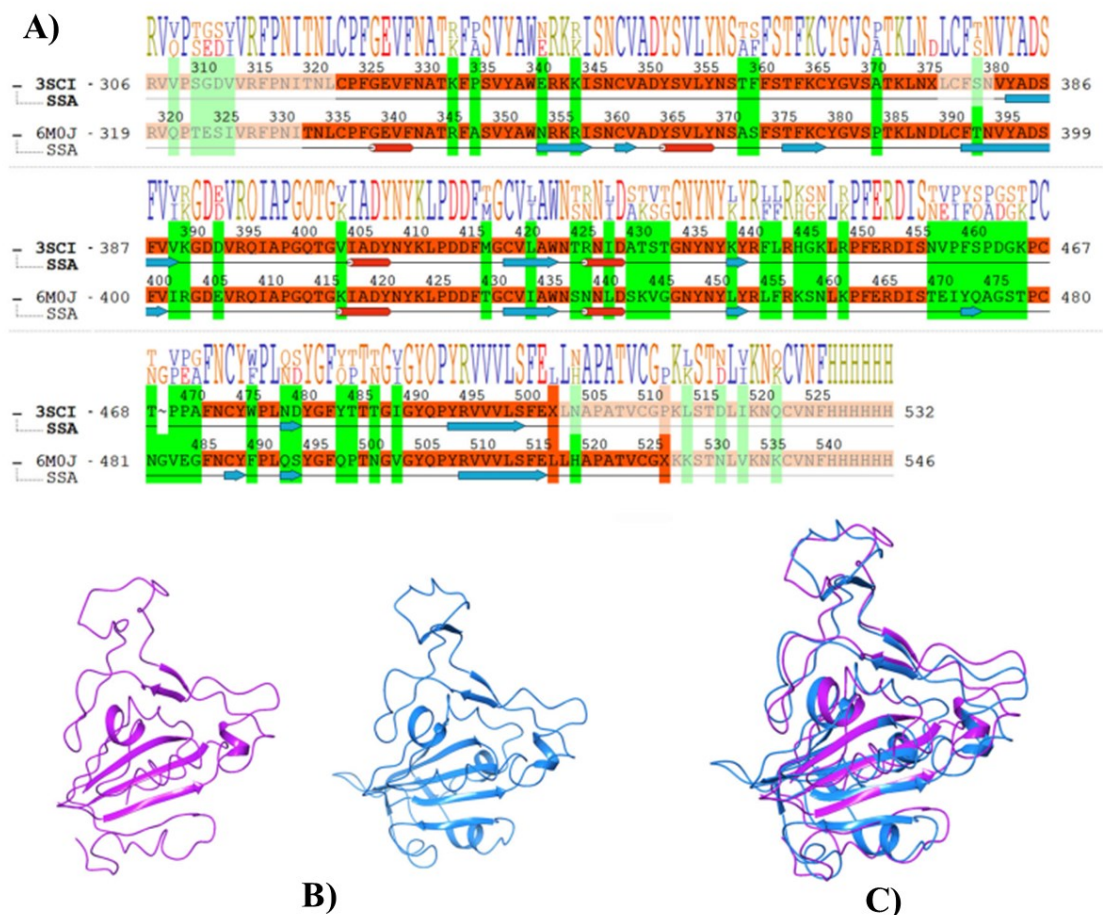
Budući da je virus SARS-CoV već bio poznat srodnik novog virusa SARS-CoV-2, znanstvenici su usporedili sekvence ovih virusa kao i sekvence glikoproteina S kako bi došli do novih znanstvenih spoznaja koje bi mogle biti važne za borbu s koronavirusima.

U tu svrhu, uspoređene su sekvence glikoproteina S iz virusa SARS-CoV-2 i SARS-CoV. Rezultati poravnavanja pokazali su da dva proteina dijele 75,9 % sličnosti u sekvenci, a sličnost u receptor vezujućoj domeni je 74 %.

Prijašnja su istraživanja utvrdila da se slijed aminokiselina koje sačinjavaju receptor-vezujuću domenu (RBD) kod SARS-CoV nalaze na položajima 306-527 s time da ostaci 424-494 ostvaruju ključne interakcije s receptorom, angiotenzin-konvertirajućim enzimom 2 (ACE2). Kod SARS-CoV-2 ključni ostaci su smješteni na položajima 319-541 i 437-508. U usporedbi dvaju proteinskih sekvenci identificirano je 58 aminokiselinskih ostataka koji su promijenjeni unutar receptor-vezujuće domene SARS-CoV-2. Uzimajući u obzir važnost vezujućih domena, SARS-CoV-2 i SARS-CoV vezujuće domene su dalje analizirane u svrhu uočavanja određenih strukturnih promjena koje su mogle nastati kao posljedica novonastalih mutacija (Veeramacheni i sur., 2020).

2.7.2. Strukturna analiza receptor-vezujuće domene

Strukturne analize dostupnih receptor-vezujućih domena (RBD) pokazale su da se infektivnost pojedinih vrsta koronavirusa može povezati s mutacijama u ovim domenama. Naime, pregled mutacijskih promjena u aminokiselinskom slijedu (Slika 7A) i sekundarnim strukturama receptor vezujućih-domena virusa SARS-CoV-2 i SARS-CoV pokazale su se važnima u interakciji s receptorom na membrani stanica domaćina. Kod SARS-CoV, domena RBD je sastavljena od dvije α -zavojnice i pet β -nabranih ploča dok je kod SARS-CoV-2 sastavljena od četiri α -uzvojnica i deset β -nabranih ploča (Slika 7B). Povećani broj α -uzvojnica i β -nabranih ploča omogućava ostvarivanje većeg broja vodikovih veza između receptor-vezujuće domene i receptora ACE2 (Veeramacheni i sur., 2020) što se dovodi u vezu s povećanom infektivnosti virusa SARS-CoV-2.

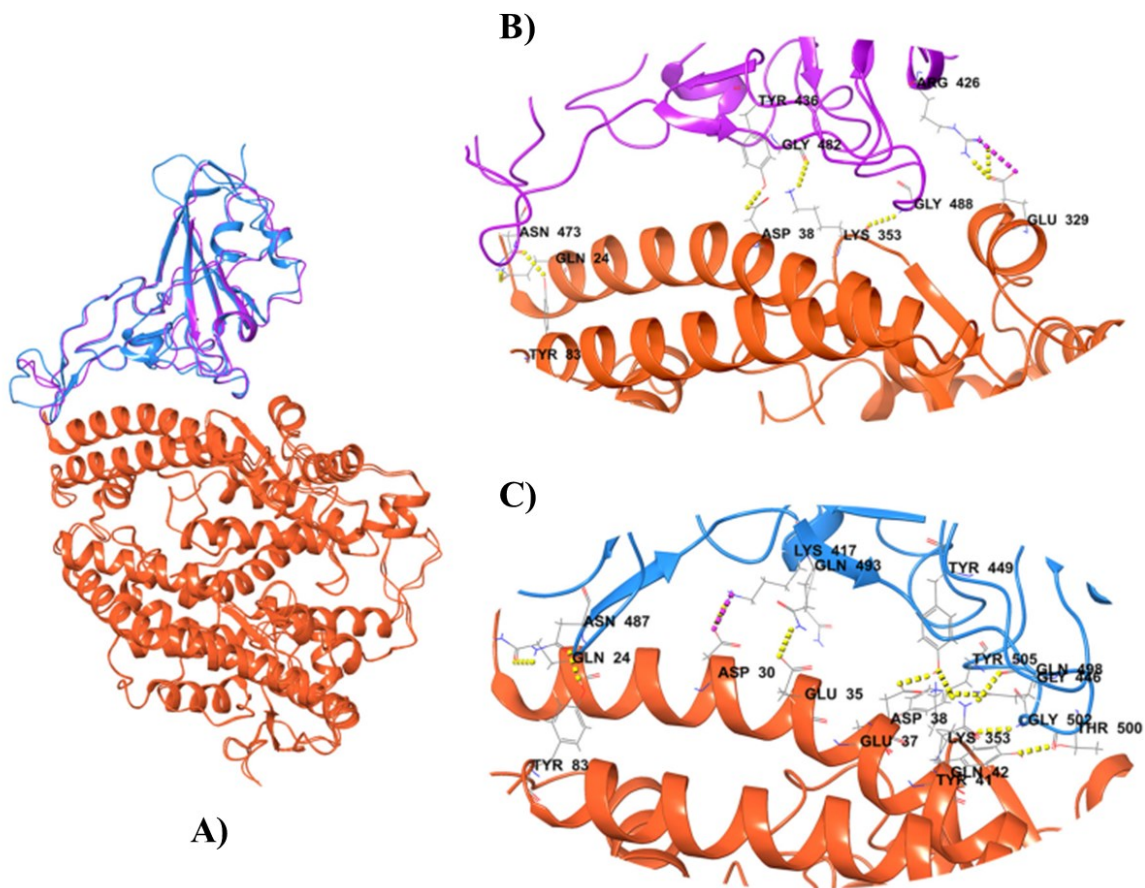


Slika 7. Višestruko poravnanje slijedova te superpozicija SARS-CoV-2 i SARS-CoV receptor-vezujućih domena (RBD) glikoproteina S. Zelenom bojom istaknute su aminokiseline u primarnoj strukturi RBD domena koje su različite (mutirane). Strukture RBD domena SARS-CoV (ljubičasto) i SARS-CoV-2 (plavo). Superpozicija RBD domena (C) (preuzeto i prilagođeno G. K. Veeramachaneni i sur., *J Biomol Struct Dyn* (2020) doi:10.1080/07391102.2020.1773318)

2.7.3. Interakcija receptor-vezujuće domene (RBD) i angiotenzin-konvertirajućeg enzima 2 (ACE2)

Analizirane su kristalne strukture kompleksa ACE2 i receptor-vezujućih domena SARS-CoV-2 i SARS-CoV (Slika 8A). Analizom je ustanovljeno da su kod SARS-CoV vezujuća domena i ACE2 receptor povezani sa sedam vodikovih veza jednom kovalentnom vezom i jednom elektrostatskom interakcijom (Slika 8B). Istovremeno kod SARS-CoV-2 vezujuća domena i ACE2 su povezani s jedanaest vodikovih veza i jednom elektrostatskom interakcijom (Slika 8C). Također su na dodirnoj površini između ACE2 i receptor-vezujuće domene SARS-CoV-2, identificirane ključne aminokiseline odgovorne za održavanje njihove međusobne

povezanosti. Tu spadaju aminokiselinski ostatci Glu35, Tyr83, Asp38, Lys31, Glu37, His34 ACE2 receptora te aminokiselinski ostatci Gln493, Gln498, Asn487, Tyr505 i Lys417 receptor-vezujuće domene SARS-CoV-2. Upravo zbog većeg broja formiranih vodikovih veza, kompleks ACE2:receptor-vezujuća domena SARS-CoV-2 je čvršće i stabilnije povezan. U prilog tome ide i jakost ostvarenih vodikovih veza. Na temelju udaljenosti između donora i akceptora, vodikove veze su podijeljene po jakosti na jake (2.2–2.5 Å), srednje (2.5-3.2 Å) i slabe (3.2-4.0Å) s time da formirane vodikove veze između ACE2 i receptor-vezujuće domene SARS-CoV-2 spadaju u kategoriju srednje jakih, dok kod ACE2 i receptor –vezujuće domene SARS-CoV spadaju u kategoriju slabih veza (Veeramachaneni i sur., 2020).



Slika 8. Superpozicija kompleksa ACE2 (narančasto) sa SARS-CoV-2 (plavo) i SARS-CoV (lubičasto) vezujućom domenom (A) te detaljan prikaz ostvarenih interakcija (B i C) (preuzeto i prilagođeno iz G. K. Veeramachaneni i sur., *J Biomol Struct Dyn* (2020) doi:10.1080/07391102.2020.1773318)

2.8. Tri jedinstvene značajke SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 receptor-vezujuća domena (RBD) ima izraženiji afinitet prema ACE2 od RBD domene SARS-CoV. Dodatna posebnost ove interakcije razotkrivena je korištenjem krio-elektronske mikroskopije. Tom metodom je ustanovljeno da RBD domene virusa SARS-CoV većinu vremena provode u uspravnoj konformaciji dok su kod SARS-CoV-2 pretežno u polegnutoj konformaciji što ih čini manje dostupnima za vezanje receptora ACE2. Negativna strana njihove smanjene dostupnosti je skrivenost domena od imunološkog odgovora. SARS-CoV se prilikom ulaska u stanicu proteolitički doraduje djelovanjem TMPRSS2 dok se SARS-CoV-2 uz TMPRSS2 dodatno može proteolitički aktivirati i djelovanjem furina. Furin omogućava ulazak SARS-CoV-2 u pojedine stanice koje imaju manju prisutnost TMPRSS2 na svojim membranama (Shang i sur., 2020).

2.9. Potraga za potencijalnim lijekom

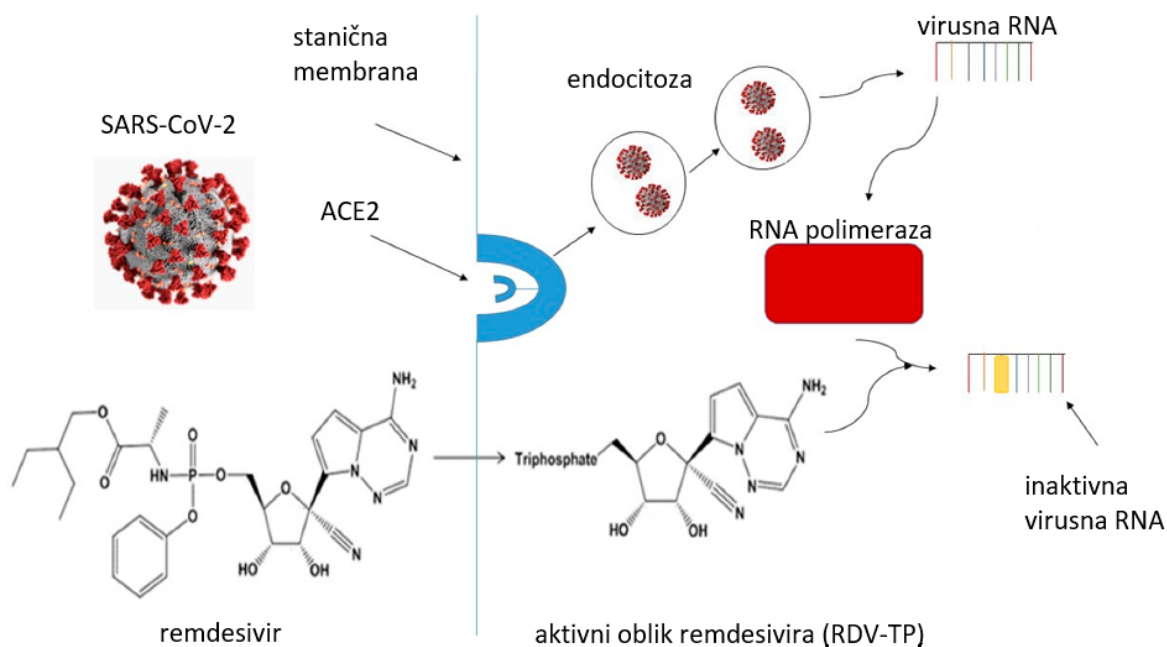
2.9.1. Klorokin

Klorokin ili 9-aminokinolin koji je otkriven 1934. godine, slaba je baza koja povećava pH vezikula. Kada se dodaje izvanstanično, neprotonirani dio klorokina ulazi u stanicu gdje postaje protoniran i koncentrira se u kiselim organelima niskog pH poput endosoma, Golgijevih vezikula i lizosoma. Povećanje pH osim što utječe na aktivnost lizosomalnih enzima utječe i na proces endocitoze, koji u ovakvim promjenjenim uvjetima može izostati. Antivirusni učinak većim dijelom ovisi o stupnju iskorištenosti endosoma od strane virusa kao ulaznim točkama u stanicu. Smatra se da klorokin utječe i na terminalnu glikozilaciju staničnog receptora ACE2 pri čemu smanjuje uspostavljanje interakcija između receptor-vezujuće domene i ACE2 dovodeći do zaustavljanja infekcije (Vincent i sur., 2005).

2.9.2. Remdesivir

Remdesivir je prvenstveno razvijen u svrhu proučavanja utjecaja na inhibiciju replikacije virusa ebole. U svijetu je prepoznat kao obećavajući antivirusni lijek protiv velikog spektra RNA virusa (Slika 9). Remdesivir (RDV) je prolijek koji se prvo u organizmu mora metabolizirati kako bi se postigao antiinfektivni učinak. Aktivna forma je u obliku trifosfata (RDV-TP) i tada

predstavlja analog adenzotrifosfata (ATP), substratu koji se koristi za sintezu ribonukleinske kiseline. RDV-TP se natječe s ATP-om za ugradnju u RNA i tako inhibira aktivnost RNA-polimeraze. To rezultira prekidom transkripcije RNA i smanjenom proizvodnjom virusne RNA (Gordon i sur., 2020).

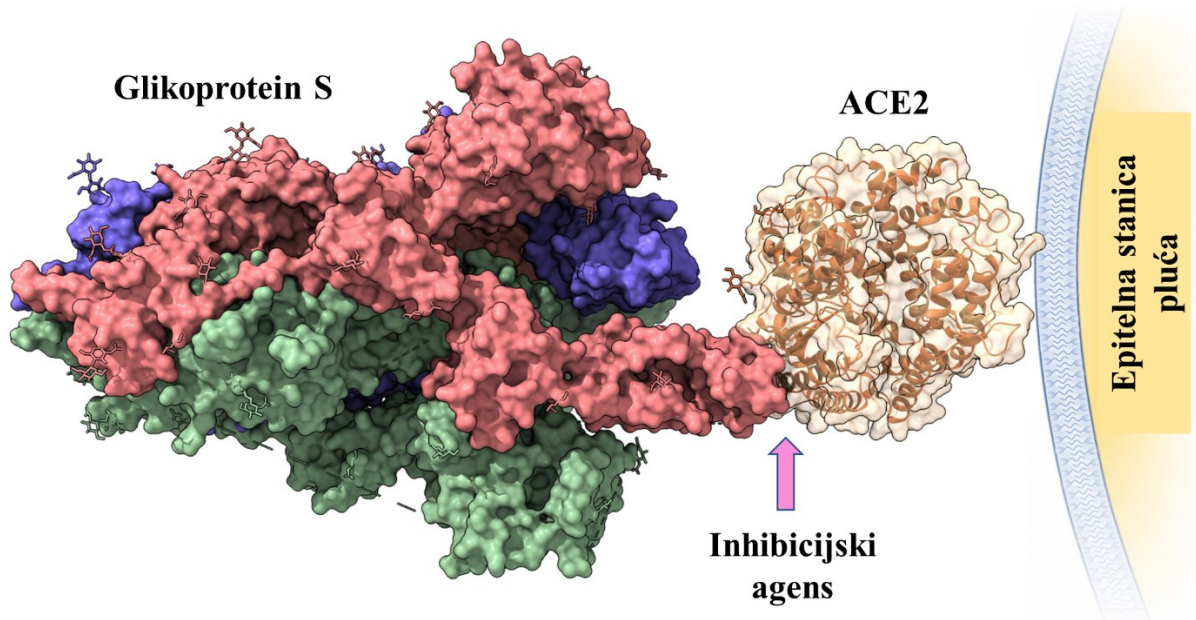


Slika 2. Način djelovanja remdesivira (preuzeto i prilagođeno iz Al-Tannak i sur., *Sci Pharm* 88 (2020) 29-41)

2.9.3. *De novo* dizajn peptida u borbi protiv bolesti COVID-19

Poznato je da bolest COVID-19 nastaje kao posljedica ulaska virusa SARS-CoV-2 u stanicu domaćina i da je taj ulazak posredovan receptor-vezujućim domenama na virusu i receptora ACE2 na stanicama domaćina. Budući da je uspješnost vezanja virusa na stanicu domaćina ključni predkorak u infekciji, logično je za pretpostaviti da bi obustavljanje ove interakcije spriječilo ulazak virusa i tako obustavilo infekciju (Slika 10). Novi pristup u borbi protiv ovog virusa temelji se na *de novo* sintezi i dizajnu peptida koji se kompeticijski veže za receptor-vezujuće domene SARS-CoV-2 i tako obustavlja interakciju s ACE2 receptorom. Postupak *de novo* dizajna započinje računalnim i strukturnim analizama ACE2 proteina. Nakon što se pronađe potencijalna peptidna sekvenca, započinje se računalnim simulacijama koja analizira afinitet potencijalnog peptida i RBD domena virusa nakon čega slijedi redizajn sekvence i

optimizacija afiniteta vezanja. Osim što su izrazito efikasni u narušavanju protein-protein interakcija, mali peptidi izazivaju smanjenu pojavu imunogeničnosti što ih čini izrazito dobrim kandidatima za terapeutike (Huang i sur., 2020).



Slika 10. Kristalna struktura receptor-vezujućih domena SARS-CoV-2 (plavo, crveno i zeleno) i angiotenzin-konvertirajućeg enzima 2 (ACE2) na površini membrane epitelne stanice pluća. Područje međusobne interakcije je ciljano mjesto djelovanja inhibicijskog agensa (preuzeto i prilagođeno iz Lawrence Berkley National Laboratory, Berkley Lab Computing Sciences, NERSC's Scientific Computing Power Steps into Coronavirus Battle <https://cs.lbl.gov/news-media/news/2020/nerscs-scientific-computing-power-steps-into-the-coronavirus-battle/>)

3. ZAKLJUČAK

SARS-CoV-2 je novi patogen iz roda virusa β -Cov. Pandemija je započela zoonotičkom transmisijom virusa sa posrednog životinjskog domaćina ljuskavca na čovjeka. Međutim za sada još nije ustanovljena životinja koja bi u prirodi bila rezervoar odnosno izvor toga virusa. Isto tako, potrebno je dodatno istražiti i razjasniti molekularne mehanizme koji su omogućili širenje istog tog virusa među različitim vrstama. Zajednička karakteristika koja povezuje ovaj virus sa preostalim pripadnicima istoga roda je slična organizacija genoma kao i njegova ekspresija. Genom kodira 4 velika strukturalna proteina: glikoprotein S, protein membrane (M), protein nukleokapside (N) i protein ovojnice (E).

Glikoprotein S je građen od dvije velike podjedinice S1 i S2. Svaka podjedinica ima svoju funkciju prilikom ulaska virusa u stanicu. Pa je tako S1-podjedinica zadužena za ostvarivanje interakcije sa specifičnim receptorm na površini membrane domaćina, a podjedinica S2 za fuziju membrane virusa i membrane domaćina.

Podjedinica S1 izgrađena je od nekoliko domena, međutim domena koja se pokazala ključnom u prepoznavanju i interakciji s angiotenzin-konvertirajućim enzimom 2 (ACE2) na površini humanih stanica je receptor-vezujuća domena (RBD). Budući da je glikoprotein S heterotrimer, tri su RBD domene koje mogu ostvariti interakciju s ACE2. Strukturne analize su pokazale da se receptor-vezujuća domena može naći u dvije konformacije, a da je uvjet uspješnog povezivanja RBD i ACE2 prijelaz iz pognute u uspravnu konformaciju. Zbog novonastalih mutacija unutar domene RBD koje su rezultirale povećanim brojem α -uzvojnica i β -ploča, SARS-CoV-2 ima veći afinitet za vezanje ACE2 od RBD domena SARS-CoV. Ovo ide u prilog činjenici da je virus SARS-CoV-2 infektivniji od SARS-CoV.

Unatoč trenutno maloj stopi smrtnosti od 3,4 % pojava velikog broja zaraženih u kratkom vremenskom razdoblju mogla bi rezultirati kolapsom zdravstvenog sustava, a time bi i stopa smrtnosti porasla. Stoga treba uložiti velike napore u razvoj cjepiva i antivirusnih lijekova. Za sada dostupnog cjepiva nema, ali zato postoje određeni antivirusni lijekovi koji bi zahvaljujući specifičnom mehanizmu djelovanja mogli zaustaviti virusnu infekciju.

4. LITERATURA

Al-Tannak, N. F., Novotny, L., Alhunayan, A. (2020). Remdesivir—Bringing Hope for COVID-19 Treatment. *Sci. Pharm*, 88(2), 29-41.

Cai, Y., Zhang, J., Xiao, T., Peng, H., Sterling, S.M., Walsh, R.M. (2020). Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science*, doi:10.1126/science.abd4251.

Contini, C., Di Nuzzo, M., Barp, N., Bonazza, A., De Giorgio, R., Tognon, M., Rubino, S. (2020). The novel zoonotic COVID-19 pandemic: An expected global health concern. *J Infect Dev Ctries*, 14(3), 254-264.

de Wit, E., van Doremalen, N., Falzarano, D., Munster, V.J. (2016). SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 14(8), 523-534.

Drak Alsibai, K. (2020). Expression of angiotensin-converting enzyme 2 and proteases in COVID-19 patients: A potential role of cellular FURIN in the pathogenesis of SARS-CoV-2. *Med Hypotheses*, doi:10.1016/j.mehy.2020.109893

Enayatkhani, M., Hasaniazad, M., Faezi, S., Guklani, H., Davoodian, P., Ahmadi, N., Einakian, M. A., Karmostaji, A., Ahmadi, K. (2020). Reverse vaccinology approach to design a novel multi-epitope vaccine candidate against COVID-19: an in silico study. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, doi:10.1080/07391102.2020.1756411

Gordon, C. J., Tchesnokov, E. P., Woolner, E., Perry, J. K., Feng, J. Y., Porter, D. P., Götte, M. (2020). Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency. *The Journal of Biological Chemistry*, 295(20), 6785-6797.

Huang, X., Pearce, R., Zhang, Y. (2020). De novo design of protein peptides to block association of the SARS-CoV-2 spike protein with human ACE2. *Aging (Albany NY)*, 12(12), 11263-11276.

Lobo-Galo, N., Terrazas-López, M., Martínez-Martínez, A., Díaz-Sánchez, Á. G. (2020). FDA-approved thiol-reacting drugs that potentially bind into the SARS-CoV-2 main protease, essential for viral replication. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, doi:10.1080/07391102.2020.1764393.

- Ludwig, S., Zarbock, A. (2020). Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. *Anesthesia and Analgesia*, 131(1):93-96.
- Masters, P.S. (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Science Direct*, 66,193-292.
- Naqvi, A. A. T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I. K., Singh, A., Atif, S. M., Hariprasad, G., Hasan, G. M., Hassan, M. I. (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis Disease*. 1866(10), 165878.
- Omrani, A. S., Al-Tawfiq, J. A., Memish, Z. A. (2015). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): animal to human interaction. *Pathogenes and Global Health*, 109(8):354-362.
- Rabaan, A. A., Bazzi, A. M., Al-Ahmed, S. H., Al-Tawfiq, J. A. (2017). Molecular aspects of MERS-CoV. *Frontiers of Medicine*, 11(3):365-377.
- Rehman, S. U., Shafique, L., Ihsan, A., Liu, Q. (2020). Evolutionary Trajectory for the Emergence of Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Pathogens*, 9(3),240.
- Sarma, P., Shekhar, N., Prajapat, M., Avti, P., Kaur, H., Kumar, S., Tingh, S., Kumar, H., Prakash, A., Dhibar, D. P., Medhi, B. (2020). In-silico homology assisted identification of inhibitor of RNA binding against 2019-nCoV N-protein (N terminal domain). *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, doi:10.1080/07391102.2020.1753580
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Aulerbach, A., Li, F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(21):11727-11734.
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., Gao, G. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*, 24(6), 490-502.
- Sutton, T. C., Subbarao, K. (2015). Development of animal models against emerging coronaviruses: From SARS to MERS coronavirus. *Virology*, doi:10.1016/j.virol.2015.02.030.
- Veeramachaneni, G. K., Thunuguntla, V. B. S. C., Bobbillapati, J., Bondili, J. S. (2020). Structural and simulation analysis of hotspot residues interactions of SARS-CoV 2 with human ACE2 receptor. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, doi:10.1080/07391102.2020.1773318.

Vincent, M. J., Bergeron, E., Benjannet, S., Erickson, B. R., Rollin, P. E., Ksiazek, T.G., Seidah, N. G., Nicol, S. T. (2005). Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virology Journal*, doi:10.1186/1743-422X-2-69.

Walls, A. C., Park, Y.J., Tortorici, M.A. , Wall, A., McGuire, A. T., Velesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2):281-292.

Ye, Z.W., Yuan, S., Yuen, K. S., Fung, S.Y., Chan, C. P., Jin, D. Y. (2020). Zoonotic origins of human coronaviruses. *Internacional Journal of Biological Sciences*, 16(10), 1686-1697.