

Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

mgr Iga Dominika Biskupek

**BADANIE MECHANIZMU ROZPOZNAWANIA ENZYMU
KONWERTUJĄCEGO ANGIOTENSYNĘ II PRZES
DOMENĘ WIĄŻĄCĄ RECEPTOR BIAŁKA S WIRUSA
SARS-CoV-2 Z WYKORZYSTANIEM POLA
SIŁOWEGO UNRES.**

Promotor:
dr hab. Artur Giełdoń, prof. UG

*Praca doktorska wykonana w Pracowni Symulacji Polimerów
w Katedrze Chemii Teoretycznej*

Gdańsk 2024

Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim:

Celem pracy doktorskiej było zbadanie mechanizmu zakażenia koronawirusem SARS-CoV-2. Wirus SARS-CoV-2 powodujący chorobę znaną jako COVID-19 pojawił się w Wuhan w Chinach i stał się zagrożeniem dla zdrowia i życia ludzkiego. Wraz z ogłoszeniem pandemii, koronawirus SARS-CoV-2 wzbudził duże zainteresowanie naukowców na całym świecie. Kwestią niezwykle istotną dla szeroko pojętego zdrowia publicznego zdecydowanie było i wciąż pozostaje poznanie sposobu w jaki wirus adaptuje się do nowych warunków oraz ewoluuje. Światowa Organizacja Zdrowia zidentyfikowała najbardziej rozpowszechnione warianty koronawirusa SARS-CoV-2, a mianowicie: alfa, beta, gamma, delta i omikron. Wraz z ewolucją wirusa wzrosła liczba zaobserwowanych w domenie wiążącej receptor (RBD) mutacji w porównaniu z wariantem odkrytym pierwotnie – tzw wild type. W wariantcie alfa występuje tylko jedna mutacja; w beta i gamma trzy natomiast w wariantcie omikron piętnaście. Wariant delta wydaje się być efektem niezależnej ewolucji, gdyż posiada dwie mutacje w innych niż w poprzednio przetoczonych przypadkach miejscach sekwencji. Proces ewolucji wirusa, a tym samym występowanie mutacji może prowadzić do znaczących zmian w powinowactwie wirionów do komórek gospodarza a tym samym do zwiększenia zaraźliwości lub zmiany poznanej dotychczas sposobu tworzenia kompleksu wirus-gospodarz.

W tej pracy doktorskiej badałam powinowactwo wiązania ludzkiego koronawirusa SARS-CoV-2 do receptora ACE2 u wybranych gatunków (pies, mysz, nietoperz, świnia, cyweta i człowiek) za pomocą pola siłowego UNRES. Drugim celem było zbadanie zmian w mechanizmie infekcji wirusowej w przypadku ludzkiego enzymu ACE2 oraz najbardziej rozpowszechnionych wariantów wirusa SARS-CoV-2, a mianowicie alfa, beta, gamma, delta, omikron oraz pierwszym rozpoznany wariantem (wild type). Na podstawie uzyskanych wyników udało mi się zidentyfikować stan przejściowy w którym tworzony jest kompleks wirus-gospodarz zlokalizowany po zewnątrzkomórkowej stronie receptora ACE2 gospodarza. Opisałam fragmenty zarówno ACE2 jak i RBD wirusa kluczowe we wzajemnym dopasowaniu się białek i utworzeniu stabilnego kompleksu. Opisałam oddziaływania potencjalnie odpowiedzialne za rozwój infekcji u badanych organizmów, omówiłam zależności energetyczne i różnice w budowie ACE2 będące powodem zmiennej podatności na COVID-19 wśród zwierząt. Omówiłam także różnice w oddziaływaniu poszczególnych wariantów wirusa z ludzkim ACE2 wskazując reszty aminokwasowe mające największy udział w tworzeniu się stabilnego połączenia RBD-ACE2.

Otrzymane przeze mnie wyniki wskazują, na to, że odpowiednie dopasowanie się konformacyjne białek jest pierwszym etapem infekcji która w uproszczeniu może być definiowana jako seria zmian konformacyjnych prowadzących do uwolnienia wirionów potomnych.

Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim:

The aim of the doctoral thesis was to investigate the mechanism of infection by the SARS-CoV-2 coronavirus. The SARS-CoV-2 virus, causing the disease known as COVID-19, emerged in Wuhan, China, and became a threat to human health and life. With the announcement of the pandemic, the SARS-CoV-2 coronavirus sparked significant interest among scientists worldwide. A crucial aspect for public health was and still is understanding how the virus adapts to new conditions and evolves. The World Health Organization identified the most prevalent variants of the SARS-CoV-2 coronavirus, namely: alpha, beta, gamma, delta, and omicron. With the virus's evolution, the number of observed mutations in the receptor-binding domain (RBD) increased compared to the originally discovered wild type variant. The alpha variant has only one mutation; beta and gamma have three, while the omicron variant has fifteen. The delta variant appears to be a result of independent evolution, as it has two mutations in sequence locations different from previously observed cases. The virus evolution process and the occurrence of mutations can lead to significant changes in virion affinity for host cells, thereby increasing infectivity or altering the previously understood mechanism of virus-host complex formation.

In this doctoral thesis, I investigated the binding affinity of the human coronavirus SARS-CoV-2 to the ACE2 receptor in selected species (dogs, mice, bats, pigs, civets, and humans) using the UNRES force field. The second goal was to examine changes in the viral infection mechanism for the human ACE2 enzyme and the most prevalent SARS-CoV-2 variants, namely alpha, beta, gamma, delta, micron, and the first recognized variant (wild type). Based on the obtained results, I identified a transition state in which the virus-host complex is formed located on the extracellular side of the host's ACE2 receptor. I described segments of both ACE2 and RBD crucial for the mutual protein matching and the formation of a stable complex. I discussed interactions potentially responsible for the development of infection in the studied organisms, elaborated on energy dependencies, and differences in ACE2 structure leading to variable susceptibility to COVID-19 among animals. I also discussed differences in the interaction of individual virus variants with human ACE2, indicating amino acid residues with the greatest contribution to the formation of a stable RBD-ACE2 connection.

The results obtained indicate that the proper conformational matching of proteins is the first stage of infection, which can be simplified as a series of conformational changes leading to the release of progeny virions.

Spis treści

I. Wykaz skrótów.....	2
II. Część teoretyczna.....	4
1. Koronawirusy – klasyfikacja.....	5
1.1. Budowa koronawirusów.....	6
2. Układ Renina–Angiotensyna (RAS).....	10
2.1 Receptor konwertujący angiotensynę II (ACE2).....	12
3. Ewolucja wirusów.....	14
3.1 Ewolucja koronawirusów – przyczyny.....	17
3.2 Koronawirusy zwierzęce.....	20
3.3 Przenoszenie się między gatunkami.....	21
3.4 SARS–CoV–1 (SARS).....	24
3.5 MERS–CoV–1 (MERS).....	26
4. SARS–CoV–2 (COVID–19).....	28
4.1 Transfer z ludzi na zwierzęta.....	29
4.2 Droga zarażenia.....	32
4.3 Proces infekcji.....	37
4.4 Mutacje SARS–CoV–2.....	40
5. Metody obliczeniowe.....	42
5.1 UNRES.....	45
5.2 Chimera UCSF i biblioteka rotamerów.....	48
III. Cel pracy.....	49
IV. Część eksperymentalna.....	50
Badanie mechanizmu infekcji oraz powinowactwa koronawirusa SARS–CoV–2 względem enzymu konwertujących angiotensynę II (ACE2).....	51
1. Wprowadzenie do badań.....	51
2. Omówienie wyników.....	55
2.1 Oddziaływania niespecyficzne w strukturze eksperymentalnej.....	57
2.2 Unikalne interakcje zaobserwowane w strukturze eksperymentalnej.....	62
.....	64
2.3. Poszukiwanie stabilnych konformacji RBD – ACE2.....	65
2.4. Siła oddziaływania międzybiałkowego.....	69
2.5. Oddziaływania w stanie przejściowym.....	70
2.6. Analiza powierzchni elektrostatycznej badanych białek.....	79
3. Dyskusja wyników.....	81
Badanie roli mechanizmu rozpoznawania enzymu konwertującego angiotensynę–2 (ACE2) przez domenę wiążącą białka S, dominujących wariantów wirusa SARS–CoV2.....	84
1. Wprowadzenie do badań.....	84
1.2 Metodyka badań.....	87
2. Omówienie wyników.....	89
2.1. Charakterystyka energetyczna stanu przejściowego.....	96
3. Dyskusja wyników.....	99
V. Wnioski rozprawy doktorskiej.....	100
VI. Wykaz rysunków.....	101
VII. Bibliografia.....	107

I. Wykaz skrótów

ACE	ang. <i>Angiotensin Converting Enzyme</i> , enzym konwertujący angiotensynę I
ACE2	ang. <i>Angiotensin Converting Enzyme 2</i> , enzym konwertujący angiotensynę II
ALI	ang. <i>Acute Lung Injury</i> , ostre uszkodzenie płuc
ARDS	ang. <i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i> , zespół ostrej niewydolności oddechowej
CASP	ang. <i>Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction</i> , międzynarodowy eksperyment pozwalający na bezstronną ocenę technik przewidywania struktury przestrzennej białek metodami teoretycznymi przez zespoły badawcze na świecie
COVID–19	ang. <i>Coronavirus Disease–2019</i> , choroba zakaźna wywołana wirusem SARS–CoV–2
CT	ang. <i>Cytoplasmic Tail</i> , ogon cytoplazmatyczny
CTD	ang. <i>C–terminal domain</i> , domena C–końcowa
DGR	ang. <i>Diversity–generating</i> , retroelementy generujące różnorodność
FP	ang. <i>Fusion Peptide</i> , peptyd fuzyjny
HLH	ang. <i>Hemophagocytic lymphohistiocytosis</i> , zespół objawów immunologicznych znanych jako limfohistiocytoza hemofagocytarną
HSPC	ang. <i>Hematopoietic Stem and Progenitor Cell</i> , krwiotwórcze komórki macierzyste występujące w szpiku kostnym
ICTV	ang. <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> , Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów
MD	ang. <i>Molecular Dynamics</i> , dynamika molekularna, metoda obliczeniowa stosowana w modelowaniu molekularnym
MERS	ang. <i>Middle East Respiratory Syndrome</i> , bliskowschodni zespół niewydolności

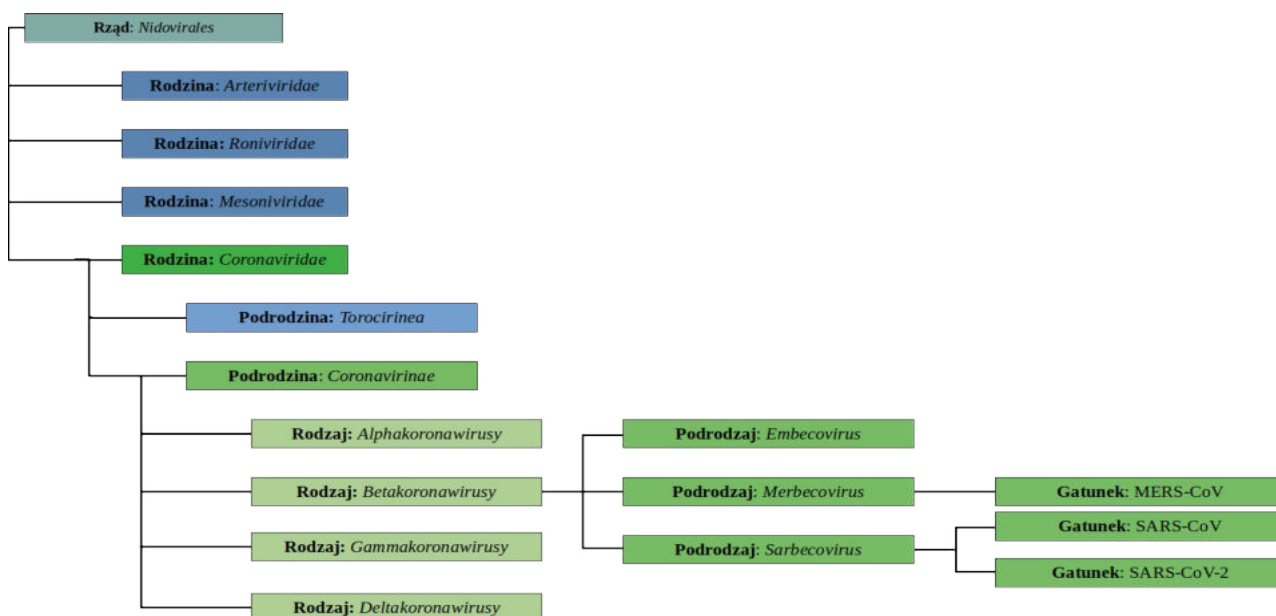
oddechowej, choroba zakaźna

MTU	ang. <i>Molecular Time Unit</i> , MTU, jednostka czasu molekularnego zastosowana w polu siłowym UNRES wynosząca 48,9 fs
NEP	ang. <i>Neutral–endopeptidase</i> , enzym proteolityczny należący do grupy peptydaz błonowych
NTD	ang. <i>N–terminal domain</i> , domena N–końcowa
PDB	ang. <i>Protein Data Bank</i> , baza zawierająca zbiór ustalonych eksperymentalnie trójwymiarowych struktur białek, kwasów nukleinowych oraz innych makrocząsteczek biologicznych, udostępnionych w formie elektronicznej posiadającej rozszerzenie "plik.pdb"
PEP	ang. <i>Prolyl–endopeptidase</i> , enzym z grupy peptydaz błonowych
RAS	ang. <i>Renin–Angiotensin System</i> , układ renina–angiotensyna
RBD	ang. <i>Receptor–binding Domain</i> , domena wiążąca receptor
RMSD	ang. <i>Root–mean–square deviation</i> , średnie odchylenie kwadratowe, miara pozwalająca na ocenę podobieństwa struktury natywnej oraz eksperymentalnej badanego układu
SARS	ang. <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i> , ciężki ostry zespół oddechowy, choroba zakaźna
TM	ang. <i>Transmembrane Domain</i> , domena transbłonowa
TMPRSS2	ang. <i>Transmembrane Serine Protease 2</i> , enzym proteaza transbłonowa seryny II
UNRES	ang. <i>United Residue</i> , pole siłowe wykorzystywane w pracy doktorskiej, w dosłownym tłumaczeniu zjednoczone reszty, co w odniesieniu do modelu gruboziarnistego oznacza zredukowany model łańcuchów polipeptydowych
VOC	ang. <i>Variant of Concern</i> , szczepy wirusów zakwalifikowane przez WHO jako budzące obawy dla zdrowia publicznego
WHO	ang. <i>World Health Organization</i> , Światowa Organizacja Zdrowia

II. Część teoretyczna

1. Koronawirusy – klasyfikacja

Koronawirusy są największą grupą wirusów należącą do rzędu *Nidovirales* w którym wyodrębniono cztery rodziny: *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Mesoniviridae* i *Roniviridae*. Wirusy należące do rodziny i podrodziny *Coronavirinae* są szeroko rozpowszechnione wśród ssaków, a jednymi z najliczniej występujących przedstawicieli tej podrodziny są wirusy należące do rodzaju betakoronawirusów.^{1,2} Początkowo betakoronawirusy uważano za patogeny powodujące jedynie łagodne infekcje dróg oddechowych lub jelit. Podejście to zmieniło się w 2002 roku, po wykryciu i zidentyfikowaniu wirusa SARS-CoV, czyli zespołu ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej. Wybuch epidemii zwiększył zainteresowanie świata nauki ewolucją, patogenezą i rozprzestrzenianiem się koronawirusów. Zdobyta wiedza okazała się nieoceniona podczas pandemii spowodowanej wirusem SARS-CoV-2, klasyfikowanym podobnie jak SARS-CoV do podrodzaju Sarbecovirus^{3,4} (rys. I.1).



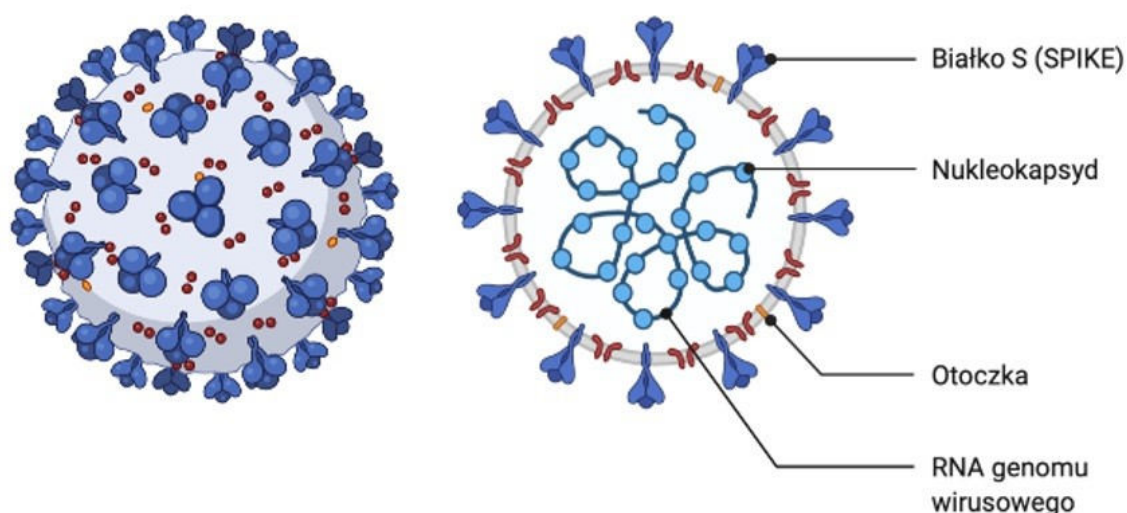
Rysunek I.1: Schemat przedstawiający podział wirusów rzędu *Nidovirales*, kolorem zielonym oznaczono rodzinę *Coronavirinae*.

1.1. Budowa koronawirusów.

Wszystkie wirusy z rzędu *Nidovirales* dzielą wspólną morfologię, są otoczkowymi, niesegmentowanymi wirusami RNA o dodatniej polarności.^{5,6} Zdolne do zarażania, przystosowane do przetrwania poza organizmem żywiciela kompletne cząstki wirusowe nazywane są wirionami. Wiriony koronawirusów są kulistymi tworami mającymi średnicę około 125nm. Ich charakterystyczną cechą są kolce w kształcie przypominającym maczugę, zlokalizowane na powierzchni otoczki wirusa. Wspomniane kolce tworzą skupiska wyglądem przypominające koronę słoneczną, stąd też to właśnie im koronawirusy zawdzięczają swoją nazwę.

Wiriony zbudowane są z czterech głównych jednostek strukturalnych: białka kolca (ang. *Spike Protein*, S), białka błony (ang. *Membrane Protein*, M), białka otoczki zwanego kapsydem (ang. *Envelope Protein*, E) oraz nukleokapsydu (ang. *Nucleocapsid*, N) składającego się z białka nukleokapsydu (ang. *Nucleocapsid Protein*, białko N) którego funkcją jest ochrona materiału genetycznego wirusa, oraz genomu RNA. Białka kolca (S), błony (M) i otoczki (E) zlokalizowane są w dwuwarstwie lipidowej otoczki wirusowej⁷ (rys. I.2).

Struktura informacji genetycznej koronawirusa sama w sobie nie jest skomplikowana. W uproszczeniu można powiedzieć, że składa się w dwóch trzecich z genu replikazy, który koduje białka niestrukturalne oraz w jednej trzeciej z białek strukturalnych i pomocniczych. Wirusy nie posiadają wyspecjalizowanych organelli komórkowych w związku z tym nie mają metabolizmu jak klasyczne formy życia. Ich nadrzędną funkcją jest replikacja.^{8,9,10}

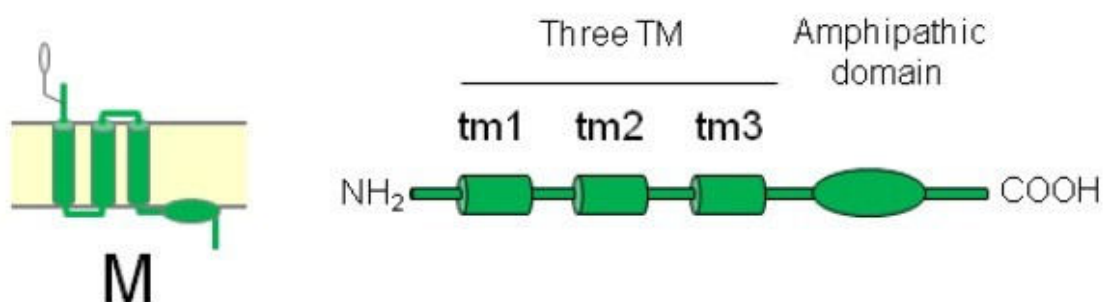


Rysunek I.2: Schemat budowy koronawirusa na przykładzie SARS-CoV-2¹¹.

Główną funkcją białka nukleokapsydu (N) jest ochrona wirusowego kwasu rybonukleinowego RNA oraz interakcja z innymi białkami strukturalnymi podczas procesu „pakowania” otoczki wirusowej – składania wirionu.^{12,13,14} Białko N bierze także udział w cyklu replikacji koronawirusów i pośredniczy w przekazywaniu odpowiedzi komórki gospodarza na infekcję wirusową.¹⁵

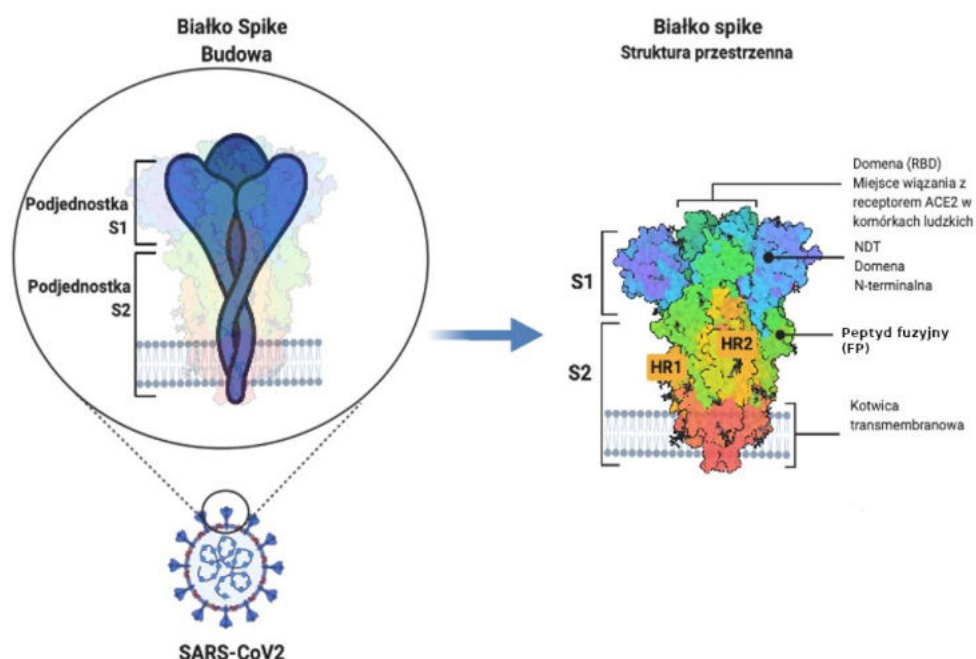
Białko otoczki (E) składa się z około 76–109 aminokwasów, co czyni go najmniejszym z głównych białek strukturalnych wyróżnianych w budowie wirusów. Jest ono dobrze zachowane genetycznie w różnych podtypach wirusów, jednakże białko to wciąż dosyć słabo zbadane. W związku z tym brakuje danych literaturowych w pełni wyjaśniających rolę białka E w procesie infekcji. Wiadomo, że w otoczce wirionu białko E działa poprzez interakcję z innymi białkami strukturalnymi. Interakcje białek E i M pozwalają zarówno na utrzymanie jak i modyfikację kształtu wirionu w taki sposób, aby ułatwić wirusowi uwalnianie materiału genetycznego do komórki gospodarza.^{13,16}

Białko błony (M) składające się z około 220–230 aminokwasów jest białkiem które występuje w otoczce wirusa w największej ilości. Zbudowane jest z trzech części nazwanych domeną N–końcową (ang. *N-terminal domain*, NTD) występującą w zewnętrznej części wirionu, trzech transbłonowych helis (ang. *Transmembrane Domain*, TM) oznaczanych jako regiony tm1, tm2 i tm3 oraz domeny końca karboksylowego (ang. *C-terminal domain*, CTD), zlokalizowanej w wewnętrznym regionie wirionu¹⁷ (rys.I.3). Białko M jest odpowiedzialne za proces pączkowania wirusa, kieruje składaniem wirionów poprzez interakcję z innymi białkami strukturalnymi, a także odpowiada za zaraźliwość wirusa. Uważa się także, że dzięki interakcjom M–M tworzony jest szkielet nadający kształt wirionom.^{18, 19}



Rysunek I.3: Schemat przedstawiający budowę białka błony (M)¹⁷.

Białko kolca (S) pośredniczy w procesie fuzji między błonami wirusa i gospodarza. Zbudowane jest z homotrimerów, czyli trzech identycznych, połączonych ze sobą polipeptydów. Homotrimery tworzą charakterystyczne maczugowate wypustki w których można wyróżnić rejon „głowy i łodygi”. Każdy z monomerów wchodzących w skład homotrimeru białka S zbudowany jest z dwóch podjednostek: S1 zlokalizowanej na N–końcu oraz S2 na C–końcu białka (rys. I.4). Podjednostka S1 odpowiedzialna jest za rozpoznawanie i wiązanie atakowanego receptora. Zbudowana jest ona z domeny N–końcowej (NTD) oraz domeny wiążącej receptor (ang. *Receptor-binding Domain*, RBD). Podjednostka S2 umożliwia wniknięcie (fuzję) wirusa do organizmu gospodarza. Składa się ona z peptydu fuzyjnego (ang. *Fusion Peptide*, FP), sekwencji powtórzeń heptapeptydu 1 i 2 (HR1 oraz HR2), domeny transbłonowej (TM) oraz ogona cytoplazmatycznego (ang. *Cytoplasmic Tail*, CT).^{16,18,20,21} Peptyd fuzyjny jest to krótki odcinek składający się z 10–15 aminokwasów, zawierający głównie reszty hydrofobowe, które przyczepiają się do błony komórkowej organizmu gospodarza. Obszary HR1 (zlokalizowany na C–końcu hydrofobowego białka fuzyjnego) i HR2 (zlokalizowany na N–końcu domeny TM) zbudowane są z powtarzalnego heptapeptydu: HPPHCPC, w którym H jest resztą hydrofobową (nie mylić z histydyną), P jest polarną (nie mylić z proliną) lub hydrofilową resztą, a C jest inną naładowaną resztą (nie mylić z cysteiną). HR1 i HR2 wspólnie tworzą strukturę niezbędną do wniknięcia wirusa do atakowanych komórek²². Domena transbłonowa (TM) bierze udział w wiązaniu receptora i wnikaniu wirusa do infekowanej komórki. Ogon cytoplazmatyczny składa się z około 37 aminokwasów, jest jednostką potencjalnie odpowiedzialną za zaraźliwość i rozprzestrzenianie się wirusa.^{23,24}

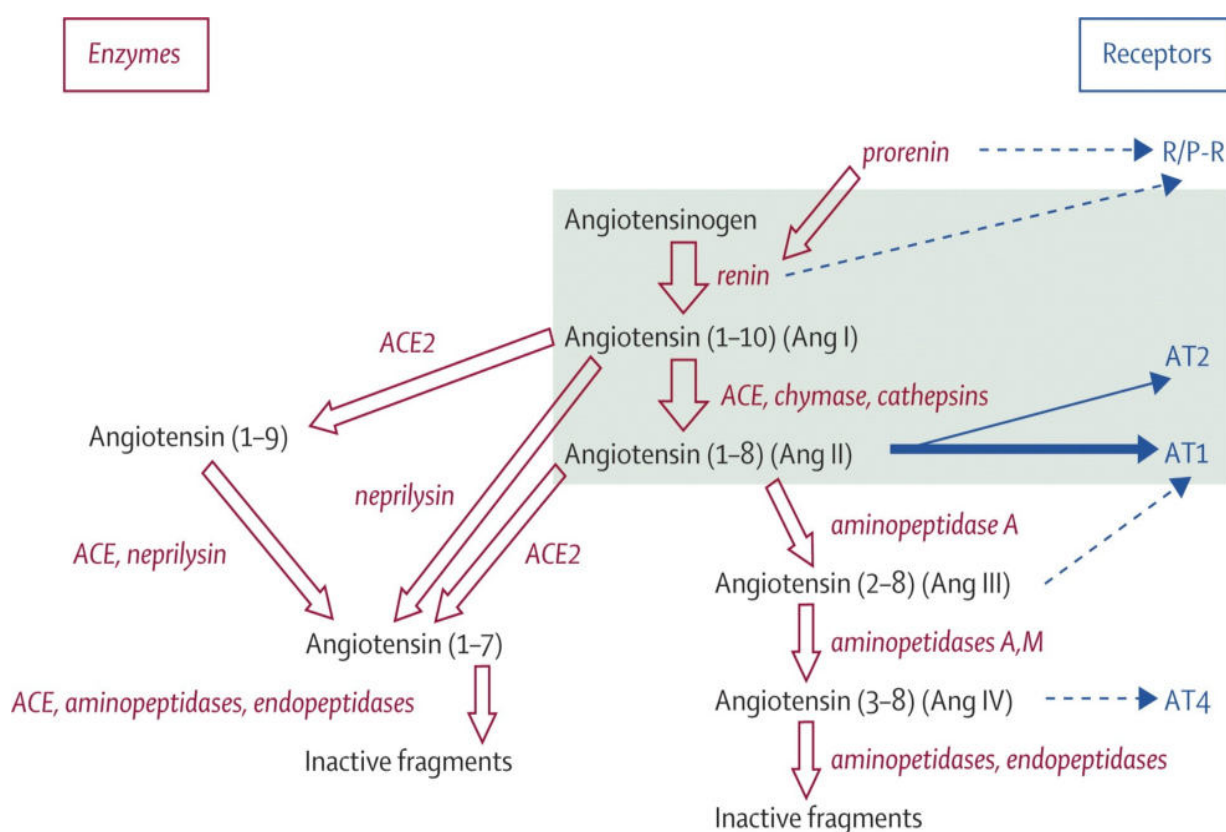


Rysunek I.4: Schemat przedstawiający budowę białka S²⁵.

Warto wspomnieć, że w stanie natywnym białko S jest nieaktywnym prekursorem i dopiero podczas infekcji, w wyniku działania enzymów (proteaz) komórek gospodarza jest ono dzielone na podjednostki S1 i S2. Dopiero podział ten aktywuje peptyd fuzyjny i pozwala na wnikanie wirusa do komórek zarażonego organizmu.²⁶ W przypadku SARS-CoV-2 można powiedzieć, że białko S odpowiedzialne jest za rozpoznanie i wiązanie receptora wiążącego enzym konwertujący angiotensynę II (ang. *Angiotensin Converting Enzyme 2*, ACE2).²⁷

2. Układ Renina–Angiotensyna (RAS)

Kluczowym elementem dla wyjaśnienia w jaki sposób zachodzi infekcja wirusem SARS–CoV–2 jest poznanie budowy oraz zasady działania receptora gospodarza. Enzym konwertujący angiotensynę II (ACE2) pełni bardzo ważną rolę w układzie renina–angiotensyna (ang. *Renin–Angiotensin System*, RAS). Odpowiada on za regulację czynności nerek oraz układu sercowo–naczyniowego. RAS jest procesem bardzo złożonym, dlatego wciąż prowadzone są badania naukowe mające na celu poszerzenie wiedzy w tym zakresie. Schemat działania układu renina–angiotensyna zobrazowano poniżej (rys. I.5).²⁸



Rysunek I.5: Schematyczny przegląd białek, peptydów, enzymów i receptorów oraz ich interakcji występujących w układzie renina–angiotensyna²⁶.

Enzym renina jest kluczowym regulatorem zaangażowanym w RAS. Renina jest wytwarzana w tak zwanych komórkach nabłonkowych przykłębuszkowych zlokalizowanych w ścianach tętniczek doprowadzających nerki, przy wejściu do sieci naczyń włosowatych kłębuszków nerkowych. Wraz z reniną w nerkach produkowana jest także jej nieaktywna forma czyli prorenina. Prorenina wyposażona jest w propeptyd zawierający sekwencję sygnałową kierującą proreninę do aparatu przykłębuszkowego nerki, gdzie jest przekształcana w reninę. Postać aktywna reniny zawiera od 339 do 343 reszt aminokwasowych. Prorenina zawiera dodatkowe 43 reszty których usunięcie powoduje aktywację białka.^{29,30,31}

Działanie reniny prowadzi do rozpadu angiotensynogenu pochodzącego z komórek wątroby. W wyniku tego rozpadu powstaje nieaktywna biologicznie angiotensyna I, która następnie przy udziale enzymu konwertującego angiotensynę (ang. *Angiotensin Converting Enzyme*, ACE) przekształcana jest w angiotensynę II. Biologiczna aktywacja angiotensyny II możliwa jest dzięki receptorom typu 1 (AT1). Pobudzenie tych receptorów powoduje wzrost ciśnienia tętniczego krwi. Angiotensyna II wspomaga wzrost i proces rozmnażania się komórek, bierze udział w pobudzaniu układu krzepnięcia oraz nasila procesy zapalne w organizmie.^{32,33} Działanie enzymu homologicznego do ACE, czyli konwertazy angiotensyny 2 (ACE2), prowadzi do przekształcenia angiotensyny I do angiotensyny (1–9), a angiotensyny II do angiotensyny (1–7). Angiotensyna (1–7) wyposażona w receptory MAS, działa przeciwzkrzepowo, przeciwzapalnie, obniża ciśnienie tętnicze krwi, przeciwdziała przerostowi lewej komory serca oraz zwłóknieniu mięśnia sercowego, a ponadto ogranicza wzrost i rozmnażanie się komórek w organizmie. Można powiedzieć, że wyniki działania enzymu konwertującego angiotensynę II są przeciwne do tych spowodowanych działaniem ACE. W organizmie ACE2 pełni więc nie tylko rolę enzymu przekształcającego, ale także regulującego poziom angiotensyny II (rys.I.5).³⁴

Biorąc pod uwagę mnogość funkcji organizmu regulowanych przez układ renina–angiotensyna można podejrzewać, że nieprawidłowości w działaniu układu renina–angiotensyna (RAS) mogą mieć poważne konsekwencje dla zdrowia. Efekty wewnątrzdzielnicze (tkanka–tkanka), parakryne (komórka–komórka) oraz wewnątrzkomórkowe obserwowane podczas działania układu RAS są zasadnicze dla utrzymania homeostazy sercowo–naczyniowej, immunologicznej, płucnej, nerwowej czy nerkowej. Dodatkowo układ renina–angiotensyna wpływa na przebieg chorób patofizjologicznych w szczególności tych dotyczących nerek i płuc. Wykazano także, że zaburzenia w działaniu RAS mogą potęgować stan zapalny oraz sprzyjać rozwojowi chorób w tym COVID–19.^{31, 35, 36}

2.1 Receptor konwertujący angiotensynę II (ACE2)

Receptor wiążący enzym konwertujący angiotensynę II (ang. *Angiotensin Converting Enzyme 2 – ACE2*) znajduje się na powierzchni komórek nabłonkowych. W 2004 roku Hamming i wsp. opublikowali pracę, w której pokazują, iż enzym konwertujący angiotensynę 2 jest obecny przynajmniej w 72 tkankach ludzkiego organizmu.³⁷ Jednakże do tej pory jest to białko stosunkowo słabo poznane i wciąż odkrywane są jego nowe lokalizacje i funkcje (rys. I.6).

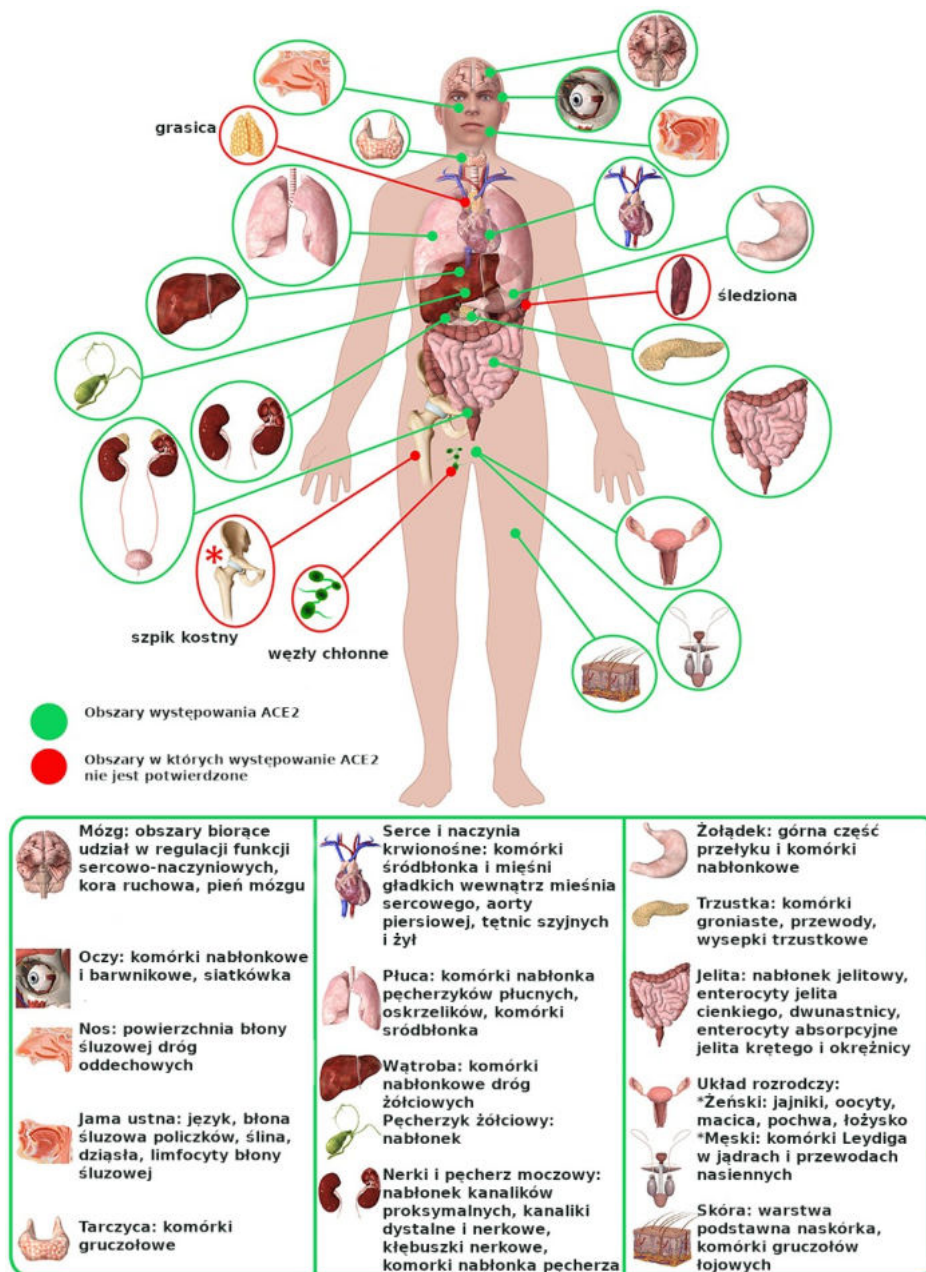
Początkowo w badaniach nad lokalizacją ACE2 koncentrowano się na jego roli w układzie renina–angiotensyna, co zaowocowało wykryciem jego obecności w tkankach nerki i tkankach układu sercowo–naczyniowego. Enzym konwertujący angiotensynę II pełniąc funkcję regulującą w układzie RAS uznawany jest za substancję chroniącą tkanki naczyniowe i śródbłonek oraz wspierający regenerację tych obszarów. Jednocześnie uszkodzenie ACE2 prowadzi do ciężkich dysfunkcji mięśnia sercowego, zwiększa ryzyko miażdżycy tętnic oraz nadciśnienia tętniczego.^{24,38} Badania dowodzą, że zmiany w obrębie serca często połączone są z nieprawidłowym funkcjonowaniem tarczycy, w szczególności z jej nadczynnością. Hormony tarczycy potencjalnie wpływają na uwalnianie ACE2 w nadmiernej ilości, a badanie stosunku ACE2 do ACE pozwalają na określenie stopnia zaawansowania nowotworów tarczycy.^{39,40,41} Aktywność enzymu konwertującego angiotensynę 2 wykryto też w mózgu, gdzie jest zaangażowany w proces uczenia się i zapamiętywania. Jego rola polega na regulacji ekspresji czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego. Ponadto ACE2 wykazuje pozytywny wpływ na regenerację neuronów u osób po udarze mózgu.⁴²

Warto wspomnieć także o obecności ACE2 w układzie pokarmowym, ze szczególnym uwzględnieniem enterocytów wszystkich części jelita cienkiego (w tym także dwunastnicy), jelita czczego i krętego (z wyłączeniem enterocytów okrężnicy). Jedną z głównych funkcji ACE2 w jelitach jest utrzymywanie homeostazy i regulacja mikrobiomu jelit poprzez wychwyt aminokwasów pochodzących z trawionego pożywienia, a także przekazywanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych.⁴³ W przewodzie pokarmowym ACE2 ulokowane jest także w komórkach mięśni gładkich, śródbłonku naczyń żołądka i okrężnicy, komórkach mięśni gładkich błony śluzowej mięśniówki i mięśniówki właściwej.

Poza przewodem pokarmowym, obecność ACE2 potwierdzono także w nerkach, trzustce, wątrobie, układzie oddechowym, układzie rozrodczym, błonach śluzowych, a nawet w oku (rys.I.6). Enzym konwertujący angiotensynę II zaangażowany jest też między innymi w utrzymywanie gospodarki elektrolitycznej w nerkach, regulacje funkcjonowania komórek β wysp trzustkowych,

regulację cyklu menstruacyjnego. Oprócz szeregu funkcji pełniących w tkankach całego ciała, enzym ten został zidentyfikowany jako receptor wychwyty dla patogenów, w tym koronawirusa SARS-CoV i SARS-CoV-2.^{33,44, 45, 46}

Mimo potwierdzenia obecności ACE2 w wielu narządach, tkankach oraz komórkach wciąż trwają badania mające na celu wskazanie nowych ról i lokalizacji enzymu konwertującego angiotensynę II. Obecnie wydaje się on nie występować w śledzionie, grasicy, węzłach chłonnych oraz niektórych komórkach układu odpornościowego i szpiku kostnym (rys.I.6)⁴⁷.

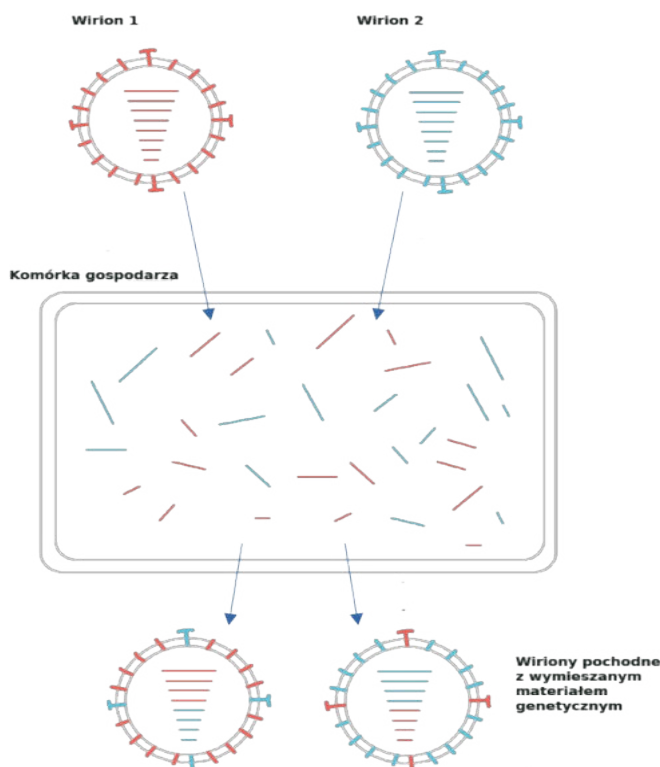


Rysunek I.6: Schemat przedstawiający występowanie ACE2 w organizmie ludzkim. Kolorem zielonym oznaczono miejsca, w których występowanie ACE2 zostało dobrze udokumentowane. Na czerwono oznaczono miejsca w których występowanie enzymu ACE2 nie jest w pełni potwierdzone⁴⁵.

3. Ewolucja wirusów

Ewolucja wirusów jest zależna od dwóch niezależnych od siebie procesów – mutacji genomu oraz selekcji naturalnej. „Mutacja” w odniesieniu do wirusów jest określeniem oznaczającym pojedynczą zmianę w informacji genetycznej najczęściej wywołaną przez błędy w procesie replikacji, rekombinacji lub nieprawidłowe działanie polimerazy czy też enzymów komórkowych.

W przypadku wirusów RNA do mutacji najczęściej dochodzi podczas replikacji genomu, czyli procesu intensywnego powielania materiału genetycznego. W replikacji uczestniczą enzymy katalizujące syntezę kwasów nukleinowych, które nie są zdolne do zweryfikowania poprawności powielanej w tym procesie informacji genetycznej, co może być źródłem spontanicznych zmian. Niezależnym od wirusów czynnikiem sprzyjającym zmienności mogą być też uszkodzenia w polimerazach powodujące ich nieprawidłowe działanie. Innym procesem pozwalającym na utrzymanie różnorodności genetycznej jest rekombinacja. Polega ona na wymianie materiału genetycznego między wirionami atakującymi tę samą komórkę gospodarza w tym samym czasie (rys. I.7).^{48, 49, 50}



Rysunek I.7. Schemat rekombinacji materiału genetycznego wirusów podczas procesu infekcji.

Nieco bardziej skomplikowanym mechanizmem prowadzącym do mutacji, zaobserwowanym u bakteriofagów DNA jest edycja materiału genetycznego przez białka kodowane przez gospodarza lub przez wyspecjalizowane systemy molekularne zwane retroelementami generującymi różnorodność (DGR, ang. *Diversity-generating retroelements*)⁵¹.

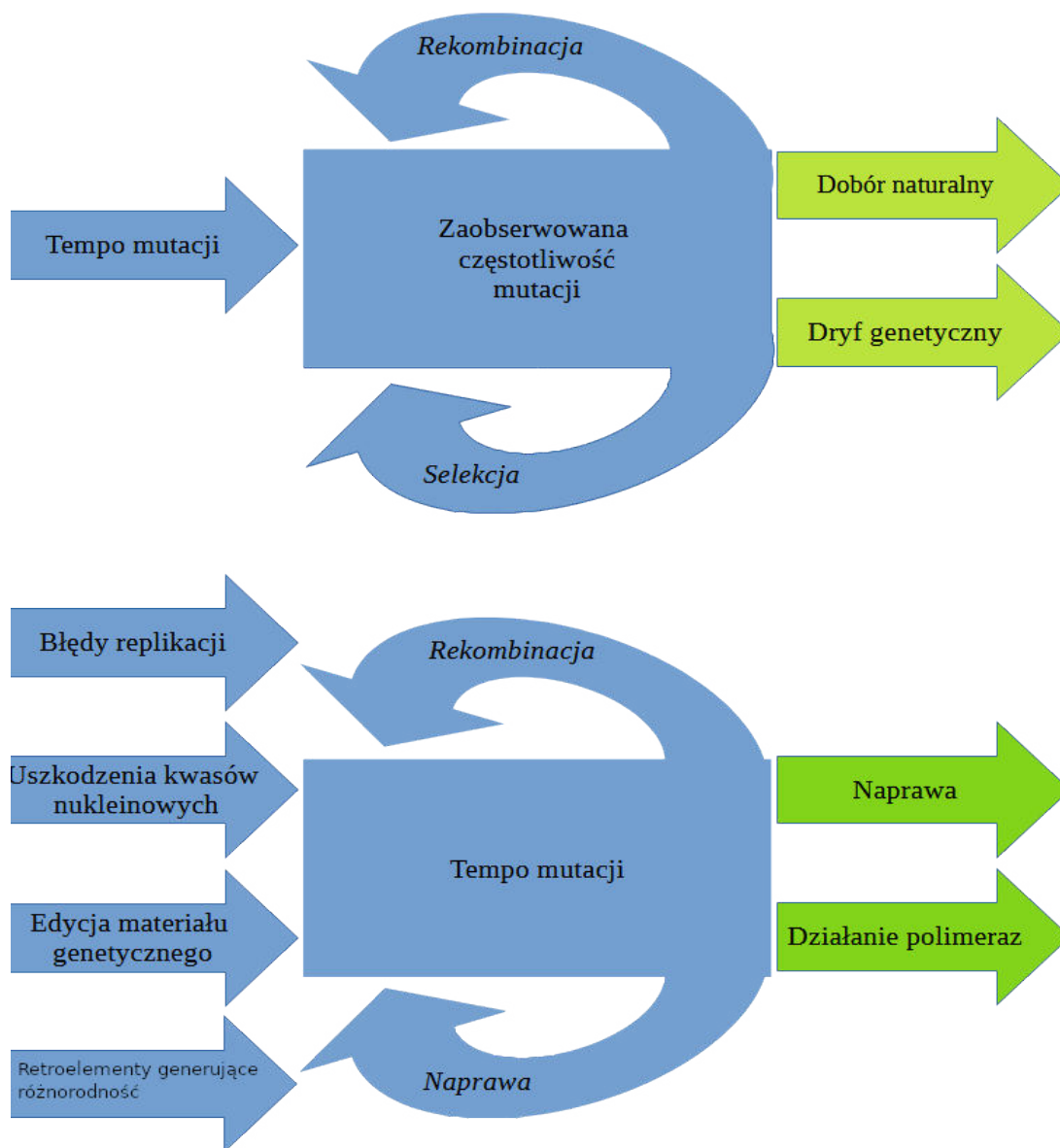
Drugim obok mutacji czynnikiem odpowiedzialnym za ewolucję wirusa jest wybór zmutowanych wirionów najlepiej przystosowanych do określonych warunków, czyli selekcja naturalna. Korzystne dla ekspansji wirusa mutacje lub ich kombinacje dzięki selekcji naturalnej mogą być nie tylko utrzymywane w populacji ale i uprzywilejowane. Za przydatne dla populacji wirusów można uznać mutacje, które mogą wpłynąć na rozszerzenie zakresu żywicieli wirusa, zwiększające tolerancję na leki, czy też pozwalające na uniknięcie odpowiedzi immunologicznej zaatakowanego organizmu. Prawdopodobieństwo z jakim dana zmiana w dotychczasowej informacji genetycznej zostanie przekazana następnemu pokoleniu wirusów nosi nazwę szybkości, inaczej tempa mutacji. W przypadku wirusów, „pokolenie” definiowane jest jako cykl infekcji komórkowej. Cyklem tym nazywa się proces obejmujący przyczepienie się wirionu do powierzchni komórki gospodarza, wniknięcie do wnętrza komórki, ekspresję genów, replikację, złożenie oraz uwolnienie nowych wirionów zdolnych do ponownej infekcji. Przekazywanie nowym pokoleniom wirusów zmian w materiale genetycznym przyczynia się do podniesienia wskaźnika mutacji wirusowych. Mianem wskaźnika mutacji wirusowych określa się ilość zmian genetycznych w populacji, które powstały w opisanym czasie – w przypadku wirusów w ciągu jednego pokolenia. Wysoki wskaźnik mutacji w praktyce oznacza, że dany wirus posiada wiele wariantów.^{52,53}

Procesem niezależnym od doboru naturalnego, prowadzącym do zmniejszenia różnorodności genetycznej populacji, ale mającym wpływ na przekazywanie określonej cechy jest dryf genetyczny. Dryf genetyczny prowadzi do utrwalania allelu, czyli pewnej wersji genu zakodowanej w kwasie nukleinowym i zależy wyłącznie od wielkości populacji wirusa.

Tym samym ignorowane są wpływy selekcji naturalnej, co oznacza, że zmiana zostanie utrwalona w populacji niezależnie od jej wartości adaptacyjnej. Gdy populacja jest liczna wpływ doboru naturalnego będzie przeważać nad dryfem genetycznym. Oznacza to, że szkodliwe allele zostaną usunięte z populacji, a większe prawdopodobieństwo utrwalenia będą miały te warianty wirusa które są lepiej przystosowane do życia w określonych warunkach. W przypadku gdy populacja jest niewielka wpływ dryfu genetycznego będzie dominował nad doбором naturalnym. W tej sytuacji przekazywane będą losowe cechy, a allele adaptacyjne mogą zostać przypadkowo utracone.

Różnorodność genetyczna wirusów zależy od wielu czynników, jednakże tempo mutacji ich materiału genetycznego jest szczególnie interesujące, gdyż jest głównym źródłem odpowiedzialnym

za ich zmienność genetyczną. Naturalna teoria ewolucji molekularnej mówi o liniowej zależności pomiędzy tempem mutacji, a tak zwanym tempem ewolucji molekularnej czyli procesem utrwalania się poszczególnych alleli w populacjach wirusów. Znajomość procesów leżących u podstaw zmienności genetycznej wirusów jest kluczowa dla zrozumienia i radzenia sobie na przykład z lekoopornością czy nowymi objawami chorób.^{46, 54}



Rysunek I.8: Zestawienie czynników wpływających na częstość oraz tempo mutacji. Zielone strzałki obrazują procesy regulujące zachodzące w populacji zmiany⁵².

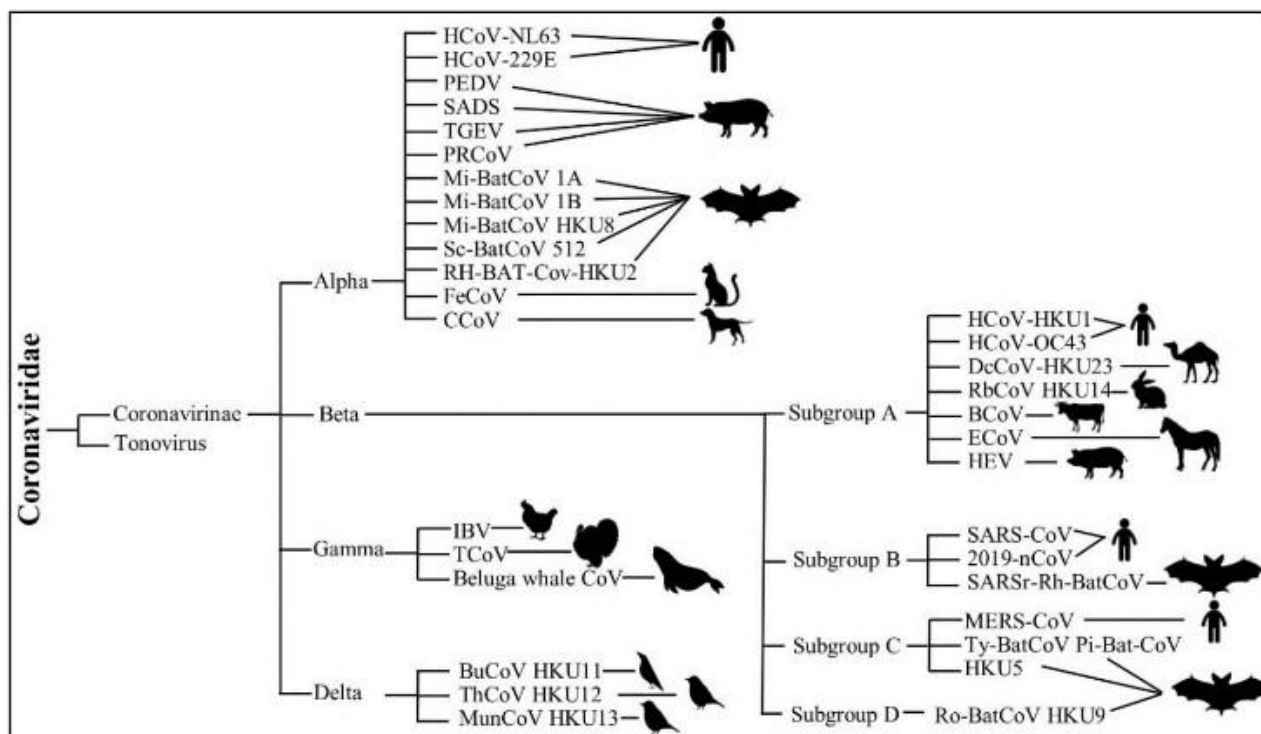
3.1 Ewolucja koronawirusów – przyczyny

Organizacją odpowiedzialną za taksonomię wirusów jest Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ang. *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV). Klasyfikacja wirusów opiera się na ustaleniu oraz porównaniu zarówno cech morfologicznych jak i właściwości nowo odkrytych wirusów z patogenami już opisanymi. W przeszłości alfa-, beta- i gammakoronawirusy były oznaczane odpowiednio jako koronawirusy grupy 1, grupy 2 i grupy 3, przy czym deltakoronawirusy były najmłodszą spośród zdefiniowanych grup.^{8,55,56,57}

Koronawirusy są grupą posiadającą największe genomy spośród wszystkich znanych wirusów RNA. Materiał genetyczny szacowany na 26,4 do 31,7 tys. nukleotydów sprawia, że genom przedstawicieli *Coronavirinae* jest szczególnie podatny na procesy mutacji i rekombinacji. Taki stan rzeczy przyczynia się do większej heterogeniczności przekazywanej przez wiriony informacji genetycznej, a tym samym sprzyja zróżnicowaniu zakresu żywicieli oraz zmianom w potencjale pojawienia się choroby.⁵⁸ Analiza sekwencyjna kwasów nukleinowych koronawirusów wskazuje, że wszyscy dotychczas poznani przedstawiciele *Coronavirinae* są ze sobą spokrewnieni i posiadają zbliżony zakres żywicieli. Wspólny przodek dla wszystkich znanych koronawirusów przypuszczalnie pojawił się około 8000p.n.e.⁵⁶

Podrodzina *Coronavirinae* jest bardzo rozległa. Wirusy wchodzące w jej skład infekują wiele gatunków ptaków i ssaków. Koronawirusy zazwyczaj powodują choroby układu oddechowego lub jelit, chociaż kilka z nich może również powodować zapalenie wątroby, zakaźne zapalenie otrzewnej, zapalenie nerek, zapalenie mięśnia sercowego, zapalenie gruczołu mlekowego lub zaburzenia neurologiczne, immunologiczne lub układu rozrodczego.⁵⁷

Badania zajmujące się drogą rozwojową wirusów wskazują, że koronawirusy z podrodziny *Coronavirinae* można podzielić na cztery obszerne grupy: alfakoronawirusy, betakoronawirusy, gammakoronawirusy oraz deltakoronawirusy. Podział ten bazuje na podobieństwach składu antygenowego i genetycznego poszczególnych grup oraz na zbliżonych strategiach procesu replikacji (rys. I.1, rys. I.9)².



Rysunek I.9: Schemat przedstawiający atakowane organizmy przez wirusy z rodziny i podrodziny Coronaviridae⁵⁹. Alfakoronawirusy obejmują ludzkie wirusy takie jak koronawirus HCoV 229E i NL63. Betakoronawirusy są podzielone na podgrupy A–D, przy czym HKU1 i OC43 należą do grupy A, SARS-CoV do grupy B a MERS-CoV do grupy C. Gammakoronawirusy są w dużej mierze pochodzenia ptasiego i obejmują IBV, a także wirusy ssaków morskich. Deltakoronawirusy obejmują głównie wirusy atakujące ptactwo.

Przedstawiciele alfa i betakoronawirusów atakują tylko ssaki. Powodują choroby układu oddechowego u ludzi oraz poważne problemy z układem pokarmowym u zwierząt. Gammakoronawirusy i deltakoronawirusy infekują ptactwo oraz niektóre ssaki morskie⁶⁰. Większość infekcji wirusami z grup alfa- i beta- koronawirusów przebiega u ludzi w łagodny sposób. Zagrożenie życia występuje jedynie w przypadku osób z upośledzonym układem odpornościowym, osób starszych oraz niemowląt i małych dzieci. Wyjątki stanowią SARS-CoV, SARS-CoV-2 oraz MERS-CoV. Infekcja koronawirusami z grup alfa i beta u zwierząt domowych może skończyć się śmiercią.^{61,62,63}

Prawdopodobnie rozpowszechnienie się koronawirusów związane jest z dużymi skupiskami potencjalnych żywicieli mogących wchodzić ze sobą w interakcję. Do takich miejsc można zaliczyć na przykład ферmy, schroniska lub powszechne, szczególnie w krajach azjatyckich targi z żywymi zwierzętami. Ingerencja człowieka w środowisko naturalne oraz kontakt między dużą ilością żywicieli zwiększa szansę infekcji. W naturalnych warunkach populacje poszczególnych zwierząt mają dość ograniczone możliwości kontaktu, dlatego zmiany żywicieli lub modyfikacje w przebiegu choroby są trudniej zauważalne i przebiegają zdecydowanie wolniej. Badania naukowe wskazują, że w schroniskach i hodowlach ilość psów posiadających przeciwciała świadczące o przebyciu infekcji przenoszonym drogą fekalno–oralną psim koronawirusem (CCoV–I i CCoV–II) jest większa niż w przypadku zwierząt mieszkających w mniejszym skupisku. Dowiedziono też, że w schroniskach w których przebywają jednocześnie psy i koty, zwierzęta były nosicielami zrekombinowanych między sobą koronawirusów psich (CCoV–I) i kocich (FCoV–II). Podobieństwa objawów i przebiegu obu chorób, jak również analiza sekwencji wirusów pozwalają podejrzewać, że oba wirusy wyewoluowały bezpośrednio ze wspólnego przodka.^{64,65} Ważnym aspektem zwiększającym ryzyko choroby są też ogólne warunki w jakich przebywają zwierzęta. Narażenie na stres, zaniedbywanie stanu zdrowia i higieny, ogólne osłabienie układu odpornościowego czyni organizm bardziej podatnym na chorobę.^{59,66}

Podczas namnażania się wirionów w komórkach gospodarza wzrasta prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji umożliwiających przystosowanie się koronawirusów zarówno do nowych warunków środowiskowych, jak i do przenoszenia się z jednego gatunku na inny. Adaptacja koronawirusów do transferu międzygatunkowego możliwa jest dzięki rekombinacji w obrębie domeny wiążącej receptor (RBD), zlokalizowanej w białku S wirionu. Zmiany w strukturze RBD mogą umożliwić wirionom efektywniejsze przyłączenie się do komórek gospodarza, a tym samym zwiększyć szansę na infekcję i uwolnienie wirionów potomnych.⁶⁷

3.2 Koronawirusy zwierzęce

Na przestrzeni lat koronawirusy wielokrotnie opisywane były jako czynnik powodujący ogromne straty ekonomiczne ponoszone w wyniku śmiertelnych chorób szczególnie wśród zwierząt hodowlanych.

Jednym z przykładów wirusa powodującego masowy pomór świń jest wirus hemaglutynacyjnego zapalenia rdzenia i mózgu świń – PHEV. U większości chorych zwierząt wirus prowadzi do infekcji jelitowych. W niektórych przypadkach PHEV może zaatakować układ nerwowy, co prowadzi do zapalenia mózgu oraz uporczywych wymiotów, a w konsekwencji śmierci zwierzęcia. Równie groźnymi szczególnie dla młodych prosiąt są wirusy zakaźnego zapalenia żołądka i jelit (TEGV) oraz wirus epidemicznej biegunki świń (PEDV). Oba wirusy powodują zaburzenia ze strony układu pokarmowego, a u niektórych zwierząt zapalenie błony śluzowej macicy. Rozwinięcie się któregośkolwiek z wirusów u większości świń kończy się śmiercią, a wysoka zaraźliwość w szczególności w hodowlach przemysłowych jest powodem olbrzymich strat.⁶¹

Równie niebezpieczny jest koronawirus bydlęcy (BCoV) oraz dotyczący drób i dzikie ptactwo wirus zakaźnego zapalenia oskrzeli – IBV. W przypadku bydła BCoV przenoszony jest drogą fekalno–oralną i może wywołać różne objawy, w tym choroby jelit u cieląt i krów w okresie laktacji. BCoV odpowiedzialny jest także za silną biegunkę prowadzącą do utraty masy ciała i odwodnienia. Poza dysfunkcjami układu pokarmowego bydlęcy koronawirus może powodować także chorobę zwaną „gorączką transportową” objawiającą się problemami z układem oddechowym, która jest szczególnie niebezpiecznymi dla cieląt.^{68,69} Wirus drobiu najczęściej prowadzi do chorób układu oddechowego, możliwe są też problemy z układem pokarmowym i moczowo–płciowym. Zakażenia niektórymi szczepami IBV kurcząt prowadzi do chorób nerek, a u kur znacznie zmniejsza produkcję jaj.

Do koronawirusów najczęściej występujących u kotów zaliczane są koronawirus jelitowy kotów (FECV) i wirus zakaźnego zapalenia otrzewnej kotów (FIPV). Pierwszy z nich, przenoszony drogą fekalno–oralną FECV zwykle powoduje łagodną biegunkę lub przebiega bezobjawowo. Podczas przedłużającej się infekcji istnieje możliwość zmutowania wirusa FECV w wirusa zakaźnego zapalenia otrzewnej. FIPV powoduje ogólnoustrojową i w większości przypadków śmiertelną chorobę – zakaźne zapalenie otrzewnej kotów (FIP).^{70,71} Podobny przebieg choroby powoduje koronawirus jelitowy psów – CCoV. Początkowo wirus ten powodował u zarażonych

psów łagodną biegunkę, z czasem zauważono, że u niektórych psów infekcja może prowadzić do zakażenia całego organizmu, a w konsekwencji śmierci.^{63,72}

Jednym z najczęściej wykorzystywanych w warunkach laboratoryjnych przedstawicielem koronawirusów zwierzęcych jest MHV czyli wirus mysiego zapalenia wątroby. Wirus ten w zależności od wyizolowanego szczepu może powodować u zainfekowanych myszy infekcje dróg oddechowych, jelit, wątroby, a także objawy neurologiczne. Mnogość szczepów wywołujących drastycznie różne objawy sprawia, że MHV jest idealnym modelem do badania odpowiedzi immunologicznej organizmu, podstaw procesu replikacji i patogenezy koronawirusów.^{73, 74, 75}

3.3 Przenoszenie się między gatunkami

Mechanizm międzygatunkowego przenoszenia się koronawirusów nie jest do końca poznany. Większość projektów naukowych dotyczących tego tematu opiera się na badaniu zwierząt żyjących w niewoli lub infekowanych wirusami w warunkach laboratoryjnych. Motywacją badań najczęściej jest znalezienie odpowiednich modeli zwierzęcych w celu opracowania nowych leków na znane choroby. Oczywiście powstają inicjatywy obierające za cel zbadanie dotychczas nieujawnionych wirusów wśród zwierząt w naturalnym środowisku, jednak jest to zadanie niezwykle wymagające i kosztowne.⁷⁶

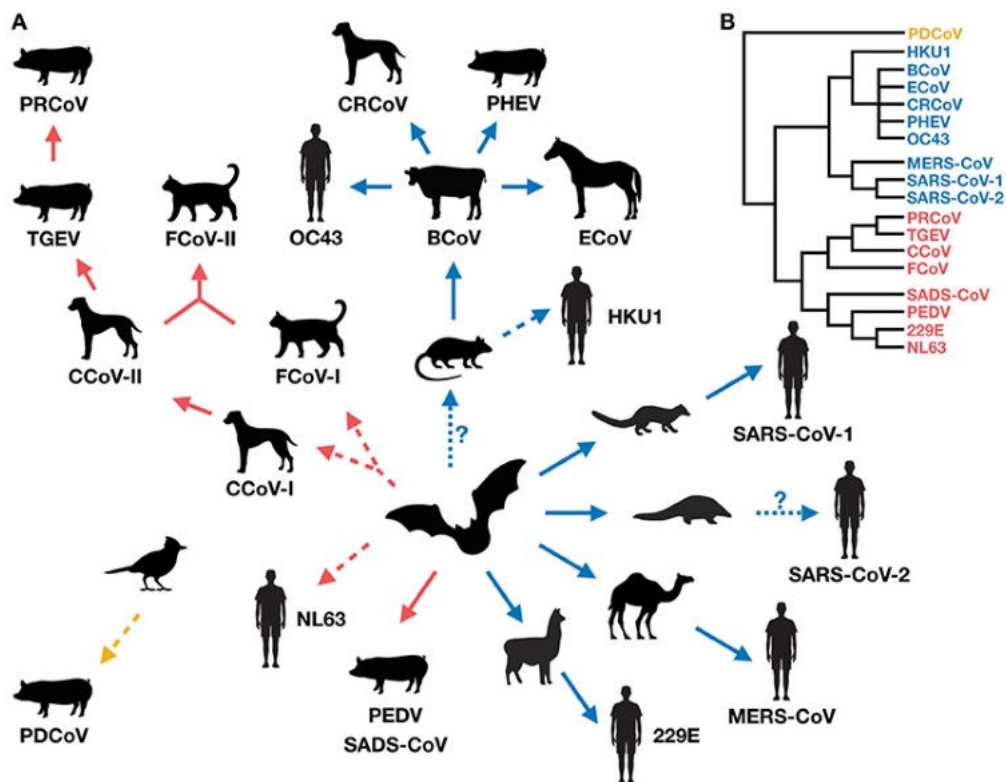
Zależności między koronawirusami występującymi wśród zwierząt przebywających w hodowlach lub wspólnych skupiskach wydają się oczywiste. Zwierzęta mają możliwość kontaktu ze sobą lub też swoim materiałem biologicznym. Przy założeniu obniżonej odporności lub choroby któregoś ze zwierząt istnieje prawdopodobieństwo przeniesienia się patogenu między osobnikami, a w konsekwencji mutacji materiału genetycznego. Wykazano, że wirus zakaźnego zapalenia żołądka i jelit świń (TGEV), wirus zakaźnego zapalenia otrzewnej kotów (FIPV) oraz koronawirus psów (CCoV) są ze sobą spokrewnione antygenowo. Koronawirusy te mogą tworzyć między sobą rekombinaty prawdopodobnie dlatego, że wszystkie trzy mogą zarażać krzyżowo koty, świnię oraz psy.⁷⁷ Podobnie bydłęcy koronawirus (BCoV) jest wirusem od którego wyewoluował szczep Equine-CoV powodujący zapalenie jelit u koni.^{78,79,80,81} We wszystkich wymienionych przypadkach prawdopodobnym jest, aby przedstawiciele gatunków będących gospodarzami tych koronawirusów przebywały w podobnym środowisku. Szansę na infekcję podnosi także sposób szerzenia się tych

wirusów drogą fekalno– oralną. Źródłem zarażenia może być nie tylko bezpośredni kontakt z zakażonymi wirusem odchodami, ale także korzystanie z zanieczyszczonych pomieszczeń, ściółki lub zbiorników wody. W transmisji zakażenia ważna rola przypada też opiekunowi kontaktującemu się z chorymi zwierzętami i środowiskiem zanieczyszczonym przez koronawirusy.⁸²

Trudną do wyjaśnienia kwestią jest jednak to w jaki sposób choroby przenoszą się między przedstawicielami gatunków, którzy w naturze mają niewielką szansę na interakcję, a budowa ich organizmów drastycznie się od siebie różni. Każdy z wirusów aby dostać się do organizmu gospodarza potrzebuje odpowiedniego receptora umożliwiającego efektywne atakowanie komórki gospodarza, a w konsekwencji replikację materiału genetycznego i uwolnienie wirionów potomnych.

Badania naukowe wskazują, że zwierzęta domowe i hodowlane mogą być bardzo ważnym ogniwem łączącym koronawirusy atakujące dzikie zwierzęta z koronawirusami ludzkimi.⁶ Początkowo koronawirusy atakujące ludzi traktowane były jako niegroźne wirusy odpowiadające głównie za łagodne infekcje układu oddechowego. Obecnie znanych jest siedem koronawirusów zdolnych do infekowania ludzi. Są to przedstawiciele betakoronawirusów wyizolowane w latach 60 XX wieku: HCoV–OC43 i HCoV–HKU1 powodujące przeziębienie oraz SARS–CoV–1, MERS–CoV, SARS–CoV–2 mogące powodować poważne problemy z układem oddechowym w konsekwencji prowadzące do śmierci. Do alfakoronawirusów infekujących ludzi należą HCoV–NL63 i HCoV–229E. Wymienione alfakoronawirusy oraz OC43 i HKU1 uznawane są za wirusy endemiczne, powodujące co roku około 15–30% infekcji dróg oddechowych. Przebieg choroby może być cięższy u seniorów, noworodków oraz osób z obniżoną w wyniku innych dolegliwości odpornością. W skrajnych wypadkach HCoV–NL63 może powodować ostre zapalenie krtani i tchawicy.^{83, 84}

Przyjmuje się, iż znani obecnie przedstawiciele *Coronavirinae* infekujący ludzi pochodzą od dziko żyjących zwierząt, a transfer od naturalnych żywicieli nastąpił za pośrednictwem żywiciela pośredniego – gatunku mającego bliższy kontakt z człowiekiem. W przypadku wirusów SARS–CoV–1, MERS–CoV, SARS–CoV–2, HCoV–NL63 oraz HCoV–229E żywicielem naturalnym były nietoperze^{60,85,86} a HCoV–OC43 i HKU1 prawdopodobnie pierwotnie infekowały gryzonie.⁵⁵ (rys. I.10)



Rysunek I.10: (A) Ewolucja i zależności koronawirusów występujących u ludzi i zwierząt dzikich oraz domowych. Strzałki czerwona, niebieska i żółta wskazują kierunek rozprzestrzeniania się koronawirusa odpowiednio dla **alfa-**, **beta-** i **deltakoronawirusów**. Ciągłe strzałki oznaczają bezpośrednie przenoszenie koronawirusa między gatunkami żywicieli, a strzałki przerywane oznaczają podejrzewane przenoszenie pośrednie przez niezidentyfikowany gatunek. Kropkowane strzałki ze znakiem zapytania oznaczają przypadki przeniesienia będącego losową interakcją bez podstaw w badaniach środowiskowych. (B) Uproszczona filogeneza koronawirusów⁸⁷.

Szeroko pojęte badania naukowe wskazują, że aż 7 z 11 znanych gatunków alfakoronawirusów oraz 4 z 9 betakoronawirusów zidentyfikowano tylko u nietoperzy, czyniąc je głównym rezerwuarami alfa i betakoronawirusów w środowisku naturalnym. Wiadomo że nie tylko ludzie, ale i zwierzęta domowe mogą cierpieć na koronawirusy przenoszone przez nietoperze lub organizmy blisko z nimi spokrewnione.^{58,59,84,88} Dowiedziono, że sekwencje genomowe wirusów atakujących nietoperze są bardzo podobne do tych występujących w wirusach powodujących biegunkę u świń – PEDV i SADS.^{61,89} Na podstawie badań filogenetycznych odkryto, że wirusy OC43 i 229E przeniosły się z dzikich zwierząt na człowieka za pośrednictwem bydła i ssaków z rodziny wielbłądowatych (*Camelidae*). Dodatkowo OC43 i koronawirus bydlęcy mają około 96% wspólnego materiału zgodności nukleotydowej. Prawdopodobnie przeniesienie się z gryzoni na

bydło w przypadku OC43 związane jest z obserwowaną bardzo dużą zmiennością genetyczną wirusa.^{90,91}

Ciągłe rozprzestrzenianie się wirusów z naturalnych żywicieli na zwierzęta domowe i ludzi spowodowane jest w dużej mierze działalnością człowieka, w tym nowoczesnymi praktykami rolniczymi i postępującą urbanizacją. Zajmowanie przez człowieka coraz większych terenów spowodowało, że wirusy pierwotnie występujące i rozprzestrzeniające się wśród zwierząt hodowlanych zaczęły pojawiać się u zwierząt dzikich, u których wcześniej nie były wykrywane. W 2019 roku jeden z azjatyckich szczepów koronawirusa psów (CCoV) został wyizolowany od wilka we Włoszech.^{92,93} Podobnie wirus PEDV atakujący świnie hodowane przez człowieka przeniósł się na populacje dzikich świń bytujących w USA.⁹⁴

3.4 SARS-CoV-1 (SARS)

Wirus SARS-CoV powodujący chorobę znaną jako ciężki, ostry zespół oddechowy (ang. *Severe Acute Respiratory Syndrome*, SARS) pojawił się w prowincji Guangdong w Chinach. Wirus ten atakował komórki nabłonkowe w płucach i w początkowych stadiach choroby przypominał grypę. Z czasem objawy zaostrzały się w efekcie powodując ciężką niewydolność oddechową, a w skrajnych przypadkach niewydolność wielonarządową. SARS-CoV przenosi się drogą kropelkową poprzez bezpośredni kontakt z zarażoną osobą. Podczas epidemii SARS rozpoznano ponad 8000 przypadków choroby, spośród których około 9% okazało się śmiertelne. Ilość zgonów była znacznie wyższa wśród osób starszych, gdzie u osób w wieku powyżej 60 lat śmiertelność zbliżała się do 50%.^{95,96}

Wirus wnika do organizmu zarówno człowieka, jak i innych ssaków wykorzystując jako receptor enzym konwertujący angiotensynę II. Po epidemii SARS w latach 2002–2003 priorytetem stało się wyjaśnienie w jaki sposób wirus trafił do ludzkiego organizmu.⁹⁷ Przeciwciała świadczące o kontakcie z wirusem SARS-CoV wykryto u cywet palmowych (łac. *Paguma larvata*) i innych ssaków na jednym z targowisk na których sprzedawano żywe zwierzęta. Dokładniejsze badania zarówno cywet hodowlanych, jak i dzikich wykazały, że zwierzęta hodowlane są żywicielami pośrednimi wirusa SARS-CoV. Dowodem na to były przeciwciała wykryte w izolacie pobranym od cywet.^{98, 99, 100, 101, 102, 103}

W 2005 roku zgłoszono odkrycie spokrewnionych z ludzkim SARS-CoV koronawirusów u nietoperzy należących do rodziny podkopców (*Rhinolophus*).^{104,105,106} Analiza porównawcza

materiału wyizolowanego od cywet oraz nietoperzy wykazała, że gatunkiem rezerwuarem u którego pierwotnie pojawił się SARS-CoV są nietoperze, a cywety prawdopodobnie zaraziły się od nich wirusem stając się żywicielem pośrednim. Szersze badania filogenetyczne różnych populacji nietoperzy z całego świata dowiodły, że u wielu przedstawicieli tych ssaków bytujących na różnych kontynentach występują wirusy bardzo zbliżone do SARS-CoV. Może to świadczyć o tym, że koronawirusy pokrewne SARS-CoV występowały w populacjach nietoperzy już na długo przed epidemią SARS.^{107,108,109,110} Spekulacje w jaki sposób wirus przeniósł się z nietoperzy na inne zwierzęta, a w konsekwencji wyewoluował w SARS-CoV mogący zarażać na ludzi trwają do dziś.

Przypuszczalnie interakcje pomiędzy nietoperzami różnych gatunków, zamieszkujących jedną z jaskini w prowincji Yuannn w Chinach doprowadziły do serii mutacji wirusa, który w ostateczności był zdolny do przeniesienia się z nietoperzy na żywiciela pośredniego w postaci cywety. Jaskinia w Yuann została uznana za dogodne środowisko dla mutacji materiału genetycznego, ponieważ zamieszkiwana jest przez wiele gatunków nietoperzy, a wykryte wśród nich szczepy wirusów posiadały wszystkie elementy genetyczne wykryte w SARS-CoV.^{111,112,113,114} Analiza procesu rekombinacji wirusów potwierdziła hipotezę, że szczepy zbliżone do ludzkiego SARS-CoV wykryte u cywet powstały w wyniku rekombinacji dwóch szczepów wirusów nietoperzy.¹¹¹ Wyizolowane z cywet palmowych szczepy SARS-CoV oznaczone jako cSz02 i cHb05 wykazywały niskie powinowactwo do ludzkiego receptora ACE2, a co za tym idzie było niewielkie prawdopodobieństwo infekcji wśród ludzi. Te same szczepy wykazywały natomiast wysokie powinowactwo do ACE2 cywet, jednocześnie powodując u zwierząt wysokie prawdopodobieństwo infekcji. Dopiero szczep hcGd03 wyizolowany zarówno od cywet jak i ludzi miał umiarkowane powinowactwo do ACE2 i potencjalnie był zdolny do infekcji obu gatunków, jednak nie miał zdolności do przenoszenia się między ludźmi. Dopiero mutacje zachodzące w ludzkim wirusie SARS-CoV z czasem doprowadziły do powstania szczepu epidemicznego zdolnego do przenoszenia się między ludźmi i odpowiedzialnego za wybuch epidemii w 2002 roku.^{96,115,116,117}

Przeniesienie się ze zwierząt na ludzi nastąpiło najprawdopodobniej poprzez ich kontakt ze zwierzętami zarażonymi wirusami pokrewnymi SARS-CoV. Proces ten nastąpił najprawdopodobniej na jednym na jednym z targowisk. Próbki pobrane od zwierząt z targu Shanzhen ujawniły ponad 99% zgodności nukleotydów z izolatami cywet i jenotów będących drugim potencjalnym żywicielem wirusa blisko spokrewnionego z SARS-CoV. Ponadto wykazano, że borsuki i fretki wytworzyły przeciwciała świadczące o kontakcie z tym wirusem. Podobne przeciwciała wytworzone zostały przez lokalnych sprzedawców oraz ludzi opiekującymi się

zwierzętami lub mających z nimi kontakt. Przeciwciała wytworzone u ludzi, (którzy nie zgłaszali objawów choroby) pozwalają sądzić, że mieli oni kontakt z bardzo blisko spokrewnionym wirusem jeszcze przed wybuchem epidemii SARS. Spekulowano, czy w takim przypadku istniała konieczność żywiciela pośredniego pozwalającego na wyewoluowanie wirusa do postaci zaraźliwego SARS-CoV. Mimo, że rola cywet nie jest oczywista, prawdopodobnie pozwoliły one na przyspieszenie mutacji wirusa która zwiększyła jego powinowactwo do komórek ludzkich.^{96,100,101,118,119}

Obecnie SARS jest chorobą pojawiającą się bardzo rzadko. Rozprzestrzenianie się wirusa zatrzymano poprzez wprowadzenie kwarantanny. Od wygaszenia epidemii na całym świecie pojawiło się tylko kilka przypadków zakażenia wirusem SARS-CoV.^{8,120}

3.5 MERS-CoV-1 (MERS)

Wirus MERS-CoV (ang. *Middle East Respiratory Syndrome*, MERS) powodujący bliskowschodni zespół niewydolności oddechowej, wykryty został na Bliskim Wschodzie w 2012 roku. Charakteryzuje się poważnymi infekcjami dróg oddechowych, a objawy choroby są bardzo zbliżone do tych obserwowanych w przebiegu SARS.

MERS-CoV jako receptor wykorzystuje enzym peptydazę dipeptydylową 4 (DPP4, znaną również jako CD26) i infekuje nierzęskowe komórki nabłonka oskrzeli oraz pneumocyty typu II zlokalizowane w pęcherzykach płucnych. Dipeptydylopeptydaza 4 jest enzymem należącym do proteaz, bierze udział w metabolizmie glukozy, reguluje pracę przewodu pokarmowego, wpływa na układ immunologiczny oraz pośredniczy w procesie powstawania stanów zapalnych.^{121,122,123,124,125, 126}

Przyjmuje się, że MERS-CoV wyewoluował przy zaangażowaniu żywiciela pośredniego z wirusów występujących u nietoperzy. Wirus blisko spokrewniony z MERS-CoV wykryto u kilkunastu gatunków nietoperzy należących do rodzin mroczkowatych (*Vespertilionidae*) i bruzdonosowatych (*Nycteridae*). Największą zgodność genetyczną z MERS wykazują szczególnie wirusy wykryte u dwóch gatunków – *Tylonycteris* i *Pipistrellus*, nazwane HKU4 i HKU5.^{127,128,129} Podczas badań serologicznych u wielbłądów jednogarbnych zamieszkujących Bliski Wschód zidentyfikowano przeciwciała MERS-CoV, co może sugerować, że zwierzęta te są żywicielami pośrednimi pomiędzy nietoperzami a ludźmi. Późniejsze badania potwierdziły tę teorię ponieważ

zidentyfikowano niemal identyczny szczep wirusa pokrewnego MERS-CoV zarówno u wielbłądów, jak i ludzi przebywających w pobliżu wielbłądów i mających z nimi kontakt.^{130,131,132,}

¹³³ Zainfekowane wielbłądy wydają MERS-CoV poprzez swoje płyny ustrojowe, szczególnie wydzieliny z nosa. Chore zwierzęta mają podwyższoną temperaturę ciała oraz wykazują objawy zbliżone do przeziębienia obserwowanego u ludzi. Osoby przebywające w pobliżu wielbłądów mogą zarazić się bezpośrednio od zwierząt MERS-CoV, a następnie wirus może przenosić się między ludźmi poprzez bezpośredni kontakt. MERS traktowany jest jako wirus endemiczny na Półwyspie Arabskim, sporadycznie przenosząc się w inne rejony świata. Do 31 lipca 2019 roku zgłoszonych zostało 2458 przypadków MERS potwierdzonych laboratoryjnie, spośród których 848 zakończyło się zgonem (34% śmiertelnych przypadków)¹³⁴. Podejrzewa się, że podobnie jak w przypadku SARS środowiskiem sprzyjającym mutacjom MERS oraz wirusów pokrewnych są targowiska z wielbłądami lub produktami zawierającymi mleko, skórę czy wełnę tych zwierząt.

Badania przeprowadzone w latach 2010–2013 w Arabii Saudyjskiej pokazują, że 90% z 310 i 74% z 203 przebadanych wielbłądów posiadało przeciwciała świadczące o kontakcie z MERS-CoV. Badania filogenetyczne próbek pobranych przed 2012 roku od wielbłądów bytujących na Bliskim Wschodzie, w Azji i Afryce pokazały, że koronawirusy podobne do MERS-CoV były obecne w organizmach wielbłądów już co najmniej przez kilka dekad.^{135,136,137,138,139,140}

Ewolucja wirusów blisko spokrewnionych do szczepu MERS-CoV zdolnego do zarażenia ludzi najprawdopodobniej przebiegała u poszczególnych gospodarzy przez wiele lat, na co wskazują stosunkowo duże różnice w budowie białka S wykrywane w badaniach genetycznych wirusów. Szacuje się, że podobieństwo w sekwencji białka między wirusem wyizolowanym od nietoperzy, a tym z wirusów ludzkich i wielbłądzich wynosi około 45–65%.^{141,}

^{142, 143, 144, 145}

4. SARS-CoV-2 (COVID-19)

Wirus SARS-CoV-2 po raz pierwszy zaobserwowano w grudniu 2019 roku w Wuhan w prowincji Hubei w Chinach. Zgłaszane przez chorych objawy takie jak gorączka, złe samopoczucie, suchy kaszel czy duszności rozpoznane zostały jako zapalenia płuc o podłożu wirusowym. Początkowo prasa określała nową chorobę jako „zapalenie płuc Wuhan”. Po serii badań okazało się, że za nietypowe zapalenia płuc odpowiada nowy koronawirus. Już w styczniu 2020 patogen odpowiedzialny za nową chorobę został zaklasyfikowany jako SARS-CoV-2, a sama choroba wywoływana przez wirus powszechnie nazywana jest COVID-19 (ang. *Coronavirus Disease-2019*).^{146,147,148,149,150}

Zakrojone na szeroką skalę badania wykazały, że nowy przedstawiciel koronawirusów podobnie jak SARS-CoV z 2003 roku atakuje enzym konwertujący angiotensynę II oraz podobnie jak w przypadku opisanych przez mnie SARS-CoV i MERS-CoV odpowiedzialne za jego przenoszenie na początkowym etapie były nietoperze i można te zwierzęta z dużym prawdopodobieństwem uznać za gatunek rezerwuarowy.^{85,151}

Wirus SARS-CoV-2 najbliższym spokrewnionym jest z izolatami wirusów pobranymi w 2013 i 2019 od nietoperzy z rodziny podkowcowatych (*Rhinolophidae*) żyjących w chińskiej jaskini Yunnan. Wirusy pokrewne pobrane od nietoperzy pomimo zgodności materiału genetycznego wynoszącej niemal 97% różnią się budową domeny wiążącej receptor (RBD) od ludzkiego SARS-CoV-2. W praktyce oznacza to, że wirus nietoperzy mimo niemal identycznego materiału genetycznego, nie jest zdolny do efektywnego przeniesienia się na ludzi ze względu na różnice w budowie białka łączącego się podczas infekcji z ludzkim enzymem konwertującym angiotensynę II. Taki stan rzeczy sugeruje, że ewolucja wirusa pokrewnego SARS-CoV-2 wymaga istnienia żywiciela pośredniego między nietoperzem a człowiekiem.^{152, 153}

Hipotetycznym żywicielem pośrednim umożliwiającym przeniesienie się wirusa z żywiciela rezerwuarowego na człowieka jest łuskowiec jawański (*Manis javanica*). Łuskowce są ssakami będącymi najpopularniejszym przedmiotem nielegalnego handlu. Są wykorzystywane jako źródło pożywienia, a ich łuski są wykorzystywane w tradycyjnej medycynie chińskiej. W początkowym etapie pojawiania się COVID-19 zauważono, że większość przypadków zachorowań jest powiązanych z rynkiem owoców morza w chińskiej prowincji Hubei. Pobrane z rynku próbki środowiskowe wykazały obecność wirusa SARS-CoV-2, stąd też uznano, że dzikie zwierzęta sprzedawane w tym miejscu mogą być związane z pojawieniem się wirusa wśród ludzi. Analogicznie jak miało to miejsce w przypadku przeniesienia się wirusa SARS-CoV-1.

Izolaty wirusów pokrewnych SARS-CoV-2 pobrane od łuskowców okazały się blisko spokrewnione z wirusem SARS-CoV-2 powodującym COVID-19 u ludzi. W związku z tym przypuszcza się, że to właśnie łuskowce lub inne zwierzęta sprzedawane na jednym z targowisk umożliwiły ewolucję koronawirusa nietoperzy pokrewnego SARS-CoV-2 do formy infekującej ludzi.^{154,155,156,157}

Przebieg COVID-19 różni się w zależności od początkowego stanu zdrowia osoby chorej. Ogólnie przyjętymi objawami charakterystycznymi dla choroby są: gorączka, zmęczenie, suchy kaszel, bóle mięśni i duszności. W skrajnych przypadkach wirus może powodować uszkodzenia płuc, serca, nerek, wątroby i skóry, oraz ośrodkowego układu nerwowego, a także doprowadzić ostrej niewydolności wielonarządowej a w skrajnych przypadkach do śmierci chorego. Oprócz pełnoobjawowej choroby, COVID-19 może przebiegać także bezobjawowo. Taki przebieg choroby nie zmienia jednak zdolności wirusa do przenoszenia się między ludźmi. Stąd też Światowa Organizacja Zdrowia zdecydowała o wprowadzeniu zasad bezpieczeństwa mających na celu zminimalizowanie skutków infekcji oraz ograniczenie możliwości rozprzestrzeniania się wirusa.^{158, 159,160}

4.1 Transfer z ludzi na zwierzęta

Opisane przez mnie przykłady koronawirusów obserwowanych szczególnie u zwierząt hodowlanych pokazują, że szczególnie ważne w przypadku szerzenia się wirusów drogą fekalno-oralną jest zachowanie higieny w hodowli oraz dbanie o dobrostan zwierząt. Badania wśród cywet wykazały, że zanedbywane zwierzęta przebywające na targowiskach były bardziej narażone na kontakt z wirusem SARS-CoV-1 w porównaniu do cywet żyjących w hodowlach zaopatrujących targowiska.⁹⁷ W przypadku rozprzestrzeniania się ludzkich koronawirusów zwierzęta okazały się zarówno rezerwuarami jak i pośrednikami, umożliwiając wirusom ewolucję do postaci zdolnej do przekazania wirusa człowiekowi. Analizując proces transferu koronawirusów ze zwierząt na ludzi warto przeanalizować, czy możliwy jest transfer wirusa wykrywanego u ludzi na zwierzęta. W procesie infekcji bardzo ważnym elementem jest odpowiednie dopasowanie się receptora gospodarza ze zlokalizowaną w białku S wirusa domeną wiążącą receptor. Odpowiednio silny kompleks wirus-receptor umożliwia wirusowi efektywną infekcję żywiciela.

Tabela I.1: Sumaryczne informacje dotyczące ludzkich koronawirusów.

Nazwa wirusa	SARS-CoV	MERS-CoV	SARS-CoV-2
Zasięg, data wybuchu	Epidemia, 2002–2003	Epidemia, 2012	Pandemia, 2019
Pochodzenie wirusa	provincia Guangdong, Chiny	Arabia Saudyjska	provincia Hubei, Chiny
Żywiciel rezerwurowy	Nietoperze z rodziny Podkowcowatych	Nietoperze z rodziny Podkowcowatych	Nietoperze z rodziny Podkowcowatych
Prawdopodobny gospodarz pośredni	Cyweta palmowa, Jenot azjatycki, Ryjonos piżmowy	Wielbłąd dromader	Łuskowiec jawajski
Gospodarz nabyty/incydentalny	Jenot azjatycki, Ryjonos piżmowy	Nieznany	Zwierzęta domowe – psy, koty Zwierzęta w zoo – lwy, tygrysy
Eksperymentalnie potwierdzona możliwość infekcji	Cyweta Palmowa, Jenot azjatycki, Ryjonos piżmowy, Marmozeta, Makak, Kot domowy, Chomik Syryjski	Makak królewski, Marmozeta, Myszy, Króliki	Fretka Kot domowy, Pies domowy
Sposób zarażenie transmisji na człowieka	Człowiek– człowiek	Człowiek– człowiek/wielbłąd	Człowiek– człowiek
Szacunkowa ilość potwierdzonych zgonów	8100	2500	7000000
Procentowa ilość przypadków śmiertelnych	9,6%	34,5%	1,5%

Wirus SARS-CoV do wnikięcia do komórki gospodarza wykorzystuje receptor wiążący enzym konwertujący angiotensynę II (ang. *Angiotensin Converting Enzyme 2* – ACE2). Zwierzęta, które zostały poddane badaniom na podatność infekcji SARS-CoV to: koty, fretki, kawie domowe, chomiki, marmozety pospolite, grivety oraz makaki. W warunkach laboratoryjnych makaki i rezusy mogą ulec zakażeniu wirusem i wykazywać podobne choroby jak ludzie.^{161,162,163} Kawie domowe zwykle wykazują łagodne objawy kliniczne, podczas gdy koty i chomiki złociste nie wykazują objawów choroby.^{164,165,166} W dwóch przeprowadzonych badaniach zainfekowane fretki wykazywały jedynie oznaki letargu. Ponadto fretki i koty zdolne są do przenoszenia wirusa w obrębie każdego z gatunków. W naturalnych warunkach koty mieszkające wraz z ludźmi chorymi na SARS zarażyły się, co sugeruje możliwą transmisję z człowieka na kota.^{167,168} Myszy i drób nie są podatne na zakażenie SARS-CoV-1, a świnie mogą zarażić się SARS-CoV-1, natomiast replikacja wirusa jest słaba.^{169,170,171,172}

MERS-CoV w odróżnieniu od SARS-CoV i SARS-CoV-2 jako receptor umożliwiający infekcję wykorzystuje DPP4. W wyniku przeprowadzonych na różnych zwierzętach badaniach okazało się, że mały rozwinięły odpowiednio łagodną do umiarkowanej i umiarkowaną do ciężkiej postać choroby. U świń i lam pojawił się wyciek z nosa, a króliki i alpaki nie rozwinęły objawów klinicznych. Jednakże w przypadku alpak zaobserwowano transfer wirusa alpaka-alpaka. Ponadto wirus MERS-CoV wykryto u owiec, kóz, krów i osłów.^{85,173,174} Wykazano, że w przypadku przenoszenia się wirusa MERS brak homologii sekwencyjnej receptora DPP4 u myszy, chomików, drobiu i frotek uniemożliwia tym zwierzętom zarażenie się wirusem zarówno bezpośrednio od nietoperzy, jak i od wielbłądów czy ludzi.^{6,175,176}

Transmisja SARS-CoV-2 z człowieka na psa jest możliwa, natomiast bardzo mało prawdopodobna. Psy mają niską podatność na SARS-CoV-2 i nie wykazują objawów klinicznych ani transmisji z psa na psa. Prawdopodobną przyczyną jest niska ekspresja ACE2 w psich drogach oddechowych.^{177,178,179} Kotowate także wykazują małą podatność na infekcję wirusem SARS-CoV-2. Jednakże, zgromadzone dowody potwierdzają, że możliwy jest transfer wirusa z człowieka na kota, a także na tygrysa czy lwa, co potwierdzają doniesienia z ogrodów zoologicznych.^{180,181,182,181} Możliwy jest także transfer z człowieka na goryla.¹⁸³ W przypadku innych zwierząt możliwe jest przenoszenie się SARS-CoV-2 między fretkami, norkami i chomikami.^{184,185,186,187} Myszy, świnie oraz drób nie są podatne na zakażenie SARS-CoV-2, co oznacza, że budowa ACE2 uniemożliwia wytworzenie dostatecznie silnego kompleksu wirus-receptor aby możliwa była infekcja.^{178,188,189,190}

Przetoczone prze mnie przykłady pokazują, że zwierzęta towarzyszące człowiekowi mogą rozwijać pełnoobjawowy SARS, MERS lub COVID-19, jednakże dzieje się to tylko i wyłącznie

w specyficznych warunkach. Bardzo mało prawdopodobne jest aby zwierze zaraziło się od człowieka w warunkach naturalnych którąkolwiek z opisanych chorób. Oczywiście, by zmniejszyć prawdopodobieństwo zakażenia, zawsze należy pamiętać o zachowaniu higieny, zwłaszcza w przypadku kontaktu ze zwierzętami dzikimi lub wykazującymi objawy jakiegokolwiek choroby.

4.2 Droga zarażenia

Mówiąc o zarażeniu wirusem SARS-CoV-2 warto przeanalizować sposób, w jaki wirus może znaleźć się w organizmie gospodarza oraz jakie warunki powinny być spełnione aby kontakt z patogenem zakończył się chorobą. W poprzednich częściach swojej pracy doktorskiej wspomniałam, że SARS-CoV-2 rozprzestrzenia się u gospodarza atakując enzym konwertujący angiotensynę II. Struktura ACE2 jest bardzo podobna u wszystkich ssaków, a enzym jest dobrze zachowany genetycznie i występuje w wielu narządach (rys.I.6). Pomimo dużego podobieństwa strukturalnego, podobieństwo sekwencyjne potrafi się różnić w kluczowych miejscach pomiędzy gatunkami. Wiadomo że różnica nawet jednej reszty aminokwasowej potrafi diametralnie zmienić prawdopodobieństwo infekcji.^{191,192} Kolejnym ważnym aspektem o którym warto wspomnieć, jest fakt, iż sprawnie funkcjonujący układ immunologiczny potrafi zapobiec infekcji. Innym ważnym aspektem decydującym o powodzeniu ataku, jest ilość wirusów która wnika do organizmu.

Podczas procesu infekcji wirus SARS-CoV-2 angażuje jako receptor umożliwiający wniknięcie do komórek gospodarza enzym konwertujący angiotensynę II będący nieodłączną częścią układu renina-angiotensyna (rys.I.5).^{193,194,195,196} Wykazano, że zaburzenia równowagi układu RAS regulowanego przez ACE i ACE2 mają związek z przebiegiem chorób przewlekłych oraz zaostrzeniem się stanów zapalnych toczących się w organizmie. Spadek poziomu ACE2 przyczynia się do aktywowania niekorzystnego wpływu angiotensyny II. Atak wirusa SARS-COV-2 obniża poziom enzymu konwertującego angiotensynę 2 w organizmie, co może być bardzo niebezpieczne dla osób z wyjściowym niedoborem tego enzymu wywołanym innymi dolegliwościami.

W przypadku SARS-COV-2 przyjmuje się, że najbardziej narażone na infekcję są osoby u których wykryto tak zwane choroby współistniejące. Do najczęściej wymienianych w źródłach naukowych chorób współistniejących należą nadciśnienie, cukrzyca, przewlekłe choroby płuc i nerek. Jednocześnie zbyt niski poziom ACE2 w organizmie może przyczynić się do dłuższego utrzymywania się i zintensyfikowanych objawów COVID-19 u osób już zainfekowanych.

Czynnikami ryzyka opisywanymi w kontekście wyższego prawdopodobieństwa zakażenia i cięższego przebiegu COVID-19 są: podeszły wiek, płeć, palenie tytoniu czy przyjmowanie leków przeciwnadciśnieniowych będących inhibitorami ACE i blokerami receptora angiotensyny.

W literaturze naukowej podjęto szereg spekulacji nad wpływem zarówno chorób współistniejących jak i czynników ryzyka na wzrost ekspresji receptora ACE2 w organizmie. Badania naukowe nie są jednak w tej kwestii zupełnie zgodne.^{197,198,199,200,201,202,203}

Szerokie rozpowszechnienie enzymu konwertującego angiotensynę 2 w tkankach ludzkich i zwierzęcych nasuwa pytanie w jaki sposób dochodzi do infekcji. W przypadku większości koronawirusów do zakażenia chorobą dochodzi drogą oddechową lub fekalno-oralną. Badania wykazują, że dostępność ACE2 dla potencjalnych patogenów różni się w zależności od lokalizacji enzymu. Dominującą drogą zakażenia w przypadku SARS-CoV-2 jest droga kropelkowa, a głównym celem replikacji wirusa są górne drogi oddechowe. Badania epidemiologiczne wskazują, że SARS-CoV-2 może przenosić się także drogą fekalno-oralną, ponieważ wykryto aktywne wiriony także w kale.²⁰⁴ Najczęściej wirus przenosi się z człowieka na człowieka podczas kichania lub kaszlu. Wtedy wiriony obecne w ślinie zainfekowanej osoby przedostają się do dróg oddechowych osoby zdrowej atakując nabłonek nosa i gardła. Następnie infekcja przenosi się do oskrzeli i dalej do pęcherzyków płucnych, a w efekcie wywołuje pierwsze objawy choroby. Ważną kwestią związaną z przenoszeniem się wirusa SARS-CoV-2 jest możliwość bezobjawowej infekcji COVID-19. Zakażenia bezobjawowe wykrywane są przez wykrycie kwasu nukleinowego wirusa SARS-CoV-2 w próbkach pacjentów przy pomocy testów diagnostycznych. Wczesne wykrycie zakażenia i odcięcie możliwości przeniesienia wirusa na inną osobę jest niezbędne dla ograniczenia ilości zachorowań. W przypadku bezobjawowych infekcji jest to bardzo trudne, ponieważ osoba zarażona z reguły nie zdaje sobie sprawy ze swojej choroby i możliwości przekazania wirusa innym. W celu ograniczenia transferu wirusa wprowadzono więc kwarantannę oraz szczepienia ochronne przeciw wirusowi SARS-CoV-2.^{205,206,207,208, 209,210}

Taki sposób zakażenia związany jest z bardzo wysoką ekspresją ACE2 w komórkach rzęskowych nabłonka nosa i górnych oskrzeli. Co istotne, nie należy mylić ekspresji czy dostępności enzymu z jego poziomem czy też stężeniem. Podczas wyboru drogi wejścia do organizmu wirus wybiera miejsca gdzie znajduje się możliwie największa powierzchnia receptorów, zdolna do wychwytu wirionów. Enzym ACE2 lokuje się na powierzchni komórek i stamtąd jest uwalniany do krwioobiegu w celu regulacji układu RAS. Jeżeli stężenie ACE2 w organizmie jest niskie, czego powodem może być na przykład infekcja oznacza to, że niewielka ilość enzymu może zostać zaangażowana w układ RAS. Nie zmienia to faktu, że tkanka zdolna do

wydzielania enzymu wciąż jest w tym samym miejscu, a ACE2 może być wykorzystany w inny sposób. W uproszczeniu można powiedzieć, że podczas infekcji wirus wybiera te tkanki, które mają największą powierzchnię zdolną do uwolnienia wybranego receptora. Przez wirusa SARS-CoV-2 enzym ACE2 traktowany jest jak receptor, co oznacza, że przyłączenie się do enzymu umożliwia wirusowi przedostanie się do krwioobiegu gospodarza. Podsumowując patogen wybiera najłatwiejszą drogę dostania się do organizmu gospodarza, a w miarę postępu choroby przedostaje się w inne rejony organizmu.

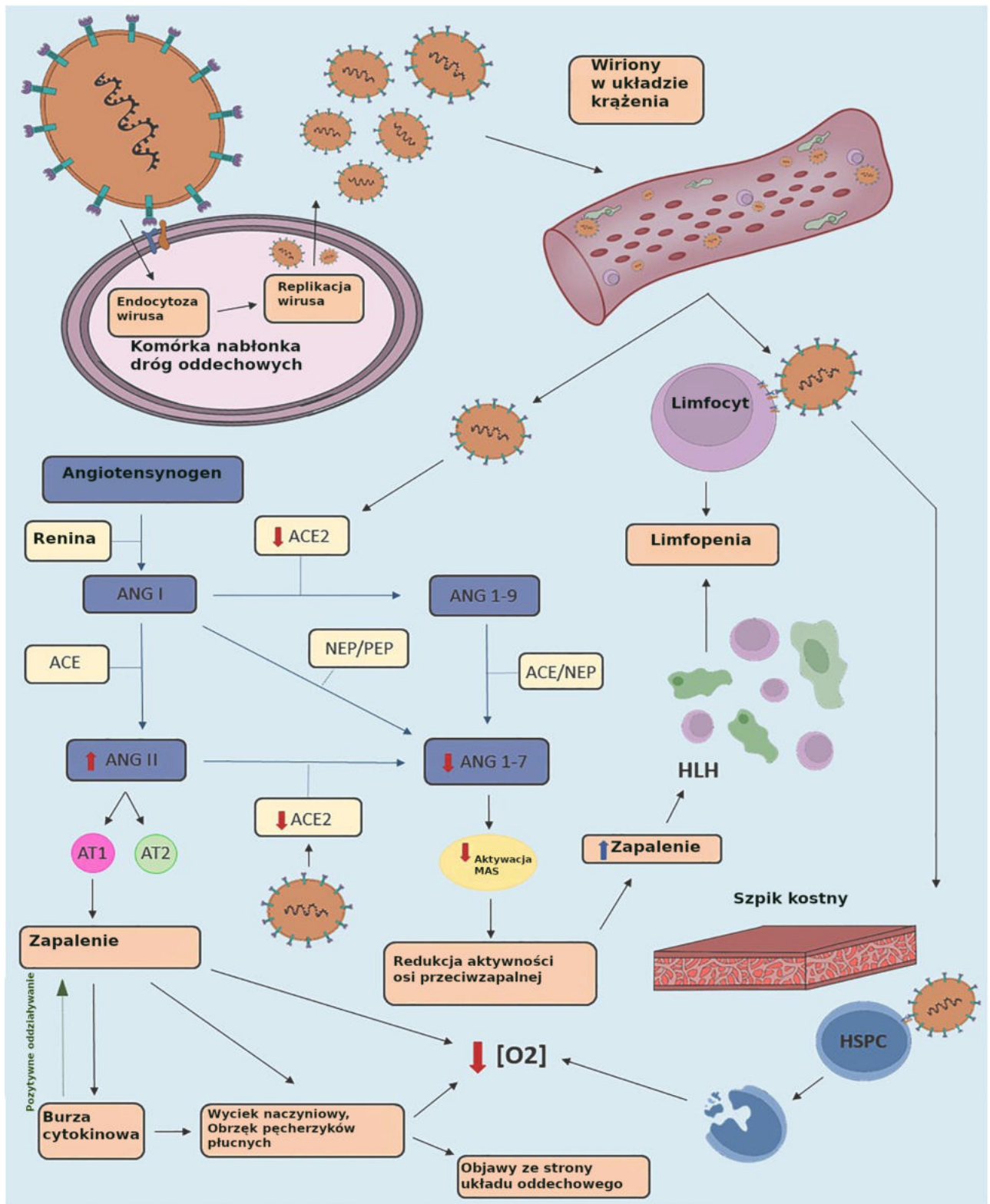
W przypadku układu oddechowego SARS-CoV-2 atakuje także płuca w których ekspresja receptora ACE2 nie jest tak wysoka jak w górnych drogach oddechowych, a obecność wirusa w tej lokalizacji nie jest wykrywana na początku, lecz już w przebiegu choroby. W płucach ACE2 jest wykrywany w komórkach zwanych pneumocytami. typu II, stanowiących zaledwie 5% wszystkich pneumocytów. Pneumocyty to komórki nabłonkowe powierzchni pęcherzyków płucnych, wyróżnia się wśród nich typ I i II. Wspomniane komórki typu II są bardziej rozproszone niż typ I, pełnią też funkcję ich komórek macierzystych. Pneumocyty typu I odgrywają istotną rolę w wymianie gazowej. Zmniejszenie aktywności enzymu konwertującego angiotensynę 2 w wyniku infekcji może utrudniać działanie pneumocytów typu II, a tym samym zakłócać proces wymiany gazowej. Zaatakowanie przez wirusa płuc powoduje, że wiriony bardzo szybko przedostają się do krwioobiegu powodując dalsze dolegliwości oraz uszkodzając inne narządy. Masywne niszczenie komórek nabłonka i śródbłonka może spowodować wyciek naczyniowy powodujący ostry stan zapalny, zespół ostrej niewydolności oddechowej (ang. *Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS), ostrej uszkodzenie płuc (ang. *Acute Lung Injury*, ALI) ALI, a ostatecznie zapaść wielonarządową i śmierć.^{35,211, 212}

Poza układem oddechowym bardzo wysoki poziom ekspresji enzymu konwertującego angiotensynę 2 obserwowany jest też w jelicie cienkim, okrężnicy, nerkach, mięśniu sercowym, jądrach oraz tarczycy. Do najpoważniejszych obserwowanych powikłań COVID-19 należą te związane z zakażeniem mięśnia sercowego, zwłóknieniem płuc oraz problemami z pracą nerek, wątroby czy też układu pokarmowego.^{207,213, 214, 215, 216, 217}

Na rysunku I.11 zostały zobrazowane zależności pomiędzy zaburzeniami równowagi systemu RAS, a patofizjologią COVID-19. W przypadku zakażenia SARS-CoV-2 wirus wnika do komórek gospodarza, a następnie rozpoczyna się replikacja wirionów. Uwolnienie wirionów potomnych z komórek płuc do krwioobiegu zmniejsza poziom krążącego i transbłonowego ACE2 oraz zwiększa wiramię. Innymi słowy zdolny do pełnienia funkcji w organizmie enzym konwertujący angiotensynę II wykorzystywany jest przez wirus jako nośnik umożliwiający atakowanie kolejnych narządów, co w konsekwencji utrudnia lub uniemożliwia wykorzystanie

przez organizm ACE2 zgodnie z jego przeznaczeniem. Zmniejszenie dostępności ACE2 powoduje zaburzenia układu RAS, co z kolei prowadzi do wzrostu poziomu angiotensyny II i spadku poziomu angiotensyny-(1-7). Wiązanie angiotensyny II z receptorem angiotensyny II typu 1 (AT1) wyzwała reakcję zapalną, w tym wyciek naczyniowy i obrzęk pęcherzyków płucnych. Zmiany w obrębie układu oddechowego związane są bezpośrednio ze zmniejszeniem poziomu nasycenia organizmu tlenem. Objawy te mogą być wzmacniane przez tak zwany zespół burzy cytokininowej (ang. *Cytokine Storm*, CSS).

Cytokiny są cząsteczkami sygnałowymi produkowanymi przez leukocyty I wspomagającymi komunikację w układzie odpornościowym organizmu. Ich nadmiar w organizmie powoduje bardzo gwałtowną odpowiedź układu odpornościowego prowadzącą do ogólnoustrojowego stanu zapalnego, zaburzeń w funkcjonowaniu narządów, a w efekcie nawet do śmierci. W przebiegu COVID-19 mechanizm ten może przyczynić się do wzmocnienia objawów ze strony układu oddechowego. Ponadto regulacja w dół ścieżki ACE2/Ang-(1-7)/Mas zmniejsza działanie przeciwzapalne alternatywnej ścieżki RAS (rys.I.5). Ze względu na ekspresję ACE2 w dojrzałych limfocytach SARS-CoV-2 może powodować limfopenię, czyli spadek poziomu limfocytów we krwi spowodowany tak zwaną limfohistiocytozą hemofagocytarną (ang. *Hemophagocytic lymphohistiocytosis*, HLH) będącą wynikiem rozległego stanu zapalnego w organizmie. Dodatkowym czynnikiem wpływającym na upośledzenie funkcji układu oddechowego oraz ogólnoustrojowy stan zapalny może być zaatakowanie przez SARS-CoV-2 krwiotwórczych komórek macierzystych (ang. *Hematopoietic Stem and Progenitor Cell*, HSPC) zlokalizowanych w szpiku kostnym.^{218,219}



Rysunek I.11. Schemat przedstawiający zaburzenia układu Renina–Angiotensyna w przebiegu infekcji wirusem SARS–CoV–2, skrótami NEP oraz PEP zostały oznaczone kolejno ang. Neutral–endopeptidase, oraz ang. Prolyl–endopeptidase; będące enzymami z grupy proteaz³³.

4.3 Proces infekcji

Proces infekcji wirusem SARS-CoV-2 w uproszczeniu zaczyna się od przyłączenia się białka S wirusa do błony komórkowej gospodarza (hosta). Jak wspomniałam we wcześniejszej części pracy białko S tworzy charakterystyczne kolce na powierzchni wirionu, a w jego skład wchodzi połączone ze sobą podjednostki S1 i S2. Przed zaatakowaniem komórki hosta białko S jest rozszczepiane na podjednostki przy pomocy konwertaz probiałkowych. Podjednostka S1 wyposażona w domenę wiążącą receptor (RBD) przyłącza się do receptora gospodarza w postaci enzymu konwertującego angiotensynę 2. Podjednostka S2 natomiast zakotwicza białko S w błonie komórkowej hosta, a ponadto zawiera ona tak zwany peptyd fuzyjny i pośredniczy w fuzji błonowej po zakażeniu nowej komórki.^{220, 221}

W etapie poprzedzającym przyłączenie się do hosta białko S musi przejść pewną zmianę konformacyjną. Przechodzi ze swojego stanu podstawowego, do tak zwanego stanu metastabilnego, czyli stanu podatnego na przejście do konformacji o niższej energii. Takie przejście ma na celu zapewnienie wystarczającej energii do przewyciężenia odpychania między patogenem a błonami komórkowymi gospodarza i stworzenie porów fuzyjnych umożliwiających genomowi wirusowemu dotarcie do cytoplazmy komórek hosta. Czynniki umożliwiającymi wspomniane przejścia są dwa cięcia proteolityczne. Pierwsze z nich ma miejsce na granicy podjednostki S1 i S2, drugie następuje w tak zwanym miejscu S2' zlokalizowanym w podjednostce S2 białka S wirusa.²²²

W przypadku SARS-CoV-2 granica pomiędzy podjednostkami S1 a S2 jest rozszczepiana przez furynę w komórce żywiciela wirusa, podczas gdy rozszczepienie miejsca S2' nadal wymaga proteaz komórki docelowej.^{223, 224} Wejście do komórki jest zatem zależne od proteaz komórek docelowych. Do głównych proteaz należą: proteaza transbłonowa seryny 2 (ang. *Transmembrane Serine Protease 2*, TMPRSS2), oraz katepsyna L. Obie te substancje zaangażowane są w aktywację białka S. Ponieważ TMPRSS2 jest obecny na powierzchni komórki, aktywacja białka S za pośrednictwem TMPRSS2 zachodzi na błonie komórkowej, a aktywacja za pośrednictwem katepsyny zachodzi w endolizosomie. Rozszczepienie granicy S1-S2 jest warunkiem wstępnym rozszczepienia miejsca S2', a oba zdarzenia rozszczepienia są niezbędne do zainicjowania procesu fuzji wirusa do komórek gospodarza.^{221, 222, 225, 226}

Fuzja wirusa może zachodzić na drodze dwóch mechanizmów. Pierwszy z nich zakłada rozcięcie miejsca S2' przez białko TMPRSS2 zlokalizowane na powierzchni komórki, drugi przez katepsyny w endosomach zlokalizowanych wewnątrz komórki.²²⁷ TMPRSS2 należy do grupy białek transbłonowych typu II o aktywności proteazy serynowej, którego główna rola fizjologiczna

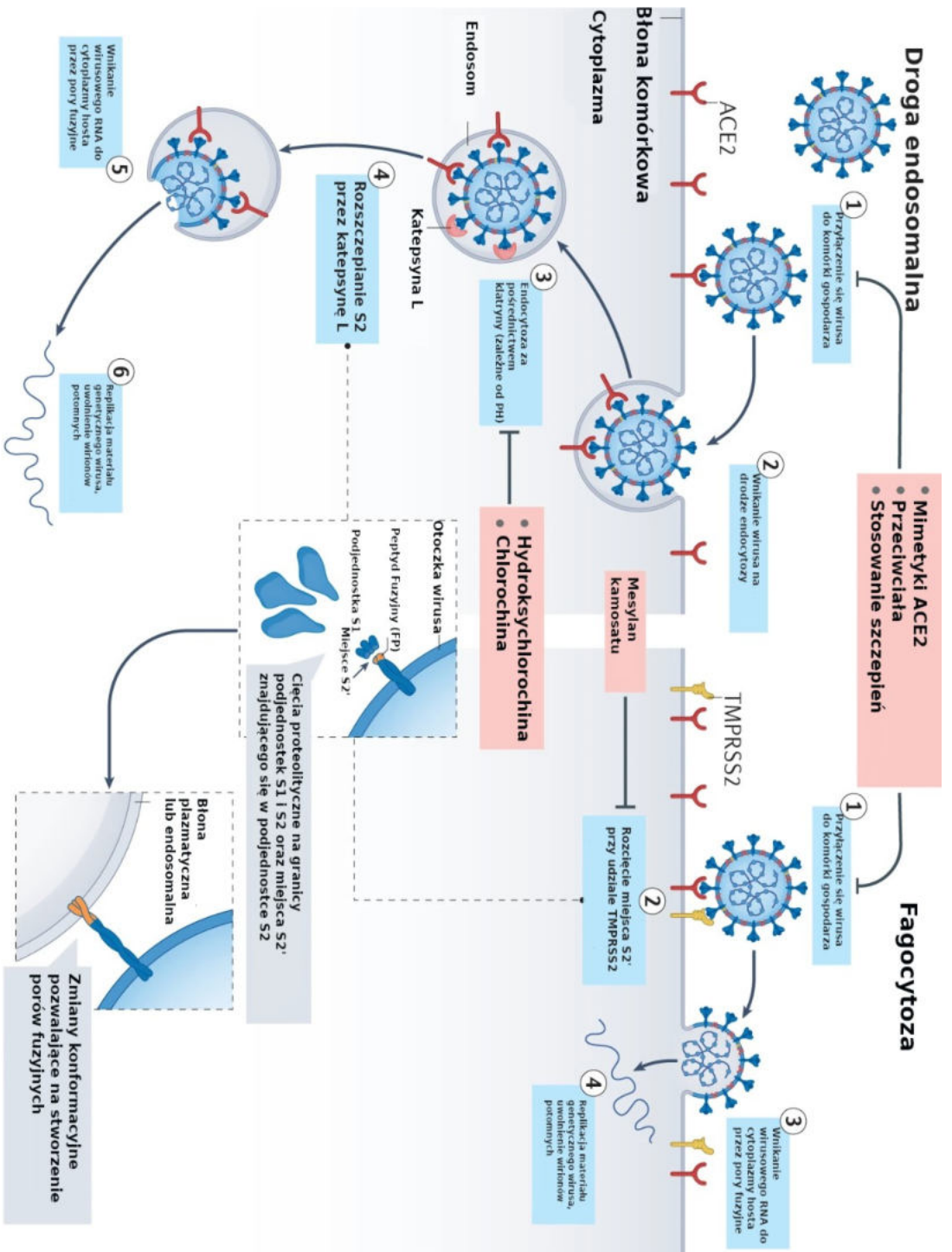
i specyficzność substratowa nie zostały jeszcze dokładnie poznane. Wykazano jednak, że pełni ważną rolę w przypadku infekcji wirusowych układu oddechowego – zwłaszcza wirusa grypy i koronawirusów. TMPRSS2 znajduje się w nabłonku przewodu pokarmowego, układu oddechowego i moczowo-płciowego. Wśród wymienionych tkanek trzy główne typy komórek zawierają jednocześnie TMPRSS2 i ACE2. Są to tak zwane pneumocyty typu II zlokalizowane w płucach, enterocyty wchłaniające w jelicie krętym i komórki wydzielnicze występujące w jamie nosowej. Mechanizm ten jest preferowany przez SARS-CoV-2.

Drugi mechanizm jest zależny od pH, wykorzystuje endocytozę i polega na rozcięciu S2' za pośrednictwem katepsyn (zwłaszcza katepsyny L). Katepsyny to niespecyficzne proteazy o aktywności endopeptydazy i egzopeptydazy, które uczestniczą w degradacji białek w endosomach i lizosomach. Mechanizm ten zachodzi gdy zaatakowany organizm nie posiada dostatecznego stężenia TMPRSS2 lub kompleks wirus-ACE2 nie napotka na cząsteczki TMPRSS2. W takim przypadku wirus SARS-CoV-2 jest wchłaniany poprzez endocytozę za pośrednictwem klatryny (ang. *clathrin-mediated endocytosis*) do endolizosomu, gdzie miejsce S2' jest rozszczepiane przez katepsyny. Aktywacja wirionu zachodzi w endosomie, a fuzja wirusa jest stymulowana przez kwaśne pH, co skutkuje uwolnieniem materiału genetycznego do cytoplazmy gospodarza.^{228, 229, 230}

W obu szlakach wejścia rozszczepienie miejsca S2' odsłania peptyd fuzyjny (FP), a dysocjacja S1 od S2 indukuje zmiany konformacyjne w podjednostce S2 które z kolei inicjują fuzję membranową. Połączenie między błonami wirusowymi i komórkowymi tworzy pory fuzyjne, przez które wirusowe RNA jest uwalniane do cytoplazmy komórki gospodarza i replikowane. Namnażanie się prowadzi w ostateczności do zniszczenia komórki gospodarza i uwolnienia wirionów potomnych zdolnych do zainfekowania kolejnych komórek.

Istnieje kilka czynników mogących zakłócać interakcję pomiędzy białkiem S a ACE2. Stosowanie mimetyków receptora konwertującego angiotensynę 2 zawartych w niektórych lekach przeciwastmatycznych oraz stosowanie szczepień ochronnych blokuje oddziaływanie białka S wirusa z receptorem ACE2 hamując jakkolwiek mechanizm wejścia do komórek gospodarza. Oprócz tego istnieją także mechanizmy ukierunkowane na powstrzymanie działania wirusa SARS-CoV-2 już po związaniu się z receptorem. Stosowanie leków zawierających organiczny związek o nazwie mesylan kamosatu będący inhibitorem proteazy serynowej ogranicza szlak wnikania wirusa bazujący na interakcji z TMPRSS2. Hydroksychlorochina i chlorochina zawarte głównie w lekach przeciwmalarycznych blokują zakwaszenie endosomów, które jest niezbędne dla aktywności katepsyny, a tym samym ograniczają szlak wejścia, w którym pośredniczy katepsyna. Hamowanie tworzenia kompleksu wirusa z ACE2 wykazują też opioidy, które dodatkowo mogą

wzmacniać odpowiedź immunologiczną organizmu, a tym samym być użyte jako leki na COVID-19.^{231, 232, 233, 234}



Rysunek I.12: Schemat obrazujący dwie możliwości infekcji wirusem SARS-CoV-2, droga endosomalna jest dominującym sposobem zakażenia się wirusem. W różnych rankach przedstawione są sposoby ograniczające możliwość infekcji oraz nazwy substancji chemicznych zawartych w lekach potencjalnie ograniczających lub hamujących poszczególne etapy wnikania wirusa do komórek gospodarza.²³³

4.4 Mutacje SARS–CoV–2

Choroba spowodowana wirusem SARS–CoV–2 okazała się najpoważniejszym globalnym kryzysem zdrowotnym od czasów pandemii grypy hiszpanki w 1918 roku. Mimo że znaczny postęp w badaniach klinicznych pozwolił lepiej zrozumieć mechanizmy oraz specyfikę SARS–CoV–2, na całym świecie wciąż notowane są nowe ogniska COVID–19. Podobnie jak inne wirusy RNA, SARS–CoV–2 jest podatny na ewolucję genetyczną wraz z rozwojem mutacji w czasie. W wyniku tych zmian powstają nowe, zmutowane warianty które mogą mieć inne cechy niż pierwotny wirus.

W trakcie pandemii opisano kilka wariantów SARS–CoV–2, z których tylko nieliczne zostały uznane przez Światową Organizację Zdrowia (ang. *World Health Organization, WHO*) za tak zwane warianty budzące obawy (ang. *Variant of Concern, VOC*), biorąc pod uwagę ich wpływ na zdrowie publiczne na świecie. Na podstawie aktualizacji epidemiologicznej WHO od początku pandemii zidentyfikowano pięć wariantów SARS–CoV–2 budzących obawy, są to:

- Alpha (B.1.1.7): opisany w Wielkiej Brytanii (UK) pod koniec grudnia 2020 roku,
- Beta (B.1.351): zgłoszony w Afryce Południowej w grudniu 2020 roku,
- Gamma (P.1): zgłoszony w Brazylii na początku stycznia 2021 roku,
- Delta (B.1.617.2): zgłoszony w Indiach w grudniu 2020 roku,
- Omicron (B.1.1.529): zgłoszony w Afryce Południowej w listopadzie 2021 roku.^{235,236,237}

Powyższe warianty różnią się od pierwotnie występującej wersji SARS–CoV–2 mutacjami w genomie wirusa, w tym także w obrębie białka S pełniącego kluczową rolę we wnikaniu wirionu do wnętrza organizmu gospodarza.²³⁸ Zmiany sekwencji wymienionych wariantów SARS–CoV–2 w stosunku do struktury natywnej z uwzględnieniem reszty aminokwasowej w której doszło do mutacji zestawiałam w poniższej tabeli. Liczba poprzedzająca opis modyfikacji jest numerem reszty aminokwasowej wchodzącej w skład domeny łączącej receptor zlokalizowanej w białku S SARS–CoV–2.

W ramach swojej pracy doktorskiej przeprowadziłam badania mające na celu wyjaśnienie zarówno procesu infekcji koronawirusem u wybranych gatunków zwierząt¹⁹⁰ jak i porównanie zjadliwości koronawirusa w zależności od wariantu.

Tabela I.2: Zestawienie mutacji w poszczególnych resztach aminokwasowych w wybranych wariantach wirusa SARS-CoV-2. Znak "→" pokazuje wymianę aminokwasu w stosunku do struktury natywnej receptora kolca wirusa SARS-CoV-2.

Alpha	Beta	Gamma	Delta	Omicron
				339, G → D
				371, S → L
				373, S → P
				375, S → F
	417, K → N	417, K → T		417, K → N
				440, N → K
				446, G → S
			452, L → R	
				477, S → N
				478, T → K
	484, E → K	484, E → K		484, E → A
			487, T → K	
				493, Q → R
				496, G → S
				498, Q → R
501, N → Y	501, N → Y	501, N → Y		501, N → Y
				505, Y → H

5. Metody obliczeniowe

Chemia obliczeniowa zajmuje się w dużym uproszczeniu przewidywaniem i tłumaczeniem skomplikowanych zagadnień wypełniających przestrzeń pomiędzy teorią a eksperymentem. Jako eksperyment opisuje się próbę realizacji nowatorskiego pomysłu lub doświadczenie naukowe przeprowadzane w celu zbadania jakiegoś zjawiska. Powszechnie jednak, uważa się, że eksperyment jest doświadczeniem przeprowadzonym w warunkach laboratoryjnych z wykorzystaniem odczynników chemicznych oraz specjalistycznej aparatury (pomijając niestety eksperymenty *in silico*). Często przeprowadzenie badań eksperymentalnych powiązane jest także z koniecznością uzyskania regulowanych prawem zezwoleń oraz rozwiązania pojawiających się dylematów natury etycznej. Kwestie organizacyjne oraz proceduralne w przypadku badań naukowych, w szczególności tych dotyczących ludzi i zwierząt bywają niezwykle czasochłonne. Pandemia wywołana koronawirusem SARS-CoV-2 pokazała, że czas odgrywa kluczową rolę dla zdrowia i życia ludzi. W takiej sytuacji metody teoretyczne pozwalają na uzyskanie szybkiej odpowiedzi na nurtujące pytania.

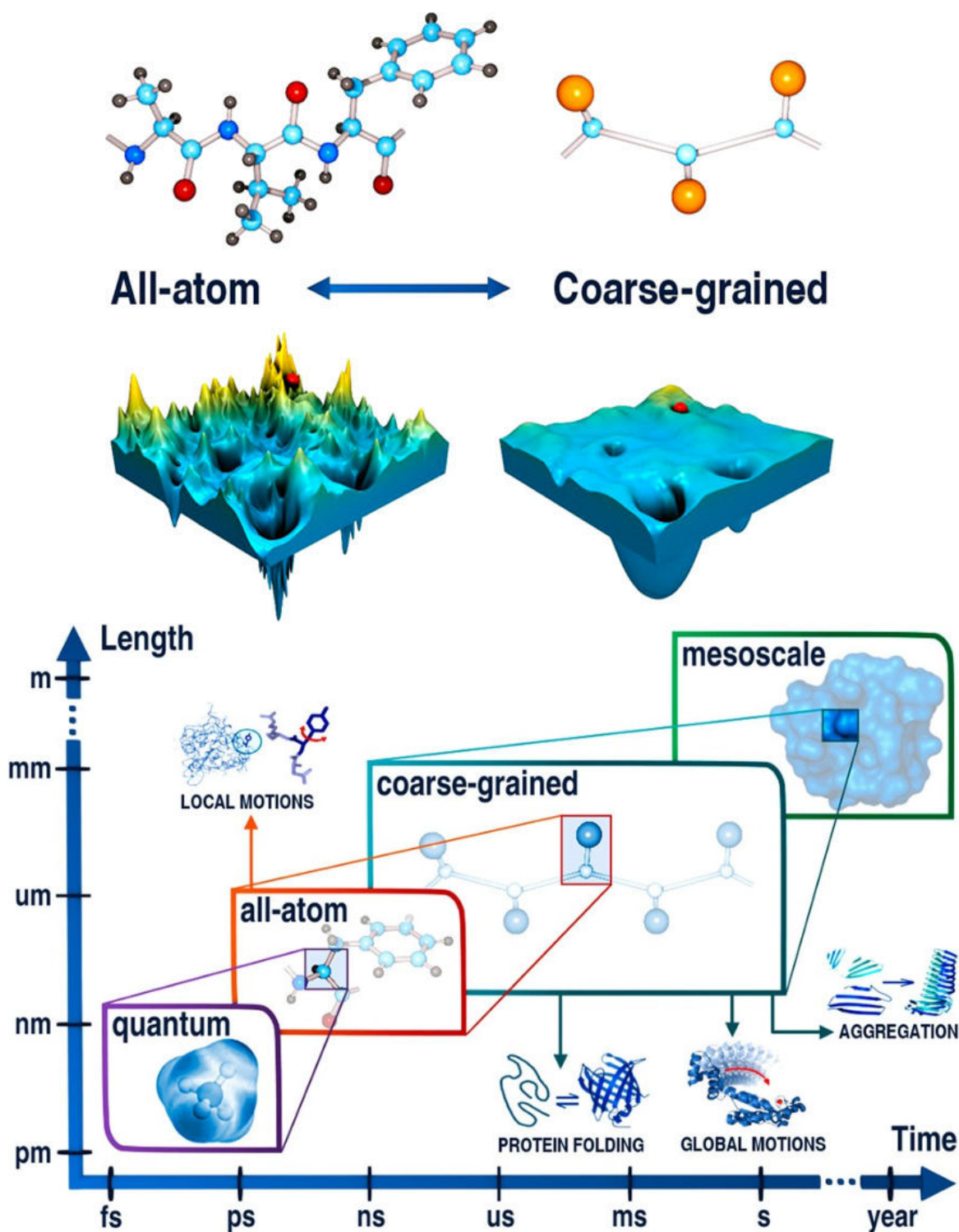
Początki chemii obliczeniowej datowane są na lata 50-te XX wieku, jednak to szybki postęp technologiczny lat 70-tych sprawił, że dziedzina ta bardzo się rozwinęła. Gwałtowny wzrost mocy obliczeniowej ówczesnych komputerów połączony ze spadkiem ich ceny spowodował obniżenie kosztów przeprowadzanych na coraz szerszą skalę obliczeń.

Pomimo ogromnego postępu w dziedzinie przewidywania struktur przestrzennych białek²³⁹, badania polegające na obserwacji ich zmienności konformacyjnej, a co za tym idzie efektywne przeszukiwanie hiperpowierzchni energii potencjalnej wymagają jeszcze sporo pracy.²⁴⁰ Budowane modele molekularne oraz projektowane funkcje energii używane do symulowania ich ewolucji w czasie powinny uwzględniać wiele czynników, w tym: właściwości konformacyjne łańcucha głównego oraz łańcuchów bocznych a także otoczenia. Model powinien także móc wychwycić różnicę w zachowaniu białek o zmienionej sekwencji, gdyż ewentualne mutacje w strukturze natywnej mogą być potencjalnym zagrożeniem dla zdrowia publicznego. Często to właśnie przypadkowa, pojedyncza zmiana w sekwencji drastycznie wpływa na funkcje lub upośledza strukturę badanego układu.^{241, 242} Jak pokazały przykłady zarówno koronawirusów zwierzęcych jak i ludzkich, wirusy mogą okazać się patogenami niezwykle niebezpiecznymi i nieprzewidywalnymi. Klasyczne modelowanie molekularne na poziomie atomowym w praktyce ograniczone jest wydajnością algorytmiczną i dostępną mocą obliczeniową. Nawet przy użyciu specjalnego superkomputera dedykowanego do obliczeń pełnoatomowej dynamiki molekularnej,

symulowanie większych układów jest niewydajne, a w niektórych przypadkach nawet niemożliwe.^{243, 244, 245} W związku z tym ten typ symulacji stosuje się głównie do przewidywania lokalnych ruchów białka.

Na chwilę obecną modele gruboziarniste wydają się być najlepszą metodą pozwalającą na efektywne przeszukiwanie przestrzeni konformacyjnej białek. Pozwalają one na zachowanie równowagi pomiędzy olbrzymią ilością danych uzyskanych z symulacji, a dobrą jakością otrzymywanych wyników. Modele gruboziarniste bazują na łączeniu całych grup atomów w centra oddziaływań (pseudoatomy). Takie uproszczenia pozwalają na symulowanie znacznie dłuższych skal czasowych dla znacznie większych układów niż w przypadku modeli pełnoatomowych.^{246, 247, 248} Dlatego, rozwiązanie w postaci użycia modelu gruboziarnistego jest obecnie dobrym kompromisem pomiędzy czasem obliczeń a odwzorowaniem rozmieszczenia atomów w badanym układzie. Dostępne narzędzia do modelowania molekularnego pozwalają na pełną rekonstrukcję gruboziarnistego układu molekularnego do poziomu pełnoatomowego.²⁴⁹ Otwiera to możliwości modelowania wieloskalowego, łączącego szybkość obliczeniową przypisywaną wykorzystaniu modeli gruboziarnistych z wysoką dokładnością klasycznej pełnoatomowej MD (ang. *Molecular Dynamics*, MD).^{250,251,252,253}

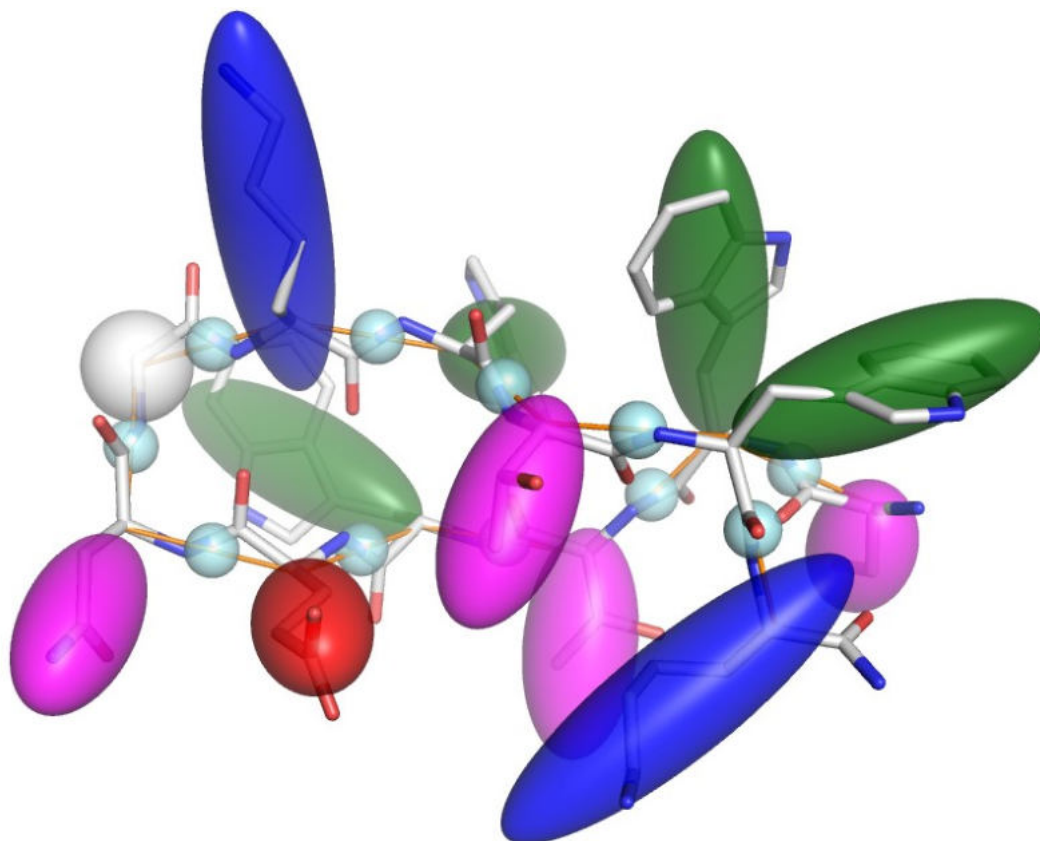
Współczesne narzędzia oferowane przez chemię obliczeniową pozwalają bowiem nie tylko na pokazanie procesu przy wykorzystaniu potwierdzonych eksperymentalnie danych, ale także na modelowanie i przewidywanie struktur cząsteczek istniejących dotychczas jedynie w rozważaniach teoretycznych, a także mają nieoceniony wkład na przykład w projektowanie leków i szczepionek ochronnych.^{254, 255, 256, 257}



Rysunek I.13. Zastosowanie różnych poziomów teorii do przewidywania konkretnych właściwości układów molekularnych: kwantowy, pełnoatomowy, gruboziarnisty i mezoskala. Przybliżona skala czasowa oraz rozmiar badanego układu zostały przedstawione odpowiednio na osi odciętych i rzędnych.²⁴²

5.1 UNRES

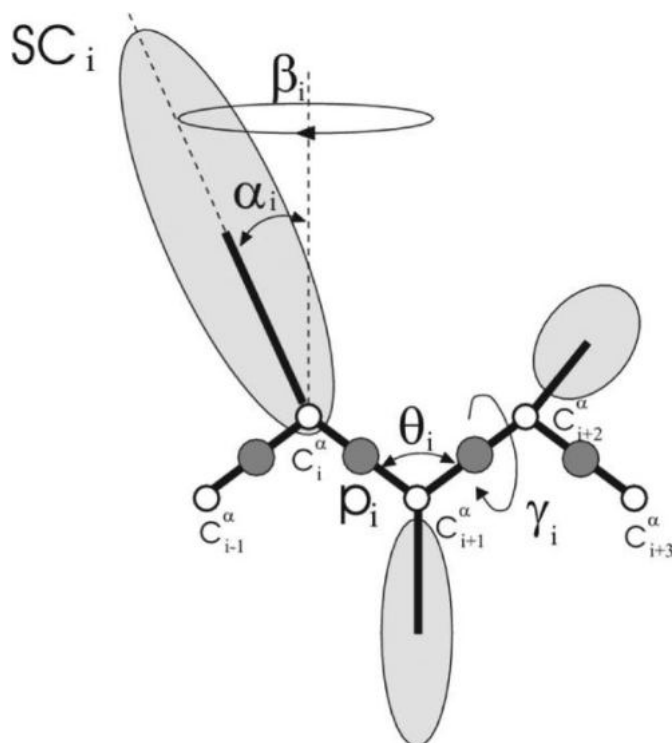
Nazwa UNRES pochodzi od angielskich słów *UN*ited oraz *RES*idue czyli w dosłownym tłumaczeniu zjednoczone reszty, co w odniesieniu do modelu gruboziarnistego oznacza zredukowany model łańcuchów polipeptydowych. Pomysłodawcami modelu są prof. Józef Adam Liwo z Uniwersytetu Gdańskiego oraz nieżyjący już prof. Harold A. Sheraga z Cornell University.



Rysunek I.14. Porównanie modelu pełnoatomowego i gruboziarnistego. Różnokolorowe elipsy przedstawiają przybliżenie łańcuchów bocznych. Niebieskie kulki przedstawiają położenie wiązań peptydowych (www.unres.pl).

Uproszczenia zastosowane w modelu UNRES polegają na przedstawieniu układu biologicznego (białka) jako zjednoczonego łańcucha głównego z przyłączonymi do niego zjednoczonymi grupami peptydowymi, gdzie wymienione grupy są miejscami interakcji. W modelu UNRES, przedstawionym na poniższym schemacie szkielet polipeptydowy jest reprezentowany jako sekwencja atomów węgla α ($C\alpha$) połączonych wiązaniami wirtualnymi. Grupa peptydowa (p) jest umieszczona w środku każdego wirtualnego wiązania szkieletu, a łańcuch boczny (SC) jest

przyłączony do odpowiedniego atomu $C\alpha$. Tylko grupy peptydowe i łańcuchy boczne są miejscami interakcji, a $C\alpha$ służą do określenia geometrii badanego białka^{258, 259,260,261,262}.



Rysunek I.15. Model łańcucha polipeptydowego używany w polu siłowym UNRES. Ciemne kółka reprezentują zjednoczone grupy peptydowe (p), białe kółka reprezentują atomy $C\alpha$, które służą jako punkty geometryczne, a elipsoidy reprezentują łańcuchy boczne (SC). Punkty p znajdują się w połowie odległości między dwoma kolejnymi atomami $C\alpha$. Wirtualne kąty wiązania θ , kąty dwuścienne wirtualnego wiązania γ oraz kąty αSC i βSC , definiują położenie łańcucha bocznego względem łańcucha głównego.

Funkcja energii pola siłowego UNRES jest oparta na fizyce oddziaływań i została sparametryzowana na podstawie obliczeń potencjału średniej siły łańcuchów polipeptydowych w wodzie. Stopnie swobody obecne w modelu pełnoatomowym, a nieobecne w modelu gruboziarnistym zostały uśrednione.^{263,264} Zaimplementowane oddziaływania wielociałowe, wyprowadzone na podstawie rozwinięcia szeregu klastrowo-kumulantowego Kubo²⁶⁵ odpowiedzialne za tworzenie regularnych struktur drugorzędowych, pozwalają polu siłowemu UNRES na przewidywanie struktur przestrzennych białek w trybie *ab initio*. Zdolność ta została potwierdzona w międzynarodowym eksperymencie dotyczącym krytycznej oceny technik przewidywania struktury białek – CASP (ang. *Critical Assessment of Techniques for Protein*

Structure Prediction, CASP). Przedsięwzięcie to, przeprowadzane co dwa lata od 1992 r., umożliwia osobom zajmującym się modelowaniem molekularnym bezstronny test wybranych przez grupy metod badawczych polegający na odtworzeniu struktury wcześniej niepublikowanych układów złożonych z białek.^{266, 267}

Wzór opisujący funkcję energii prezentowaną w polu siłowym UNRES został przedstawiony w równaniu I.1.

$$U = \omega_{sc} \sum_{i < j} U_{SC_i SC_j} + \omega_{sc_p} \sum_{i \neq j} U_{SC_i p_j} + \omega_{pp}^{VDW} \sum_{i < j-1} U_{p_i p_j}^{VDW} + \omega_{pp}^{el} f_2(T) \sum_{i < j-1} U_{p_i p_j}^{el} +$$

$$\omega_{tor} f_2(T) \sum_i U_{tor}(\gamma_i, \theta_i, \theta_{i+1}) + \omega_b \sum_i U_b(\theta_i) + \omega_{rot} \sum_i U_{rot}(\theta_i, \alpha_{CS_i}, \beta_{SC_i}) +$$

$$\omega_{bond} \sum U_{bond}(d_i) + \omega_{corr}^{(3)} f_3(T) U_{corr}^{(3)} + \omega_{turn}^{(3)} f_3(T) U_{turn}^{(3)}$$

Równanie I.1: Funkcja energii wykorzystywana w polu siłowym UNRES, gdzie θ_i to kąt wirtualnego wiązania szkieletu i -tego, γ_i to kąt dwuścienny wirtualnego wiązania rdzenia i -tego, α_i i β_i to kąty biegunowe określające położenie środka zjednoczonego łańcucha bocznego reszty i , d_i to długość i -te wiązanie wirtualne, które jest wiązaniem wirtualnym $C\alpha \cdots C\alpha$ lub wiązaniem wirtualnym $C\alpha \cdots SC$. $U_{SC_i SC_j}, U_{SC_i p_j}$ definiują energię swobodną oddziaływania łańcuch główny – łańcuch główny, łańcuch główny – wiązanie peptydowe. Potencjał opisujący oddziaływanie pomiędzy wiązaniami peptydowymi został podzielony na część pochodzącą od potencjału Lennarda–Jonesa ($U_{p_i p_j}^{VDW}$) oraz od oddziaływań elektrostatycznych ($U_{p_i p_j}^{el}$). $U_{tor}(\gamma_i, \theta_i, \theta_{i+1})$ to kąt dwuścienny pomiędzy wiązaniami wirtualnymi, $U_b(\theta_i)$ to kątowe odkształcenie wiązania wirtualnego, $U_{rot}(\theta_i, \alpha_{CS_i}, \beta_{SC_i})$ opisuje potencjał rotameryczny, $U_{bond}(d_i)$ oznacza potencjał pochodzący od odkształcenia wiązania wirtualnego, $f_n(T)$ to współczynniki korelacyjne uwzględniające wkład temperaturowy zdefiniowane przy pomocy równania I.2.

Każdy człon energii U mnoży się przez odpowiednią wagę w_x , a człony odpowiadające czynnikom rzędu większym od 1 dodatkowo mnoży się przez odpowiednie współczynniki temperaturowe $f_n(T)$.^{268, 269}

$$f_n(T) = \frac{\ln[\exp(1 + \exp(-1))]}{\ln \{ \exp[T/T_o]^{n-1} + \exp[-(T/T_o)^{n-1}] \}}$$

Równanie I.2: Temperaturowe współczynniki korelacyjne

Dzięki temu, że funkcja energii pola siłowego UNRES została oparta na fizyce oddziaływań, pole to może być z powodzeniem wykorzystywane w symulacjach molekularnych, efektywnie przeszukując przestrzeń konformacyjną białek, dobrze odwzorowując hiperpowierzchnię energii potencjalnej badanych układów molekularnych. Gruboziarnistość modelu umożliwia ~1000–4000-krotne przyspieszenie w symulacjach dynamiki molekularnej w porównaniu z modelem pełnoatomowym. Zaimplementowane rozwiązania wykorzystujące obliczenia równoległe pozwalają na symulację procesu fałdowania się białka składającego się z 200 reszt aminokwasowych zaledwie w kilka godzin, a nie dni.^{270, 271, 272}

5.2 Chimera UCSF i biblioteka rotamerów

Chimera UCSF jest pakietem umożliwiającym zarówno interpretację wyników symulacji molekularnych jak i przygotowanie plików służących jako struktury początkowe do symulacji. Pakiet składa się z dwóch części – rdzenia oraz rozszerzeń. Rdzeń zapewnia podstawowe usługi oraz wizualizację molekuly wczytanej z pliku wybranego przez użytkownika. Pakiet rozszerzeń umożliwia modyfikacje Chimery o przygotowane już nakładki takie jak Multiscale lub Collaboratory oraz napisane samodzielnie przez użytkownika programy. Multiscale dodaje możliwość wieloskładnikowych układów molekularnych takich jak na przykład kapsyd wirusowy, a Collaboratory umożliwia współpracę zdalną.

Podczas pracy w trakcie swojego doktoratu wykorzystywałam pakiet Chimera UCSF jako narzędzie do analizy struktur przed symulacją. Używając dostępnych w programie narzędzi wprowadzałam do pliku PDB zawierającego informację o strukturze badanego białka zmiany dla każdej mutacji. W tym celu wykorzystywałam bibliotekę rotamerów umożliwiającą zastosowanie najbardziej prawdopodobnej geometrii wprowadzonego łańcucha bocznego.²⁷³ Dodatkowo dzięki możliwości wyświetlenia na ekranie komputera całej struktury zarówno fragmentu białka S wirusa SARS-CoV-2 jak i receptora ACE2 zawartych w pliku PDB mogłam opisać zaobserwowane interakcje. Dzięki programowi istnieje także opcja zobaczenia całej symulacji w postaci filmu, co pozwala dokładniej przeanalizować całą trajektorię.

Podstawowym językiem programowania umożliwiającym wprowadzanie zmian w architekturze Chimery jest Python. Program jest dostępny dla użytkowników na różnych poziomach umiejętności zapewniając zarówno interfejs graficzny jak i korzystanie z wiersza poleceń. Całe oprogramowanie może być z powodzeniem używane przez osoby korzystające z obecnie używanych systemów operacyjnych.²⁷⁴

III. Cel pracy

Głównym założeniem mojej pracy było zbadanie molekularnego mechanizmu zakażenia koronawirusem SARS-CoV-2, powodującym chorobę COVID-19. W tym celu w ramach pracy doktorskiej:

- Wykonałam serię symulacji procesu wiązania pomiędzy receptorem wychwytyjącym enzym konwertujący angiotensynę 2 (ACE2) człowieka oraz wybranych zwierząt a wirusem SARS-CoV-2 z zastosowaniem metody dynamiki molekularnej w gruboziarnistym polu siłowym UNRES.
- W oparciu o Multiple Sequence Alignment wskazałam różnice w sekwencji aminokwasów budujących ACE2 u wybranych organizmów, wskazałam miejsca kluczowe dla utworzenia kompleksu SARS-CoV-2-receptor ACE
- Opisałam reszty aminokwasowe występujące w receptorze kolca wirusa SARS-CoV-2 oraz w enzymach ACE2 mające kluczowe znaczenie dla przebiegu procesu infekcji u badanych organizmów.
- Przeanalizowałam serię danych dotyczących infekcji i stworzyłam statystykę opisującą proces infekcji kończący się chorobą u człowieka i wybranych zwierząt.
- Przy pomocy programu CHIMERA oraz informacji opublikowanych przez World Health Organization (WHO) dotyczących mutacji wirusa SARS-CoV-2 opracowałam modele wariantów (RBD) białka S wirusa uwzględniające mutacje pojawiające się w odmianach alpha, beta, gamma, delta oraz omicron.
- Wykonałam serię symulacji procesu wiązania pomiędzy enzymem konwertującym angiotensynę 2 (ACE2) człowieka a wariantami wt, alpha, beta, gamma, delta, oraz omicron wirusa SARS-CoV-2 z zastosowaniem metody dynamiki molekularnej zaimplementowanej w gruboziarnistym polu siłowym UNRES.

IV. Część eksperymentalna

Badanie mechanizmu infekcji oraz powinowactwa koronawirusa SARS-CoV-2 względem enzymu konwertujących angiotensynę II (ACE2).

1. Wprowadzenie do badań

Analiza sekwencyjna genomu koronawirusów wskazuje, że wykazują one wysokie podobieństwo genetyczne wynoszące ok. 60% wśród białek niestrukturalnych i ok. 45% wśród białek strukturalnych. Jak wspomniałam w poprzedniej części pracy, ludzki wirus SARS-CoV-2 i pokrewny wirus występujący u nietoperzy wykazują około 96% podobieństwa.¹⁵⁰ Niezależnie od rozpatrywanego gatunku, proces infekcji wirusem SARS-CoV-2 lub pokrewnym rozpoczyna się od przyłączenia się wirionu do komórek gospodarza, w przypadku SARS-CoV-2 w tym celu wykorzystywany jest enzym konwertujący angiotensynę II (ACE2).

Genom ACE2 charakteryzuje się wysoką homologią sekwencyjną w królestwie zwierząt, mimo tego, nie każdy gatunek zagrożony jest zachorowaniem na COVID-19.²⁷⁵ Niezależnie od siebie, grupy badawcze pod kierownictwem Gou i Damas wykazały, że wirus SARS-CoV-2 posiada niezwykle wysoki wskaźnik infekcji u ludzi, natomiast w królestwie zwierząt myszy nie chorują i są odporne.^{276,277} Biorąc pod uwagę wysokie podobieństwo budowy enzymu konwertującego angiotensynę II w świecie zwierząt oraz fakt, że niektóre gatunki są odporne na infekcję SARS-CoV-2 zasadnym wydaje się pytanie: jakie zmiany w resztach aminokwasowych odpowiedzialnych za rozpoznanie ACE2 przez domenę wiążącą receptor (ang. *Receptor Binding Domanin*, RBD) zlokalizowaną w białku S wirusa SARS-CoV-2 wpływają na podatność organizmu na chorobę?

Aby odpowiedzieć na postawione pytanie przeprowadziłam serię symulacji dynamiki molekularnej zaimplementowanej w polu siłowym UNRES.²⁷⁸ Wykorzystując techniki modelowania molekularnego postanowiłam zidentyfikować kluczowe reszty aminokwasowe oraz oddziaływania międzybiałkowe biorące udział w tworzeniu się kompleksu pomiędzy domeną wiążącą receptor wchodzącą w skład w białka S SARS-CoV-2 oraz enzymem konwertującym angiotensynę II pełniącym funkcję receptora w tworzeniu kompleksu wirus – receptor.

1.2. Metodyka badań

Jako szablon do modelowania wykorzystałam domenę wiążącą receptor (ang. *Receptor Binding Domain*, RBD) białka S koronawirusa, skompleksowaną z ludzkim enzymem konwertującym angiotensynę II (ACE2). Kompleks ten opisany przez Wanga i wsp. wraz z opisanymi poniżej modyfikacjami w mojej pracy stanowić będzie strukturę natywną oraz punkt startowy symulacji (kompleks przedfuzyjny).¹⁹⁴

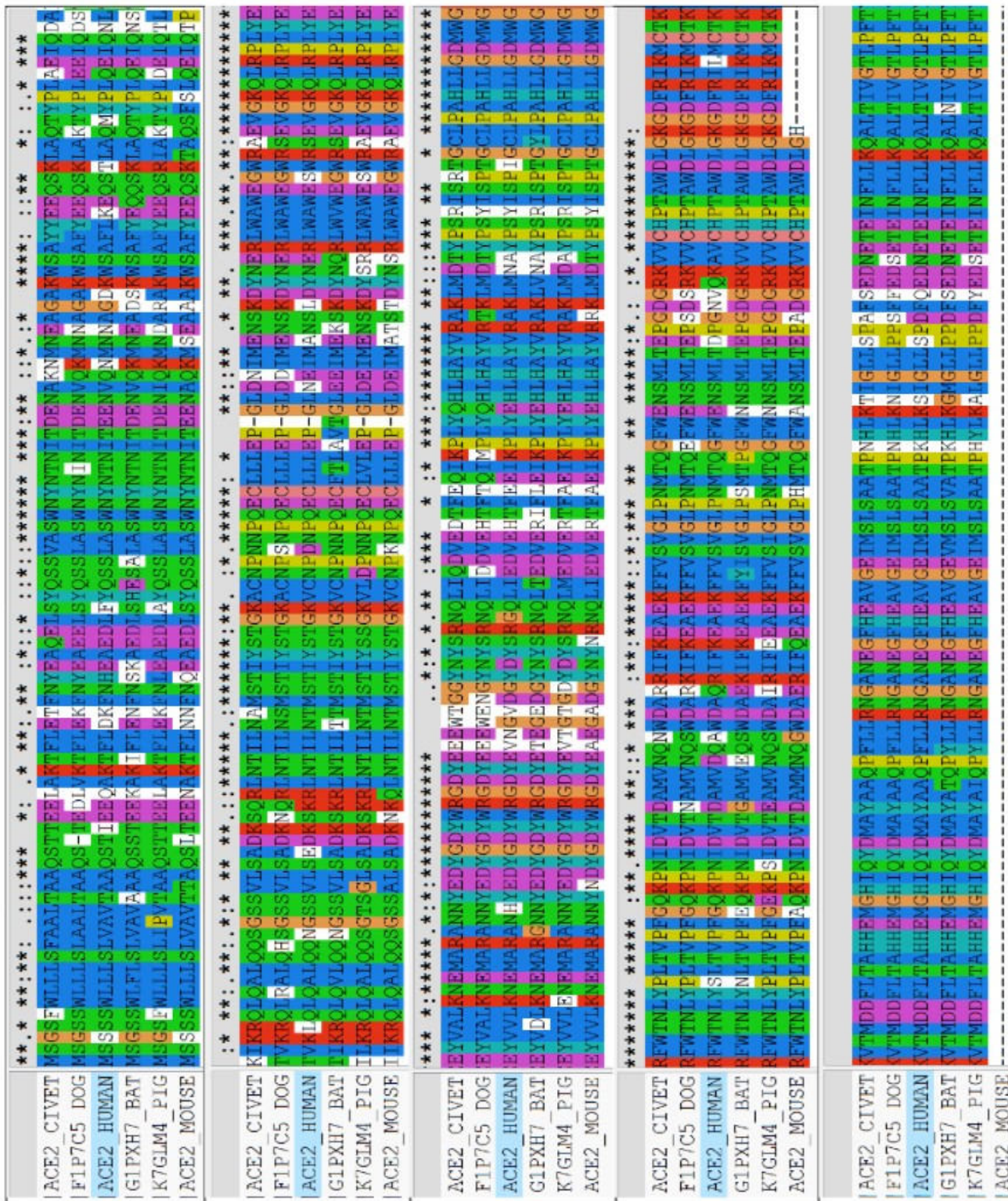
W kolejnym kroku użyłam sekwencji ACE2 z bazy danych Swiss Prot Data Database (UniProt)²⁷⁹, a następnie dopasowałam je do siebie przy użyciu oprogramowania Clustal²⁸⁰.

W swojej pracy wykorzystałam następujące sekwencje:

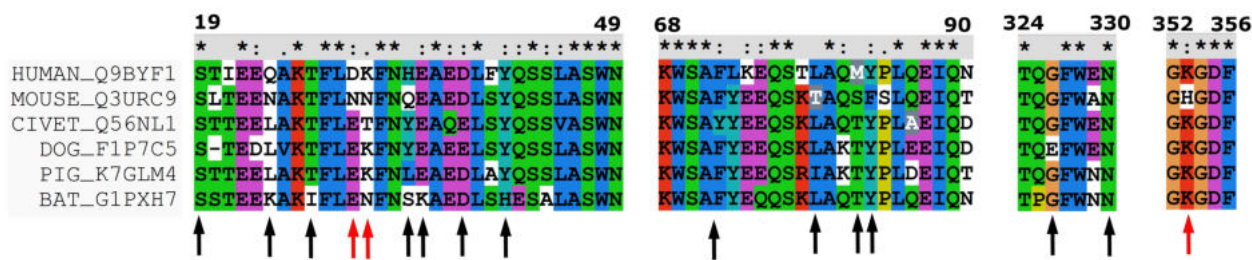
- człowiek – human – Q9BYF1²⁸¹,
- nietoperz – bat – G1PXH7,
- świnia – pig – K7GLM4,
- cyweta – civet – Q56NL1,
- mysz – mouse – Q3URC9²⁸²,
- pies – dog – F1P7C5.

Na poniższej ilustracji (rys.II.1) przedstawiłam poglądowe zestawienie sekwencji enzymu konwertującego angiotensynę II dla wybranych organizmów. Uporządkowane dane pozwalają zaobserwować zarówno podobieństwa, jak i różnice w kolejności aminokwasów budujących enzym. Aby wyodrębnić i dokładnie zidentyfikować miejsca bezpośrednio zaangażowane w interakcje białko–białko wykorzystałam oprogramowanie RasMol AB będące jednym z najczęściej używanych programów do wizualizacji molekularnej.²⁸³

W celu uzyskania modeli receptora ACE2 wybranych gatunków niezbędne było wykonanie mutacji punktowych w szablonie 6LZG w taki sposób, aby struktura nowego modelu zgodna była z sekwencją występującą w enzymie konwertującym angiotensynę II (ACE2) u wybranego gatunku. Bazując na danych zestawionych w programie Clustal, wykonałam serię mutacji punktowych za pomocą oprogramowania UCSF Chimera²⁶⁶. Dzięki wykorzystaniu biblioteki rotamerów zaimplementowanej w oprogramowaniu, podczas wprowadzania zmian wybrałam najbardziej prawdopodobny rotamer zmienianej reszty aminokwasowej.²⁶⁵



Rysunek II.1: Analiza sekwencyjna (Multiple Sequence Alignment) dla wybranych sekwencji ACE2 wykonana przy użyciu programu ClustalX. Odpowiednimi kolorami zostały oznaczone reszty aminokwasowe o podobnych właściwościach (zasadowe – czerwony, kwasowe – fioletowy, hydrofobowe – zielony, reszty amidowe oraz posiadające grupę hydroksylową – żółty). Na białą zostały zaznaczone są fragmenty nie wykazujące podobieństwa.

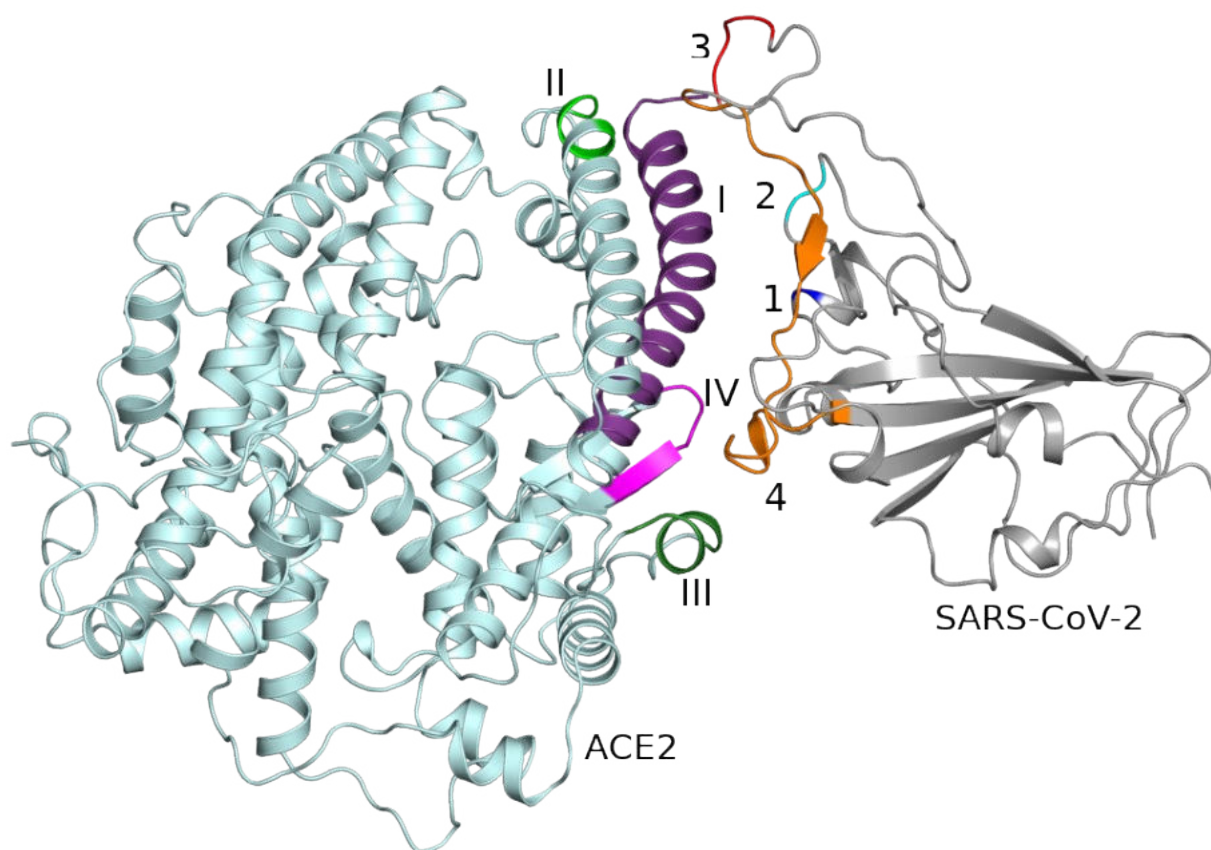


Rysunek II.2: Analiza sekwencyjna enzymu konwertującego angiotensynę II (ACE2) dla ludzi – kod Q9BYF1, myszy – kod Q3URC9, cyweta – kod Q56NL1, psa – kod F1P7C5, świnia – kod K7GLM4 i nietoperza – kod G1PXH7 pokazująca cztery regiony zidentyfikowane jako miejsca oddziałujące z RBD wirusa SARS-CoV-2. Wspólne i unikalne miejsca interakcji są oznaczone odpowiednio czarną i czerwoną strzałką. Gwiazdki i kropki wskazują podobieństwo sekwencji, jak przedstawiono w oprogramowaniu Clustal.

Nowo zbudowane modele kompleksu SARS-CoV-2 – ACE2 dla człowieka, nietoperza i myszy symulowałam przy użyciu dynamiki molekularnej (ang. *Molecular Dynamic*, MD) zaimplementowanej w gruboziarnistym polu siłowym UNRES. Dla każdego z wybranych kompleksów przeprowadziłam dwadzieścia cztery niezależne trajektorie dynamiki molekularnej. Wykonałam osiem milionów kroków MTU, (ang. *Molecular Time Unit*, MTU, jednostka czasu molekularnego zastosowana w polu siłowym UNRES wynosząca 48,9 fs) co daje 39,1 ns dla czasu symulacji MD.^{284,285,286} Trzeba tu zauważyć, iż ze względu na uśrednienie stopni swobody zastosowanych w polu siłowym UNRES czas symulacji można skalować od 1.000 do 10.000 razy w porównaniu do pól pełnoatomowych. Możliwość symulacji tak dużej skali czasowej pozwala na zastosowanie pola siłowego UNRES do modelowania procesów biologicznych.

2. Omówienie wyników

Szczegółowa analiza fragmentów białek odpowiedzialnych za wzajemną interakcję ACE2 – RBD pozwoliła mi na opis najbardziej obiecujących miejsc, odpowiedzialnych za tworzenie kompleksu wirus–receptor (rys. II.3). Fragmentami mającymi największy udział w tworzeniu się kompleksu są obszary ACE2 w zakresach reszt aminokwasowych: 19–49 (I), 79–83 (II), 324–330 (III) i 352–356 (IV), oraz fragmenty 417 (1), 455–456 (2), 475–478 (3) i 486–505 (4) wchodzące w skład RBD białka S. W enzymie ACE2 największy obszar oddziaływań obejmuje pierwszą α -helisę, C-końcową część drugiej α -helisy, jeden obrót β i jedną pętlę. Z białka S SARS-CoV-2 są to dwa skręcone β -arkusze i dwie pętle. (rys.II.3)



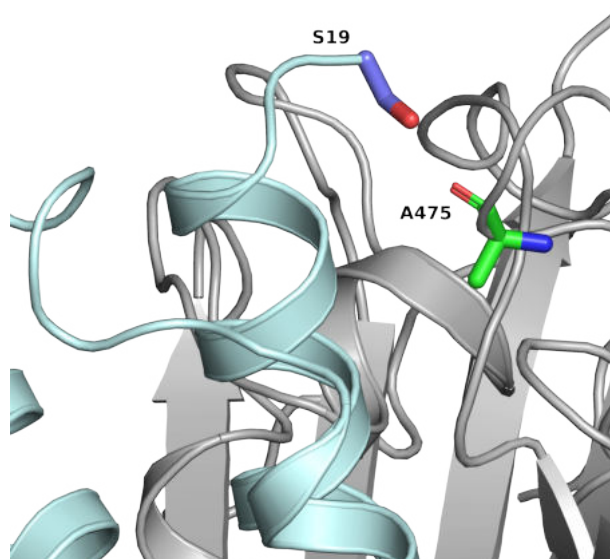
Rysunek II.3: Fragmenty zaangażowane w proces tworzenia kompleksu wirus–receptor. Obszary należące do ACE2: I – 19–49 (fioletowy), II – 79–83 (zielony), III– 324–330 (ciemnozielony) oraz IV– 352–356 (magenta) a także do białka S wirusa SARS-CoV-2: 1–417 (niebieski), 2– 455–456 (cyan), 3 – 475–478 (czerwony), 4 –486–505 (pomarańczowy).

Ze względu na to, że sekwencja ACE2 jest zbliżona u wszystkich analizowanych gatunków zdecydowałam się wyróżnić dwa rodzaje interakcji: powszechne – które są widoczne we wszystkich omawianych przykładach, potencjalnie nieistotne dla selektywności procesu infekcji wirusem SARS-CoV-2 oraz unikalne i potencjalnie kluczowe dla selektywności wirusa.

Aby rozróżnić opisywane przeze mnie reszty aminokwasowe, po numerze reszty będę stosowała skróty: ACE2 dla reszt pochodzących od enzymu konwertującego angiotensynę II oraz RBD dla reszt wchodzących w skład domeny receptora wiążącego białka S wirusa SARS-CoV-2. Jako, że ACE2 w opisywanej przeze mnie interakcji pełni rolę receptora określenia „enzym ACE2” oraz „receptor” będę stosować wymiennie. Podczas opisu oddziaływań obserwowanych w procesie tworzenia się kompleksu ACE2-SARS-CoV-2 w pierwszej kolejności będę odnosić się do ludzkiego modelu enzymu konwertującego angiotensynę II. Wykonane ilustracje pogładowe, obrazujące oddziaływające reszty aminokwasowe ACE2 oraz RBD wirusa, prezentują interakcje zaobserwowane w modelu otrzymanym z symulacji ludzkiego enzymu konwertującego angiotensynę II. Różnice w budowie poszczególnych pozycji sekwencji ACE2 w przypadku cywety, myszy, psa, świni oraz nietoperza będę omawiać równolegle w oparciu o analizę sekwencyjną przedstawioną na rysunku II.2.

2.1 Oddziaływania niespecyficzne w strukturze eksperymentalnej

Seryna S19(ACE2), zlokalizowana na N–końcowej części pierwszej α –helisy, może tworzyć wiązanie wodorowe z grupą karboksylową z wiązania peptydowego A475(RBD) (rys. II.4). To samo oddziaływanie obserwowane było także przez Wang i wsp.²⁸⁷ Biorąc pod uwagę, że wymieniona interakcja obserwowana jest u wszystkich analizowanych gatunków – zarówno podatnych jak i niepodatnych na infekcję wirusem SARS–CoV–2 przypuszczalnie nie jest ona kluczowa w procesie tworzenia się kompleksu ACE2–RBD.

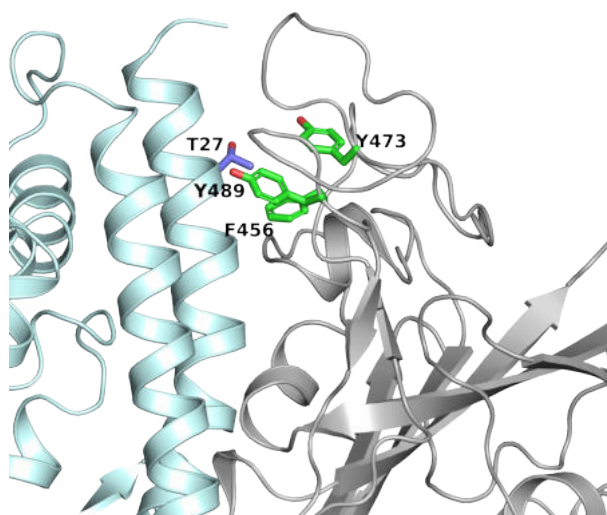


Rysunek II.4: Oddziaływanie S19(ACE2) oraz A475(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.

Drugim zaobserwowanym oddziaływaniem jest interakcja reszty z pozycji 24(ACE2) z N487(RBD) (rys.II.19). W pozycji 24 ACE2 znajdują się trzy rodzaje reszt aminokwasowych (rys. II.2). U ludzi i myszy występuje amid (Q, N); u cywet, psów i świń występuje hydrofobowa reszta (L), natomiast u nietoperzy występuje reszta zasadowa (K). Ten sam rodzaj reszty w ACE2 u ludzi, którzy chorują i myszy niepodatnych na infekcje pozwala przypuszczać, że to oddziaływanie nie jest kluczowe dla rozpoznania ACE2 przez RBD a tym samym dla zainfekowania wirusem. Wymieniona interakcja została zaobserwowane także przez Wang i Zhai.^{279,288}

Grupa metylowa pochodząca od reszty treoniny znajdującej się w pozycji 27(ACE2) jest położona pomiędzy trzema resztami hydrofobowymi – F456(RBD), Y473(RBD) i Y489(RBD), natomiast grupa hydroksylowa jest skierowana w stronę rozpuszczalnika. Treonina występuje u większości analizowanych gatunków, z wyjątkiem nietoperza, który posiada izoleucynę (I). W związku z występowaniem w tym rejonie oddziaływań głównie reszt hydrofobowych zlokalizowanych na powierzchni ACE2 wskazany obszar białka S SARS-CoV-2 będzie faworyzował reszty hydrofobowe. Tak więc oddziaływanie tylko z grupą metylową będzie znacznie słabsze niż w przypadku leucyny, izoleucyny czy fenyloalaniny.

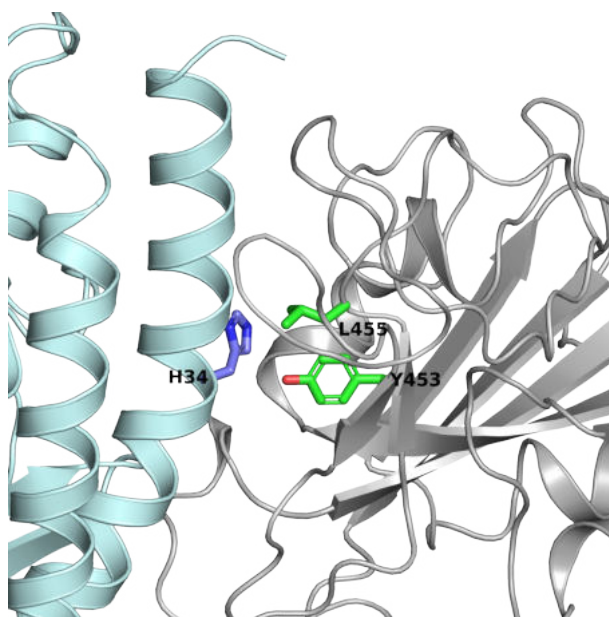
Opisana zależność pozwala przypuszczać, że to właśnie z powodu wyższego powinowactwa wirusa do reszt hydrofobowych nietoperze uważane są za gatunek atakowany przez wirusa w fazie jego ewolucji. Przypuszczalnie stopniowe mutacje w genomie wirusa pokrewnego SARS-CoV-2 z czasem doprowadziły do formy wirusa umożliwiającej infekowanie także organizmów posiadających w sekwencji genomu receptora ACE2 także inne reszty.²⁸⁹ Jednakże oddziaływanie pomiędzy resztą z pozycji 27 sekwencji ACE2 wydaje się nieistotne dla procesu infekcji, może jednak stanowić dowód na poprawność teorii mówiącej o ewolucji wirusa pokrewnego SARS-CoV-2 do formy znanej obecnie (rys.II.5). Wymienione oddziaływania hydrofobowe zostały zaobserwowane przez Zhai i wsp.²⁸⁰



Rysunek II.5: Oddziaływanie pomiędzy T27(ACE2) a F456(RBD), Y473(RBD) i Y489(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.

Reszta 34 pochodząca od ACE2 oddziałuje z Y453(RBD) i L455(RBD). W pozycji 34 sekwencja enzymu konwertującego angiotensynę II różni się dla poszczególnych gatunków: dla człowieka jest to histydyna (H), dla myszy – glutamina (Q), dla cywety i psa tyrozyna (Y), dla świni leucyna (L), a dla nietoperza seryna (S) (rys. II.2). U ludzi, cywet i psów występuje reszta aminokwasowa posiadająca aromatyczny łańcuch boczny. W przeciwieństwie do ludzi i cywet ryzyko infekcji u psów jest bardzo mało prawdopodobne.²⁹⁰ Z tego powodu, trudno podejrzewać aby charakter aromatyczny tyrozyny, lub jej zdolność do tworzenia wiązań wodorowych miała kluczowy wpływ na selektywność procesu infekcji wirusem SARS-CoV-2.

Równie niejednoznacznie wygląda sytuacja w przypadku reszt alifatycznych występujących u pozostałych gatunków. Świnie oraz nietoperze mogą zarazić się wirusem, natomiast myszy nie chorują. W przypadku nietoperzy występująca w sekwencji seryna zdolna do utworzenia wiązania wodorowego co może potencjalnie ułatwić utworzenie kompleksu wirus-receptor. Fakt ten może potwierdzać teorię o tym, że nietoperze są żywicielem pierwotnym wirusa pokrewnego SARS-CoV-2. Opisane zależności nie definiują jednoznacznej roli pozycji 34 w procesie infekcji wirusem SARS-CoV-2, dlatego mogą podejrzewać, że oddziaływania reszty 34 z Y453(RBD) i L455(RBD) nie są kluczowe dla selektywności procesu infekcji (rys. II.6). Przytoczone interakcje zostały opisane także przez Zhai i wsp.²⁸⁰



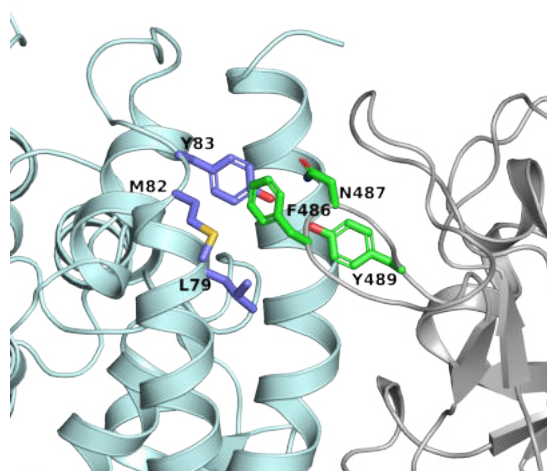
Rysunek II.6: Oddziaływanie między H34(ACE2) a Y453(RBD) i L455(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.

Reszty z pozycji 35(ACE2), 38(ACE2) i 42(ACE2) mogą tworzyć wiązania wodorowe odpowiednio z Q493(RBD), Y449(RBD) i Q498(RBD) (rys.II.2, rys.II.19) Pomimo, że są to stosunkowo silne oddziaływania, występują one u prawie wszystkich analizowanych gatunków, co daje podstawy do spekulacji, że nie są one kluczowe w procesie infekcji SARS-CoV-2.²⁹¹

Interakcje te zaobserwowały również grupy Wang, Zhai oraz Damas.^{269,279,280}

Reszta aromatyczna w pozycji 41 skierowana jest w stronę Q498(RBD), T500(RBD) i N501(RBD) (rys.II.19). Zarówno w przypadku nietoperza posiadającego resztę histydyny – H41(ACE2) jak i pozostałych gatunków u których występuje reszta tyrozyny – Y41(ACE2) nie jest w stanie utworzyć dostatecznie silnych interakcji aby były one kluczowe dla procesu selektywności wzajemnego rozpoznawania RBD-ACE2.

Trzy reszty z C-końcowej części drugiej α -helisy, a mianowicie reszty z pozycji 79(ACE2), 82(ACE2) i 83(ACE2), tworzą klaster oddziaływań z N487(RBD), F486(RBD) i Y489(RBD). W pozycji 79 u ludzi, cywet, psów i nietoperzy występuje reszta leucyny (L), u świń reszta izoleucyny (I), a u myszy treonina (T). W pozycji 82 występują trzy rodzaje reszt aminokwasowych. U ludzi jest to reszta metioniny (M), u myszy reszta seryny (S), u pozostałych opisywanych gatunków w sekwencji występuje w tej lokalizacji reszta treoniny (T). W pozycji 83 u większości opisywanych gatunków występuje reszta tyrozyny (Y), u myszy jest to reszta fenyloalaniny (F) (rys. II.2). Porównując energię oddziaływania reszt z pozycji 79, 82 i 83 u podatnych na infekcję wirusem SARS-CoV-2 ludzi i niepodatnych myszy, okazuje się, że różnica wynosi tylko około 2 kcal/mol na korzyść myszy.^{282,283} Jest to zdecydowanie zbyt mała wartość, aby była kluczowa dla stabilizacji interakcji między ACE2 a domeną wiążącą receptor SARS-CoV-2. Podobne interakcje obserwowwały także grupy Zhai oraz Nelsona.^{280,292}



Rysunek II.7: Oddziaływanie między L79(ACE2), M82(ACE2), Y83(ACE2) a N487(RBD), F486(RBD) i Y489(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.

Ostatnim elementem opisu oddziaływań niespecyficznych jest analiza fragmentu ACE2 od reszty 324 do 330 określanego przeze mnie jako fragment III oznaczony na rysunku II.3 (rys. II.3) kolorem ciemnozielonym. W tym obszarze na szczególną uwagę zasługuje pozycja 329(ACE2) (rys. II.2) potencjalnie mogąca utworzyć mostek solny. W analizowanych modelach nie występuje element struktury wirusa zdolny do utworzenia dostatecznie silnego oddziaływania z białkiem receptora. Jednakże budowa reszty z pozycji 326(ACE2) sugeruje inną funkcję opisanego fragmentu. Występująca u większości badanych organizmów w tej pozycji reszta glicyny (G) umożliwia dobre dopasowanie receptora oraz wirusa. Zależność ta związana jest z niewielkimi rozmiarami glicyny, a tym samym swobodą konformacyjną potrzebną do dobrego dopasowania się białek. Wyjątkiem w tym przypadku jest enzym konwertujący angiotensynę II u psa który w pozycji 326 zawiera resztę kwasu glutaminowego (E). Biorąc pod uwagę brak jednoznacznych oddziaływań z wirionem w tym miejscu sekwencji można podejrzewać, że rola tego fragmentu ACE2 nie jest kluczowa w procesie infekcji.

Ostatnim elementem fragmentu III zaliczonym przeze mnie do grupy oddziaływań niespecyficznych jest pozycja 330 zlokalizowana w ACE2 oraz T500(RBD). We wszystkich analizowanych gatunkach w pozycji 330 znajduje się reszta asparaginy N330(ACE2) która wraz z treoniną może utworzyć wiązanie wodorowe. Jednakże uwagi na ten fakt że występuje ona zarówno w gatunkach które mogą ulec zakażeniu jak i odpornych, można przypuszczać, że interakcja ta nie jest istotna w procesie selektywności infekcji.¹⁵⁶

Tabela II.1: Zestawienie opisywanych interakcji niespecyficznych pomiędzy poszczególnymi resztami ACE2 występującymi u analizowanych gatunków oraz resztami aminokwasowymi wchodzącymi w skład domeny wiążącej receptor w białku S wirusa SARS-CoV-2.

Oddziałujące reszty ACE2						Oddziałujące reszty SARS-CoV-2
człowiek	mysz	cyweta	pies	świnia	nietoperz	
S19						A475
Q24	N24	L24			K24	N487
T27					I27	F456, Y473, Y489
H34	Q34	Y34		L34	S34	Y453, L455
E35					K35	Q493
D38		E38		D38		Y449
Q42					E42	Q498
Y41					H41	Q498, T500, N501
L79, M82, Y83	T79, S82, F83	L79, T82, Y83	L79, T82, Y83	I79, T82, Y83	L79, T82, Y83	N497, F486 i Y489

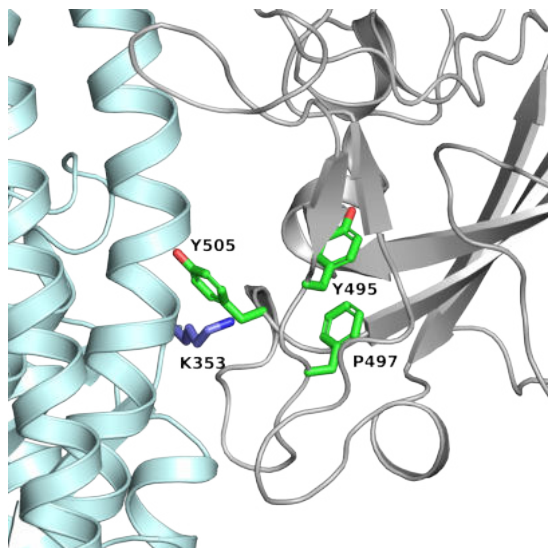
2.2 Unikalne interakcje zaobserwowane w strukturze eksperymentalnej

Jedną z kluczowych interakcji stabilizujących powierzchnię przylegania białko-białko jest oddziaływanie pomiędzy resztą z pozycji 30(ACE2) oraz K417(RBD) prowadzące do utworzenia mostka solnego. W ludzkim enzymie konwertującym angiotensynę II w pozycji 30 zlokalizowana jest reszta kwasu asparaginowego (D), u innych gatunków w tym miejscu sekwencji występuje reszta kwasu glutaminowego (E). Natomiast u myszy występuje asparagina (N) niezdolna do wytworzenia takiego oddziaływania. Przypuszczalnie właśnie brak interakcji pomiędzy N30(ACE2) oraz K417(RBD) jest jednym z czynników odpowiadających za brak podatności myszy na infekcję wirusem SARS-CoV-2.

Drugim ważnym centrum oddziaływań potencjalnie odpowiedzialnym za selektywne rozpoznanie białka jest reszta znajdująca się w enzymie konwertującym angiotensynę II w pozycji 31. W tym miejscu występują trzy rodzaje reszt. W przypadku ludzi, psów oraz świń jest to lizyna (K), u myszy i nietoperzy jest to asparagina (N), u cywety – treonina (T) (rys. II.2, II.19, tabela

II.2). Dokładna analiza struktury eksperymentalnej (kod PDB 6LZG) pokazała, że resztą najbardziej sprzyjającą utworzeniu stabilnego kompleksu z wirusem SARS-CoV-2 w tej pozycji jest lizyna zdolna do utworzenia mostka solnego z E484(RBD). Ważnym aspektem wymagającym omówienia jest fakt, iż zarówno psy jak i świnie co prawda nie wykazują podatności na SARS-CoV-2, jednak badania laboratoryjne pobranego od nich materiału genetycznego wykazują, że niektóre osobniki wytworzyły przeciwciała świadczące o wcześniejszym kontakcie z wirusem. Publikowane raporty mówią głównie o przypadkach w których zwierzęta nie wykazywały objawów choroby, a sama obecność przeciwciał spowodowana była przebywaniem w otoczeniu ludzi chorych na COVID-19 lub też zainfekowaniem zwierząt w warunkach laboratoryjnych.^{282,293} Obecność lizyny w sekwencji aż trzech gatunków spośród których tylko jeden jest w pełni podatny na infekcję oraz rozwinięcie pełnoobjawowej choroby COVID-19 wskazuje, że reszta K31(ACE2) może być kluczowa dla trwałości kompleksu ACE2-RBD. Może to oznaczać, że utworzony mostek solny z E484(RBD) jest oddziaływaniem na tyle silnym i w perspektywie czasu długotrwałym, że umożliwia nie tylko zarażenie się wirusem, ale też utrzymanie wirionu w zasięgu ACE2 na tyle długo, aby organizm żywiciela zdołał wytworzyć przeciwciała. Inną zaskakującą zależnością jest obecność asparaginy w pozycji 31 w przypadku niepodatnej na SARS-CoV-2 myszy oraz nietoperzy uważanych za żywiciela rezerwuarnego. Obserwacja ta może stanowić kontrargument dla teorii mówiącej o roli nietoperzy w rozprzestrzenianiu wirusów pokrewnych SARS-CoV-2.²⁹⁴

Reszta z pozycji 353(ACE2) znajduje się w gnieździe hydrofobowym, składającym się z Y495(RBD), F497(RBD) i Y505(RBD). W większości przypadków w pozycji 353 zlokalizowana jest reszta lizyny (K), wyjątkiem jest ACE2 myszy gdzie w tym miejscu występuje reszta histydyny. Na pierwszy rzut oka reszta histydyny obecna w mysim ACE2 powinna być najbardziej preferowanym miejscem oddziaływania, ponieważ zdolna jest do utworzenia interakcji π - π . W przypadku opisywanej zależności tak się nie dzieje ze względu na ograniczenia konformacyjne. Duże reszty aminokwasowe o ograniczonej elastyczności konformacyjnej takie jak fenyloalanina, tyrozyna, tryptofan czy wspomniana histydyna w warunkach naturalnych odpychają domenę wiążącą receptor wirusa zamiast wchodzić z nią w interakcję. Co może tłumaczyć brak podatności myszy na SARS-CoV-2. W przypadku lizyny problem związany z ograniczeniem elastyczności cząsteczki nie jest tak dotkliwy. Dodatkowo mogą się tu pojawić oddziaływania kation - π , które będą stabilizować badany kompleks. Dlatego też można spekulować, że zależności pomiędzy Y495(RBD), F497(RBD) i Y505(RBD) oraz K353(ACE2) są kluczowe dla selektywności procesu infekcji wirusem SARS-CoV-2.



Rysunek II.8: Oddziaływania pomiędzy K353(ACE2) a Y495(RBD), F497(RBD) i Y505(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.

Tabela II.2: Zestawienie opisywanych unikalnych interakcji pomiędzy poszczególnymi resztami ACE2 u analizowanych gatunków oraz resztami aminokwasowymi wchodzącymi w skład domeny wiążącej receptor w białku S wirusa SARS-CoV-2.

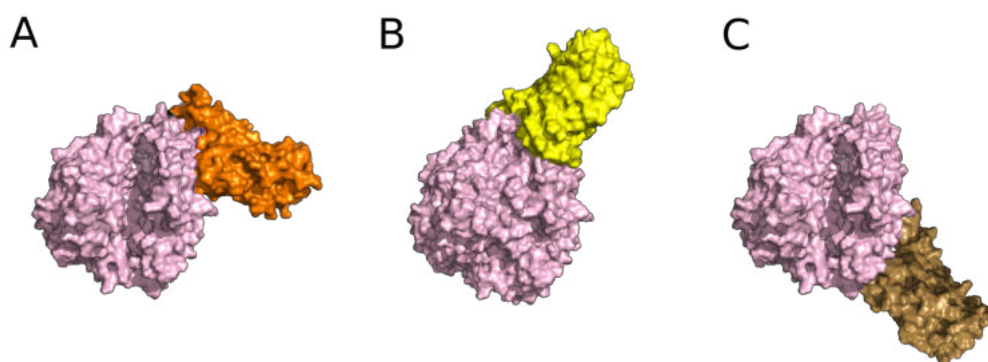
Oddziałujące reszty ACE2						Oddziałujące reszty SARS-CoV-2
człowiek	mysz	cyweta	pies	świnia	nietoperz	
D30	N30	E30				K417
K31	N31	T31	K31		N31	E484
K353	H353	K353				Y495, F497, Y505

2.3. Poszukiwanie stabilnych konformacji RBD – ACE2

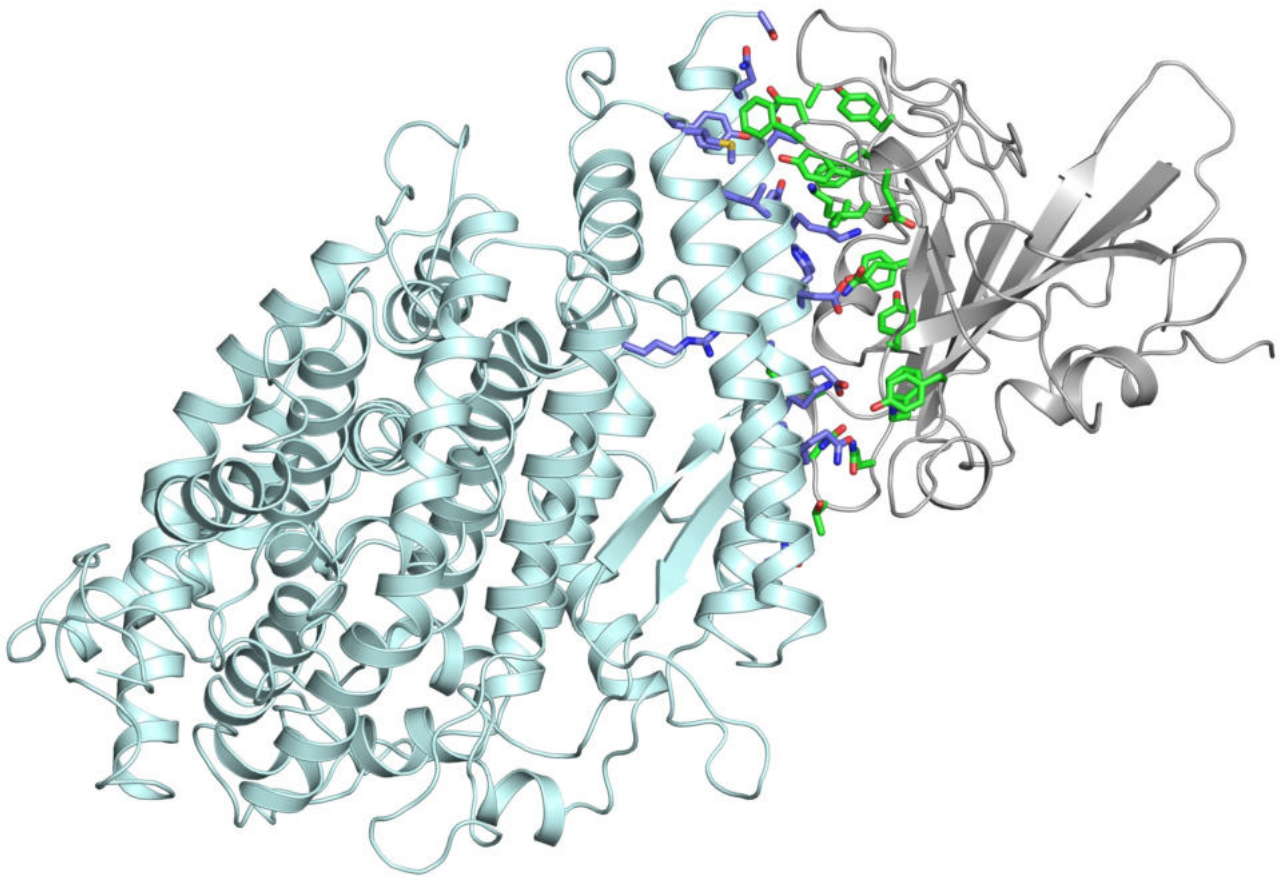
Aby zbadać stabilność kompleksu białek ACE2–RBD, przeprowadziłam symulację dynamiki molekularnej, zaimplementowaną w polu siłowym UNRES (podrozdział 1.2 Metodyka badań, część eksperymentalna). W celu wyodrębnienia różnic między gatunkami, skonstruowałam modele receptora konwertującego angiotensynę II zgodnego z sekwencją białka człowieka, myszy oraz nietoperza. Analiza przebiegu symulacji wykazała, że proces może zakończyć się na trzy sposoby.

W pierwszym przypadku wynikiem symulacji była konformacja ACE2–RBD zbliżona do pierwotnej konformacji układu (rys. II.9A oraz II.10), co świadczy jedynie o lokalnym przeszukiwaniu przestrzeni konformacyjnej. W drugim przypadku, w przebiegu symulacji receptor wiążący domenę wirusa znalazł się w eksponowanym miejscu od strony zewnątrzkomórkowej na powierzchni ACE2, co jest sytuacją pożądaną i sprzyjającą utworzeniu stabilnego kompleksu ACE2–RBD (rys. II.9B oraz II.11). W ostatnim z rozpatrywanych przypadków wynikiem symulacji jest takie wzajemne ułożenie białek w którym pętla (473–489) domeny wiążącej receptor zlokalizowanej w białku SARS–CoV 2 znajdowała się w pobliżu C–końcowej części pierwszej α –helisy ACE2 (rys. II.9C). Ze względu na położenie tej części ACE2 jest ona niedostępna dla RBD wirusa. Taki stan rzeczy oznacza, że trajektoria dynamiki molekularnej doprowadziła do konformacji, która z pewnością nie występuje naturalnie. W związku z tym trajektorie kończące się w ten sposób nie były brane pod uwagę przy opisie oddziaływań.

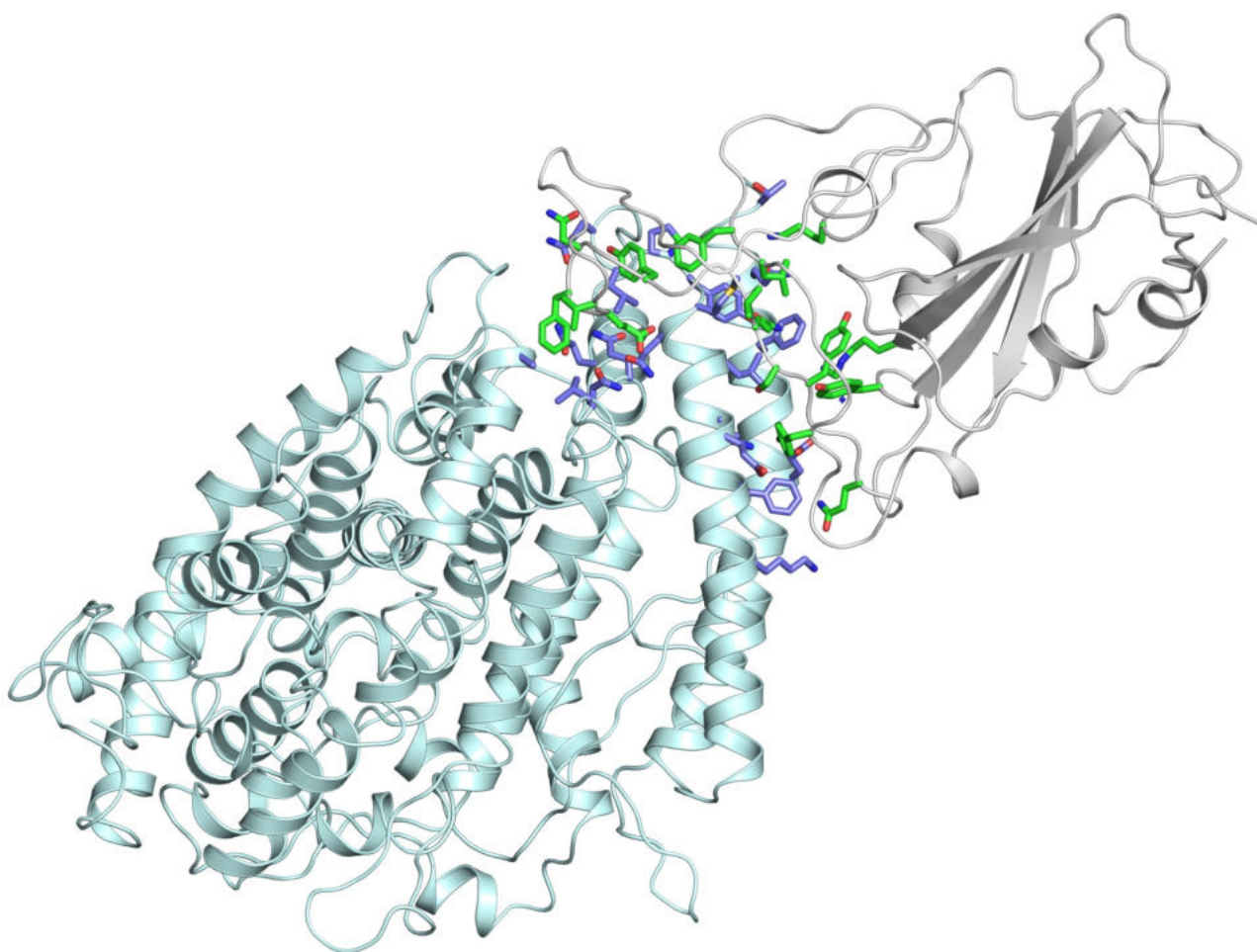
Opisane przeze mnie przypadki zobrazowane zostały na poniższej ilustracji.



Rysunek II.9: Ilustracja przypadków zaobserwowanych podczas symulacji dynamiki molekularnej kompleksu ACE2–RBD. A) Lokalne przeszukiwanie przestrzeni konformacyjnej, B) Stabilny stan przejściowy, C) Symulacja zakończona niepowodzeniem z powodu braku możliwości utworzenia kompleksu w warunkach naturalnych.



Rysunek II.10: Kompleks ludzkiego enzymu konwertującego angiotensynę II (ACE2) (jasnoniebieski) oraz domeny wiążącej receptor zlokalizowanej w białku S wirusa SARS-CoV-2 (RBD) (szary) w stabilnej konformacji zidentyfikowanej przez Wang i wsp¹⁹⁴, kolorem niebieskim oznaczono reszty aminokwasowe pochodzące od ACE2, zielonym reszty RBD.



Rysunek II.11: Kompleks ludzkiego enzymu konwertującego angiotensynę II (ACE2) (jasnoniebieski) oraz domeny wiążącej receptor zlokalizowanej w białku S wirusa SARS-CoV-2 (RBD) (szary) zidentyfikowany jako stan przejściowy występujący podczas procesu infekcji. Kolorem niebieskim oznaczono reszty aminokwasowe pochodzące od ACE2, zielonym reszty RBD.

Analiza otrzymanych trajektorii symulacji dynamiki molekularnej, prowadzących do utworzenia stabilnego kompleksu ACE2–RBD powstającego na pierwszym etapie infekcji pozwoliła na zidentyfikowanie stabilnego stanu przejściowego. Zestawienie wyników znajduje się w tabeli 3. Ponad połowa symulacji przeprowadzonych dla ludzkich białek zakończyła się stanem, w którym możliwa jest obserwacja stabilnego kompleksu ACE2–RBD. Tę samą zależność zaobserwowałam również w symulacjach białek pochodzących od nietoperzy oraz myszy, jednak w tym przypadku odsetek konformacji ten był znacznie niższy.

Tabela II.3: Analiza statystyczna obserwowanych trajektorii MD dla człowieka, nietoperza oraz myszy.

Gatunek	Człowiek	Nietoperz	Mysz
Ilość badanych trajektorii zakończonych infekcją	16/24	1/24	2/24
Procent trajektorii zakończonych utworzeniem stabilnego kompleksu ACE2-RBD	67%	4%	8%

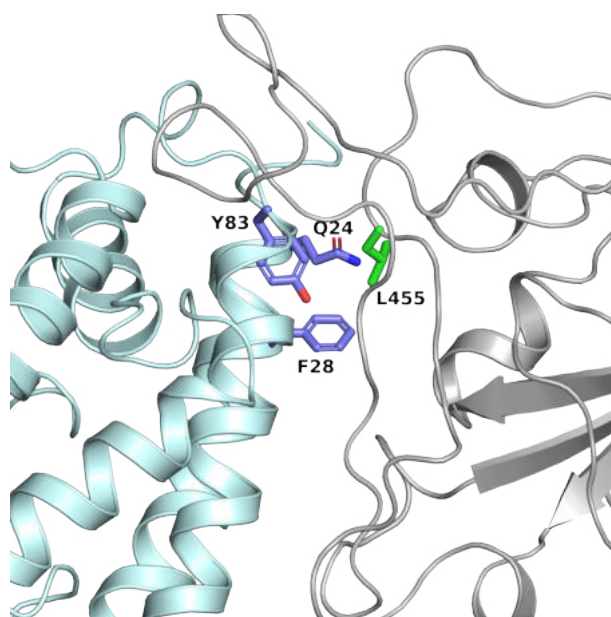
2.4. Siła oddziaływania międzybiałkowego

Utworzenie stabilnego kompleksu obserwowanego w stanie przejściowym procesu infekcji wirusem SARS-CoV-2, pomiędzy domeną wiążącą receptor zlokalizowaną w białku S wirusa SARS-CoV-2 a enzymem konwertującym angiotensynę II, uzależnione jest od siły interakcji poszczególnych reszt aminokwasowych wchodzących w skład obu białek. Ogólny schemat infekcji SARS-CoV-2 został przeze mnie opisany w podrozdziale 4.3 „Proces infekcji” w części teoretycznej pracy.

Można przyjąć, że pomiędzy fazą początkową tworzona przez kompleks ACE-2 zidentyfikowany przez Wanga (rys. II.10), a stanem przejściowym zakończonym utworzeniem stabilnego kompleksu wirus-gospodarz (rys. II.11), wyróżnia się etap w którym RBD wirusa SARS-CoV-2 rozpoznaje białka wchodzące w skład ACE2 potencjalnego gospodarza. W tej fazie konieczne jest utworzenie na tyle silnych interakcji wirus-żywiciel aby kluczowe w pierwszym etapie infekcji reszty aminokwasowe, wchodzące w skład receptorów żywiciela zostały możliwie jak najdokładniej rozpoznane przez wirion, lecz jednocześnie na tyle słabe, aby możliwa była wzajemna zmiana położenia białek tworzących kompleks. Skutkiem utworzenia zbyt silnych oddziaływań na etapie rozpoznania wirus-żywiciel może być nieodpowiednie dopasowanie poszczególnych białek biorących udział w procesie infekcji, czego konsekwencją może być zatrzymanie interakcji już na wstępnym etapie. Z kolei przy zbyt małej wartości siły oddziaływania możliwe jest całkowite odłączenie się wirionu od potencjalnego żywiciela ze względu na zbyt dużą energię kinetyczną poruszającego się wirionu.

2.5. Oddziaływania w stanie przejściowym

L455(RBD) tworzy słabe oddziaływania hydrofobowe z resztami zlokalizowanymi w pozycjach 28(ACE2) i 83(ACE2) oraz 24(ACE2). Zarówno w przypadku pozycji 28 jak i 83 u wszystkich analizowanych gatunków reszty aminokwasowe są takie same – w pierwszym przypadku jest to fenyloalanina (F28(ACE2)), w drugim tyrozyna (Y83(ACE2)). Różnice w budowie receptora konwertującego angiotensynę II widoczne występują w pozycji 24. U cywety, psa i świni występuje reszta leucyny (L), u człowieka reszta glutaminy (Q), u myszy reszta asparaginy (N), a u nietoperza reszta lizyny (K). Biorąc pod uwagę siłę oddziaływań najkorzystniejsze pod względem energetycznym są oddziaływania hydrofobowe.²⁸³

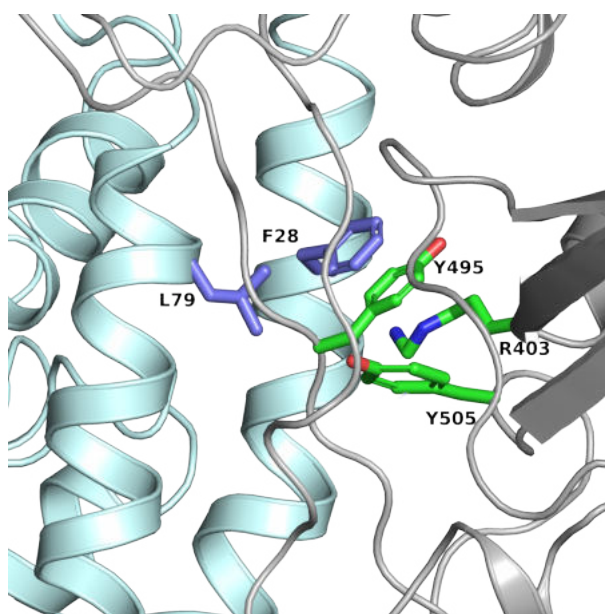


Rysunek II.12: Interakcja pomiędzy F28(ACE2), Y83(ACE2), Q24(ACE2) a L455(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.

Kolejnym obserwowanym centrum oddziaływań jest rejon obejmujący Y449(RBD) oraz reszty z pozycji 72 i 75 pochodzące zlokalizowane w enzymie konwertującym angiotensynę II (rys. II.20). W przypadku pozycji 72 w większości przypadków znajduje się fenyloalanina (F72(ACE2)), wyjątkiem jest cyweta posiadająca w tym miejscu resztę tyrozyny (Y72(ACE2)). W pozycji 75 jedynie u nietoperzy występuje reszta glutaminy (Q75(ACE2)), w pozostałych przypadkach w tej lokalizacji jest kwas glutaminowy (E75(ACE2)). Biorąc pod uwagę fakt, iż te same oddziaływania występują zarówno wśród gatunków wykazujących podatność na infekcję

SARS-CoV-2 jak i tych odpornych obserwowane w tym fragmencie białka interakcje nie odgrywają ważnej roli w procesie wzajemnego rozpoznania białek.

Ważnym centrum oddziaływań jest hydrofobowy klaster utworzony przez Y495(RBD) i Y505(RBD) oraz dwiema resztami aminokwasowymi zlokalizowanymi w ACE2 – jednakową u wszystkich analizowanych gatunków resztą fenyloalaniny – F28(ACE2) oraz resztą z pozycji 79 – resztą treoniny T79(ACE2) w przypadku myszy, oraz L79(ACE2) we wszystkich pozostałych przypadkach. Zaobserwowany hydrofobowy klaster zapewnia dobrze dopasowaną, dużą powierzchnię styku obu badanych białek. W analizie oddziaływań Y495(RBD), Y505(RBD) oraz reszt F28(ACE2) oraz 79(ACE2) warto zwrócić uwagę na dodatkowe oddziaływanie typu kation- π pomiędzy R403(RBD) a F28(ACE2) potencjalnie odpowiedzialne za stabilizację kompleksu enzym-wirus.

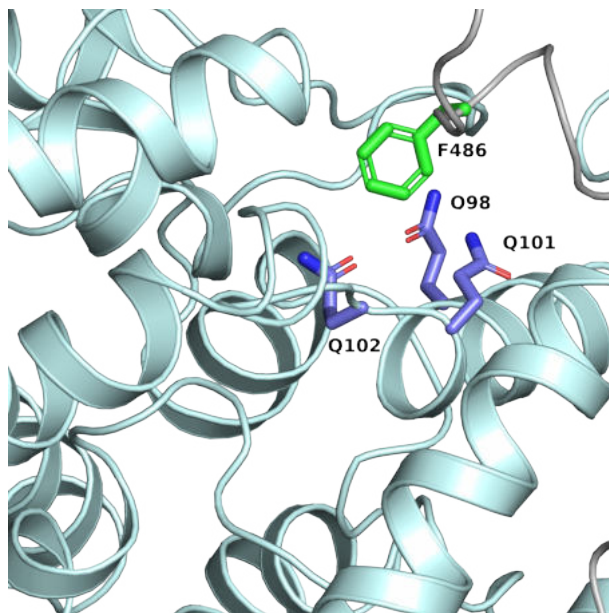


Rysunek II.13: Interakcja pomiędzy F28(ACE2), L79(ACE2) a Y495(RBD), R403(RBD), Y505(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.

Interakcja pomiędzy resztą z pozycji 86(ACE2) a N487(RBD) na pierwszy rzut oka wydaje się nieistotna dla procesu infekcji wirusem SARS-CoV-2 (rys 20). W pozycji 86 występują cztery rodzaje reszt aminokwasowych – u ludzi, myszy oraz nietoperzy jest to reszta glutaminy(Q), u cywet reszta alaniny (A), u psów reszta kwasu glutaminowego (E), a u świń reszta kwasu asparaginowego (D) (rys. II.2). Umieszczenie w tym miejscu sekwencji reszt kwasowych w przypadku psa i świni, sugeruje, że oddziaływanie między resztą 86E/D(ACE2) a N487(RBD) będzie silniejsze o około 4kcal/mol w porównaniu z interakcją amid-amid. Tym samym zwierzęta

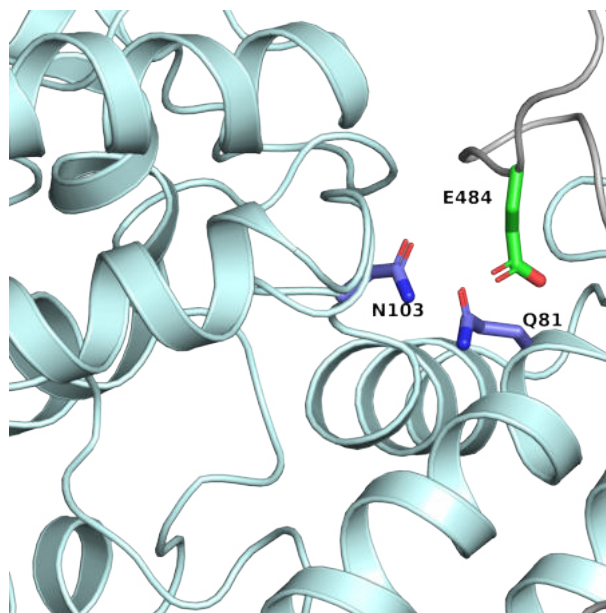
te powinny być bardziej podatne na infekcję wirusem SARS-CoV-2, co nie jest zgodne z aktualnym stanem wiedzy.^{283,295}

Oddziaływanie F486(RBD) oraz trzema resztami zlokalizowanymi w pozycjach 98, 101 i 102 sekwencji enzymu konwertującego angiotensynę II stanowi ciekawy przykład sieci interakcji. W przypadku pozycji 98 oraz 102 jedyna różnica w sekwencji struktury ACE2 występuje u psa posiadającego w pozycji 98 resztę argininy (R98(ACE2)), a w pozycji 102 resztę histydyny (H102(ACE2)). U pozostałych opisywanych gatunków zarówno reszta 98 jak i 102 jest resztą glutaminy (G98(ACE2) oraz G102(ACE2)). Reszta glutaminy jest obecna także w pozycji 101 i jest identyczna dla wszystkich opisywanych gatunków (G101(ACE2)). Wzajemne ułożenie omówionych reszt glutaminy budujących receptor konwertujący angiotensynę II tworzy gniazdo w którym umieszczona jest F486(RBD).



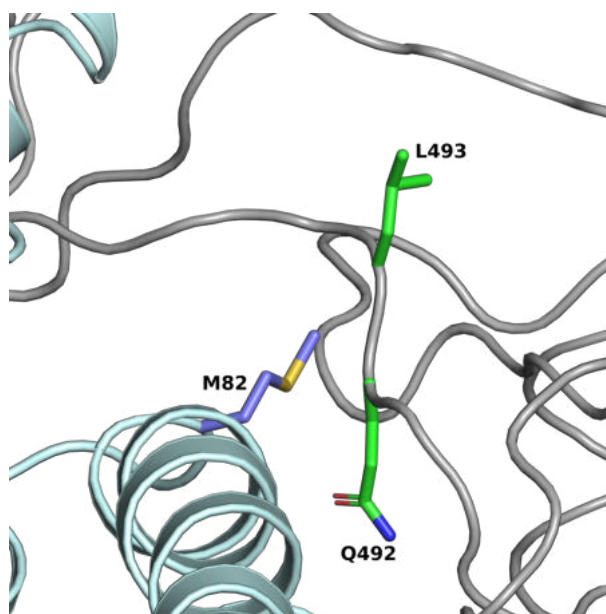
Rysunek II.14: Interakcja pomiędzy Q102(ACE2), Q101(ACE2), Q98(ACE2) a F486(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.

Przykładem wzmocnienia oddziaływań w zidentyfikowanym stanie przejściowym pomiędzy ACE2 a domena wiążącą receptor (RBD) są interakcje tworzone przez resztę E484(RBD). Reszta ta może tworzyć wiązania wodorowe z N103(ACE2) występującą u ludzi i nietoperzy oraz Q81(ACE2) zidentyfikowaną u ludzi, myszy, cywet i nietoperzy. U psów i świń w pozycji 81 występuje reszta lizyny (K) (rys.II.2). Natomiast w pozycji 103 u pozostałych gatunków znajduje się reszta seryny (S103(ACE2)). Utworzenie mostka solnego może więc znacząco wzmocnić siłę oddziaływania między białkami podczas początkowego etapu infekcji a tym samym doprowadzić do jej dalszego rozwoju.



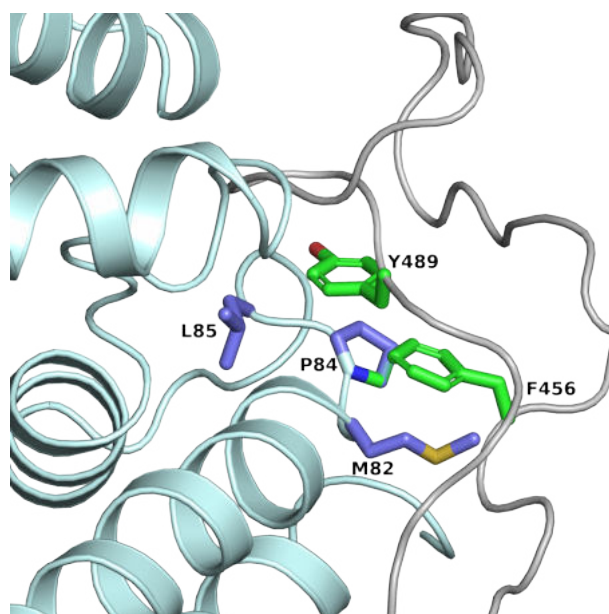
Rysunek II.15: Interakcja pomiędzy N103(ACE2), Q81(ACE2) a E484(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.

Reszta aminokwasowa zlokalizowana w pozycji 82 w sekwencji receptora konwertującego angiotensynę II oddziałuje z L492(RBD) i Q493(RBD). W pozycji 82 u większości analizowanych gatunków występuje reszta treoniny – T82(ACE2), różnice można wyodrębnić w przypadku człowieka u którego w tej lokalizacji znajduje się reszta metioniny (M82(ACE2)) oraz myszy u której występuje reszta seryny – S82(ACE2). Oddziaływanie tworzone przez resztę metioniny – M82(ACE2) z łańcuchami bocznymi pochodzącymi od L493(RBD) i Q493(RBD) może sugerować, że jedynie ludzie nie są podatni na infekcję wirusem SARS-CoV-2, co nie jest zgodne z prawdą.



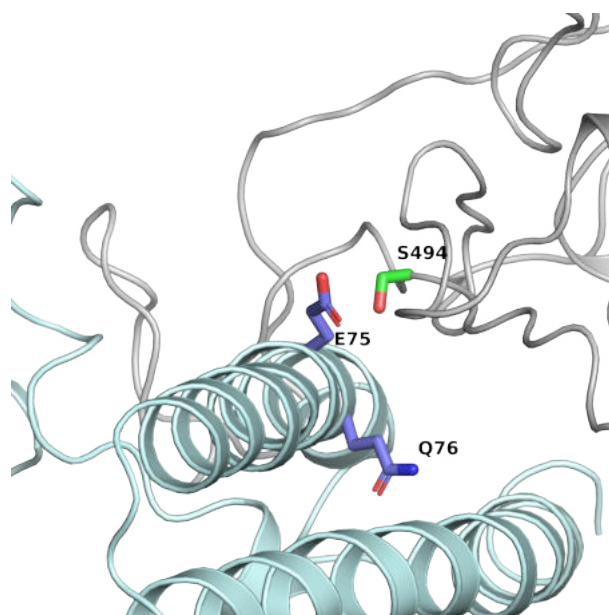
Rysunek II.16: Interakcje między M82(ACE2) a L492(RBD) i Q493(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.

Kolejny zidentyfikowany przeze mnie duży hydrofobowy klaster utworzony jest przez F456(RBD) i Y489(RBD) oraz reszty z pozycji 82, 84 i 85 wchodzące w skład enzymu konwertującego angiotensynę II (ACE2). Z uwagi na jego wielkość można przypuszczać, że odgrywa on ważną rolę w etapie infekcji polegającym na nawiązaniu wzajemnego połączenia wirus–receptor. Oprócz omówionych wyżej różnic w sekwencji enzymu konwertującego angiotensynę II w pozycji 82, jedyną różnicą w sekwencji ACE2 w resztach 84 i 85 jest występowanie reszty seryny (S84(ACE2)) u myszy. U pozostałych gatunków reszta 84 jest resztą proliny (P84(ACE2)), a w pozycji 85 u wszystkich omawianych organizmów zlokalizowana jest reszta leucyny (L85(ACE2)). Z uwagi na fakt że seryna będzie sprzyjać interakcjom z wodą, może to utrudniać proces przyłączania receptora wiążącego domenę białka S wirusa do receptora ACE2, który w odpowiadającym miejscu sekwencji ma reszty hydrofobowe. Z uwagi na specyficzną budowę proliny można spekulować, że obecność tej reszty w tej lokalizacji nie jest przypadkowa, a raczej wiąże się bezpośrednio z ewolucyjnym dostosowaniem struktury białka ACE2 do odpowiedniej konformacji.



Rysunek II.17: Interakcje między M82(ACE2), P84(ACE2) i L85(ACE2) a F456(RBD), Y489(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.

Przykładem wiązania wodorowego tworzonego poprzez oddziaływanie atomu tlenu pochodzącego z wiązania peptydowego pomiędzy resztami zlokalizowanymi w ACE2 w pozycji 75 i 76 oraz łańcuch boczny reszty aminokwasowej S494(RBD). W pozycji 75 u większości analizowanych gatunków obecna jest reszta kwasu glutaminowego (E75(ACE2)), jedynym odstępstwem jest reszta glutaminy (Q75(ACE2)) występująca w sekwencji ACE2 nietoperza. Pozycja 76 jest jednakowa dla wszystkich omawianych gatunków – Q76(ACE2).

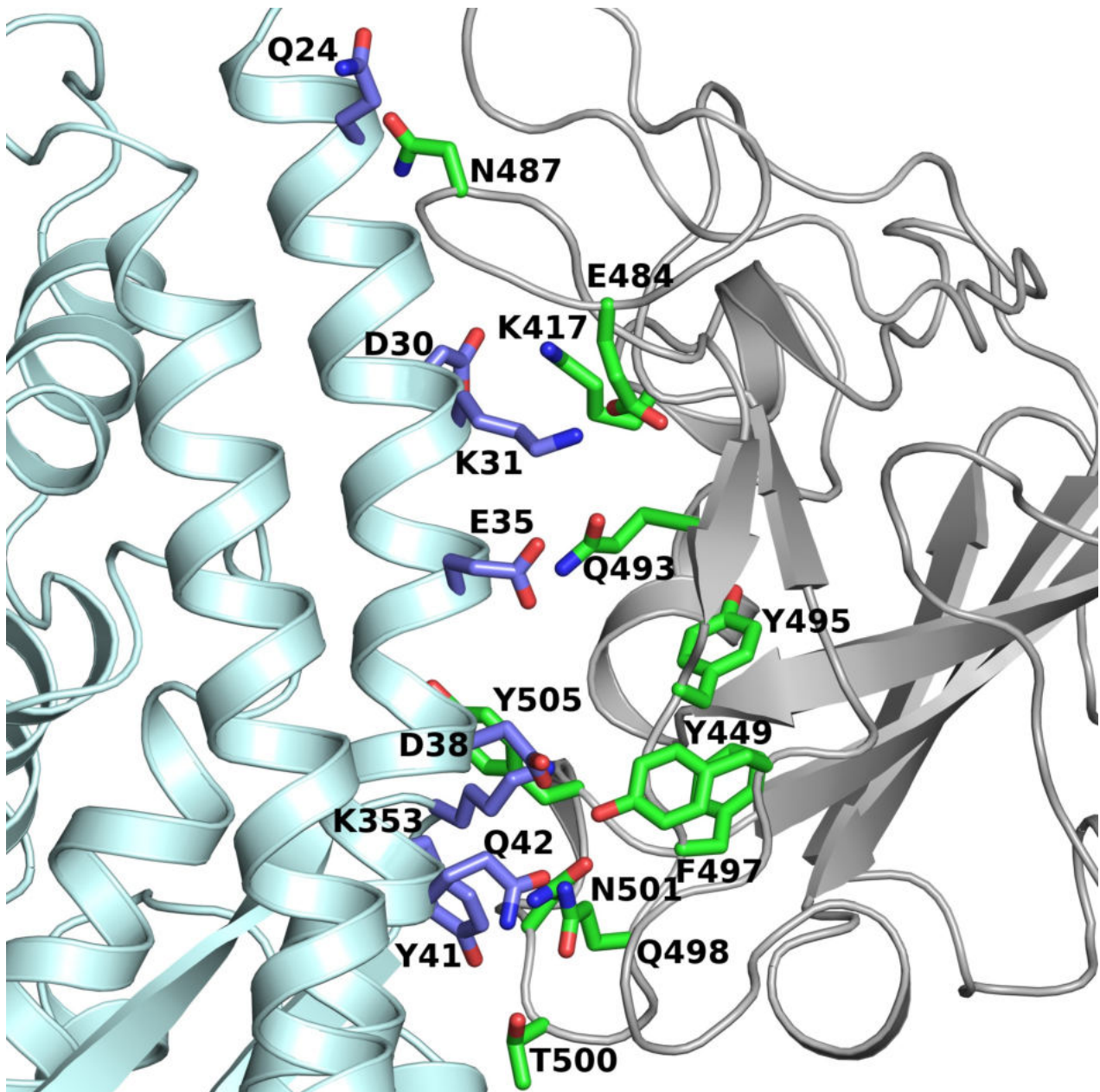


Rysunek II.18: Interakcje między E75(ACE2), Q76(ACE2) a S494(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.

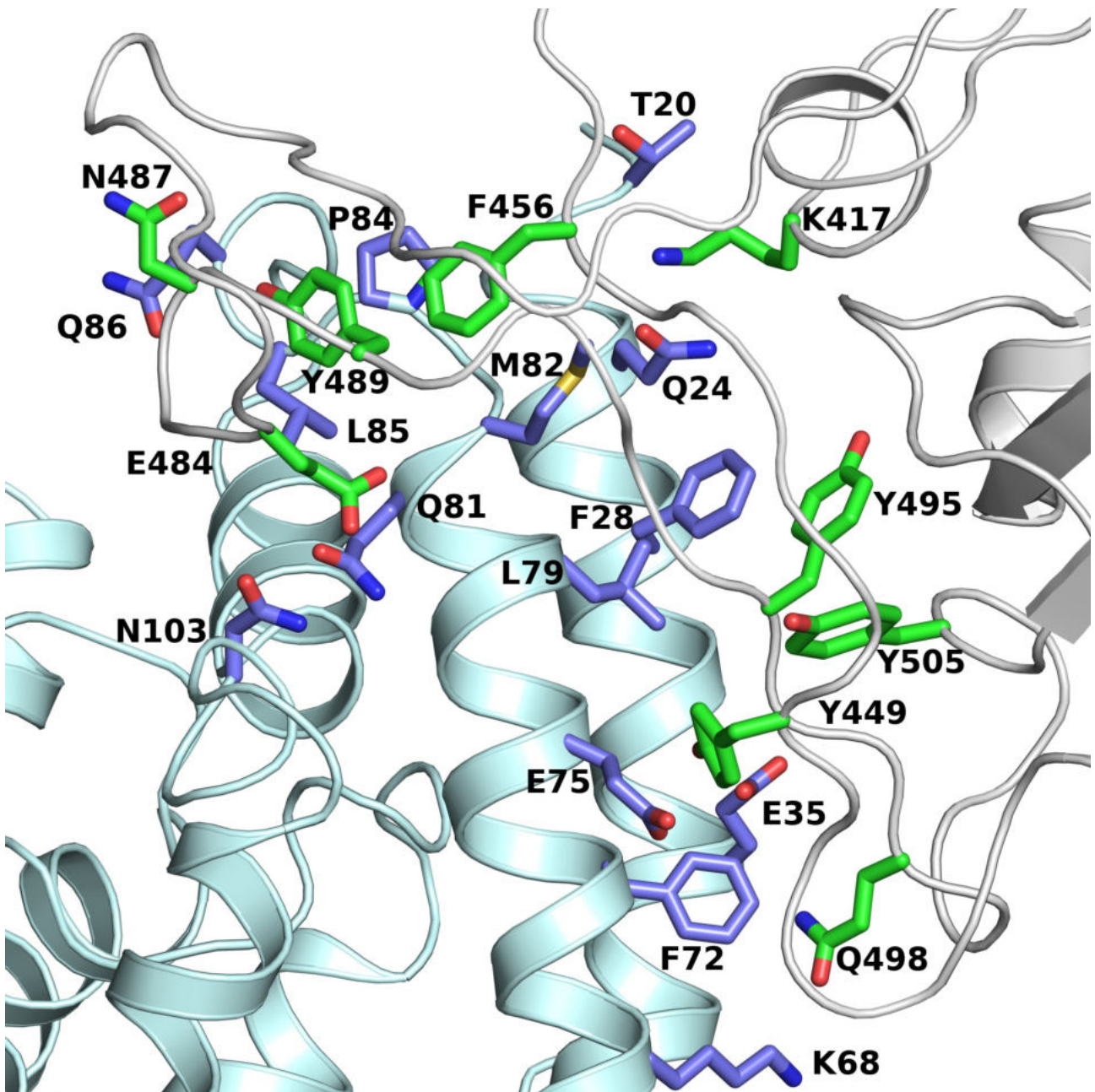
Q498(RBD) oddziałuje z resztami z pozycji 35, 68 i 72 enzymu konwertującego angiotensynę II (rys. II.2, II.20). W przypadku pozycji 35 u większości omawianych gatunków występuje reszta kwasu glutaminowego (E35(ACE2)), wyjątkiem jest nietoperz posiadający w tym miejscu sekwencji resztę lizyny (K35(ACE2)). Podobnie pod względem różnorodności wygląda pozycja 72 – dla większości gatunków w tym miejscu zlokalizowana jest reszta fenyloalaniny (F72(ACE2)), wyjątkiem jest cyweta posiadająca resztę tyrozyny (T72(ACE2)). Pozycja 68 jest jednakowa dla sekwencji wszystkich uwzględnionych przeze mnie gatunków i tworzy ją reszta lizyny (K68(ACE2)). Różnica w budowie enzymu konwertującego angiotensynę II opisana dla nietoperzy (K35(ACE2)) sprawia, że oddziaływanie wirus–receptor zostaje wzmocnione o około 9 kcal/mol²⁸³. Można spekulować, że to właśnie ta zmiana pozwala nietoperzowi pełnić rolę gatunku rezerwuarnego dla wirusa pokrewnego SARS–CoV–2²⁸¹.

Interakcja pomiędzy K417(RBD) a resztami z pozycji 20 i 24 sekwencji enzymu konwertującego angiotensynę II jest dość niejednoznaczna (rys. II.20). W zarówno w pozycji 20 jak i 24 występuje duża różnorodność w budowie. W przypadku psa, pozycja 20 ACE2 stanowi delecję, u pozostałych gatunków występuje w tej lokalizacji: u człowieka, cywety oraz świni – reszta treoniny (T), u myszy reszta leucyny (L), a u nietoperza reszta seryny (S). Pozycja 24 zawiera resztę glutaminy (Q) u człowieka, resztę asparaginy (N) u myszy, resztę leucyny (L) u cywety, psa i świni, oraz resztę lizyny (K) u nietoperza. Taka interakcja nie wydaje się być kluczowa dla procesu infekcji wirusem SARS–CoV–2, jednakże jest to bardzo silne oddziaływanie w przypadku niepodatnych na zarażenie się wirusem SARS–CoV–2 myszy.²⁸¹

Zestawienie najważniejszych interakcji pomiędzy enzymem konwertującym angiotensynę II a domeną wiążącą receptor zlokalizowaną w białku S wirusa SARS–CoV–2 w stanie stabilnym (kod PDB: 6:LZG) oraz w zidentyfikowanym stabilnym kompleksie wirus–receptor zobrazowałam na rysunkach II.19 i II.20.



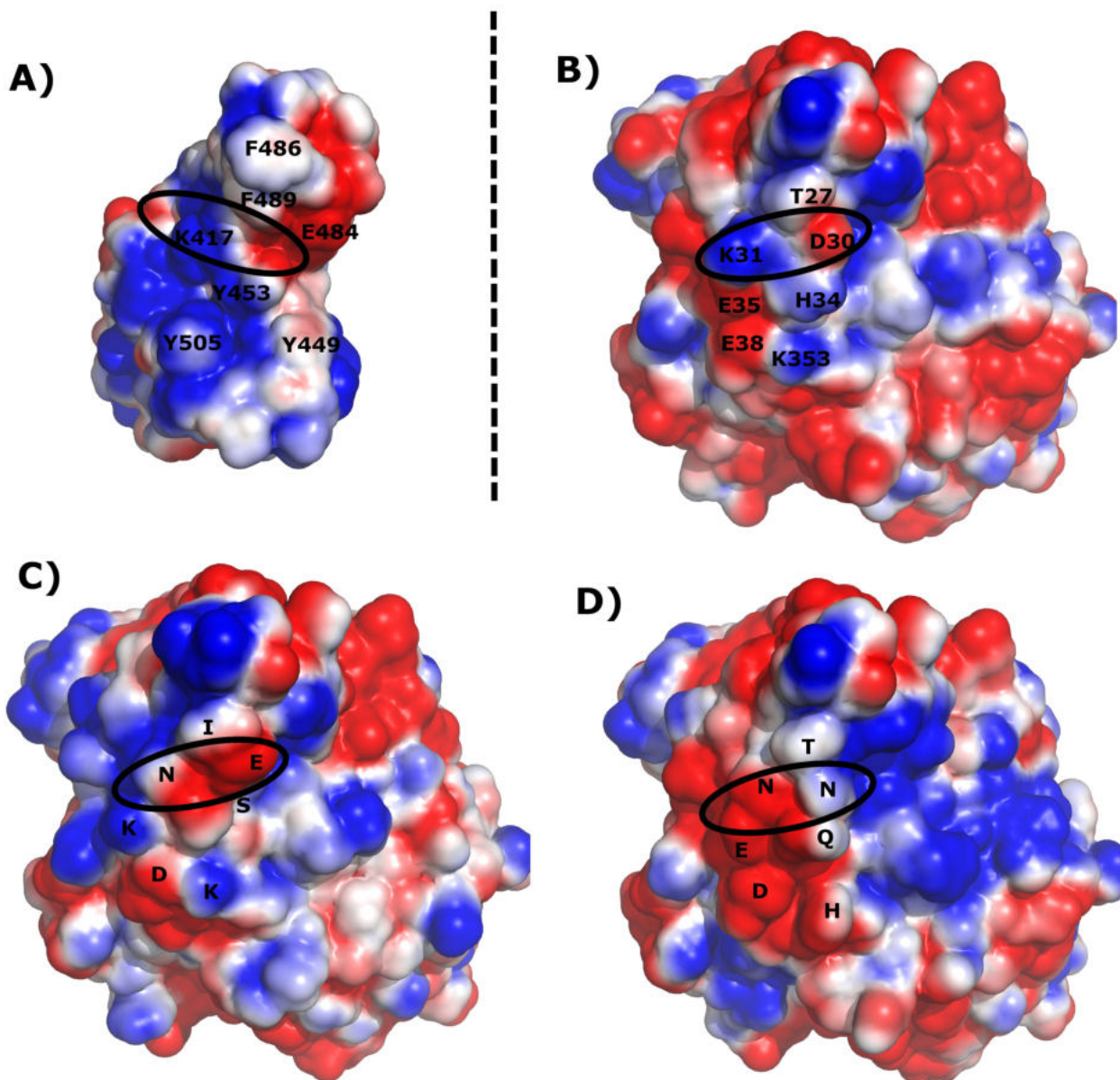
Rysunek II.19: Najważniejsze interakcje zachodzące pomiędzy resztami aminokwasowymi receptora ACE2 (jasnoniebieski, niebieski) a RBD wirusa SARS-CoV-2 (szary, zielony) obserwowane przed infekcją w stabilnym stanie zidentyfikowanym przez Wang i wsp (PDB: 6LZG)¹⁹⁴.



Rysunek II.20: Najważniejsze interakcje zachodzące pomiędzy resztami aminokwasowymi receptora ACE2 (jasnoniebieski, niebieski) a RBD wirusa SARS-CoV-2 (szary, zielony) zaobserwowane z zidentyfikowanym stabilnym kompleksie wirus-receptor.

2.6. Analiza powierzchni elektrostatycznej badanych białek

Aby zweryfikować dopasowanie domeny wiążącej receptor, białka S wirusa SARS-CoV-2 do ACE2, przeprowadziłam analizę powierzchni elektrostatycznej badanych białek. Powierzchnię obliczyłam za pomocą modeli solwatacji kontinuum Poissona-Boltzmann, przy $\text{pH} = 7$, przy użyciu wtyczki ABPS²⁹⁶ zaimplementowanej w oprogramowaniu PyMol (Delano Scientific, San Carlos, CA, USA)²⁹⁷



Rysunek II.21: Wizualizacja potencjału elektrostatycznego domeny wiążącej receptor wirusa SARS CoV-2 (A) i receptora ACE2 dla człowieka (B), nietoperza (C) oraz myszy (D). Niebieski obszar pokazuje lokalizację dodatniego potencjału elektrostatycznego, czerwony obszar to lokalizacja ujemnego potencjału elektrostatycznego. Elipsy oznaczają miejsca oddziaływań międzybiałkowych o istotnym znaczeniu.

Zlokalizowana w domenie wiążącej receptor w białku S wirusa SARS-CoV-2 w pozycji 417 lizyna (K417(RBD)) bardzo dobrze dopasowuje się konformacyjnie do wnęki utworzonej przez resztę kwasu asparaginowego D30(ACE2) w centrum ludzkiego receptora konwertującego angiotensynę II tworząc mostek solny. Inną ważną interakcją obserwowaną w przy tworzeniu się stabilnego kompleksu ACE2-RBD w przypadku człowieka jest oddziaływanie pomiędzy K31(ACE2) oraz znajdującą się we wnęce białka S resztą kwasu glutaminowego E484(RBD). Opisany obszar zaznaczony został na rysunku 21 jako elipsa. Rozkład ładunków elektrostatycznych wskazuje idealne dopasowanie do siebie zarówno ludzkiego enzymu konwertującego angiotensynę II jak i domeny wiążącej receptor w wirusie SARS-CoV-2.

W przypadku ACE2 nietoperza sytuacja nie jest jednoznaczna, ponieważ silne oddziaływanie reszty kwasu glutaminowego występującego w komplementarnym miejscu struktury (patrz elipsa – rysunek 21 C powyżej) z K417(RBD) jest niewystarczające do stabilizacji kompleksu wirus–receptor. Druga z obserwowanych interakcji: reszta asparaginy – E484(RBD) jest zbyt słaba by zrekompensować brak drugiego mostka solnego.

Analiza rozkładu ładunku elektrostatycznego w tworzeniu się interakcji pomiędzy SARS-CoV-2 a ACE2 myszy sugeruje, że powstanie stabilnego kompleksu ACE2-RBD nie będzie możliwe, lub będzie bardzo utrudnione. Obszary o takim samym znaku ładunku elektrostatycznego znajdują się naprzeciw siebie (patrz elipsa – rysunek II.21), czego konsekwencją będzie wzajemne odpychanie się białek wirusa i potencjalnego żywiciela.

3. Dyskusja wyników

W tej części pracy opisałam interakcje międzybiałkowe zachodzące w procesie tworzenia się stabilnego kompleksu wirus–receptor pomiędzy fragmentem domeny wiążącej receptor zlokalizowanej w białku S wirusa SARS-CoV-2 (RBD) a eksponowanym od strony zewnątrzkomórkowej receptorem wiążącym angiotensynę II (ACE2) zaobserwowane w toku procesu infekcji wirusem SARS-CoV-2. Obserwacja przebiegu infekcji wirusem dla myszy, nietoperza oraz człowieka była możliwa dzięki zastosowaniu symulacji dynamiki molekularnej (MD) w gruboziarnistym polu siłowym UNRES. Jako szablonu do modelowania użyłam fragmentu domeny wiążącej receptor (RBD) znajdującej się w białku S koronawirusa SARS-CoV-2 w kompleksie z ludzkim ACE2 opisaną jako konformacja stabilna w publikacji Wang (kod PDB, 6LZG).¹⁹⁴

Najważniejszymi oddziaływaniami, które wydają się odgrywać kluczową rolę w stabilizacji połączenia białko–białko, kluczowego w mechanizmie infekcji, są dwa mostki solne, a mianowicie D30(ACE2)–K417(RBD) i K31(ACE2)–E484(RBD) opisane na przykładzie modelu ludzkiego ACE2 z RBD wirusa SARS-CoV-2. Dzięki tym interakcjom wirus może bardzo dobrze dopasować się do eksponowanej części ACE2 tworząc silne oddziaływania międzybiałkowe. Wyniki symulacji dynamiki molekularnej przeprowadzonych przez Ali i in. oraz Piplani i in.^{298,299} pokazały, że region RBD białka S wirusa znajdujący się w bezpośrednim sąsiedztwie K417(RBD) wykazywał bardzo ograniczone fluktuacje. Dodatkowym oddziaływaniem stabilizującym kompleks jest wzajemna orientacja przestrzenna RBD–ACE2. Jest to możliwe dzięki reszcie E484(RBD) odgrywającej w tym procesie ważną rolę (rys. II.21).

Ze względu na wysokie powinowactwo domeny wiążącej receptor wchodzącej w skład białka S wirusa SARS-CoV-2 do ACE2, podczas symulacji w polach siłowych w których stosuje się modele pełnoatomowe w większości przypadków wynikiem jest jedynie lokalne przeszukiwanie hiperpowierzchni energii potencjalnej.²⁸⁸ W celu identyfikacji minimów lokalnych znajdujących się w nieokreślonej odległości od zidentyfikowanego eksperymentalnie minimum globalnego należy przeprowadzić bardzo długą symulację lub zastosować gruboziarniste pole siłowe.

Dzięki uzyskanym wynikom otrzymanym przy użyciu gruboziarnistego pola siłowego UNRES, mogłam zidentyfikować stabilny, tymczasowy stan przejściowy kompleksu RBD i ACE2. Zidentyfikowany rejon oddziaływań znajdujący się na powierzchni ACE2, znajduje się na eksponowanej od strony zewnątrzkomórkowej części białka i jest bezpośrednio wystawiony na atak wirusa. Prowadzone symulacje oraz otrzymane wyniki pozwoliły mi na spekulację,

że ta konformacja jest pierwszym krokiem kaskady zmian konformacyjnych prowadzących do infekcji, a tym samym stanowi stan przejściowy pomiędzy etapem początkowym polegającym na rozpoznaniu białko–białko a dalszymi etapami procesu infekcji prowadzącego w ostatniej fazie do uwolnienia wirionów potomnych.

Badana przeze mnie zależność pomiędzy podatnością na infekcję, a sekwencją ACE2 u badanych gatunków wygląda nieco inaczej. Pierwszym i wydaje się, że najważniejszym warunkiem jest to, aby siła oddziaływania w stanie początkowym, poprzedzającym potencjalne utworzenie stabilnego kompleksu RBD–ACE2, umożliwiała utrzymanie interakcji pomiędzy białkami, a jednocześnie by możliwe było dalsze przeszukiwanie przestrzeni konformacyjnej w celu utworzenia stabilnego kompleksu wirus–żywiciel. Proces ten jest niezbędny, gdyż tylko stabilny kompleks RBD–ACE2 jest w stanie umożliwić dalszy rozwój infekcji, prowadzący do uwolnienia wirionów potomnych.

Otrzymane przeze mnie wyniki potwierdzają fakt, że myszy nie mogą być zainfekowane, gdyż interakcja na etapie rozpoznania białko–białko nie jest wystarczająco silna, aby utrzymać wirusa dostatecznie blisko błony komórkowej żywiciela. Analiza symulacji dynamiki molekularnej wykazała, że domena wiążąca receptor nie jest w stanie nawiązać na tyle długotrwałej interakcji z ACE2 myszy, aby możliwe było przejście do etapu przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej. Mimo nieznaczących różnic sekwencyjnych względem receptora ludzkiego ACE2, w przypadku myszy domena wiążąca receptor wirusa SARS–CoV–2 nie jest w stanie zorientować się przestrzennie względem ACE2 na tyle korzystnie, aby możliwe było nawiązanie silnego oddziaływania, a tym samym niemożliwe jest utworzenie stabilnego kompleksu wirus–gospodarz.

Inaczej wyglądają interakcje obserwowane w przypadku enzymu konwertującego angiotensynę II u psów oraz świń. W tym przypadku interakcja na pierwszym etapie rozpoznania białko – białko jest bardzo silna, a wirion zostaje połączony z ACE2 w sposób uniemożliwiający dalsze przeszukiwanie przestrzeni konformacyjnej a tym samym kolejne etapy infekcji. Jak wspomniałam wcześniej podatność psów na SARS–CoV–2 nie została jednoznacznie potwierdzona, jednak istnieją badania mówiące o tym, że niektóre osobniki posiadają w swoim organizmie przeciwciała świadczące o kontakcie z wirusem. Same fakt posiadania przeciwciał oraz kontaktu z wirusem, nie oznacza, że doszło do pełnoprawnej infekcji zakończonej uwolnieniem wirionów potomnych zdolnych do zarażenia kolejnego żywiciela. Potencjalnie, to właśnie silne związanie RBD na etapie rozpoznawania wirus–gospodarz jest odpowiedzialne za wytworzenie przeciwciał ponieważ ekspozycja enzymu konwertującego angiotensynę II na działanie RBD wirusa była dostatecznie długa aby organizm mógł wytworzyć odpowiedź immunologiczną

na patogen.^{282,285,300} Częściowy dowód na poparcie tej hipotezy można znaleźć w badaniu opublikowanym przez Sit i wsp.¹⁷⁵

W otrzymanych przeze mnie wynikach przedstawiłam dwa dowody strukturalne na poparcie zidentyfikowanego stanu przejściowego. Pierwszym dowodem jest interakcja N487(RBD) z resztą zlokalizowaną w pozycji 86 która u psów jest resztą kwasu glutaminowego – (86E(ACE2)), a u świń resztą kwasu asparaginowego (86D(ACE2)). Reszty kwasowe występujące w tym miejscu sekwencji wzmacniają oddziaływania o około 4 kcal/mol w porównaniu z interakcją amid–amid wykrywaną u innych opisywanych gatunków²⁸³. Drugi dowód dotyczy interakcji reszty 82(ACE2) z L492(RBD) oraz Q493(RBD). W tym przypadku można by się spodziewać, że ze względu na umiejscowienie w tym miejscu sekwencji ACE2 reszty metioniny (M82(ACE2)) jedynym gatunkiem, który powinien być odporny na SARS–CoV–2, są ludzie lecz nie jest to zgodne z faktem.

Opisane przeze mnie w tej części wyniki zostały opublikowane w 2022 roku w czasopiśmie *Molecules*¹⁹⁰.

Badanie roli mechanizmu rozpoznawania enzymu konwertującego angiotensynę–2 (ACE2) przez domenę wiążącą białka S, dominujących wariantów wirusa SARS–CoV2.

1. Wprowadzenie do badań

W ostatnich latach wirus SARS–CoV–2 stał się jednym z najlepiej zbadanych patogenów w historii ludzkości. Zmiana konformacji przestrzennej układu wirus–receptor widoczna na rysunkach przedstawiających model przed i po infekcji SARS–CoV–2 (rysunki 10 i 11) dowodzi, że oprócz odpowiedniej siły potrzebnej do zainicjowania kontaktu pomiędzy białkami wirusa i żywiciela kluczową rolę odgrywają wzajemne oddziaływania międzybiałkowe niezbędne do stabilizacji utworzonego kompleksu w optymalnej orientacji.

W poprzedniej części pracy wskazałam interakcje odpowiedzialne za selektywność infekcji zachodzące pomiędzy resztami aminokwasowymi zlokalizowanymi w domenie wiążącej receptor wchodzącej w skład białka S wirusa SARS–CoV–2 oraz resztami aminokwasowymi enzymu konwertującego angiotensynę II (ACE2) u pięciu gatunków – ludzi, psów, cywet, nietoperzy, świń oraz myszy. Zgodnie z przedstawionymi przeze mnie w poprzednim rozdziale badaniami, mogę stwierdzić, że proces infekcji jest zależny od wielu czynników. Analiza trajektorii uzyskanych w wyniku symulacji dynamiki molekularnej pokazuje, że infekcja jest procesem kilkietapowym, a najważniejszy w mojej opinii jest etap drugi polegający na rozpoznaniu i przyłączeniu się wirusa do receptora.

Badania opublikowane przez Casalino i współpracowników wykazały, że białko S wirusa SARS–CoV–2 cechuje się wewnętrzną elastycznością ułatwiającą interakcję z receptorami ACE2 komórek potencjalnego gospodarza.³⁰¹ Podobne wnioski, tym razem opisujące ruchy białka S zostały przedstawione przez grupy badawcze Yu i Ma.^{302,303} W badaniach prowadzonych przez Ma i wsp. wykazano, że w domenie wiążącej receptor (RBD) w białku S wirusa znajdują się trzy reszty – F486, Q498 i Y505, które są szczególnie zaangażowane w utrzymanie odpowiedniego położenia pomiędzy ACE2 a RBD. Co więcej reszty te odgrywają kluczową rolę we wstępnym rozpoznaniu receptora przez wirus.²⁹⁵

Szczególnie ważne w kontekście prowadzonych przeze mnie badań wydają się informacje z pracy opublikowanej przez Pak i wsp. w 2022 roku. Autorzy wykonali symulację dynamiki

molekularnej białka S SARS-CoV-2 przy użyciu gruboziarnistego pola siłowego. Wskazali, że wiązanie RBD z ACE2 indukuje cykliczny proces otwierania i zamykania białka, który stopniowo osłabia interakcje zachodzące w podjednostce S1 białka S wirusa. Wiadomo, że białko S w swojej zamkniętej formie nie jest w stanie zainicjować procesu infekcji i musi przejść do formy otwartej.³⁰⁴ Dowody eksperymentalne na kolejne etapy wiązania ACE2 białka S SARS-CoV-2 zostały przedstawione przez Bentona i współpracowników. Badacze wskazali, że geometria RBD w konformacji zamkniętej jest niekompatybilna z ACE2. Wstępny proces rozpoznania a następnie wiązanie RBD do ACE2 prowadzi do w pełni otwartej formy białka S, co z kolei umożliwia infekcję.³⁰⁵ Badania równowagi pomiędzy otwartą oraz zamkniętą konformacją wiązania receptora prowadzone są przez liczne grupy naukowe i szeroko publikowane w literaturze.^{306,307,308,309,310,311}

Zgodnie z informacjami zawartymi przeze mnie w części teoretycznej pracy w podrozdziale 4.3, w konformacji przedfuzyjnej (rys. II.10) podjednostka S1 białka S wirusa składa się z czterech domen — domeny N-końcowej (N-końcowej) (NTD), domeny wiążącej receptor (RBD) i dwóch domen karboksykońcowych (C-końcowych) – CTD1 i CTD2. Białko S wiąże się z komórką docelową poprzez interakcję między ACE2 i RBD, pośrednicząc w przyłączeniu wirusa do gospodarza.^{19,231} Ten krok uruchamia następny, napędzany przez podjednostkę S2 – fuzję błonową. Wiadomo, że białko S występuje w dwóch strukturalnie odrębnych konformacjach, przed i po fuzji (przedfuzyjnej i pofuzyjnej). W literaturze nazywa się je także: „up” dla stanu dostępnego dla receptora i „down” dla stanu niedostępnego dla receptora. W stanie po fuzji zmiany konformacyjne prowadzą do odłączenia podjednostki S1 od S2 i prawdopodobnie jej dysocjacji od S2, podczas gdy S2 przechodzi kaskadę zmian konformacyjnych, tworząc stabilny i „wydłużony” trimer³⁰⁰, ostatecznie prowadząc do fuzji błony.^{19,231,312}

Opisany proces zmian konformacyjnych białka S wirusa jest niezbędny, aby uniknąć wykrycia przez układ odpornościowy gospodarza.^{293,302,303} Ponieważ RBD podlega ciągłym zmianom pomiędzy konformacją otwartą i zamkniętą i jest niekompatybilny z ACE2 w formie zamkniętej, możemy spekulować, że mechanizm rozpoznawania przez układ odpornościowy białek wirusa SARS-CoV-2 jest w rzeczywistości znacznie bardziej skomplikowany.^{19,296}

Proces mutacji SARS-CoV2 napędzany jest działaniem doboru naturalnego, który jest wielowymiarowy. Zależy to od wielu czynników: odpowiednich etapów procesu replikacji, odpowiedzi układu odpornościowego, szybkości rozprzestrzeniania się, zdolności rozpoznania żywiciela i wielu innych.^{313,314} Kwestia ewolucji koronawirusów została przeze mnie poruszona w rozdziale 3 „Ewolucja koronawirusów” w części teoretycznej rozprawy doktorskiej.

W poniższym rozdziale, wykorzystując informacje zgromadzone w literaturze oraz otrzymane przeze mnie wyniki odpowiem na pytanie: w jaki sposób zmiany w sekwencji domeny wiążącej receptor zlokalizowanej w białku S wirusa SARS-CoV-2 wpływają na jego zdolność do tworzenia kompleksu z ludzkim enzymem konwertującym angiotensynę II?

1.2 Metodyka badań

Dokładnie jak w omówionej w poprzednim rozdziale części badań, jako szablonu do modelowania wykorzystałam domenę wiążącą receptor białka S koronawirusa SARS-CoV-2, skompleksowaną z ludzkim receptorem ACE2 (kod PDB 6LZG)¹⁹⁴. W celu otrzymania modeli badanych kompleksów RBD – ACE2 wykonałam mutacje punktowe z uwzględnieniem najbardziej prawdopodobnych rotamerów korzystając z oprogramowania USCF Chimera²⁶⁶. Stosując technikę mutacji punktowej zmieniałam wybrane reszty aminokwasowe wchodzące w skład domeny wiążącej receptor zlokalizowanej w białku S wirusa SARS-CoV-2 (RBD) zgodnie z danymi zawartymi w Tabeli 4. W tej pracy użyłam mutacji występujących w dominujących wariantach wirusa wskazanych przez WHO³¹⁵.

- Alpha (B.1.1.7),
- Beta (B.1.351),
- Gamma (P.1),
- Delta (B.1.617.2),
- Omicron (B.1.1.529)

Nowo zbudowane warianty alfa, beta gamma oraz omicron (α , β , γ , δ i \omicron) RBD białka S wirusa SARS-CoV-2, w połączeniu z modelami ACE2, symulowałam w polu siłowym UNRES. Dla każdego z pięciu skonstruowanych kompleksów przeprowadziłam po czterdzieści niezależnych trajektorii dynamiki molekularnej. Aby zapobiec nadmiernym zmianom konformacyjnym symulowanych białek, dodałam więzy harmoniczne na wirtualne kąty które są używane w polu siłowym UNRES do zdefiniowania struktury białka. Sumaryczna długość wszystkich trajektorii to dziesięć milionów kroków MD wynoszących o długości 1 MTU (jednostka czasu molekularnego). MTU zastosowany w UNRES MD wynosi 48,9 fs, co daje 48,9 ns czasu symulacji^{276,277,278}. Otrzymane gruboziarniste modele przekonwertowałam do reprezentacji pełnoatomowych za pomocą oprogramowania PULCHRA³¹⁶ a następnie poddałam krótkiej minimalizacji przy użyciu pola siłowego AMBER³¹⁷. Należy zauważyć, że jedną z wad gruboziarnistego pola siłowego jest to, że po zakończeniu symulacji wymagany jest proces rekonstrukcji modelu pełnoatomowego.

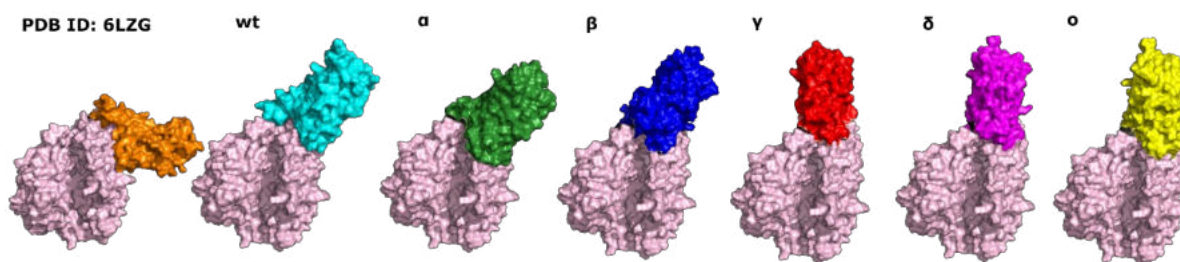
Tabela II.4. Zestawienie mutacji w poszczególnych resztach aminokwasowych RBD wariantach wirusa SARS-CoV-2 wraz z resztami zidentyfikowanymi w stanie pośrednim kompleksu RBD-ACE2. Pierwszą zidentyfikowaną wersję SARS-CoV 2 nazwano wt (ang. Wild Type). Kolumna oznaczona wt-6LZG zawiera reszty zlokalizowane na granicy faz RBD – ACE2 zidentyfikowane w strukturze eksperymentalnej (ID PDB: 6LZG).

Mutacje zidentyfikowane w RBD					Reszty aminokwasowe zlokalizowane w kompleksie RBD – ACE2 w stanie pośrednim						
α	β	γ	δ	θ	6LZG	wt	α	β	γ	δ	θ
				339, G → D							
				371, S → L							
				373, S → P							
				375, S → F							
						R403	R403	R403	R403	R403	R403
								D405	D405	D405	
											E406
									R408		
								Q409			
								Q414			
								T415			
	417, K → N	417, K → T		417, K → N	K417	K417	K417	N417	T417	K417	N417
							I418	I418			
							Y421				
				440, N → K							
				446, G → S							
					N478			N448	N448	N448	N448
			452, L → R								
					Y453		Y453				Y453
					L455	L455	L455	L455	L455	L455	L455
					F456	F456	F456				
								R457	R457	R457	R457
							T470			T470	
					Y473			Y473			
				477, S → N				S477			
				478, T → K					T478		
									N481	N481	N481
						V483	V483			V483	V483
	484, E → K	484, E → K		484, E → A	E484	E484	E484	K484	K484	E484	A484
					F486	F486	F486	F486	F486	F486	F486
			487, T → K		N487	N487		N487			N487
					Y489	Y489	Y489	Y489	Y489	Y489	Y489
							F490		F490	F490	F490
							P491				
						L492	L492			L492	L492
				493, Q → R	Q493	Q493					R493
						S494		S494		S494	
					Y495	Y495	Y495		Y495	Y495	
				496, G → S							
					F497		F497				
				498, Q → R	Q498	Q498			Q498	Q498	R498
					T500					T500	
501, N → Y	501, N → Y	501, N → Y		501, N → Y	N501		Y501	Y501	Y501	Y501	Y501
								V503			
				505, Y → H	Y505	Y505	Y505	Y505	Y505	Y505	H505

2. Omówienie wyników

W pierwszej kolejności porównałam ze sobą stabilne stany przejściowe prowadzące do utworzenia kompleksu SARS-CoV-2-ACE2 otrzymane dla każdej z badanych mutacji wirusa SARS-CoV-2 otrzymane dzięki zastosowaniu symulacji metodami dynamiki molekularnej. Wynikiem symulacji w większości przypadków była konformacja bardzo zbliżona do punktu początkowego symulacji czyli kompleksu ACE2-RBD zidentyfikowanego przez Wanga i wsp. (kod PDB: 6LZG, rys. II.10)¹⁹⁴, co oznacza jedynie lokalne przeszukiwanie przestrzeni konformacyjnej (rys. II.9A). W tym miejscu pragnę wspomnieć, że statystyka przedstawionych wyników różni się od wyników prezentowanych w poprzedniej części pracy, gdzie większość obserwowanych trajektorii kończyła się przypadkiem drugim (rys. II.9B), czyli utworzeniem stabilnego kompleksu ACE2-RBD świadczącym o zainfekowaniu koronawirusem. Fakt ten wynika z zastosowanej metody symulacji. W poprzedniej pracy symulacje dynamiki molekularnej były przeprowadzone bez żadnych więzów, dając polu siłowemu pełną swobodę przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej samych białek jak i ich wzajemnego ułożenia. W tym przypadku, by zapobiec nadmiernym zmianom konformacyjnym symulowanych białek, nałożyłam więzy harmoniczne na kąty wirtualne zdefiniowane w polu siłowym. W konsekwencji w znacznie większej liczbie symulacji wystąpiło jedynie przeszukiwanie lokalne. Analizę statystyczną otrzymanych wyników symulacji zawarłam w tabeli 5.

Porównanie struktur symulowanych kompleksów pozwoliło mi na określenie orientacji przestrzennej domeny wiążącej receptor zlokalizowanej w białku S wirusa względem enzymu konwertującego angiotensynę II we wszystkich symulowanych modelach wariantów koronawirusa. Warto wspomnieć, że opisywany przeze mnie w poprzedniej części pracy wariant wirusa SARS-CoV-2 w odniesieniu do mutacji określane jest jako wt (ang. *Wild Type*, wt). Okazało się, że wersje wt, alfa i beta SARS-CoV-2 wykazują bardzo podobne wzajemne ułożenie RBD – ACE2, podczas gdy ułożenie przestrzenne w mutacjach gamma, delta i omikron było nieco inne (rys. II.22). Wynik ten jest zgodny z publikacją Mandala i współpracowników.³¹⁸ Innym powodem różnorodności konformacji jest to, że różnica pomiędzy energiami oddziaływania, obliczonymi przy użyciu pełnoatomowego pola siłowego, mieści się w granicach 250 kcal/mol.³⁰⁶



Rysunek II.22: Porównanie punktu początkowego (kolor pomarańczowy) ze zidentyfikowanym stanem pośrednim we wszystkich analizowanych układach. Kształt białka ACE2 zaznaczono kolorem jasnoróżowym. RBD wt bazuje na modelu 6LZG i wyróżnia się konformacją początkową, przedfuzyjną (pomarańczowy), stan przejściowy wt (cyjan); mutacje SARS-CoV-2 RBD w stanie przejściowym: alfa (ciemnozielony), beta (niebieski), gamma (czerwony), delta (magenta) i omikron (żółty).

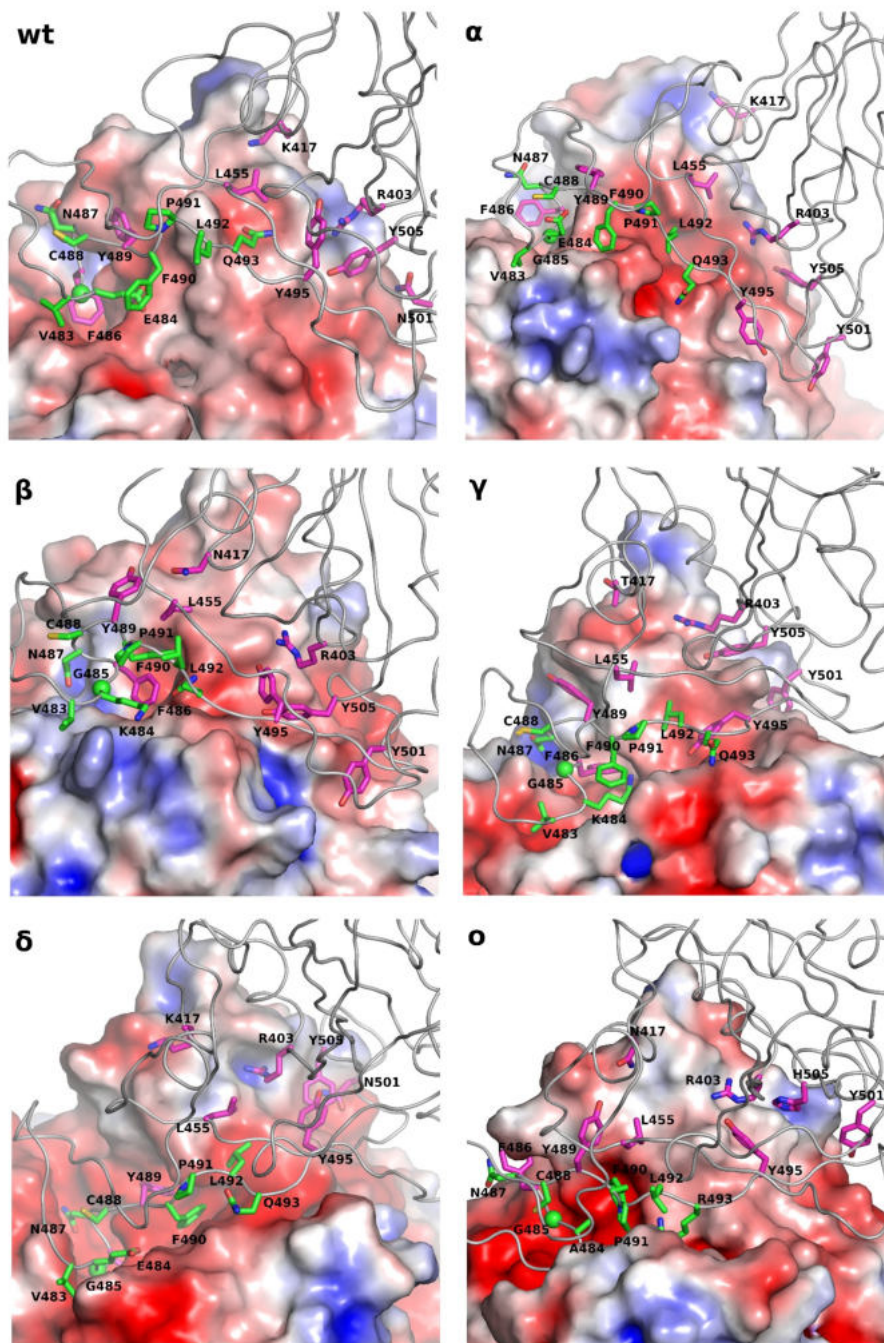
Tabela II.5: Analiza statystyczna przeprowadzonych symulacji MD dla wariantów wt, alfa, beta, gamma, delta oraz omicron. Liczby pokazują ilość symulacji, które zakończyły się wstanie początkowym (podczas trajektorii MD zostało przeprowadzone jedynie lokalne przeszukiwanie przestrzeni konformacyjnej); pośrednim (utworzenie kompleksu ACE2-RBD).

	wt	α	β	γ	δ	o
Stan początkowy	70%	73%	68%	70%	63%	60%
Stan pośredni	20%	25%	30%	28%	30%	25%

Statystycznie najsilniejsze oddziaływanie pomiędzy domeną wiążącą receptor i enzymem konwertującym angiotensynę II utrzymujące układ w konformacji zbliżonej do stanu początkowego wystąpiło w wariantcie alfa. W tym przypadku w około 73% trajektorii MD prowadziło jedynie do lokalnego przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej, a tym samym dominującą formą kompleksu była konformacja przedfuzyjna. Najsłabsze oddziaływania pomiędzy RBD i ACE2 zaobserwowałam natomiast w wariantcie omicron, gdzie zaledwie 60% trajektorii kończyło się w pobliżu stanu początkowego. Jeśli porównamy otrzymane wyniki z badaniami Hana i współpracowników³⁰⁶, wartość stałej dysocjacji (ang. Disociation Constant, [Kd]), mierzona dla wariantu omicron była największa, co oznacza, że najszybciej tworzył on stabilny kompleks RBD-ACE2 spotykany w stanie pośrednim, a zarazem najszybciej rozpadał się kompleks przedfuzyjny. Zatem proces infekcji wariantem omicron potencjalnie zachodzi najszybciej.

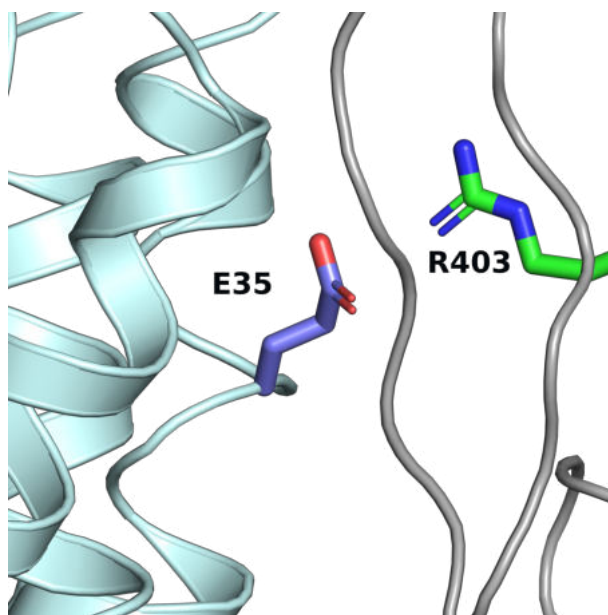
Wariant omicron wirusa SARS-CoV-2 jest szczególny, gdyż w jednym z najważniejszych miejsc RBD, pozycji 417 zamiast reszty lizyny ma resztę asparaginy – N417(RBD). Ta sama mutacja występuje w wariancie beta wirusa. Kluczowy mostek solny pomiędzy D30(ACE2) a K417(RBD) spotykany w wariantach wt, alfa i delta można zastąpić innymi interakcjami, jednak nie możliwe jest zastąpienie tego oddziaływania całkowicie (rys 21, elipsy). Tłumaczy to także wyniki stałej dysocjacji kompleksu RBD-ACE2 uzyskane przez grupę badawczą Han³⁰⁶.

Aby wyjaśnić zaobserwowane różnice w budowie przestrzennej zidentyfikowanego stanu pośredniego, przeprowadziłam analizę reszt aminokwasowych znajdujących się na granicy białko-białko w układach ACE2-wirus. Zidentyfikowałam osiem reszt aminokwasowych z domeny wiążącej receptor (RBD) jako obecnych w prawie każdym symulowanym układzie. Są to: R403(RBD), reszta w pozycji 417 – K417(RBD) dla wariantów wt, alfa, delta, N417(RBD) dla wariantu beta i omicron, T417(RBD) dla wariantu gamma; L455(RBD), F486(RBD), Y489(RBD), F497(RBD), Y501(RBD) i Y505(RBD). Wymienione reszty zostały oznaczone na rysunku 23 magentą.



Rysunek II.23: Stany pośrednie, zidentyfikowane we wszystkich symulowanych wariantach domeny wiążącej receptor wraz z enzymem konwertującym angiotensynę II, oznaczono greckimi literami. Najważniejsze reszty zidentyfikowane jako odgrywające kluczową rolę w pierwszym etapie rozpoznawania RBD–ACE2 oznaczono kolorem magenta. Reszty znajdujące się w pętli umożliwiającej dobre dopasowanie RBD do ACE2 oznaczono kolorem zielonym. Powierzchnię Poissona Boltzmanna²⁸⁸ białka ACE2 wygenerowano przy użyciu ABPS zaimplementowanego w oprogramowaniu PyMol. Niebieski obszar pokazuje lokalizację dodatniego potencjału elektrostatycznego, czerwony obszar to lokalizacja ujemnego potencjału elektrostatycznego. Źródłem czerwonych plam znajdujących się w miejscu wiążącym są atomy tlenu z wiązań peptydowych.

Pośród zidentyfikowanych reszt aminokwasowych, występujących w stanach przejściowych wszystkich modelowanych wariantów wirusa SARS-CoV-2 najsilniejsze oddziaływanie może być utworzone przez R403(RBD) a resztą kwasową zlokalizowaną na powierzchni ACE2 (rys. II.24). Jest to mostek solny. Jedynym układem, w którym zidentyfikowałam przytoczone oddziaływanie był wariant alfa, w którym R403(RBD) oddziaływał z E35(ACE2). Opisane oddziaływanie jest widoczne także na rysunku 23 α , gdzie łańcuch boczny arginy znajduje się naprzeciwko czerwonego obszaru na powierzchni ACE2.

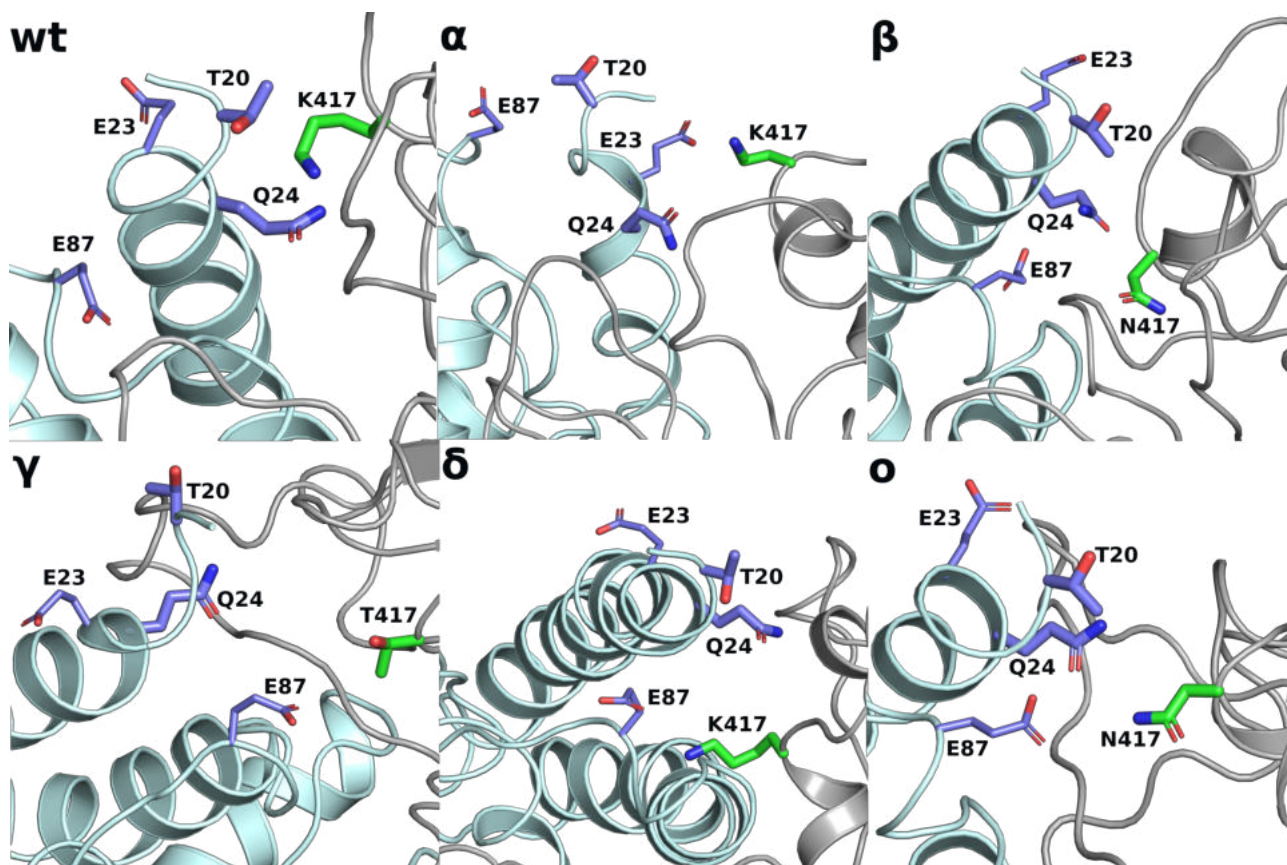


Rysunek II.24: Oddziaływanie R403(RBD) a E35(ACE2) obserwowane w wariancie alfa(α). ACE2 – cyan, RBD – szary.

Sama reszta R403(RBD) zaangażowana jest w tworzenie interakcji takich jak kation – π czy wiązanie wodorowe praktycznie w każdym z opisywanych wariantów wirusa. Taki stan rzeczy związany jest z samą lokalizacją przestrzenną R403(RBD) znajdującą się w przeważającej ilości przypadków w pobliżu reszt hydrofobowych (widoczne na rysunku 23 wt, α , β , γ , δ i o jasne plamy).

Resztą aminokwasową wchodzącą w skład domeny wiążącej receptor mogącą odgrywać istotną rolę w mechanizmie wzajemnego rozpoznawania białek jak również tworzenia oddziaływań w trakcie tworzenia stabilnego kompleksu RBD – ACE2 w stanie pośrednim, jest reszta z pozycji 417(RBD). W następujących wariantach wirusa SARS-CoV2: wt, α i δ SARS-CoV2 w pozycji 417 znajduje się reszta lizyny (K417(RBD)). W wariancie wt K417(RBD) tworzy wiązanie wodorowe

z T20(ACE2) i Q24(ACE2). Podobna sytuacja występuje w wariantie delta, gdzie K417(RBD) tworzy wiązanie wodorowe z Q87(ACE2). Natomiast w wariantie alfa występuje mostek solny K417(RBD) – E23(ACE2). Różnice w budowie reszt budujących pozycję 417 sekwencji RBD zostały zestawione w tabeli 4 i uwzględnione na rysunku II.25.



Rysunek II.25: Oddziaływania pomiędzy resztą z pozycji 417(RBD) obserwowane dla mutacji alfa, beta, gamma, delta, omicron. ACE2 – cyan, RBD – szary.

Dzięki szczegółowej analizie styku białko–białko możliwa była identyfikacja fragmentu RBD (483–493), który podczas symulacji bardzo dobrze dopasowywał się do powierzchni ACE2. W tym fragmencie struktury znajdują się dwie (F486(RBD), Y489(RBD),) z ośmiu reszt zidentyfikowanych w każdym z badanych układów. Interakcje zachodzące w omówionym fragmencie zostały pokazane na rysunku 23. Pozostałe reszty RBD, które zidentyfikowałam w każdym z badanych układów jako biorące udział w oddziaływaniach białko – białko: L455(RBD), F486(RBD), Y489(RBD), F497(RBD), Y501(RBD) i Y505(RBD), utworzyły

oddziaływania π - π oraz hydrofobowe z następującymi resztami zlokalizowanymi na powierzchni ACE2: F28(ACE2), F72(ACE2), L79(ACE2), Y83(ACE2) i L85(ACE2) (rys. II.23).

Jedną z najważniejszych reszt w strukturze RBD, która nie oddziałuje z ACE2, gdyż jej łańcuch boczny jest skierowany do wnętrza białka, jest reszta prolina w pozycji 491, (P491(RBD), rys. II.23). Znajduje się ona w N-końcowym fragmencie jednej z β – kartek domeny wiążącej receptor białka S wirusa SARS-CoV-2. Dodatkowo w pozycji 485(RBD) zlokalizowana jest reszta glicyny zapewniająca dodatkową mobilność opisywanego fragmentu RBD. Mogę w tym miejscu spekulować, że G485(RBD) wraz z P491(RBD), stanowią klucz do dobrego wzajemnego dopasowania się białek zapewniając odpowiednią swobodę konformacyjną i jednocześnie usztywnienie struktury (rys. II.23).

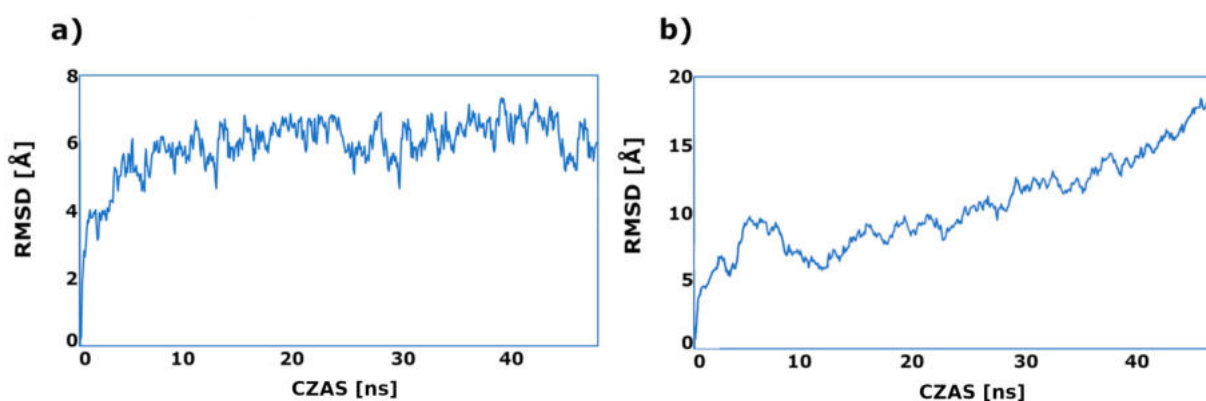
Kolejną istotną pozycją w opisanym fragmencie domeny wiążącej receptor jest reszta o numerze 484. W wariantach wt oraz δ występuje reszta kwasowa (E484(RBD)), natomiast w β i γ reszta zasadowa (K484(RBD)) (Tabela 4). W zależności od typu występującej reszty, po stronie ACE2 występuje partner do utworzenia stabilnego mostka solnego K31(ACE2) lub E75(ACE2)). Taka sytuacja występuje w strukturze startowej, gdzie powstaje mostek solny pomiędzy E484(RBD) a K31(ACE2) widoczny na rysunku II.19.

W stanie pośrednim rola reszty z pozycji 484 – wydaje się niejasna. W przypadku wariantu wt E484(RBD) może tworzyć wiązanie wodorowe z Q81(ACE2) (rys. II,20). W pozostałych przypadkach (rys. II.23), poza wariantem gamma, zaobserwowałam brak dopasowania ładunku elektrostatycznego. W wariacie alfa oraz delta E484(RBD) skierowane jest do obszaru oznaczonego kolorem czerwonym (ładunku ujemnego). W wariacie beta K484(RBD) skierowane jest do obszaru niebieskiego (ładunku dodatniego). Jedyne zaobserwowane przeze mnie dopasowanie występuje w wariacie gamma, gdzie K484(RBD) znajduje się przy obszarze ACE2 oznaczonym kolorem czerwonym. W mutacji omicron w RBD występuje reszta alaniny (A484(RBD)), która ze względu na wielkość łańcucha bocznego zdaje się nie pełnić żadnej istotnej roli.

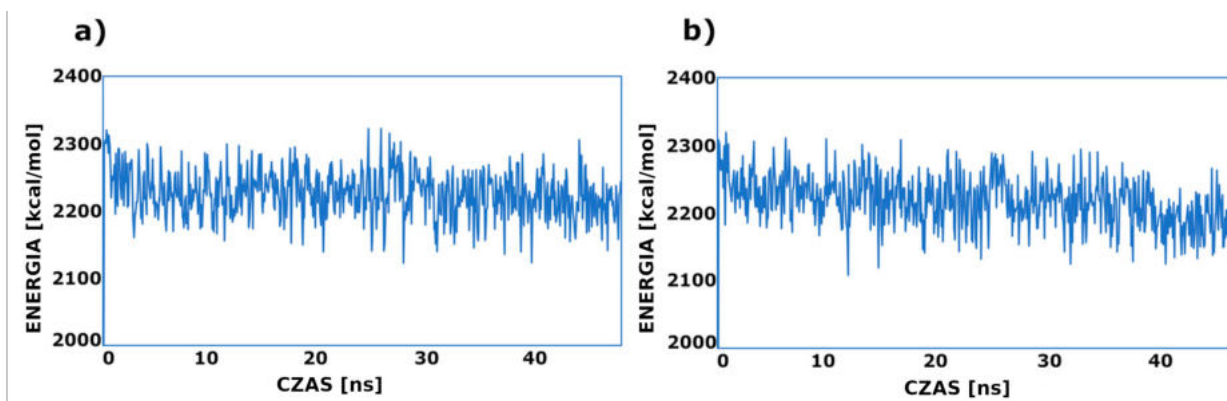
Dokładna analiza zidentyfikowanego stanu przejściowego (rys. II.9B, II.22 oraz II.23) pokazała, że silne interakcje, takie jak mostki solne i wiązania wodorowe, są marginalne. Oddziaływania hydrofobowe wraz z π - π odgrywają główną rolę tworząc dużą powierzchnię styku RBD-ACE2. Wraz z dobrą adaptacją konformacyjną RBD jest to klucz do molekularnego rozpoznania ACE2. Z uwagi na fakt, że większość zaobserwowanych oddziaływań w stanie przejściowym, jest stosunkowo słaba, mogłam zaobserwować różne wzajemne ułożenia białek względem siebie (rys. II.22).

2.1. Charakterystyka energetyczna stanu przejściowego.

W celu wyłomaczenia powinowactwa badanych wariantów SARS-CoV2 wykonałam analizę profilu energii RBD-ACE2. Analiza obejmowała zmiany zachodzące w profilu energii potencjalnej jak i energii oddziaływania zarówno dla lokalnego przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej jak i przejścia kompleksu ACE2-RBD od stanu startowego do stanu przejściowego. Zmiany konformacyjne zachodzące pomiędzy strukturą przedfuzyjną, a zdefiniowanym stanem przejściowym zilustrowałam na wykresach RMSD (ang. *Root-mean-square deviation*) (wykres II.1).

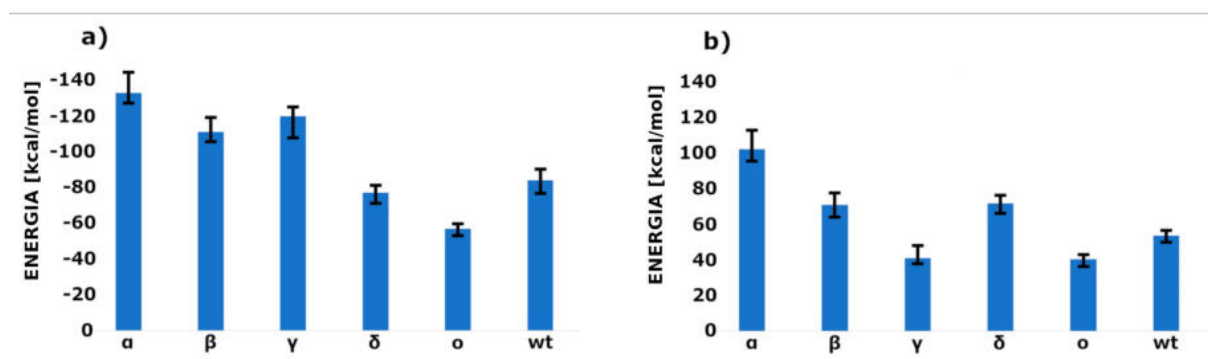


Wykres II.1: Wykresy RMSD dla wybranych trajektorii MD wariantu wt. a) trajektoria MD, na której układ wykonał jedynie przeszukiwanie lokalne; b) trajektoria MD prowadząca do stanu pośredniego.



Wykres II.2: Wykresy energii potencjalnej wybranych trajektorii MD wariantu wt. a) trajektoria MD, na której układ wykonał jedynie przeszukiwanie lokalne; b) trajektoria MD prowadząca do stanu pośredniego.

Wykresy energii potencjalnej w obu przypadkach są bardzo podobne. Analiza wyników pokazała, że znaczna liczba konformacji (tabela II.5) zakończyła się stabilnym stanem pośrednim z niskim spadkiem energii. Nie jest to zbyt wyraźnie widoczne na profilu energii potencjalnej, dlatego zdecydowałam się obliczyć energię interakcji. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że ze względu na procedurę parametryzacji zastosowaną w polu siłowym UNRES, wkład pochodzący od energii swobodnej jest także uwzględniony w funkcji energii potencjalnej.



Wykres II.3: Wykresy energii oddziaływania dla wszystkich badanych układów RBD – ACE2. a) Energia oddziaływania struktur wyjściowych, skonstruowanych przy użyciu struktury eksperymentalnej PDB ID: 6LZG. b) Różnica energii pomiędzy zidentyfikowanym stanem pośrednim a strukturą początkową.

Najniższą energię oddziaływania, obliczoną dla struktury wyjściowej, zaobserwowałam w przypadku mutacji alfa (wykres II.2). Otrzymany wynik bardzo dobrze koreluje z pracą Hana i współpracowników³⁰⁶, ponieważ wariant alfa wykazywał najniższą stałą dysocjacji. Po drugiej stronie znajduje się mutacja omicron o najwyższej stałej dysocjacji i najwyższej zaobserwowanej energii interakcji. Reszta wartości również bardzo dobrze koreluje z wynikami eksperymentalnymi.³⁰⁶. Jeśli porównamy różnicę pomiędzy energią oddziaływania obliczoną dla stanu pośredniego a struktury początkowej, największe wartości były w przypadku wariantu alfa i delta (powyżej 100 kcal/mol), najmniejsze w przypadku gamma i omicron (około 50 kcal/mol). Beta i wt wykazywały bardzo podobną różnicę (około 70–80 kcal/mol).

Zgromadzone informacje pozwalają spekulować na temat domniemanego mechanizmu wiązania oraz rozpoznawania RBD – ACE2. Wiadomo, że badane białka odgrywają istotną rolę tylko w jednym z pierwszych etapów procesu rozpoznawania komórki wirusa. Tak więc najważniejszym czynnikiem, inicjującym całą kaskadę zmian konformacyjnych, finalnie prowadzących do zainfekowania atakowanej komórki, jest dopasowanie jednego białka do

drugiego. Najbardziej prawdopodobnym scenariuszem infekcji jest atak na miejsce na powierzchni ACE2, które jest bezpośrednio eksponowane od strony zewnątrzkomórkowej na następnie przejście do stabilnego stanu przejściowego. Minimum energetyczne w stanie pośrednim nie może być zbyt głębokie, gdyż proces infekcji zatrzyma się w niewłaściwym miejscu, co uniemożliwi efektywne zarażenie potencjalnego gospodarza, a tym samym uwolnienie wirionów potomnych. Taka sytuacja ma miejsce w przypadku ACE2 psów oraz świń.¹⁹⁰ Płaska hiperpowierzchnia energii potencjalnej z bardzo dobrze zdefiniowanym minimum globalnym i płytkim minimum lokalnym wraz ze zidentyfikowanymi oddziaływaniami hydrofobowymi mogą wyjaśniać, dlaczego SARS-CoV-2 odniósł taki sukces adaptacyjny w rozpoznaniu i atakowaniu receptora konwertującego angiotensynę II.

3. Dyskusja wyników

Problem szybkości oraz mechanizmu asocjacji białko–białko jest bardzo skomplikowany. Ponieważ zagrożenie SARS–CoV2 jest w dalszym ciągu bardzo wysokie – według danych zgromadzonych przez WHO do 25 października 2023 r. potwierdzonych zostało 771 549 718 przypadków zachorowań na COVID–19, w tym 6 974 473 zgonów; każda dodatkowa informacja na temat mechanizmu zakażenia może być kluczowa dla pełnego zrozumienia procesu infekcji. W swojej pracy wykonałam analizę jedynie niewielkiego fragmentu skomplikowanego mechanizmu molekularnego który odpowiada za opis procesu infekcji wirusem SARS–CoV–2.

W pierwszym etapie kontaktu RBD – ACE2 kluczową rolę odgrywają głównie reszty hydrofobowe RBD, a mianowicie: L455, F486, Y489, F497, Y501 i Y505 oraz opisane reszty proliny i glicyny zapewniające bardzo dobrą adaptację konformacyjną.

W wariantcie omicron dodatkowo występuje reszta A484(RBD), która pomaga w dobrym dopasowaniu białek do siebie i może być wyjaśnieniem sukcesu tego wariantu pomimo niekorzystnej mutacji w pozycji 417 (mutacja z K417RBD) na N417(RBD)) i utraty kluczowego mostka solnego mostka, który niewątpliwie wzmacnia stabilną konformację RBD – ACE2 w stanie przejściowym (rys.II.11). Wirus SARS–CoV–2 jak każdy wirus podlega ciągłym zmianom. Większość z nich nigdy nie przechodzi do następnego pokolenia wirusów, jednakże możemy się spodziewać kolejnych wariantów, które mogą być znacznie lepiej dostosowane do atakowania i infekowania komórek. Dlatego uważam, że pomimo bardzo dużej ilości prac naukowych zarówno eksperymentalnych jak i teoretycznych, badania nad wirusem SARS–CoV–2 powinny być kontynuowane. Istnieje bowiem ryzyko, że, w przyszłości pojawi się wariant, w którym śmiertelność będzie znacznie większa niż obecne 0,1 – 10 % w zależności od wieku i chorób współistniejących.

Omówione przeze mnie wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences w 2024 roku.³¹⁹

V. Wnioski rozprawy doktorskiej

Zgodnie ze zgromadzonymi przeze mnie informacjami, dotychczas nikt nie poszukiwał stabilnych stanów przejściowych występujących podczas asocjacji RBD – ACE2. Jednakże dostępne dane eksperymentalne wyraźnie wskazują na ich istnienie. Identyfikacja i opis zmian zachodzących w rozbudowanych układach biologicznych jak kompleksy białko–białko jest skomplikowana. Uzyskanie wiarygodnych wyników przy wykorzystaniu pełnoatomowych pól siłowych jest niezwykle trudne i czasochłonne. W badanym przeze mnie przypadku tworzenia się stabilnego stanu przejściowego kompleksu pomiędzy domeną wiążącą receptor a enzymem konwertującym angiotensynę II, ze względu na bardzo dobre dopasowanie konformacyjne białek tylko gruboziarniste pole siłowe takie jak UNRES, pozwala na uzyskanie wiarygodnych wyników. Pole siłowe UNRES zostało zaprojektowane do wykonywania szerokiego przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej, co z powodzeniem pozwala odnaleźć najbardziej prawdopodobne i trwałe struktury. W części eksperymentalnej mojej pracy doktorskiej opisałam wyniki badań mających na celu wyjaśnienie roli mechanizmu rozpoznawania enzymu konwertującego angiotensynę–II (ACE2) przez domenę wiążącą receptor zlokalizowaną w białku S wirusa SARS–CoV–2. W swoich badaniach wyjaśniłam, w jaki sposób nawet niewielkie różnice w budowie ACE2 u poszczególnych organizmów – człowieka, psa, cywety, myszy, świni i nietoperza wpływają na zdolność wirusa do utworzenia stabilnego kompleksu w stanie przejściowym oraz podkreśliłam także znaczenie siły wiązania wirus–gospodarz dla rozwoju infekcji wirusowej. W drugiej części zbadałam i opisałam w jaki sposób mutacje w materiale genetycznym wirusa wpływają trwałość utworzonego stanu przejściowego oraz które fragmenty zarówno ACE2 jak i SARS–CoV–2 odpowiadają za wzajemne dopasowanie białek. Mając na uwadze fakt, iż ewolucja wirusów jest procesem ciągłym i nieprzewidywalnym uważam, że oprócz kontynuacji badań nad SARS–CoV–2 oraz innymi wirusami stanowiącymi zagrożenie dla zdrowia publicznego, bardzo ważne jest wspieranie inicjatyw mających na celu rozpowszechnienie i spopularyzowanie metod teoretycznych w badaniach naukowych. Z mojej perspektywy wygodnym narzędziem odnoszącym bardzo dobre rezultaty jest ciągle rozwijane i udoskonalane pole siłowe UNRES. Wykorzystanie chemii obliczeniowej umożliwia nie tylko oszczędność czasu, ale przede wszystkim pozwala pracować nad projektem bez narażania zdrowia i życia, co może się wydarzyć się podczas pracy z materiałem biologicznym pobranym od ludzi czy zwierząt. Ostatnie lata pokazały, że to właśnie bezpieczeństwo i przeciwdziałanie potencjalnemu zagrożeniu jest dla współczesnej nauki największym wyzwaniem.

VI. Wykaz rysunków

- Rysunek I.1 *Schemat przedstawiający podział wirusów rzędu Nidovirales, kolorem zielonym oznaczono rodzinę Coronavirinae.*
- Rysunek I.2 *Schemat budowy koronawirusa na przykładzie SARS-CoV-2*
- Rysunek I.3 *Schemat przedstawiający budowę białka błony (M).*
- Rysunek I.4 *Schemat przedstawiający budowę białka S.*
- Rysunek I.5 *Schematyczny przegląd białek, peptydów, enzymów i receptorów oraz ich interakcji występujących w układzie renina-angiotensyna.*
- Rysunek I.6 *Schemat przedstawiający występowanie ACE2 w organizmie ludzkim. Kolorem zielonym oznaczono miejsca, w których występowanie ACE2 zostało dobrze udokumentowane. Na czerwono oznaczono miejsca w których występowanie enzymu ACE2 nie jest w pełni potwierdzone.*
- Rysunek I.7 *Schemat rekombinacji materiału genetycznego wirusów podczas procesu infekcji.*
- Rysunek I.8 *Zestawienie czynników wpływających na częstość oraz tempo mutacji. Zielone strzałki obrazują procesy regulujące zachodzące w populacji zmiany.*
- Rysunek I.9 *Schemat przedstawiający atakowane organizmy przez wirusy z rodziny i podrodziny Coronaviridae. Alfakoronawirusy obejmują ludzkie wirusy takie jak koronowirus HCoV-229E i NL63. Betakoronawirusy są podzielone na podgrupy grupy A–D, przy czym HKU1 i OC43 należą do grupy A, SARS-CoV do grupy B a MERS-CoV do grupy C. Gammakoronawirusy są w dużej mierze pochodzenia ptasiego i obejmują IBV, a także wirusy ssaków morskich. Deltakoronawirusy obejmują głównie wirusy atakujące ptactwo.*

- Rysunek I.10 *(A) Ewolucja i zależności koronawirusów występujących u ludzi i zwierząt dzikich oraz domowych. Strzałki czerwona, niebieska i żółta wskazują kierunek rozprzestrzeniania się koronawirusa odpowiednio dla alfa-, beta- i deltakoronawirusów. Ciągłe strzałki oznaczają bezpośrednie przenoszenie koronawirusa między gatunkami żywicieli, a strzałki przerywane oznaczają podejrzewane przenoszenie pośrednie przez niezidentyfikowany gatunek. Kropkowane strzałki ze znakiem zapytania oznaczają przypadki przeniesienia będącego losową interakcją bez podstaw w badaniach środowiskowych. (B) Uproszczona filogeneza koronawirusów.*
- Rysunek I.11 *Schemat przedstawiający zaburzenia układu Renina-Angiotensyna w przebiegu infekcji wirusem SARS-CoV-2, skrótami NEP oraz PEP zostały oznaczone kolejno ang. Neutral-endopeptidase, oraz ang. Prolyl-endopeptidase; NEP będące enzymami z grupy proteaz.*
- Rysunek I.12 *Schemat obrazujący dwie możliwości infekcji wirusem SARS-CoV-2, droga endosomalna jest dominującym sposobem zakażenia się wirusem. W różowych ramkach przedstawione są sposoby ograniczające możliwość infekcji oraz nazwy substancji chemicznych zawartych w lekach potencjalnie ograniczających lub hamujących poszczególne etapy wnikania wirusa do komórek gospodarza.*
- Rysunek I.13 *Zastosowanie różnych poziomów teorii do przewidywania konkretnych właściwości układów molekularnych: kwantowy, pełnoatomowy, gruboziarnisty i mezoskala. Przybliżona skala czasowa oraz rozmiar badanego układu zostały przedstawione odpowiednio na osi odciętych i rzędnych.*
- Rysunek I.14 *Porównanie modelu pełnoatomowego i gruboziarnistego. Różnokolorowe elipsy przedstawiają przybliżenie łańcuchów bocznych. Niebieskie kulki przedstawiają położenie wiązań peptydowych.*
- Rysunek I.15 *Model łańcucha polipeptydowego używany w polu siłowym UNRES. Ciemne kółka reprezentują połączone grupy peptydowe (p), białe kółka reprezentują atomy Ca, które służą jako punkty geometryczne, a elipsoidy reprezentują łańcuchy boczne (SC). Punkty p znajdują się w połowie odległości między dwoma kolejnymi atomami Ca. Wirtualne kąty wiązania θ , kąty dwuścienne wirtualnego wiązania γ oraz kąty α SC i β SC, definiują położenie łańcucha bocznego względem łańcucha głównego.*

- Rysunek II.1 *Analiza sekwencyjna (Multiple Sequence Alignment) dla wybranych sekwencji ACE2 wykonana przy użyciu programu ClustalX. Odpowiednimi kolorami zostały oznaczone reszty aminokwasowe o podobnych właściwościach (zasadowe – czerwony, kwasowe – fioletowy, hydrofobowe – zielony, reszty amidowe oraz posiadające grupę hydroksylową – zielony. Na białą zostały zaznaczone są fragmenty nie wykazujące podobieństwa.*
- Rysunek II.2 *Analiza sekwencyjna enzymu konwertującego angiotensynę II (ACE2) dla ludzi – kod Q9BYF1, myszy - kod Q3URC9, cywet – kod Q56NL1, psa kod F1P7C5, świni - kod K7GLM4 i nietoperza - kod G1PXH7 pokazująca cztery regiony zidentyfikowane jako miejsca oddziałujące z RBD wirusa SARS-CoV-2. Wspólnei unikalne miejsca interakcji są oznaczone odpowiednio czarną i czerwoną strzałką. Gwiazdki i kropki wskazują podobieństwo sekwencji, jak przedstawiono w oprogramowaniu Clustal.*
- Rysunek II.3 *Fragmety zaangażowane w proces tworzenia kompleksu wirus-receptor. Obszary należące do ACE2: I - 19-49 (fioletowy), II - 79-83 (zielony), III- 324-330 (ciemnozielony) oraz IV- 352-356 (magenta) a także do białka S wirusa SARS-CoV-2: 1-417 (niebieski), 2- 455-456 (cyan), 3 - 475-478 (czerwony), 4 -486-505 (pomarańczowy).*
- Rysunek II.4 *Oddziaływanie S19(ACE2) oraz A475(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.*
- Rysunek II.5 *Oddziaływanie pomiędzy T27(ACE2) a F456(RBD), Y473(RBD) i Y489(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.*
- Rysunek II.6 *Oddziaływanie między H34(ACE2) a Y455(RBD) i L455(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.*
- Rysunek II.7 *Oddziaływanie między L79(ACE2), M82(ACE2), Y83(ACE2) a N487(RBD), F486(RBD) i Y489(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.*
- Rysunek II.8 *Oddziaływania pomiędzy K353(ACE2) a Y495(RBD), F497(RBD) i Y505(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.*

- Rysunek II.9 *Ilustracja przypadków zaobserwowanych podczas symulacji dynamiki molekularnej kompleksu ACE2-RBD. A) Lokalne przeszukiwanie przestrzeni konformacyjnej, B) Stabilny stan przejściowy, C) Symulacja zakończona niepowodzeniem z powodu brak możliwości utworzenia kompleksu w warunkach naturalnych.*
- Rysunek II.10 *Kompleks ludzkiego enzymu konwertującego angiotensynę II (ACE2) (jasnoniebieski) oraz domeny wiążącej receptor zlokalizowanej w białku S wirusa SARS-CoV-2 (RBD) (szary) w stabilnej konformacji zidentyfikowanej przez Wanga i wsp¹⁹⁴, kolorem niebieskim oznaczono reszty aminokwasowe pochodzące od ACE2, zielonym reszty RBD.*
- Rysunek II.11 *Kompleks ludzkiego enzymu konwertującego angiotensynę II (ACE2) (jasnoniebieski) oraz domeny wiążącej receptor zlokalizowanej w białku S wirusa SARS-CoV-2 (RBD) (szary) zidentyfikowany jako stan przejściowy występujący podczas procesu infekcji. Kolorem niebieskim oznaczono reszty aminokwasowe pochodzące od ACE2, zielonym reszty RBD.*
- Rysunek II.12 *Interakcja pomiędzy F28(ACE2), Y83(ACE2), Q24(ACE2) a L455(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.*
- Rysunek II.13 *Interakcja pomiędzy F28(ACE2), L79(ACE2) a Y495(RBD), R403(RBD), Y505(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.*
- Rysunek II.14 *Interakcja pomiędzy Q102(ACE2), Q101(ACE2), Q98(ACE2) a F486(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.*
- Rysunek II.15 *Interakcja pomiędzy N103(ACE2), Q81(ACE2) a E484(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.*
- Rysunek II.16 *Interakcje między M82(ACE2) a L492(RBD) i Q493(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.*
- Rysunek II.17 *Interakcje między M82(ACE2), P84(ACE2) i L85(ACE2) a F456(RBD), Y489(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.*

- Rysunek II.18 *Interakcje między E75(ACE2), Q76(ACE2) a S494(RBD). ACE2 – cyan, RBD – szary.*
- Rysunek II.19 *Najważniejsze interakcje zachodzące pomiędzy resztami aminokwasowymi receptora ACE2 (jasnoniebieski, niebieski) a RBD wirusa SARS-CoV-2 (szary, zielony) obserwowane przed infekcją w stabilnym stanie zidentyfikowanym przez Wang i wsp (PDB: 6LZG).*
- Rysunek II.20 *Najważniejsze interakcje zachodzące pomiędzy resztami aminokwasowymi receptora ACE2 (jasnoniebieski, niebieski) a RBD wirusa SARS-CoV-2 (szary, zielony) zaobserwowane z zidentyfikowanym stabilnym kompleksie wirus-receptor.*
- Rysunek II.21 *Wizualizacja potencjału elektrostatycznego domeny wiążącej receptor wirusa SARS CoV-2 (A) i receptora ACE2 dla człowieka (B), nietoperza (C) oraz myszy (D). Niebieski obszar pokazuje lokalizację dodatniego potencjału elektrostatycznego, czerwony obszar to lokalizacja ujemnego potencjału elektrostatycznego. Elipsy oznaczają miejsca oddziaływań międzybiałkowych o istotnym znaczeniu.*
- Rysunek II.22 *Porównanie punktu początkowego (kolor pomarańczowy) ze zidentyfikowanym stanem pośrednim we wszystkich analizowanych układach. Kształt białka ACE2 zaznaczono kolorem jasnorożowym. RBD w bazuje na modelu 6LZG i wyróżnia się konformację początkową, przedfuzyjną (pomarańczowy), stan przejściowy wt (cyan); mutacje SARS-CoV-2 RBD w stanie przejściowym: alfa (ciemnozielony), beta (niebieski), gamma (czerwony), delta (magenta) i omikron (żółty).*
- Rysunek II.23 *Stany pośrednie, zidentyfikowane we wszystkich symulowanych wariantach domeny wiążącej receptor wraz z enzymem konwertującym angiotensynę II, oznaczono greckimi literami. Najważniejsze reszty zidentyfikowane jako odgrywające kluczową rolę w pierwszym etapie rozpoznawania RBD-ACE2 oznaczono kolorem magenta. Reszty znajdujące się w pętli umożliwiającej dobre dopasowanie RBD do ACE2 oznaczono kolorem zielonym. Powierzchnię Poissona Boltzmannna białka ACE2 wygenerowano przy użyciu ABPS zaimplementowanego w oprogramowaniu Pymol. Niebieski obszar pokazuje lokalizację dodatniego potencjału elektrostatycznego, czerwony obszar to lokalizacja ujemnego potencjału elektrostatycznego. Źródłem czerwonych plam znajdujących się w miejscu wiążącym są atomy tlenu z wiązań peptydowych.*

- Rysunek II.24 *Oddziaływanie R403(RBD) a E35(ACE2) obserwowane w wariancie alfa(α). ACE2 – cyan, RBD – szary.*
- Rysunek II.25 *Oddziaływania pomiędzy resztą z pozycji 417(RBD) obserwowane dla mutacji alfa, beta, gamma, delta, omicron. ACE2 – cyan, RBD – szary.*
- Wykres II.1 *Wykresy RMSD dla wybranych trajektorii MD wariantu wt. a) trajektoria MD, na której układ wykonał jedynie przeszukiwanie lokalne; b) trajektoria MD prowadząca do stanu pośredniego.*
- Wykres II.2 *Wykresy energii potencjalnej wybranych trajektorii MD wariantu wt. a) trajektoria MD, na której układ wykonał jedynie przeszukiwanie lokalne; b) trajektoria MD prowadząca do stanu pośredniego.*
- Wykres II.3 *Wykresy energii oddziaływania dla wszystkich badanych układów RBD – ACE2. a) Energia oddziaływania struktur wyjściowych, skonstruowanych przy użyciu struktury eksperymentalnej PDB ID: 6LZG. b) Różnica energii pomiędzy zidentyfikowanym stanem pośrednim a strukturą początkową.*

VII. Bibliografia

- ¹ Yan, Y.; Shin, W.I.; Pang, Y.X.; Meng, Y.; Lai, J.; You, C.; Zhao, H.; Lester, E.; Wu, T.; Pang, C.H. The First 75 Days of Novel Coronavirus (SARS–CoV–2) Outbreak: Recent Advances, Prevention, and Treatment. *IJERPH* **2020**, *17*, 2323, doi:[10.3390/ijerph17072323](https://doi.org/10.3390/ijerph17072323).
- ² Liu, D.X.; Liang, J.Q.; Fung, T.S. Human Coronavirus–229E, –OC43, –NL63, and –HKU1 (Coronaviridae). In *Encyclopedia of Virology*; Elsevier, 2021; pp. 428–440 ISBN 978–0–12–814516–6., doi: [10.1016/B978–0–12–809633–8.21501–X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21501-X)
- ³ Lu, R.; Zhao, X.; Li, J.; Niu, P.; Yang, B.; Wu, H.; Wang, W.; Song, H.; Huang, B.; Zhu, N.; et al. Genomic Characterisation and Epidemiology of 2019 Novel Coronavirus: Implications for Virus Origins and Receptor Binding. *The Lancet* **2020**, *395*, 565–574, doi:[10.1016/S0140–6736\(20\)30251–8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8).
- ⁴ Letko, M.; Marzi, A.; Munster, V. Functional Assessment of Cell Entry and Receptor Usage for SARS–CoV–2 and Other Lineage B Betacoronaviruses. *Nat Microbiol* **2020**, *5*, 562–569, doi:[10.1038/s41564–020–0688–y](https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y).
- ⁵ Kumar, S.; Nyodu, R.; Maurya, V.K.; Saxena, S.K. Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS–CoV–2). In *Coronavirus Disease 2019 (COVID–19)*; Saxena, S.K., Ed.; Medical Virology: From Pathogenesis to Disease Control; Springer Singapore: Singapore, 2020; pp. 23–31 ISBN 9789811548130. doi:[10.1007/978–981–15–4814–7_3](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7_3)
- ⁶ Cui, J.; Li, F.; Shi, Z.–L. Origin and Evolution of Pathogenic Coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* **2019**, *17*, 181–192, doi:[10.1038/s41579–018–0118–9](https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9).
- ⁷ Wang, B.; Zhong, C.; Tieleman, D.P. Supramolecular Organization of SARS–CoV and SARS–CoV–2 Virions Revealed by Coarse–Grained Models of Intact Virus Envelopes. *J. Chem. Inf. Model.* **2022**, *62*, 176–186, doi:[10.1021/acs.jcim.1c01240](https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c01240).
- ⁸ Fehr, A.R.; Perlman, S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. In *Coronaviruses*; Maier, H.J., Bickerton, E., Britton, P., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2015; Vol. 1282, pp. 1–23 ISBN 978–1–4939–2437–0. doi:[10.1007/978–1–4939–2438–7_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1).
- ⁹ Bárcena, M.; Oostergetel, G.T.; Bartelink, W.; Faas, F.G.A.; Verkleij, A.; Rottier, P.J.M.; Koster, A.J.; Bosch, B.J. Cryo–Electron Tomography of Mouse Hepatitis Virus: Insights into the Structure of the Coronavirion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 582–587, doi:[10.1073/pnas.0805270106](https://doi.org/10.1073/pnas.0805270106).
- ¹⁰ Neuman, B.W.; Adair, B.D.; Yoshioka, C.; Quispe, J.D.; Orca, G.; Kuhn, P.; Milligan, R.A.; Yeager, M.; Buchmeier, M.J. Supramolecular Architecture of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Revealed by Electron Cryomicroscopy. *J Virol* **2006**, *80*, 7918–7928, doi:[10.1128/JVI.00645–06](https://doi.org/10.1128/JVI.00645-06).

- ¹¹ Karthika, C.; Swathy Krishna, R.; Rahman, Md.H.; Akter, R.; Kaushik, D. COVID–19, the Firestone in 21st Century: A Review on Coronavirus Disease and Its Clinical Perspectives. *Environ Sci Pollut Res* **2021**, *28*, 64951–64966, doi:[10.1007/s11356-021-16654-9](https://doi.org/10.1007/s11356-021-16654-9).
- ¹² Arya, R.; Kumari, S.; Pandey, B.; Mistry, H.; Bihani, S.C.; Das, A.; Prashar, V.; Gupta, G.D.; Panicker, L.; Kumar, M. Structural Insights into SARS–CoV–2 Proteins. *Journal of Molecular Biology* **2021**, *433*, 166725, doi:[10.1016/j.jmb.2020.11.024](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.024).
- ¹³ Cao, Y.; Yang, R.; Lee, I.; Zhang, W.; Sun, J.; Wang, W.; Meng, X. Characterization of the SARS–CoV –2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors. *Protein Science* **2021**, *30*, 1114–1130, doi:[10.1002/pro.4075](https://doi.org/10.1002/pro.4075).
- ¹⁴ Tseng, Y.–T.; Wang, S.–M.; Huang, K.–J.; Wang, C.–T. SARS–CoV Envelope Protein Palmitoylation or Nucleocapid Association Is Not Required for Promoting Virus–like Particle Production. *J Biomed Sci* **2014**, *21*, 34, doi:[10.1186/1423-0127-21-34](https://doi.org/10.1186/1423-0127-21-34).
- ¹⁵ Xu, R.; Shi, M.; Li, J.; Song, P.; Li, N. Construction of SARS–CoV–2 Virus–Like Particles by Mammalian Expression System. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 862, doi:[10.3389/fbioe.2020.00862](https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00862).
- ¹⁶ J Alsaadi, E.A.; Jones, I.M. Membrane Binding Proteins of Coronaviruses. *Future Virology* **2019**, *14*, 275–286, doi:[10.2217/fvl-2018-0144](https://doi.org/10.2217/fvl-2018-0144).
- ¹⁷ Ujike, M.; Taguchi, F. Incorporation of Spike and Membrane Glycoproteins into Coronavirus Virions. *Viruses* **2015**, *7*, 1700–1725, doi:[10.3390/v7041700](https://doi.org/10.3390/v7041700).
- ¹⁸ Arndt, A.L.; Larson, B.J.; Hogue, B.G. A Conserved Domain in the Coronavirus Membrane Protein Tail Is Important for Virus Assembly. *J Virol* **2010**, *84*, 11418–11428, doi:[10.1128/JVI.01131-10](https://doi.org/10.1128/JVI.01131-10).
- ¹⁹ Masters, P.S. The Molecular Biology of Coronaviruses. In *Advances in Virus Research*; Elsevier, 2006; Vol. 66, pp. 193–292 ISBN 978–0–12–039869–0.
- ²⁰ Huang, Y.; Yang, C.; Xu, X.; Xu, W.; Liu, S. Structural and Functional Properties of SARS–CoV–2 Spike Protein: Potential Antivirus Drug Development for COVID–19. *Acta Pharmacol Sin* **2020**, *41*, 1141–1149, doi:[10.1038/s41401-020-0485-4](https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4).
- ²¹ Li, Q.; Huang, Q.; Kang, C. Secondary Structures of the Transmembrane Domain of SARS–CoV–2 Spike Protein in Detergent Micelles. *IJMS* **2022**, *23*, 1040, doi:[10.3390/ijms23031040](https://doi.org/10.3390/ijms23031040).
- ²² Chambers, P.; Pringle, C.R.; Easton, A.J. Heptad Repeat Sequences Are Located Adjacent to Hydrophobic Regions in Several Types of Virus Fusion Glycoproteins. *Journal of General Virology* **1990**, *71*, 3075–3080, doi:[10.1099/0022-1317-71-12-3075](https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-12-3075).
- ²³ Zhang, L.; Hom, N.; Ojha, A.; Lovendahl, K.N.; Mou, H.; Lee, K.K.; Choe, H. Cytoplasmic Tail Truncation Stabilizes S1–S2 Association and Enhances S Protein Incorporation into SARS–CoV–2 Pseudovirions. *J Virol* **2023**, *97*, e01650–22, doi:[10.1128/jvi.01650-22](https://doi.org/10.1128/jvi.01650-22).

- ²⁴ Cattin–Ortolá, J.; Welch, L.G.; Maslen, S.L.; Papa, G.; James, L.C.; Munro, S. Sequences in the Cytoplasmic Tail of SARS–CoV–2 Spike Facilitate Expression at the Cell Surface and Syncytia Formation. *Nat Commun* **2021**, *12*, 5333, doi:[10.1038/s41467-021-25589-1](https://doi.org/10.1038/s41467-021-25589-1).
- ²⁵ Grobbelaar, L.M.; Venter, C.; Vlok, M.; Ngoepe, M.; Laubscher, G.J.; Lourens, P.J.; Steenkamp, J.; Kell, D.B.; Pretorius, E. SARS–CoV–2 Spike Protein S1 Induces Fibrin(Ogen) Resistant to Fibrinolysis: Implications for Microclot Formation in COVID–19. *Bioscience Reports* **2021**, *41*, BSR20210611, doi:[10.1042/BSR20210611](https://doi.org/10.1042/BSR20210611).
- ²⁶ Hoffmann, M.; Kleine–Weber, H.; Schroeder, S.; Krüger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, T.S.; Herrler, G.; Wu, N.–H.; Nitsche, A.; et al. SARS–CoV–2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **2020**, *181*, 271–280.e8, doi:[10.1016/j.cell.2020.02.052](https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052).
- ²⁷ Bosch, B.J.; Van Der Zee, R.; De Haan, C.A.M.; Rottier, P.J.M. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *J Virol* **2003**, *77*, 8801–8811, doi:[10.1128/JVI.77.16.8801–8811.2003](https://doi.org/10.1128/JVI.77.16.8801-8811.2003).
- ²⁸ Schmieder, R.E.; Hilgers, K.F.; Schlaich, M.P.; Schmidt, B.M. Renin–Angiotensin System and Cardiovascular Risk. *The Lancet* **2007**, *369*, 1208–1219, doi:[10.1016/S0140-6736\(07\)60242-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60242-6).
- ²⁹ Kobori, H.; Nangaku, M.; Navar, L.G.; Nishiyama, A. The Intrarenal Renin–Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease. *Pharmacol Rev* **2007**, *59*, 251–287, doi:[10.1124/pr.59.3.3](https://doi.org/10.1124/pr.59.3.3).
- ³⁰ Schweda, F.; Friis, U.; Wagner, C.; Skott, O.; Kurtz, A. Renin Release. *Physiology* **2007**, *22*, 310–319, doi:[10.1152/physiol.00024.2007](https://doi.org/10.1152/physiol.00024.2007).
- ³¹ Nguyen, G. Renin, (pro)Renin and Receptor: An Update. *Clinical Science* **2011**, *120*, 169–178, doi:[10.1042/CS20100432](https://doi.org/10.1042/CS20100432).
- ³² Patel, S.; Rauf, A.; Khan, H.; Abu–Izneid, T. Renin–Angiotensin–Aldosterone (RAAS): The Ubiquitous System for Homeostasis and Pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2017**, *94*, 317–325, doi:[10.1016/j.biopha.2017.07.091](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.091).
- ³³ Lanza, K.; Perez, L.G.; Costa, L.B.; Cordeiro, T.M.; Palmeira, V.A.; Ribeiro, V.T.; Simões E Silva, A.C. Covid–19: The Renin–Angiotensin System Imbalance Hypothesis. *Clinical Science* **2020**, *134*, 1259–1264, doi:[10.1042/CS20200492](https://doi.org/10.1042/CS20200492).
- ³⁴ Frankowska, S.; Zając, K.; Zargaryan, K.; Zawilska, J. Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) – the Major Receptor for SARS–CoV–2 Virus. *Farm Pol.* **2021**, *77*, 150–154, doi:[10.32383/farmpol/135220](https://doi.org/10.32383/farmpol/135220).
- ³⁵ Costa, L.B.; Perez, L.G.; Palmeira, V.A.; Macedo E Cordeiro, T.; Ribeiro, V.T.; Lanza, K.; Simões E Silva, A.C. Insights on SARS–CoV–2 Molecular Interactions With the Renin–Angiotensin System. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 559841, doi:[10.3389/fcell.2020.559841](https://doi.org/10.3389/fcell.2020.559841).
- ³⁶ Santos, R.A.S.; Ferreira, A.J.; Verano–Braga, T.; Bader, M. Angiotensin–Converting Enzyme 2, Angiotensin–(1–7) and Mas: New Players of the Renin–Angiotensin System. *Journal of*

Endocrinology **2013**, 216, R1–R17, doi:[10.1530/JOE-12-0341](https://doi.org/10.1530/JOE-12-0341).

³⁷ Hamming, I.; Timens, W.; Bulthuis, M.; Lely, A.; Navis, G.; Van Goor, H. Tissue Distribution of ACE2 Protein, the Functional Receptor for SARS Coronavirus. A First Step in Understanding SARS Pathogenesis. *J. Pathol.* **2004**, 203, 631–637, doi:[10.1002/path.1570](https://doi.org/10.1002/path.1570).

³⁸ Crackower, M.A.; Sarao, R.; Oudit, G.Y.; Yagil, C.; Kozieradzki, I.; Scanga, S.E.; Oliveira-dos-Santos, A.J.; Da Costa, J.; Zhang, L.; Pei, Y.; et al. Angiotensin–Converting Enzyme 2 Is an Essential Regulator of Heart Function. *Nature* **2002**, 417, 822–828, doi:[10.1038/nature00786](https://doi.org/10.1038/nature00786).

³⁹ Vargas, F.; Rodríguez–Gómez, I.; Vargas–Tendero, P.; Jimenez, E.; Montiel, M. The Renin–Angiotensin System in Thyroid Disorders and Its Role in Cardiovascular and Renal Manifestations. *Journal of Endocrinology* **2012**, 213, 25–36, doi:[10.1530/JOE-11-0349](https://doi.org/10.1530/JOE-11-0349).

⁴⁰ Diniz, G.P.; Senger, N.; Carneiro–Ramos, M.S.; Santos, R.A.S.; Barreto–Chaves, M.L.M. Cardiac ACE2/Angiotensin 1–7/Mas Receptor Axis Is Activated in Thyroid Hormone–Induced Cardiac Hypertrophy. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease* **2016**, 10, 192–202, doi:[10.1177/1753944715623228](https://doi.org/10.1177/1753944715623228).

⁴¹ Narayan, S.S.; Lorenz, K.; Ukkat, J.; Hoang–Vu, C.; Trojanowicz, B. Angiotensin Converting Enzymes ACE and ACE2 in Thyroid Cancer Progression. *neo* **2020**, 67, 402–409, doi:[10.4149/neo_2019_190506N405](https://doi.org/10.4149/neo_2019_190506N405).

⁴² Alenina, N.; Bader, M. ACE2 in Brain Physiology and Pathophysiology: Evidence from Transgenic Animal Models. *Neurochem Res* **2019**, 44, 1323–1329, doi:[10.1007/s11064-018-2679-4](https://doi.org/10.1007/s11064-018-2679-4).

⁴³ Hashimoto, T.; Sakata, Y.; Fukushima, K.; Maeda, T.; Arita, Y.; Shioyama, W.; Nakaoka, Y.; Hori, Y.; Morii, E.; Aozasa, K.; et al. Pulmonary Arterial Hypertension Associated with Chronic Active Epstein–Barr Virus Infection. *Intern. Med.* **2011**, 50, 119–124, doi:[10.2169/internalmedicine.50.4143](https://doi.org/10.2169/internalmedicine.50.4143).

⁴⁴ Batlle, D.; Jose Soler, M.; Ye, M. ACE2 and Diabetes: ACE of ACEs? *Diabetes* **2010**, 59, 2994–2996, doi:[10.2337/db10-1205](https://doi.org/10.2337/db10-1205).

⁴⁵ Li, W.; Moore, M.J.; Vasilieva, N.; Sui, J.; Wong, S.K.; Berne, M.A.; Somasundaran, M.; Sullivan, J.L.; Luzuriaga, K.; Greenough, T.C.; et al. Angiotensin–Converting Enzyme 2 Is a Functional Receptor for the SARS Coronavirus. *Nature* **2003**, 426, 450–454, doi:[10.1038/nature02145](https://doi.org/10.1038/nature02145).

⁴⁶ Prabakaran, P.; Xiao, X.; Dimitrov, D.S. A Model of the ACE2 Structure and Function as a SARS–CoV Receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, 314, 235–241, doi:[10.1016/j.bbrc.2003.12.081](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.081).

⁴⁷ Salamanna, F.; Maglio, M.; Landini, M.P.; Fini, M. Body Localization of ACE–2: On the Trail of the Keyhole of SARS–CoV–2. *Front. Med.* **2020**, 7, 594495, doi:[10.3389/fmed.2020.594495](https://doi.org/10.3389/fmed.2020.594495).

⁴⁸ Payne, S. Virus Evolution and Genetics. In *Viruses*; Elsevier, 2017; pp. 81–86 ISBN 978–0–12–803109–4.

- ⁴⁹ Stern, A.; Andino, R. Viral Evolution. In *Viral Pathogenesis*; Elsevier, 2016; pp. 233–240 ISBN 978-0-12-800964-2.
- ⁵⁰ Pita, J.S.; De Miranda, J.R.; Schneider, W.L.; Roossinck, M.J. Environment Determines Fidelity for an RNA Virus Replicase. *J Virol* **2007**, *81*, 9072–9077, doi:[10.1128/JVI.00587-07](https://doi.org/10.1128/JVI.00587-07).
- ⁵¹ Guo, H.; Arambula, D.; Ghosh, P.; Miller, J.F. Diversity–Generating Retroelements in Phage and Bacterial Genomes. *Microbiol Spectr* **2014**, *2*, 2.6.25, doi:[10.1128/microbiolspec.MDNA3-0029-2014](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0029-2014).
- ⁵² Domingo, E.; Holland, J.J. RNA VIRUS MUTATIONS AND FITNESS FOR SURVIVAL. *Annu. Rev. Microbiol.* **1997**, *51*, 151–178, doi:[10.1146/annurev.micro.51.1.151](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.151).
- ⁵³ Duffy, S.; Shackelton, L.A.; Holmes, E.C. Rates of Evolutionary Change in Viruses: Patterns and Determinants. *Nat Rev Genet* **2008**, *9*, 267–276, doi:[10.1038/nrg2323](https://doi.org/10.1038/nrg2323).
- ⁵⁴ Sanjuán, R.; Domingo–Calap, P. Mechanisms of Viral Mutation. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 4433–4448, doi:[10.1007/s00018-016-2299-6](https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6).
- ⁵⁵ Peiris, J.S.M. Coronaviruses. In *Clinical Virology*; ASM Press: Washington, DC, USA, 2016; pp. 1243–1265 ISBN 978-1-68367-067-4.
- ⁵⁶ Adams, M.J.; Carstens, E.B. Ratification Vote on Taxonomic Proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2012). *Arch Virol* **2012**, *157*, 1411–1422, doi:[10.1007/s00705-012-1299-6](https://doi.org/10.1007/s00705-012-1299-6).
- ⁵⁷ Lau, S.K.P.; Woo, P.C.Y.; Li, K.S.M.; Tsang, A.K.L.; Fan, R.Y.Y.; Luk, H.K.H.; Cai, J.-P.; Chan, K.-H.; Zheng, B.-J.; Wang, M.; et al. Discovery of a Novel Coronavirus, China Rattus Coronavirus HKU24, from Norway Rats Supports the Murine Origin of Betacoronavirus 1 and Has Implications for the Ancestor of Betacoronavirus Lineage A. *J Virol* **2015**, *89*, 3076–3092, doi:[10.1128/JVI.02420-14](https://doi.org/10.1128/JVI.02420-14).
- ⁵⁸ Woo, P.C.Y.; Huang, Y.; Lau, S.K.P.; Yuen, K.-Y. Coronavirus Genomics and Bioinformatics Analysis. *Viruses* **2010**, *2*, 1804–1820, doi:[10.3390/v2081803](https://doi.org/10.3390/v2081803).
- ⁵⁹ Chan, J.F.W.; Lau, S.K.P.; To, K.K.W.; Cheng, V.C.C.; Woo, P.C.Y.; Yuen, K.-Y. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: Another Zoonotic Betacoronavirus Causing SARS–Like Disease. *Clin Microbiol Rev* **2015**, *28*, 465–522, doi:[10.1128/CMR.00102-14](https://doi.org/10.1128/CMR.00102-14).
- ⁶⁰ Woo, P.C.Y.; Lau, S.K.P.; Lam, C.S.F.; Lau, C.C.Y.; Tsang, A.K.L.; Lau, J.H.N.; Bai, R.; Teng, J.L.L.; Tsang, C.C.C.; Wang, M.; et al. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *J Virol* **2012**, *86*, 3995–4008, doi:[10.1128/JVI.06540-11](https://doi.org/10.1128/JVI.06540-11).
- ⁶¹ Su, S.; Wong, G.; Shi, W.; Liu, J.; Lai, A.C.K.; Zhou, J.; Liu, W.; Bi, Y.; Gao, G.F. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology* **2016**, *24*, 490–502, doi:[10.1016/j.tim.2016.03.003](https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003).
- ⁶² Forni, D.; Cagliani, R.; Clerici, M.; Sironi, M. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends in Microbiology* **2017**, *25*, 35–48, doi:[10.1016/j.tim.2016.09.001](https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.001).

- ⁶³ Zhou, P.; Fan, H.; Lan, T.; Yang, X.-L.; Shi, W.-F.; Zhang, W.; Zhu, Y.; Zhang, Y.-W.; Xie, Q.-M.; Mani, S.; et al. Fatal Swine Acute Diarrhoea Syndrome Caused by an HKU2-Related Coronavirus of Bat Origin. *Nature* **2018**, *556*, 255–258, doi:[10.1038/s41586-018-0010-9](https://doi.org/10.1038/s41586-018-0010-9).
- ⁶⁴ Benetka, V.; Kolodziejek, J.; Walk, K.; Rennhofer, M.; Möstl, K. M Gene Analysis of Atypical Strains of Feline and Canine Coronavirus Circulating in an Austrian Animal Shelter. *Veterinary Record* **2006**, *159*, 170–175, doi:[10.1136/vr.159.6.170](https://doi.org/10.1136/vr.159.6.170).
- ⁶⁵ Licitra, B.; Duhamel, G.; Whittaker, G. Canine Enteric Coronaviruses: Emerging Viral Pathogens with Distinct Recombinant Spike Proteins. *Viruses* **2014**, *6*, 3363–3376, doi:[10.3390/v6083363](https://doi.org/10.3390/v6083363).
- ⁶⁶ Rough Trade: Animal Welfare in the Global Wildlife Trade. *BioScience* **2013**, *63*, 928–938, doi:[10.1525/bio.2013.63.12.6](https://doi.org/10.1525/bio.2013.63.12.6).
- ⁶⁷ Geoghegan, J.L.; Duchêne, S.; Holmes, E.C. Comparative Analysis Estimates the Relative Frequencies of Co-Divergence and Cross-Species Transmission within Viral Families. *PLoS Pathog* **2017**, *13*, e1006215, doi:[10.1371/journal.ppat.1006215](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006215).
- ⁶⁸ Decaro, N.; Mari, V.; Desario, C.; Campolo, M.; Elia, G.; Martella, V.; Greco, G.; Cirone, F.; Colaianni, M.L.; Cordioli, P.; et al. Severe Outbreak of Bovine Coronavirus Infection in Dairy Cattle during the Warmer Season. *Veterinary Microbiology* **2008**, *126*, 30–39, doi:[10.1016/j.vetmic.2007.06.024](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.06.024).
- ⁶⁹ Saif LJ, Redman DR, Moorhead PD, Theil KW. Experimentally induced coronavirus infections in calves: viral replication in the respiratory and intestinal tracts. *Am J Vet Res.* 1986 Jul;47(7):1426–32. PMID: 3017160.
- ⁷⁰ Tekes, G.; Thiel, H.-J. Feline Coronaviruses. In *Advances in Virus Research*; Elsevier, 2016; Vol. 96, pp. 193–218 ISBN 978-0-12-804736-1.
- ⁷¹ Rottier, P.J.M.; Nakamura, K.; Schellen, P.; Volders, H.; Haijema, B.J. Acquisition of Macrophage Tropism during the Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis Is Determined by Mutations in the Feline Coronavirus Spike Protein. *J Virol* **2005**, *79*, 14122–14130, doi:[10.1128/JVI.79.22.14122-14130.2005](https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.14122-14130.2005).
- ⁷² Tennant, B.J.; Gaskell, R.M.; Kelly, D.F.; Carter, S.D.; Gaskell, C.J. Canine Coronavirus Infection in the Dog Following Oronasal Inoculation. *Research in Veterinary Science* **1991**, *51*, 11–18, doi:[10.1016/0034-5288\(91\)90023-H](https://doi.org/10.1016/0034-5288(91)90023-H).
- ⁷³ Aligo, J.; Walker, M.; Bugelski, P.; Weinstock, D. Is Murine Gammaherpesvirus-68 (MHV-68) a Suitable Immunotoxicological Model for Examining Immunomodulatory Drug-Associated Viral Recrudescence? *Journal of Immunotoxicology* **2015**, *12*, 1–15, doi:[10.3109/1547691X.2014.882996](https://doi.org/10.3109/1547691X.2014.882996).
- ⁷⁴ Wang, F.-I.; Stohlman, S.A.; Fleming, J.O. Demyelination Induced by Murine Hepatitis Virus JHM Strain (MHV-4) Is Immunologically Mediated. *Journal of Neuroimmunology* **1990**, *30*, 31–41, doi:[10.1016/0165-5728\(90\)90050-W](https://doi.org/10.1016/0165-5728(90)90050-W).

- ⁷⁵ Caldera–Crespo, L.A.; Paidas, M.J.; Roy, S.; Schulman, C.I.; Kenyon, N.S.; Daunert, S.; Jayakumar, A.R. Experimental Models of COVID–19. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *11*, 792584, doi:[10.3389/fcimb.2021.792584](https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.792584).
- ⁷⁶ Carroll, D.; Daszak, P.; Wolfe, N.D.; Gao, G.F.; Morel, C.M.; Morzaria, S.; Pablos–Méndez, A.; Tomori, O.; Mazet, J.A.K. The Global Virome Project. *Science* **2018**, *359*, 872–874, doi:[10.1126/science.aap7463](https://doi.org/10.1126/science.aap7463).
- ⁷⁷ Laber, K.E.; Whary, M.T.; Bingel, S.A.; Goodrich, J.A.; Smith, A.C.; Swindle, M.M. Biology and Diseases of Swine. In *Laboratory Animal Medicine*; Elsevier, 2002; pp. 615–673 ISBN 978–0–12–263951–7.
- ⁷⁸ Ismail, M.M.; Cho, K.O.; Ward, L.A.; Saif, L.J.; Saif, Y.M. Experimental Bovine Coronavirus in Turkey Poults and Young Chickens. *Avian Diseases* **2001**, *45*, 157, doi:[10.2307/1593023](https://doi.org/10.2307/1593023).
- ⁷⁹ Pusterla, N.; Vin, R.; Leutenegger, C.M.; Mittel, L.D.; Divers, T.J. Enteric Coronavirus Infection in Adult Horses. *The Veterinary Journal* **2018**, *231*, 13–18, doi:[10.1016/j.tvjl.2017.11.004](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.11.004).
- ⁸⁰ Sanz, M.G.; Kwon, S.; Pusterla, N.; Gold, J.R.; Bain, F.; Evermann, J. Evaluation of Equine Coronavirus Fecal Shedding among Hospitalized Horses. *J Vet Intern Med* **2019**, *33*, 918–922, doi:[10.1111/jvim.15449](https://doi.org/10.1111/jvim.15449).
- ⁸¹ Pusterla, N.; Vin, R.; Leutenegger, C.; Mittel, L.D.; Divers, T.J. Equine Coronavirus: An Emerging Enteric Virus of Adult Horses. *Equine Vet Educ* **2016**, *28*, 216–223, doi:[10.1111/eve.12453](https://doi.org/10.1111/eve.12453).
- ⁸² Guy, J.S.; Breslin, J.J.; Breuhaus, B.; Vivrette, S.; Smith, L.G. Characterization of a Coronavirus Isolated from a Diarrheic Foal. *J Clin Microbiol* **2000**, *38*, 4523–4526, doi:[10.1128/JCM.38.12.4523–4526.2000](https://doi.org/10.1128/JCM.38.12.4523-4526.2000).
- ⁸³ Van Der Hoek, L.; Sure, K.; Ihorst, G.; Stang, A.; Pyrc, K.; Jebbink, M.F.; Petersen, G.; Forster, J.; Berkhout, B.; Überla, K. Croup Is Associated with the Novel Coronavirus NL63. *PLoS Med* **2005**, *2*, e240, doi:[10.1371/journal.pmed.0020240](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020240).
- ⁸⁴ Corman, V.M.; Muth, D.; Niemeyer, D.; Drosten, C. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. In *Advances in Virus Research*; Elsevier, 2018; Vol. 100, pp. 163–188 ISBN 978–0–12–815201–0.
- ⁸⁵ He, B.; Zhang, Y.; Xu, L.; Yang, W.; Yang, F.; Feng, Y.; Xia, L.; Zhou, J.; Zhen, W.; Feng, Y.; et al. Identification of Diverse Alphacoronaviruses and Genomic Characterization of a Novel Severe Acute Respiratory Syndrome–Like Coronavirus from Bats in China. *J Virol* **2014**, *88*, 7070–7082, doi:[10.1128/JVI.00631–14](https://doi.org/10.1128/JVI.00631-14).
- ⁸⁶ Corman, V.M.; Baldwin, H.J.; Tateno, A.F.; Zerbinati, R.M.; Annan, A.; Owusu, M.; Nkrumah, E.E.; Maganga, G.D.; Oppong, S.; Adu–Sarkodie, Y.; et al. Evidence for an Ancestral Association of Human Coronavirus 229E with Bats. *J Virol* **2015**, *89*, 11858–11870, doi:[10.1128/JVI.01755–15](https://doi.org/10.1128/JVI.01755-15).
- ⁸⁷ Nova, N. Cross–Species Transmission of Coronaviruses in Humans and Domestic Mammals, What Are the Ecological Mechanisms Driving Transmission, Spillover, and Disease Emergence? *Front. Public Health* **2021**, *9*, 717941, doi:[10.3389/fpubh.2021.717941](https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.717941).

- ⁸⁸ Tao, Y.; Shi, M.; Chommanard, C.; Queen, K.; Zhang, J.; Markotter, W.; Kuzmin, I.V.; Holmes, E.C.; Tong, S. Surveillance of Bat Coronaviruses in Kenya Identifies Relatives of Human Coronaviruses NL63 and 229E and Their Recombination History. *J Virol* **2017**, *91*, e01953–16, doi:[10.1128/JVI.01953-16](https://doi.org/10.1128/JVI.01953-16).
- ⁸⁹ Simas, P.V.M.; Barnabé, A.C.D.S.; Durães–Carvalho, R.; Neto, D.F.D.L.; Caserta, L.C.; Artacho, L.; Jacomassa, F.A.F.; Martini, M.C.; Bianchi Dos Santos, M.M.A.; Felipe, P.A.N.; et al. Bat Coronavirus in Brazil Related to Appalachian Ridge and Porcine Epidemic Diarrhea Viruses. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 729–731, doi:[10.3201/eid2104.141783](https://doi.org/10.3201/eid2104.141783).
- ⁹⁰ Kin, N.; Miszczak, F.; Diancourt, L.; Caro, V.; Moutou, F.; Vabret, A.; Ar Gouilh, M. Comparative Molecular Epidemiology of Two Closely Related Coronaviruses, Bovine Coronavirus (BCoV) and Human Coronavirus OC43 (HCoV–OC43), Reveals a Different Evolutionary Pattern. *Infection, Genetics and Evolution* **2016**, *40*, 186–191, doi:[10.1016/j.meegid.2016.03.006](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.006).
- ⁹¹ Vijgen, L.; Keyaerts, E.; Lemey, P.; Moës, E.; Li, S.; Vandamme, A.–M.; Van Ranst, M. Circulation of Genetically Distinct Contemporary Human Coronavirus OC43 Strains. *Virology* **2005**, *337*, 85–92, doi:[10.1016/j.virol.2005.04.010](https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.04.010).
- ⁹² Identification of Pantropic Canine Coronavirus in a Wolf (*Canis Lupus Italicus*) in Italy. *Journal of Wildlife Diseases* **2019**, *55*, 504, doi:[10.7589/2018-07-182](https://doi.org/10.7589/2018-07-182).
- ⁹³ Alfano, F.; Fusco, G.; Mari, V.; Occhiogrosso, L.; Miletti, G.; Brunetti, R.; Galiero, G.; Desario, C.C.; Cirilli, M.; Decaro, N. Circulation of Pantropic Canine Coronavirus in Autochthonous and Imported Dogs, Italy. *Transbound Emerg Dis* **2020**, tbed.13542, doi:[10.1111/tbed.13542](https://doi.org/10.1111/tbed.13542).
- ⁹⁴ Bevins, S.N.; Lutman, M.; Pedersen, K.; Barrett, N.; Gidlewski, T.; Deliberto, T.J.; Franklin, A.B. Spillover of Swine Coronaviruses, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 1390–1392, doi:[10.3201/eid2407.172077](https://doi.org/10.3201/eid2407.172077).
- ⁹⁵ Cleri, D.J.; Ricketti, A.J.; Vernaleo, J.R. Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). *Infectious Disease Clinics of North America* **2010**, *24*, 175–202, doi:[10.1016/j.idc.2009.10.005](https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.10.005).
- ⁹⁶ Stadler, K.; Masignani, V.; Eickmann, M.; Becker, S.; Abrignani, S.; Klenk, H.–D.; Rappuoli, R. SARS — Beginning to Understand a New Virus. *Nat Rev Microbiol* **2003**, *1*, 209–218, doi:[10.1038/nrmicro775](https://doi.org/10.1038/nrmicro775).
- ⁹⁷ Da Silva, P.G.; Mesquita, J.R.; De São José Nascimento, M.; Ferreira, V.A.M. Viral, Host and Environmental Factors That Favor Anthroponotic Spillover of Coronaviruses: An Opinionated Review, Focusing on SARS–CoV, MERS–CoV and SARS–CoV–2. *Science of The Total Environment* **2021**, *750*, 141483, doi:[10.1016/j.scitotenv.2020.141483](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141483).
- ⁹⁸ Guan, Y.; Zheng, B.J.; He, Y.Q.; Liu, X.L.; Zhuang, Z.X.; Cheung, C.L.; Luo, S.W.; Li, P.H.; Zhang, L.J.; Guan, Y.J.; et al. Isolation and Characterization of Viruses Related to the SARS Coronavirus from Animals in Southern China. *Science* **2003**, *302*, 276–278, doi:[10.1126/science.1087139](https://doi.org/10.1126/science.1087139).
- ⁹⁹ Kan, B.; Wang, M.; Jing, H.; Xu, H.; Jiang, X.; Yan, M.; Liang, W.; Zheng, H.; Wan, K.; Liu, Q.; et al. Molecular Evolution Analysis and Geographic Investigation of Severe Acute Respiratory

Syndrome Coronavirus–Like Virus in Palm Civets at an Animal Market and on Farms. *J Virol* **2005**, *79*, 11892–11900, doi:[10.1128/JVI.79.18.11892–11900.2005](https://doi.org/10.1128/JVI.79.18.11892-11900.2005).

¹⁰⁰ Tu, C.; Crameri, G.; Kong, X.; Chen, J.; Sun, Y.; Yu, M.; Xiang, H.; Xia, X.; Liu, S.; Ren, T.; et al. Antibodies to SARS Coronavirus in Civets. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, *10*, 2244–2248, doi:[10.3201/eid1012.040520](https://doi.org/10.3201/eid1012.040520).

¹⁰¹ Song, H.–D.; Tu, C.–C.; Zhang, G.–W.; Wang, S.–Y.; Zheng, K.; Lei, L.–C.; Chen, Q.–X.; Gao, Y.–W.; Zhou, H.–Q.; Xiang, H.; et al. Cross–Host Evolution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus in Palm Civet and Human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 2430–2435, doi:[10.1073/pnas.0409608102](https://doi.org/10.1073/pnas.0409608102).

¹⁰² Wang, L.–F.; Eaton, B.T. Bats, Civets and the Emergence of SARS. In *Wildlife and Emerging Zoonotic Diseases: The Biology, Circumstances and Consequences of Cross–Species Transmission*; Childs, J.E., Mackenzie, J.S., Richt, J.A., Eds.; Current Topics in Microbiology and Immunology; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2007; Vol. 315, pp. 325–344 ISBN 978–3–540–70961–9.

¹⁰³ Wang, M.; Yan, M.; Xu, H.; Liang, W.; Kan, B.; Zheng, B.; Chen, H.; Zheng, H.; Xu, Y.; Zhang, E.; et al. SARS–CoV Infection in a Restaurant from Palm Civet. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1860–1865, doi:[10.3201/eid1112.041293](https://doi.org/10.3201/eid1112.041293).

¹⁰⁴ Lau, S.K.P.; Woo, P.C.Y.; Li, K.S.M.; Huang, Y.; Tsoi, H.–W.; Wong, B.H.L.; Wong, S.S.Y.; Leung, S.–Y.; Chan, K.–H.; Yuen, K.–Y. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus–like Virus in Chinese Horseshoe Bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 14040–14045, doi:[10.1073/pnas.0506735102](https://doi.org/10.1073/pnas.0506735102).

¹⁰⁵ Li, W.; Shi, Z.; Yu, M.; Ren, W.; Smith, C.; Epstein, J.H.; Wang, H.; Crameri, G.; Hu, Z.; Zhang, H.; et al. Bats Are Natural Reservoirs of SARS–Like Coronaviruses. *Science* **2005**, *310*, 676–679, doi:[10.1126/science.1118391](https://doi.org/10.1126/science.1118391).

¹⁰⁶ Ren, W.; Li, W.; Yu, M.; Hao, P.; Zhang, Y.; Zhou, P.; Zhang, S.; Zhao, G.; Zhong, Y.; Wang, S.; et al. Full–Length Genome Sequences of Two SARS–like Coronaviruses in Horseshoe Bats and Genetic Variation Analysis. *Journal of General Virology* **2006**, *87*, 3355–3359, doi:[10.1099/vir.0.82220–0](https://doi.org/10.1099/vir.0.82220-0).

¹⁰⁷ Hon, C.–C.; Lam, T.–Y.; Shi, Z.–L.; Drummond, A.J.; Yip, C.–W.; Zeng, F.; Lam, P.–Y.; Leung, F.C.–C. Evidence of the Recombinant Origin of a Bat Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)–Like Coronavirus and Its Implications on the Direct Ancestor of SARS Coronavirus. *J Virol* **2008**, *82*, 1819–1826, doi:[10.1128/JVI.01926–07](https://doi.org/10.1128/JVI.01926-07).

¹⁰⁸ Wacharapluesadee, S.; Duengkae, P.; Rodpan, A.; Kaewpom, T.; Maneorn, P.; Kanchanasaka, B.; Yingsakmongkon, S.; Sittidetboripat, N.; Chareesaen, C.; Khlangsap, N.; et al. Diversity of Coronavirus in Bats from Eastern Thailand. *Virol J* **2015**, *12*, 57, doi:[10.1186/s12985–015–0289–1](https://doi.org/10.1186/s12985-015-0289-1).

¹⁰⁹ Tong, S.; Conrardy, C.; Ruone, S.; Kuzmin, I.V.; Guo, X.; Tao, Y.; Niezgoda, M.; Haynes, L.; Agwanda, B.; Breiman, R.F.; et al. Detection of Novel SARS–like and Other Coronaviruses in Bats from Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 482–485, doi:[10.3201/eid1503.081013](https://doi.org/10.3201/eid1503.081013).

- ¹¹⁰ Drexler, J.F.; Gloza-Rausch, F.; Glende, J.; Corman, V.M.; Muth, D.; Goettsche, M.; Seebens, A.; Niedrig, M.; Pfefferle, S.; Yordanov, S.; et al. Genomic Characterization of Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus in European Bats and Classification of Coronaviruses Based on Partial RNA-Dependent RNA Polymerase Gene Sequences. *J Virol* **2010**, *84*, 11336–11349, doi:[10.1128/JVI.00650-10](https://doi.org/10.1128/JVI.00650-10).
- ¹¹¹ Gouilh, M.A.; Puechmaille, S.J.; Gonzalez, J.-P.; Teeling, E.; Kittayapong, P.; Manuguerra, J.-C. SARS-Coronavirus Ancestor's Foot-Prints in South-East Asian Bat Colonies and the Refuge Theory. *Infection, Genetics and Evolution* **2011**, *11*, 1690–1702, doi:[10.1016/j.meegid.2011.06.021](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.06.021).
- ¹¹² Lau, S.K.P.; Li, K.S.M.; Huang, Y.; Shek, C.-T.; Tse, H.; Wang, M.; Choi, G.K.Y.; Xu, H.; Lam, C.S.F.; Guo, R.; et al. Ecoepidemiology and Complete Genome Comparison of Different Strains of Severe Acute Respiratory Syndrome-Related *Rhinolophus* Bat Coronavirus in China Reveal Bats as a Reservoir for Acute, Self-Limiting Infection That Allows Recombination Events. *J Virol* **2010**, *84*, 2808–2819, doi:[10.1128/JVI.02219-09](https://doi.org/10.1128/JVI.02219-09).
- ¹¹³ Hu, B.; Zeng, L.-P.; Yang, X.-L.; Ge, X.-Y.; Zhang, W.; Li, B.; Xie, J.-Z.; Shen, X.-R.; Zhang, Y.-Z.; Wang, N.; et al. Discovery of a Rich Gene Pool of Bat SARS-Related Coronaviruses Provides New Insights into the Origin of SARS Coronavirus. *PLoS Pathog* **2017**, *13*, e1006698, doi:[10.1371/journal.ppat.1006698](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006698).
- ¹¹⁴ Wang, M.-N.; Zhang, W.; Gao, Y.-T.; Hu, B.; Ge, X.-Y.; Yang, X.-L.; Zhang, Y.-Z.; Shi, Z.-L. Longitudinal Surveillance of SARS-like Coronaviruses in Bats by Quantitative Real-Time PCR. *Virol. Sin.* **2016**, *31*, 78–80, doi:[10.1007/s12250-015-3703-3](https://doi.org/10.1007/s12250-015-3703-3).
- ¹¹⁵ Ge, X.-Y.; Li, J.-L.; Yang, X.-L.; Chmura, A.A.; Zhu, G.; Epstein, J.H.; Mazet, J.K.; Hu, B.; Zhang, W.; Peng, C.; et al. Isolation and Characterization of a Bat SARS-like Coronavirus That Uses the ACE2 Receptor. *Nature* **2013**, *503*, 535–538, doi:[10.1038/nature12711](https://doi.org/10.1038/nature12711).
- ¹¹⁶ Liu, L.; Fang, Q.; Deng, F.; Wang, H.; Yi, C.E.; Ba, L.; Yu, W.; Lin, R.D.; Li, T.; Hu, Z.; et al. Natural Mutations in the Receptor Binding Domain of Spike Glycoprotein Determine the Reactivity of Cross-Neutralization between Palm Civet Coronavirus and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol* **2007**, *81*, 4694–4700, doi:[10.1128/JVI.02389-06](https://doi.org/10.1128/JVI.02389-06).
- ¹¹⁷ Sheahan, T.; Rockx, B.; Donaldson, E.; Sims, A.; Pickles, R.; Corti, D.; Baric, R. Mechanisms of Zoonotic Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Host Range Expansion in Human Airway Epithelium. *J Virol* **2008**, *82*, 2274–2285, doi:[10.1128/JVI.02041-07](https://doi.org/10.1128/JVI.02041-07).
- ¹¹⁸ Xu, R.-H.; He, J.-F.; Evans, M.R.; Peng, G.-W.; Field, H.E.; Yu, D.-W.; Lee, C.-K.; Luo, H.-M.; Lin, W.-S.; Lin, P.; et al. Epidemiologic Clues to SARS Origin in China. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, *10*, 1030–1037, doi:[10.3201/eid1006.030852](https://doi.org/10.3201/eid1006.030852).
- ¹¹⁹ Wang, N.; Li, S.-Y.; Yang, X.-L.; Huang, H.-M.; Zhang, Y.-J.; Guo, H.; Luo, C.-M.; Miller, M.; Zhu, G.; Chmura, A.A.; et al. Serological Evidence of Bat SARS-Related Coronavirus Infection in Humans, China. *Virol. Sin.* **2018**, *33*, 104–107, doi:[10.1007/s12250-018-0012-7](https://doi.org/10.1007/s12250-018-0012-7).
- ¹²⁰ Hsieh, Y.-H.; King, C.-C.; Chen, C.W.S.; Ho, M.-S.; Hsu, S.-B.; Wu, Y.-C. Impact of Quarantine on the 2003 SARS Outbreak: A Retrospective Modeling Study. *Journal of Theoretical Biology* **2007**, *244*, 729–736, doi:[10.1016/j.jtbi.2006.09.015](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2006.09.015).

- ¹²¹ Gao, H.; Yao, H.; Yang, S.; Li, L. From SARS to MERS: Evidence and Speculation. *Front. Med.* **2016**, *10*, 377–382, doi:[10.1007/s11684-016-0466-7](https://doi.org/10.1007/s11684-016-0466-7).
- ¹²² Raj, V.S.; Mou, H.; Smits, S.L.; Dekkers, D.H.W.; Müller, M.A.; Dijkman, R.; Muth, D.; Demmers, J.A.A.; Zaki, A.; Fouchier, R.A.M.; et al. Dipeptidyl Peptidase 4 Is a Functional Receptor for the Emerging Human Coronavirus–EMC. *Nature* **2013**, *495*, 251–254, doi:[10.1038/nature12005](https://doi.org/10.1038/nature12005).
- ¹²³ Lu, G.; Hu, Y.; Wang, Q.; Qi, J.; Gao, F.; Li, Y.; Zhang, Y.; Zhang, W.; Yuan, Y.; Bao, J.; et al. Molecular Basis of Binding between Novel Human Coronavirus MERS–CoV and Its Receptor CD26. *Nature* **2013**, *500*, 227–231, doi:[10.1038/nature12328](https://doi.org/10.1038/nature12328).
- ¹²⁴ Scobey, T.; Yount, B.L.; Sims, A.C.; Donaldson, E.F.; Agnihothram, S.S.; Menachery, V.D.; Graham, R.L.; Swanstrom, J.; Bove, P.F.; Kim, J.D.; et al. Reverse Genetics with a Full–Length Infectious CDNA of the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110*, 16157–16162, doi:[10.1073/pnas.1311542110](https://doi.org/10.1073/pnas.1311542110).
- ¹²⁵ Nistala, R.; Savin, V. Diabetes, Hypertension, and Chronic Kidney Disease Progression: Role of DPP4. *American Journal of Physiology–Renal Physiology* **2017**, *312*, F661–F670, doi:[10.1152/ajprenal.00316.2016](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00316.2016).
- ¹²⁶ Engel, M.; Hoffmann, T.; Wagner, L.; Wermann, M.; Heiser, U.; Kiefersauer, R.; Huber, R.; Bode, W.; Demuth, H.–U.; Brandstetter, H. The Crystal Structure of Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) Reveals Its Functional Regulation and Enzymatic Mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 5063–5068, doi:[10.1073/pnas.0230620100](https://doi.org/10.1073/pnas.0230620100).
- ¹²⁷ Yang, L.; Wu, Z.; Ren, X.; Yang, F.; Zhang, J.; He, G.; Dong, J.; Sun, L.; Zhu, Y.; Zhang, S.; et al. **MERS–Related Betacoronavirus in *Vespertilio Superans* Bats, China.** *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, doi:[10.3201/eid2007.140318](https://doi.org/10.3201/eid2007.140318).
- ¹²⁸ Corman, V.M.; Ithete, N.L.; Richards, L.R.; Schoeman, M.C.; Preiser, W.; Drosten, C.; Drexler, J.F. Rooting the Phylogenetic Tree of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus by Characterization of a Conspecific Virus from an African Bat. *J Virol* **2014**, *88*, 11297–11303, doi:[10.1128/JVI.01498-14](https://doi.org/10.1128/JVI.01498-14).
- ¹²⁹ Lau, S.K.P.; Li, K.S.M.; Tsang, A.K.L.; Lam, C.S.F.; Ahmed, S.; Chen, H.; Chan, K.–H.; Woo, P.C.Y.; Yuen, K.–Y. Genetic Characterization of Betacoronavirus Lineage C Viruses in Bats Reveals Marked Sequence Divergence in the Spike Protein of Pipistrellus Bat Coronavirus HKU5 in Japanese Pipistrelle: Implications for the Origin of the Novel Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol* **2013**, *87*, 8638–8650, doi:[10.1128/JVI.01055-13](https://doi.org/10.1128/JVI.01055-13).
- ¹³⁰ Meyer, B.; Müller, M.A.; Corman, V.M.; Reusken, C.B.E.M.; Ritz, D.; Godeke, G.–J.; Lattwein, E.; Kallies, S.; Siemens, A.; Van Beek, J.; et al. Antibodies against MERS Coronavirus in Dromedary Camels, United Arab Emirates, 2003 and 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 552–559, doi:[10.3201/eid2004.131746](https://doi.org/10.3201/eid2004.131746).
- ¹³¹ Azhar, E.I.; El–Kafrawy, S.A.; Farraj, S.A.; Hassan, A.M.; Al–Saeed, M.S.; Hashem, A.M.; Madani, T.A. Evidence for Camel–to–Human Transmission of MERS Coronavirus. *N Engl J Med*

2014, 370, 2499–2505, doi:[10.1056/NEJMoa1401505](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1401505).

¹³² Haagmans, B.L.; Al Dhahiry, S.H.S.; Reusken, C.B.E.M.; Raj, V.S.; Galiano, M.; Myers, R.; Godeke, G.-J.; Jonges, M.; Farag, E.; Diab, A.; et al. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Dromedary Camels: An Outbreak Investigation. *The Lancet Infectious Diseases* **2014**, *14*, 140–145, doi:[10.1016/S1473-3099\(13\)70690-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70690-X).

¹³³ Raj, V.S.; Farag, E.A.B.A.; Reusken, C.B.E.M.; Lamers, M.M.; Pas, S.D.; Voermans, J.; Smits, S.L.; Osterhaus, A.D.M.E.; Al-Mawlawi, N.; Al-Romaihi, H.E.; et al. Isolation of MERS Coronavirus from a Dromedary Camel, Qatar, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, doi:[10.3201/eid2008.140663](https://doi.org/10.3201/eid2008.140663).

¹³⁴ Azhar, E.I.; Hui, D.S.C.; Memish, Z.A.; Drosten, C.; Zumla, A. The Middle East Respiratory Syndrome (MERS). *Infectious Disease Clinics of North America* **2019**, *33*, 891–905, doi:[10.1016/j.idc.2019.08.001](https://doi.org/10.1016/j.idc.2019.08.001).

¹³⁵ Hemida, M.G.; Alnaeem, A. Some One Health Based Control Strategies for the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *One Health* **2019**, *8*, 100102, doi:[10.1016/j.onehlt.2019.100102](https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100102).

¹³⁶ Hemida, M.G.; Chu, D.K.W.; Poon, L.L.M.; Perera, R.A.P.M.; Alhammadi, M.A.; Ng, H.; Siu, L.Y.; Guan, Y.; Alnaeem, A.; Peiris, M. MERS Coronavirus in Dromedary Camel Herd, Saudi Arabia. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, doi:[10.3201/eid2007.140571](https://doi.org/10.3201/eid2007.140571).

¹³⁷ Chu, D.K.W.; Hui, K.P.Y.; Perera, R.A.P.M.; Miguel, E.; Niemeyer, D.; Zhao, J.; Channappanavar, R.; Dudas, G.; Oladipo, J.O.; Traoré, A.; et al. MERS Coronaviruses from Camels in Africa Exhibit Region-Dependent Genetic Diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2018**, *115*, 3144–3149, doi:[10.1073/pnas.1718769115](https://doi.org/10.1073/pnas.1718769115).

¹³⁸ Perera, R.A.; Wang, P.; Gomaa, M.R.; El-Shesheny, R.; Kandeil, A.; Bagato, O.; Siu, L.Y.; Shehata, M.M.; Kayed, A.S.; Moatasim, Y.; et al. Seroepidemiology for MERS Coronavirus Using Microneutralisation and Pseudoparticle Virus Neutralisation Assays Reveal a High Prevalence of Antibody in Dromedary Camels in Egypt, June 2013. *Eurosurveillance* **2013**, *18*, doi:[10.2807/1560-7917.ES2013.18.36.20574](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.36.20574).

¹³⁹ Müller, M.A.; Meyer, B.; Corman, V.M.; Al-Masri, M.; Turkestani, A.; Ritz, D.; Sieberg, A.; Aldabbagh, S.; Bosch, B.-J.; Lattwein, E.; et al. Presence of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Antibodies in Saudi Arabia: A Nationwide, Cross-Sectional, Serological Study. *The Lancet Infectious Diseases* **2015**, *15*, 559–564, doi:[10.1016/S1473-3099\(15\)70090-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70090-3).

¹⁴⁰ De Groot, R.J.; Baker, S.C.; Baric, R.S.; Brown, C.S.; Drosten, C.; Enjuanes, L.; Fouchier, R.A.M.; Galiano, M.; Gorbalenya, A.E.; Memish, Z.A.; et al. Commentary: Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group. *J Virol* **2013**, *87*, 7790–7792, doi:[10.1128/JVI.01244-13](https://doi.org/10.1128/JVI.01244-13).

¹⁴¹ Luo, C.-M.; Wang, N.; Yang, X.-L.; Liu, H.-Z.; Zhang, W.; Li, B.; Hu, B.; Peng, C.; Geng, Q.-B.; Zhu, G.-J.; et al. Discovery of Novel Bat Coronaviruses in South China That Use the Same Receptor as Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol* **2018**, *92*, e00116–18, doi:[10.1128/JVI.00116-18](https://doi.org/10.1128/JVI.00116-18).

- ¹⁴² Paden, C.R.; Yusof, M.F.B.M.; Al Hammadi, Z.M.; Queen, K.; Tao, Y.; Eltahir, Y.M.; Elsayed, E.A.; Marzoug, B.A.; Bensalah, O.K.A.; Khalafalla, A.I.; et al. Zoonotic Origin and Transmission of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in the UAE. *Zoonoses Public Health* **2018**, *65*, 322–333, doi:[10.1111/zph.12435](https://doi.org/10.1111/zph.12435).
- ¹⁴³ Van Boheemen, S.; De Graaf, M.; Lauber, C.; Bestebroer, T.M.; Raj, V.S.; Zaki, A.M.; Osterhaus, A.D.M.E.; Haagmans, B.L.; Gorbalenya, A.E.; Snijder, E.J.; et al. Genomic Characterization of a Newly Discovered Coronavirus Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome in Humans. *mBio* **2012**, *3*, e00473–12, doi:[10.1128/mBio.00473-12](https://doi.org/10.1128/mBio.00473-12).
- ¹⁴⁴ Müller, M.A.; Corman, V.M.; Jores, J.; Meyer, B.; Younan, M.; Liljander, A.; Bosch, B.-J.; Lattwein, E.; Hilali, M.; Musa, B.E.; et al. MERS Coronavirus Neutralizing Antibodies in Camels, Eastern Africa, 1983–1997. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, doi:[10.3201/eid2012.141026](https://doi.org/10.3201/eid2012.141026).
- ¹⁴⁵ Sabir, J.S.M.; Lam, T.T.-Y.; Ahmed, M.M.M.; Li, L.; Shen, Y.; E. M. Abo-Aba, S.; Qureshi, M.I.; Abu-Zeid, M.; Zhang, Y.; Khiyami, M.A.; et al. Co-Circulation of Three Camel Coronavirus Species and Recombination of MERS-CoVs in Saudi Arabia. *Science* **2016**, *351*, 81–84, doi:[10.1126/science.aac8608](https://doi.org/10.1126/science.aac8608).
- ¹⁴⁶ He, F.; Deng, Y.; Li, W. Coronavirus Disease 2019: What We Know? *J Med Virol* **2020**, *92*, 719–725, doi:[10.1002/jmv.25766](https://doi.org/10.1002/jmv.25766).
- ¹⁴⁷ Scimeca, M.; Urbano, N.; Bonfiglio, R.; Montanaro, M.; Bonanno, E.; Schillaci, O.; Mauriello, A. Imaging Diagnostics and Pathology in SARS-CoV-2-Related Diseases. *IJMS* **2020**, *21*, 6960, doi:[10.3390/ijms21186960](https://doi.org/10.3390/ijms21186960).
- ¹⁴⁸ Mohamadian, M.; Chiti, H.; Shoghli, A.; Biglari, S.; Parsamanesh, N.; Esmailzadeh, A. COVID-19: Virology, Biology and Novel Laboratory Diagnosis. *J Gene Med* **2021**, *23*, doi:[10.1002/jgm.3303](https://doi.org/10.1002/jgm.3303).
- ¹⁴⁹ Li, X.; Wang, L.; Yan, S.; Yang, F.; Xiang, L.; Zhu, J.; Shen, B.; Gong, Z. Clinical Characteristics of 25 Death Cases with COVID-19: A Retrospective Review of Medical Records in a Single Medical Center, Wuhan, China. *International Journal of Infectious Diseases* **2020**, *94*, 128–132, doi:[10.1016/j.ijid.2020.03.053](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.053).
- ¹⁵⁰ Wu, F.; Zhao, S.; Yu, B.; Chen, Y.-M.; Wang, W.; Song, Z.-G.; Hu, Y.; Tao, Z.-W.; Tian, J.-H.; Pei, Y.-Y.; et al. A New Coronavirus Associated with Human Respiratory Disease in China. *Nature* **2020**, *579*, 265–269, doi:[10.1038/s41586-020-2008-3](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3).
- ¹⁵¹ Zhou, H.; Chen, X.; Hu, T.; Li, J.; Song, H.; Liu, Y.; Wang, P.; Liu, D.; Yang, J.; Holmes, E.C.; et al. A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein. *Current Biology* **2020**, *30*, 2196–2203.e3, doi:[10.1016/j.cub.2020.05.023](https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.05.023).
- ¹⁵² Zhou, P.; Yang, X.-L.; Wang, X.-G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.-R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.-L.; 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](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7).

¹⁵³ Latinne, A.; Hu, B.; Olival, K.J.; Zhu, G.; Zhang, L.; Li, H.; Chmura, A.A.; Field, H.E.; Zambrana-Torrel, C.; Epstein, J.H.; et al. Origin and Cross-Species Transmission of Bat Coronaviruses in China. *Nat Commun* **2020**, *11*, 4235, doi:[10.1038/s41467-020-17687-3](https://doi.org/10.1038/s41467-020-17687-3).

¹⁵⁴ Liu, P.; Jiang, J.-Z.; Wan, X.-F.; Hua, Y.; Wang, X.; Hou, F.; Chen, J.; Zou, J.; Chen, J. *Are Pangolins the Intermediate Host of the 2019 Novel Coronavirus (2019-NCoV)*

- ¹⁶⁶ Liang, L.; He, C.; Lei, M.; Li, S.; Hao, Y.; Zhu, H.; Duan, Q. Pathology of Guinea Pigs Experimentally Infected with a Novel Reovirus and Coronavirus Isolated from SARS Patients. *DNA and Cell Biology* **2005**, *24*, 485–490, doi:[10.1089/dna.2005.24.485](https://doi.org/10.1089/dna.2005.24.485).
- ¹⁶⁷ Martina, B.E.E.; Haagmans, B.L.; Kuiken, T.; Fouchier, R.A.M.; Rimmelzwaan, G.F.; Van Amerongen, G.; Peiris, J.S.M.; Lim, W.; Osterhaus, A.D.M.E. SARS Virus Infection of Cats and Ferrets. *Nature* **2003**, *425*, 915–915, doi:[10.1038/425915a](https://doi.org/10.1038/425915a).
- ¹⁶⁸ Van Den Brand, J.M.A.; Haagmans, B.L.; Leijten, L.; Van Riel, D.; Martina, B.E.E.; Osterhaus, A.D.M.E.; Kuiken, T. Pathology of Experimental SARS Coronavirus Infection in Cats and Ferrets. *Vet Pathol* **2008**, *45*, 551–562, doi:[10.1354/vp.45-4-551](https://doi.org/10.1354/vp.45-4-551).
- ¹⁶⁹ Weingartl, H.M.; Copps, J.; Drebot, M.A.; Marszal, P.; Smith, G.; Gren, J.; Andonova, M.; Pasick, J.; Kitching, P.; Czub, M. Susceptibility of Pigs and Chickens to SARS Coronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, *10*, 179–184, doi:[10.3201/eid1002.030677](https://doi.org/10.3201/eid1002.030677).
- ¹⁷⁰ Chen, W.; Yan, M.; Yang, L.; Ding, B.; He, B.; Wang, Y.; Liu, X.; Liu, C.; Zhu, H.; You, B.; et al. **SARS-Associated** Coronavirus Transmitted from Human to Pig. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 446–448, doi:[10.3201/eid1103.040824](https://doi.org/10.3201/eid1103.040824).
- ¹⁷¹ Swayne, D.E.; Suarez, D.L.; Spackman, E.; Tumpey, T.M.; Beck, J.R.; Erdman, D.; Rollin, P.E.; Ksiazek, T.G. Domestic Poultry and SARS Coronavirus, Southern China. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, *10*, 914–916, doi:[10.3201/eid1005.030827](https://doi.org/10.3201/eid1005.030827).
- ¹⁷² Yuan, L.; Tang, Q.; Cheng, T.; Xia, N. Animal Models for Emerging Coronavirus: Progress and New Insights. *Emerging Microbes & Infections* **2020**, *9*, 949–961, doi:[10.1080/22221751.2020.1764871](https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1764871).
- ¹⁷³ Adney, D.R.; Bielefeldt–Ohmann, H.; Hartwig, A.E.; Bowen, R.A. Infection, Replication, and Transmission of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Alpacas. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 1031–1037, doi:[10.3201/eid2206.160192](https://doi.org/10.3201/eid2206.160192).
- ¹⁷⁴ Cramer, G.; Durr, P.A.; Klein, R.; Foord, A.; Yu, M.; Riddell, S.; Haining, J.; Johnson, D.; Hemida, M.G.; Barr, J.; et al. Experimental Infection and Response to Rechallenge of Alpacas with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 1071–1074, doi:[10.3201/eid2206.160007](https://doi.org/10.3201/eid2206.160007).
- ¹⁷⁵ Van Doremalen, N.; Munster, V.J. Animal Models of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *Antiviral Research* **2015**, *122*, 28–38, doi:[10.1016/j.antiviral.2015.07.005](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.07.005).
- ¹⁷⁶ Zhao, J.; Li, K.; Wohlford–Lenane, C.; Agnihothram, S.S.; Fett, C.; Zhao, J.; Gale, M.J.; Baric, R.S.; Enjuanes, L.; Gallagher, T.; et al. Rapid Generation of a Mouse Model for Middle East Respiratory Syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111*, 4970–4975, doi:[10.1073/pnas.1323279111](https://doi.org/10.1073/pnas.1323279111).
- ¹⁷⁷ Sit, T.H.C.; Brackman, C.J.; Ip, S.M.; Tam, K.W.S.; Law, P.Y.T.; To, E.M.W.; Yu, V.Y.T.; Sims, L.D.; Tsang, D.N.C.; Chu, D.K.W.; et al. Infection of Dogs with SARS-CoV-2. *Nature* **2020**, *586*, 776–778, doi:[10.1038/s41586-020-2334-5](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2334-5).

- ¹⁷⁸ Bonilauri, P.; Rugna, G. Animal Coronaviruses and SARS–COV–2 in Animals, What Do We Actually Know? *Life* **2021**, *11*, 123, doi:[10.3390/life11020123](https://doi.org/10.3390/life11020123).
- ¹⁷⁹ Temmam, S.; Barbarino, A.; Maso, D.; Behillil, S.; Enouf, V.; Huon, C.; Jaraud, A.; Chevallier, L.; Backovic, M.; Pérot, P.; et al. Absence of SARS–CoV–2 Infection in Cats and Dogs in Close Contact with a Cluster of COVID–19 Patients in a Veterinary Campus. *One Health* **2020**, *10*, 100164, doi:[10.1016/j.onehlt.2020.100164](https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100164).
- ¹⁸⁰ Bosco–Lauth, A.M.; Hartwig, A.E.; Porter, S.M.; Gordy, P.W.; Nehring, M.; Byas, A.D.; VandeWoude, S.; Ragan, I.K.; Maison, R.M.; Bowen, R.A. Experimental Infection of Domestic Dogs and Cats with SARS–CoV–2: Pathogenesis, Transmission, and Response to Reexposure in Cats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2020**, *117*, 26382–26388, doi:[10.1073/pnas.2013102117](https://doi.org/10.1073/pnas.2013102117).
- ¹⁸¹ Sailleau, C.; Dumarest, M.; Vanhomwegen, J.; Delaplace, M.; Caro, V.; Kwasiborski, A.; Hourdel, V.; Chevaillier, P.; Barbarino, A.; Comtet, L.; et al. First Detection and Genome Sequencing of SARS-CoV-2 in an Infected Cat in France. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *67*, 2324–2328, doi:[10.1111/tbed.13659](https://doi.org/10.1111/tbed.13659).
- ¹⁸² Zhang, Q.; Zhang, H.; Gao, J.; Huang, K.; Yang, Y.; Hui, X.; He, X.; Li, C.; Gong, W.; Zhang, Y.; et al. A Serological Survey of SARS–CoV–2 in Cat in Wuhan. *Emerging Microbes & Infections* **2020**, *9*, 2013–2019, doi:[10.1080/22221751.2020.1817796](https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1817796).
- ¹⁸³ Gibbons, A. Captive Gorillas Test Positive for Coronavirus. *Science* **2021**, doi:[10.1126/science.abg5458](https://doi.org/10.1126/science.abg5458).
- ¹⁸⁴ Hosie, M.J.; Hofmann–Lehmann, R.; Hartmann, K.; Egberink, H.; Truyen, U.; Addie, D.D.; Belák, S.; Boucraut–Baralon, C.; Frymus, T.; Lloret, A.; et al. Anthropogenic Infection of Cats during the 2020 COVID–19 Pandemic. *Viruses* **2021**, *13*, 185, doi:[10.3390/v13020185](https://doi.org/10.3390/v13020185).
- ¹⁸⁵ Shi, J.; Wen, Z.; Zhong, G.; Yang, H.; Wang, C.; Huang, B.; Liu, R.; He, X.; Shuai, L.; Sun, Z.; et al. Susceptibility of Ferrets, Cats, Dogs, and Other Domesticated Animals to SARS–Coronavirus 2. *Science* **2020**, *368*, 1016–1020, doi:[10.1126/science.abb7015](https://doi.org/10.1126/science.abb7015).
- ¹⁸⁶ Oude Munnink, B.B.; Sikkema, R.S.; Nieuwenhuijse, D.F.; Molenaar, R.J.; Munger, E.; Molenkamp, R.; Van Der Spek, A.; Tolsma, P.; Rietveld, A.; Brouwer, M.; et al. Transmission of SARS–CoV–2 on Mink Farms between Humans and Mink and Back to Humans. *Science* **2021**, *371*, 172–177, doi:[10.1126/science.abe5901](https://doi.org/10.1126/science.abe5901).
- ¹⁸⁷ Oreshkova, N.; Molenaar, R.J.; Vreman, S.; Harders, F.; Oude Munnink, B.B.; Hakze–van Der Honing, R.W.; Gerhards, N.; Tolsma, P.; Bouwstra, R.; Sikkema, R.S.; et al. SARS–CoV–2 Infection in Farmed Minks, the Netherlands, April and May 2020. *Eurosurveillance* **2020**, *25*, doi:[10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005).
- ¹⁸⁸ Chen, J.; Huang, C.; Zhang, Y.; Zhang, S.; Jin, M. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2–Specific Antibodies in Pets in Wuhan, China. *Journal of Infection* **2020**, *81*, e68–e69, doi:[10.1016/j.jinf.2020.06.045](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.06.045).
- ¹⁸⁹ Richard, M.; Kok, A.; De Meulder, D.; Bestebroer, T.M.; Lamers, M.M.; Okba, N.M.A.; Fentener Van Vlissingen, M.; Rockx, B.; Haagmans, B.L.; Koopmans, M.P.G.; et al. SARS–CoV–2 Is Transmitted via Contact and via the Air between Ferrets. *Nat Commun* **2020**, *11*, 3496,

doi:[10.1038/s41467-020-17367-2](https://doi.org/10.1038/s41467-020-17367-2).

¹⁹⁰ Costagliola, A.; Liguori, G.; d'Angelo, D.; Costa, C.; Ciani, F.; Giordano, A. Do Animals Play a Role in the Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2)? A Commentary. *Animals* **2020**, *11*, 16, doi:[10.3390/ani11010016](https://doi.org/10.3390/ani11010016).

¹⁹¹ Cao, Y.; Sun, Y.; Tian, X.; Bai, Z.; Gong, Y.; Qi, J.; Liu, D.; Liu, W.; Li, J. Analysis of ACE2 Gene-Encoded Proteins Across Mammalian Species. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 457, doi:[10.3389/fvets.2020.00457](https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00457).

¹⁹² Biskupek, I.; Sieradzan, A.; Czaplewski, C.; Liwo, A.; Lesner, A.; Giełdoń, A. Theoretical Investigation of the Coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19) Infection Mechanism and Selectivity. *Molecules* **2022**, *27*, 2080, doi:[10.3390/molecules27072080](https://doi.org/10.3390/molecules27072080).

¹⁹³ Shang, J.; Ye, G.; Shi, K.; Wan, Y.; Luo, C.; Aihara, H.; Geng, Q.; Auerbach, A.; Li, F. Structural Basis of Receptor Recognition by SARS-CoV-2. *Nature* **2020**, *581*, 221–224, doi:[10.1038/s41586-020-2179-y](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y).

¹⁹⁴ Walls, A.C.; Park, Y.-J.; Tortorici, M.A.; Wall, A.; McGuire, A.T.; Velesler, D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* **2020**, *181*, 281–292.e6, doi:[10.1016/j.cell.2020.02.058](https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058).

¹⁹⁵ Lan, J.; Ge, J.; Yu, J.; Shan, S.; Zhou, H.; Fan, S.; Zhang, Q.; Shi, X.; Wang, Q.; Zhang, L.; et al. Structure of the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain Bound to the ACE2 Receptor. *Nature* **2020**, *581*, 215–220, doi:[10.1038/s41586-020-2180-5](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5).

¹⁹⁶ Wang, Q.; Zhang, Y.; Wu, L.; Niu, S.; Song, C.; Zhang, Z.; Lu, G.; Qiao, C.; Hu, Y.; Yuen, K.-Y.; et al. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell* **2020**, *181*, 894–904.e9, doi:[10.1016/j.cell.2020.03.045](https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.045).

¹⁹⁷ Fang, L.; Karakiulakis, G.; Roth, M. Are Patients with Hypertension and Diabetes Mellitus at Increased Risk for COVID-19 Infection? *The Lancet Respiratory Medicine* **2020**, *8*, e21, doi:[10.1016/S2213-2600\(20\)30116-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30116-8).

¹⁹⁸ Jacobs, M.; Van Eeckhoutte, H.P.; Wijnant, S.R.A.; Janssens, W.; Joos, G.F.; Brusselle, G.G.; Bracke, K.R. Increased Expression of ACE2, the SARS-CoV-2 Entry Receptor, in Alveolar and Bronchial Epithelium of Smokers and COPD Subjects. *Eur Respir J* **2020**, *56*, 2002378, doi:[10.1183/13993003.02378-2020](https://doi.org/10.1183/13993003.02378-2020).

¹⁹⁹ Leung, J.M.; Yang, C.X.; Tam, A.; Shaipanich, T.; Hackett, T.-L.; Singhera, G.K.; Dorscheid, D.R.; Sin, D.D. ACE-2 Expression in the Small Airway Epithelia of Smokers and COPD Patients: Implications for COVID-19. *Eur Respir J* **2020**, *55*, 2000688, doi:[10.1183/13993003.00688-2020](https://doi.org/10.1183/13993003.00688-2020).

²⁰⁰ Rossato, M.; Russo, L.; Mazzocut, S.; Di Vincenzo, A.; Fioretto, P.; Vettor, R. Current Smoking Is Not Associated with COVID-19. *Eur Respir J* **2020**, *55*, 2001290, doi:[10.1183/13993003.01290-2020](https://doi.org/10.1183/13993003.01290-2020).

²⁰¹ Williamson, E.J.; Walker, A.J.; Bhaskaran, K.; Bacon, S.; Bates, C.; Morton, C.E.; Curtis, H.J.; Mehrkar, A.; Evans, D.; Inglesby, P.; et al. Factors Associated with COVID-19-Related Death Using OpenSAFELY. *Nature* **2020**, *584*, 430–436, doi:[10.1038/s41586-020-2521-4](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2521-4).

- ²⁰² Peters, M.C.; Sajuthi, S.; Deford, P.; Christenson, S.; Rios, C.L.; Montgomery, M.T.; Woodruff, P.G.; Mauger, D.T.; Erzurum, S.C.; Johansson, M.W.; et al. COVID-19-Related Genes in Sputum Cells in Asthma. Relationship to Demographic Features and Corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* **2020**, *202*, 83–90, doi:[10.1164/rccm.202003-0821OC](https://doi.org/10.1164/rccm.202003-0821OC).
- ²⁰³ Furuhashi, M.; Moniwa, N.; Mita, T.; Fuseya, T.; Ishimura, S.; Ohno, K.; Shibata, S.; Tanaka, M.; Watanabe, Y.; Akasaka, H.; et al. Urinary Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Hypertensive Patients May Be Increased by Olmesartan, an Angiotensin II Receptor Blocker. *American Journal of Hypertension* **2015**, *28*, 15–21, doi:[10.1093/ajh/hpu086](https://doi.org/10.1093/ajh/hpu086).
- ²⁰⁴ Yeo, C.; Kaushal, S.; Yeo, D. Enteric Involvement of Coronaviruses: Is Faecal-Oral Transmission of SARS-CoV-2 Possible? *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* **2020**, *5*, 335–337, doi:[10.1016/S2468-1253\(20\)30048-0](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30048-0).
- ²⁰⁵ Gao, Z.; Xu, Y.; Sun, C.; Wang, X.; Guo, Y.; Qiu, S.; Ma, K. A Systematic Review of Asymptomatic Infections with COVID-19. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **2021**, *54*, 12–16, doi:[10.1016/j.jmii.2020.05.001](https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.05.001).
- ²⁰⁶ Bourgonje, A.R.; Abdulle, A.E.; Timens, W.; Hillebrands, J.; Navis, G.J.; Gordijn, S.J.; Bolling, M.C.; Dijkstra, G.; Voors, A.A.; Osterhaus, A.D.; et al. Angiotensin-converting Enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV -2 and the Pathophysiology of Coronavirus Disease 2019 (COVID -19). *J. Pathol.* **2020**, *251*, 228–248, doi:[10.1002/path.5471](https://doi.org/10.1002/path.5471).
- ²⁰⁷ Jayaweera, M.; Perera, H.; Gunawardana, B.; Manatunge, J. Transmission of COVID-19 Virus by Droplets and Aerosols: A Critical Review on the Unresolved Dichotomy. *Environmental Research* **2020**, *188*, 109819, doi:[10.1016/j.envres.2020.109819](https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109819).
- ²⁰⁸ Jarvis, M.C. Aerosol Transmission of SARS-CoV-2: Physical Principles and Implications. *Front. Public Health* **2020**, *8*, 590041, doi:[10.3389/fpubh.2020.590041](https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.590041).
- ²⁰⁹ HCA Lung Biological Network; Sungnak, W.; Huang, N.; Bécavin, C.; Berg, M.; Queen, R.; Litvinukova, M.; Talavera-López, C.; Maatz, H.; Reichart, D.; et al. SARS-CoV-2 Entry Factors Are Highly Expressed in Nasal Epithelial Cells Together with Innate Immune Genes. *Nat Med* **2020**, *26*, 681–687, doi:[10.1038/s41591-020-0868-6](https://doi.org/10.1038/s41591-020-0868-6).
- ²¹⁰ Lazarus, J.V.; Wyka, K.; White, T.M.; Picchio, C.A.; Gostin, L.O.; Larson, H.J.; Rabin, K.; Ratzan, S.C.; Kamarulzaman, A.; El-Mohandes, A. A Survey of COVID-19 Vaccine Acceptance across 23 Countries in 2022. *Nat Med* **2023**, *29*, 366–375, doi:[10.1038/s41591-022-02185-4](https://doi.org/10.1038/s41591-022-02185-4).
- ²¹¹ Barkauskas, C.E.; Crouce, M.J.; Rackley, C.R.; Bowie, E.J.; Keene, D.R.; Stripp, B.R.; Randell, S.H.; Noble, P.W.; Hogan, B.L.M. Type 2 Alveolar Cells Are Stem Cells in Adult Lung. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 3025–3036, doi:[10.1172/JCI68782](https://doi.org/10.1172/JCI68782).
- ²¹² Jin, Y.; Yang, H.; Ji, W.; Wu, W.; Chen, S.; Zhang, W.; Duan, G. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses* **2020**, *12*, 372, doi:[10.3390/v12040372](https://doi.org/10.3390/v12040372).
- ²¹³ Hou, Y.J.; Okuda, K.; Edwards, C.E.; Martinez, D.R.; Asakura, T.; Dinno, K.H.; Kato, T.; Lee, R.E.; Yount, B.L.; Mascenik, T.M.; et al. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable

Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell* **2020**, *182*, 429–446.e14, doi:[10.1016/j.cell.2020.05.042](https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.042).

²¹⁴ Wang, Y.; Wang, Y.; Luo, W.; Huang, L.; Xiao, J.; Li, F.; Qin, S.; Song, X.; Wu, Y.; Zeng, Q.; et al. A Comprehensive Investigation of the mRNA and Protein Level of ACE2, the Putative Receptor of SARS–CoV–2, in Human Tissues and Blood Cells. *Int. J. Med. Sci.* **2020**, *17*, 1522–1531, doi:[10.7150/ijms.46695](https://doi.org/10.7150/ijms.46695).

²¹⁵ Zou, X.; Chen, K.; Zou, J.; Han, P.; Hao, J.; Han, Z. Single–Cell RNA–Seq Data Analysis on the Receptor ACE2 Expression Reveals the Potential Risk of Different Human Organs Vulnerable to 2019–NCoV Infection. *Front. Med.* **2020**, *14*, 185–192, doi:[10.1007/s11684-020-0754-0](https://doi.org/10.1007/s11684-020-0754-0).

²¹⁶ Ahn, J.H.; Kim, J.; Hong, S.P.; Choi, S.Y.; Yang, M.J.; Ju, Y.S.; Kim, Y.T.; Kim, H.M.; Rahman, M.T.; Chung, M.K.; et al. Nasal Ciliated Cells Are Primary Targets for SARS–CoV–2 Replication in the Early Stage of COVID–19. *Journal of Clinical Investigation* **2021**, *131*, e148517, doi:[10.1172/JCI148517](https://doi.org/10.1172/JCI148517).

²¹⁷ Lee, I.T.; Nakayama, T.; Wu, C.–T.; Goltsev, Y.; Jiang, S.; Gall, P.A.; Liao, C.–K.; Shih, L.–C.; Schürch, C.M.; McIlwain, D.R.; et al. ACE2 Localizes to the Respiratory Cilia and Is Not Increased by ACE Inhibitors or ARBs. *Nat Commun* **2020**, *11*, 5453, doi:[10.1038/s41467-020-19145-6](https://doi.org/10.1038/s41467-020-19145-6).

²¹⁸ Torba, K.; Helbig, G.; Woźniczka, K.; Waclawik, A.; Kyrucz–Krzemień, S. Limfocytoza hemofagocytarna związana z infekcją – opis przypadku. *Acta Haematologica Polonica* **2016**, *47*, 33–37, doi:[10.1016/j.achaem.2016.02.001](https://doi.org/10.1016/j.achaem.2016.02.001).

²¹⁹ Mustafa, M.I.; Abdelmoneim, A.H.; Mahmoud, E.M.; Makhawi, A.M. Cytokine Storm in COVID–19 Patients, Its Impact on Organs and Potential Treatment by QTY Code–Designed Detergent–Free Chemokine Receptors. *Mediators of Inflammation* **2020**, *2020*, 1–7, doi:[10.1155/2020/8198963](https://doi.org/10.1155/2020/8198963).

²²⁰ 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. *Molecular Cell* **2020**, *78*, 779–784.e5, doi:[10.1016/j.molcel.2020.04.022](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.022).

²²¹ Shang, J.; Wan, Y.; Luo, C.; Ye, G.; Geng, Q.; Auerbach, A.; Li, F. Cell Entry Mechanisms of SARS–CoV–2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2020**, *117*, 11727–11734, doi:[10.1073/pnas.2003138117](https://doi.org/10.1073/pnas.2003138117).

²²² Fraser, B.J.; Beldar, S.; Seitova, A.; Hutchinson, A.; Mannar, D.; Li, Y.; Kwon, D.; Tan, R.; Wilson, R.P.; Leopold, K.; et al. Structure and Activity of Human TMPRSS2 Protease Implicated in SARS–CoV–2 Activation. *Nat Chem Biol* **2022**, *18*, 963–971, doi:[10.1038/s41589-022-01059-7](https://doi.org/10.1038/s41589-022-01059-7).

²²³ Glowacka, I.; Bertram, S.; Müller, M.A.; Allen, P.; Soilleux, E.; Pfefferle, S.; Steffen, I.; Tsegaye, T.S.; He, Y.; Gnirss, K.; et al. Evidence That TMPRSS2 Activates the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for Membrane Fusion and Reduces Viral Control by the Humoral Immune Response. *J Virol* **2011**, *85*, 4122–4134, doi:[10.1128/JVI.02232-10](https://doi.org/10.1128/JVI.02232-10).

²²⁴ Shulla, A.; Heald–Sargent, T.; Subramanya, G.; Zhao, J.; Perlman, S.; Gallagher, T. A Transmembrane Serine Protease Is Linked to the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus

Receptor and Activates Virus Entry. *J Virol* **2011**, *85*, 873–882, doi:[10.1128/JVI.02062-10](https://doi.org/10.1128/JVI.02062-10).

²²⁵ Lukassen, S.; Chua, R.L.; Trefzer, T.; Kahn, N.C.; Schneider, M.A.; Muley, T.; Winter, H.; Meister, M.; Veith, C.; Boots, A.W.; et al. SARS-CoV-2 Receptor ACE 2 and TMPRSS 2 Are Primarily Expressed in Bronchial Transient Secretory Cells. *The EMBO Journal* **2020**, *39*, e105114, doi:[10.15252/embj.20105114](https://doi.org/10.15252/embj.20105114).

²²⁶ Ou, T.; Mou, H.; Zhang, L.; Ojha, A.; Choe, H.; Farzan, M. Hydroxychloroquine-Mediated Inhibition of SARS-CoV-2 Entry Is Attenuated by TMPRSS2. *PLoS Pathog* **2021**, *17*, e1009212, doi:[10.1371/journal.ppat.1009212](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009212).

²²⁷ Wang, H.; Yang, P.; Liu, K.; Guo, F.; Zhang, Y.; Zhang, G.; Jiang, C. SARS Coronavirus Entry into Host Cells through a Novel Clathrin- and Caveolae-Independent Endocytic Pathway. *Cell Res* **2008**, *18*, 290–301, doi:[10.1038/cr.2008.15](https://doi.org/10.1038/cr.2008.15).

²²⁸ Hu, T.Y.; Frieman, M.; Wolfram, J. Insights from Nanomedicine into Chloroquine Efficacy against COVID-19. *Nat. Nanotechnol.* **2020**, *15*, 247–249, doi:[10.1038/s41565-020-0674-9](https://doi.org/10.1038/s41565-020-0674-9).

²²⁹ Bayati, A.; Kumar, R.; Francis, V.; McPherson, P.S. SARS-CoV-2 Infects Cells after Viral Entry via Clathrin-Mediated Endocytosis. *Journal of Biological Chemistry* **2021**, *296*, 100306, doi:[10.1016/j.jbc.2021.100306](https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100306).

²³⁰ Bosch, B.J.; Bartelink, W.; Rottier, P.J.M. Cathepsin L Functionally Cleaves the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Class I Fusion Protein Upstream of Rather than Adjacent to the Fusion Peptide. *J Virol* **2008**, *82*, 8887–8890, doi:[10.1128/JVI.00415-08](https://doi.org/10.1128/JVI.00415-08).

²³¹ Ebert, D.H.; Deussing, J.; Peters, C.; Dermody, T.S. Cathepsin L and Cathepsin B Mediate Reovirus Disassembly in Murine Fibroblast Cells. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 24609–24617, doi:[10.1074/jbc.M201107200](https://doi.org/10.1074/jbc.M201107200).

²³² Patel, A.B.; Verma, A. COVID-19 and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers: What Is the Evidence? *JAMA* **2020**, doi:[10.1001/jama.2020.4812](https://doi.org/10.1001/jama.2020.4812).

²³³ Jackson, C.B.; Farzan, M.; Chen, B.; Choe, H. Mechanisms of SARS-CoV-2 Entry into Cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2022**, *23*, 3–20, doi:[10.1038/s41580-021-00418-x](https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x).

²³⁴ Elfiky, A.A.; Mahdy, S.M.; Elshemey, W.M. Quantitative Structure-Activity Relationship and Molecular Docking Revealed a Potency of Anti-Hepatitis C Virus Drugs against Human Corona Viruses. *J. Med. Virol.* **2017**, *89*, 1040–1047, doi:[10.1002/jmv.24736](https://doi.org/10.1002/jmv.24736).

²³⁵ Zahmatkesh, S.; Sillanpaa, M.; Rezakhani, Y.; Wang, C. Review of Concerned SARS-CoV-2 Variants like Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2), and Omicron (B.1.1.529), as Well as Novel Methods for Reducing and Inactivating SARS-CoV-2 Mutants in Wastewater Treatment Facilities. *Journal of Hazardous Materials Advances* **2022**, *7*, 100140, doi:[10.1016/j.hazadv.2022.100140](https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2022.100140).

²³⁶ Galloway, S.E.; Paul, P.; MacCannell, D.R.; Johansson, M.A.; Brooks, J.T.; MacNeil, A.; Slayton, R.B.; Tong, S.; Silk, B.J.; Armstrong, G.L.; et al. Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage — United States, December 29, 2020–January 12, 2021. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*

2021, 70, 95–99, doi:[10.15585/mmwr.mm7003e2](https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7003e2).

²³⁷ Vaughan, A. Omicron Emerges. *New Scientist* **2021**, 252, 7, doi:[10.1016/S0262-4079\(21\)02140-0](https://doi.org/10.1016/S0262-4079(21)02140-0).

²³⁸ Cascella M, Rajnik M, Aleem A, et al. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID–19) [Updated 2023 Jan 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>

²³⁹ Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Žídek, A.; Potapenko, A.; et al. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, 596, 583–589, doi:[10.1038/s41586-021-03819-2](https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2).

²⁴⁰ Hollingsworth, S.A.; Dror, R.O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron* **2018**, 99, 1129–1143, doi:[10.1016/j.neuron.2018.08.011](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011).

²⁴¹ Nissley, D.A.; Jiang, Y.; Trovato, F.; Sitarik, I.; Narayan, K.B.; To, P.; Xia, Y.; Fried, S.D.; O’Brien, E.P. Universal Protein Misfolding Intermediates Can Bypass the Proteostasis Network and Remain Soluble and Less Functional. *Nat Commun* **2022**, 13, 3081, doi:[10.1038/s41467-022-30548-5](https://doi.org/10.1038/s41467-022-30548-5).

²⁴² Kmiecik, S.; Gront, D.; Kolinski, M.; Wieteska, L.; Dawid, A.E.; Kolinski, A. Coarse-Grained Protein Models and Their Applications. *Chem. Rev.* **2016**, 116, 7898–7936, doi:[10.1021/acs.chemrev.6b00163](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00163).

²⁴³ Schmid, F. Understanding and Modeling Polymers: The Challenge of Multiple Scales. *ACS Polym. Au* **2023**, 3, 28–58, doi:[10.1021/acspolymersau.2c00049](https://doi.org/10.1021/acspolymersau.2c00049).

²⁴⁴ Gallegos, A.; Wu, J. A Molecular Theory of Polypeptide Adsorption at Inorganic Surfaces. *J. Phys. Chem. B* **2023**, 127, 794–805, doi:[10.1021/acs.jpccb.2c06607](https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.2c06607).

²⁴⁵ Zanfack, D.R.G.; Bellaïche, A.; Etchebest, C.; Dhiman, S.; Gadhamshetty, V.; Bomgni, A.B.; Gnimpieba, E.Z. Data Mining and Machine Learning over HPC Approach Enhancing Antibody Conformations Prediction. In *ACS Symposium Series*; Dhiman, S.S., Gnimpieba, E.Z., Gadhamshetty, V., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 2023; Vol. 1434, pp. 75–92 ISBN 978-0-8412-9727-2.

²⁴⁶ Liwo, A.; Khalili, M.; Scheraga, H.A. *Ab Initio* Simulations of Protein-Folding Pathways by Molecular Dynamics with the United-Residue Model of Polypeptide Chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, 102, 2362–2367, doi:[10.1073/pnas.0408885102](https://doi.org/10.1073/pnas.0408885102).

²⁴⁷ Arsiccio, A.; Pisano, R.; Shea, J.–E. A New Transfer Free Energy Based Implicit Solvation Model for the Description of Disordered and Folded Proteins. *J. Phys. Chem. B* **2022**, 126, 6180–6190, doi:[10.1021/acs.jpccb.2c03980](https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.2c03980).

²⁴⁸ Vierros, S.; Sammalkorpi, M. Hybrid Atomistic and Coarse-Grained Model for Surfactants in Apolar Solvents. *ACS Omega* **2019**, 4, 15581–15592, doi:[10.1021/acsomega.9b01959](https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01959).

²⁴⁹ Rotkiewicz, P.; Skolnick, J. Fast Procedure for Reconstruction of Full-atom Protein Models from Reduced Representations. *J Comput Chem* **2008**, 29, 1460–1465, doi:[10.1002/jcc.20906](https://doi.org/10.1002/jcc.20906).

- ²⁵⁰ Bellussi, F.M.; Roscioni, O.M.; Ricci, M.; Fasano, M. Anisotropic Electrostatic Interactions in Coarse-Grained Water Models to Enhance the Accuracy and Speed-Up Factor of Mesoscopic Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2021**, *125*, 12020–12027, doi:[10.1021/acs.jpccb.1c07642](https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.1c07642).
- ²⁵¹ Hassan, M.; Coutsiias, E.A. Kinematic Reconstruction of Cyclic Peptides and Protein Backbones from Partial Data. *J. Chem. Inf. Model.* **2021**, *61*, 4975–5000, doi:[10.1021/acs.jcim.1c00453](https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00453).
- ²⁵² Vickery, O.N.; Stansfeld, P.J. CG2AT2: An Enhanced Fragment-Based Approach for Serial Multi-Scale Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Theory Comput.* **2021**, *17*, 6472–6482, doi:[10.1021/acs.jctc.1c00295](https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00295).
- ²⁵³ Ingólfsson, H.I.; Bhatia, H.; Aydin, F.; Ooppelstrup, T.; López, C.A.; Stanton, L.G.; Carpenter, T.S.; Wong, S.; Di Natale, F.; Zhang, X.; et al. Machine Learning-Driven Multiscale Modeling: Bridging the Scales with a Next-Generation Simulation Infrastructure. *J. Chem. Theory Comput.* **2023**, *19*, 2658–2675, doi:[10.1021/acs.jctc.2c01018](https://doi.org/10.1021/acs.jctc.2c01018).
- ²⁵⁴ Miszta, P.; Pasznik, P.; Niewieczerał, S.; Młynarczyk, K.; Filipek, S. COGRIMEN: Coarse-Grained Method for Modeling of Membrane Proteins in Implicit Environments. *J. Chem. Theory Comput.* **2022**, *18*, 5145–5156, doi:[10.1021/acs.jctc.2c00140](https://doi.org/10.1021/acs.jctc.2c00140).
- ²⁵⁵ Yan, X.; Yue, T.; Winkler, D.A.; Yin, Y.; Zhu, H.; Jiang, G.; Yan, B. Converting Nanotoxicity Data to Information Using Artificial Intelligence and Simulation. *Chem. Rev.* **2023**, *123*, 8575–8637, doi:[10.1021/acs.chemrev.3c00070](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.3c00070).
- ²⁵⁶ Jussupow, A.; Kaila, V.R.I. Effective Molecular Dynamics from Neural Network-Based Structure Prediction Models. *J. Chem. Theory Comput.* **2023**, *19*, 1965–1975, doi:[10.1021/acs.jctc.2c01027](https://doi.org/10.1021/acs.jctc.2c01027).
- ²⁵⁷ Nde, J.; Zhang, P.; Waxham, M.N.; Cheung, M.S. Experiment and Simulation Reveal Residue Details for How Target Binding Tunes Calmodulin’s Calcium-Binding Properties. *J. Phys. Chem. B* **2023**, *127*, 2900–2908, doi:[10.1021/acs.jpccb.2c08734](https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.2c08734).
- ²⁵⁸ Liwo, A.; Czaplewski, C.; Pillardy, J.; Scheraga, H.A. Cumulant-Based Expressions for the Multibody Terms for the Correlation between Local and Electrostatic Interactions in the United-Residue Force Field. *The Journal of Chemical Physics* **2001**, *115*, 2323–2347, doi:[10.1063/1.1383989](https://doi.org/10.1063/1.1383989).
- ²⁵⁹ Liwo A., Czaplewski C., Ołdziej S., Rojas A. V., Kaźmierkiewicz R., Makowski M., Murarka R. K., and Scheraga H. A., “Simulation of protein structure and dynamics with the coarse-grained UNRES force field,” in *Coarse-Graining of Condensed Phase and Biomolecular Systems*, edited by Voth G. (CRC Press, 2008), Chap. 8, pp. 107–122
- ²⁶⁰ He, Y.; Xiao, Y.; Liwo, A.; Scheraga, H.A. Exploring the Parameter Space of the Coarse-Grained UNRES Force Field by Random Search: Selecting a Transferable Medium-Resolution Force Field. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2127–2135, doi:[10.1002/jcc.21215](https://doi.org/10.1002/jcc.21215).
- ²⁶¹ Kozłowska, U.; Maisuradze, G.G.; Liwo, A.; Scheraga, H.A. Determination of Side-Chain-Rotamer and Side-Chain and Backbone Virtual-Bond-Stretching Potentials of Mean Force from AM1 Energy Surfaces of Terminally-Blocked Amino-Acid Residues, for Coarse-Grained Simulations of Protein Structure and Folding. II. Resul. *J. Comput. Chem.* **2009**, n/a–n/a,

doi:[10.1002/jcc.21402](https://doi.org/10.1002/jcc.21402).

²⁶² Liwo, A.; Baranowski, M.; Czaplewski, C.; Gołaś, E.; He, Y.; Jagieła, D.; Krupa, P.; Maciejczyk, M.; Makowski, M.; Mozolewska, M.A.; et al. A Unified Coarse-Grained Model of Biological Macromolecules Based on Mean-Field Multipole-Multipole Interactions. *J Mol Model* **2014**, *20*, 2306, doi:[10.1007/s00894-014-2306-5](https://doi.org/10.1007/s00894-014-2306-5).

²⁶³ Liwo, A.; Czaplewski, C.; Pillardy, J.; Scheraga, H.A. Cumulant-Based Expressions for the Multibody Terms for the Correlation between Local and Electrostatic Interactions in the United-Residue Force Field. *The Journal of Chemical Physics* **2001**, *115*, 2323–2347, doi:[10.1063/1.1383989](https://doi.org/10.1063/1.1383989).

²⁶⁴ Sieradzan, A.K.; Makowski, M.; Augustynowicz, A.; Liwo, A. A General Method for the Derivation of the Functional Forms of the Effective Energy Terms in Coarse-Grained Energy Functions of Polymers. I. Backbone Potentials of Coarse-Grained Polypeptide Chains. *The Journal of Chemical Physics* **2017**, *146*, 124106, doi:[10.1063/1.4978680](https://doi.org/10.1063/1.4978680).

²⁶⁵ Kubo, R. Generalized Cumulant Expansion Method. *J. Phys. Soc. Jpn.* **1962**, *17*, 1100–1120, doi:[10.1143/JPSJ.17.1100](https://doi.org/10.1143/JPSJ.17.1100).

²⁶⁶ Lubecka, E.A.; Karczyńska, A.S.; Lipska, A.G.; Sieradzan, A.K.; Zięba, K.; Sikorska, C.; Uciechowska, U.; Samsonov, S.A.; Krupa, P.; Mozolewska, M.A.; et al. Evaluation of the Scale-Consistent UNRES Force Field in Template-Free Prediction of Protein Structures in the CASP13 Experiment. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2019**, *92*, 154–166, doi:[10.1016/j.jmgm.2019.07.013](https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2019.07.013).

²⁶⁷ Antoniak, A.; Biskupek, I.; Bojarski, K.K.; Czaplewski, C.; Giełdoń, A.; Kogut, M.; Kogut, M.M.; Krupa, P.; Lipska, A.G.; Liwo, A.; et al. Modeling Protein Structures with the Coarse-Grained UNRES Force Field in the CASP14 Experiment. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2021**, *108*, 108008, doi:[10.1016/j.jmgm.2021.108008](https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2021.108008).

²⁶⁸ Liwo, A.; Khalili, M.; Czaplewski, C.; Kalinowski, S.; Ołdziej, S.; Wachucik, K.; Scheraga, H.A. Modification and Optimization of the United-Residue (UNRES) Potential Energy Function for Canonical Simulations. I. Temperature Dependence of the Effective Energy Function and Tests of the Optimization Method with Single Training Proteins. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 260–285, doi:[10.1021/jp065380a](https://doi.org/10.1021/jp065380a).

²⁶⁹ Clarke, N.D.; Kissinger, C.R.; Desjarlais, J.; Gilliland, G.L.; Pabo, C.O. Structural Studies of the Engrailed Homeodomain. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 1779–1787, doi:[10.1002/pro.5560031018](https://doi.org/10.1002/pro.5560031018).

²⁷⁰ Scheraga, H.A.; Khalili, M.; Liwo, A. Protein-Folding Dynamics: Overview of Molecular Simulation Techniques. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 57–83, doi:[10.1146/annurev.physchem.58.032806.104614](https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104614).

²⁷¹ Liwo, A.; Ołdziej, S.; Pincus, M.R.; Wawak, R.J.; Rackovsky, S.; Scheraga, H.A. A United-Residue Force Field for off-Lattice Protein-Structure Simulations. I. Functional Forms and Parameters of Long-Range Side-Chain Interaction Potentials from Protein Crystal Data. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 849–873, doi:[10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199705\)18:7<849::AID-JCC1>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199705)18:7<849::AID-JCC1>3.0.CO;2-R).

- ²⁷² Lipska, A.G.; Seidman, S.R.; Sieradzan, A.K.; Giełdoń, A.; Liwo, A.; Scheraga, H.A. Molecular Dynamics of Protein A and a WW Domain with a United-Residue Model Including Hydrodynamic Interaction. *The Journal of Chemical Physics* **2016**, *144*, 184110, doi:[10.1063/1.4948710](https://doi.org/10.1063/1.4948710).
- ²⁷³ Lovell, S.C.; Word, J.M.; Richardson, J.S.; Richardson, D.C. The Penultimate Rotamer Library. *Proteins* **2000**, *40*, 389–408, doi:[10.1002/1097-0134\(20000815\)40:3<389::AID-PROT50>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20000815)40:3<389::AID-PROT50>3.0.CO;2-2).
- ²⁷⁴ Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612, doi:[10.1002/jcc.20084](https://doi.org/10.1002/jcc.20084).
- ²⁷⁵ Rivière, G.; Michaud, A.; Deloffre, L.; Vandebulcke, F.; Levoye, A.; Breton, C.; Corvol, P.; Salzet, M.; Vieau, D. Characterization of the First Non-Insect Invertebrate Functional Angiotensin-Converting Enzyme (ACE): Leech *Tt* ACE Resembles the N-Domain of Mammalian ACE. *Biochemical Journal* **2004**, *382*, 565–573, doi:[10.1042/BJ20040522](https://doi.org/10.1042/BJ20040522).
- ²⁷⁶ Guo, Y.-R.; Cao, Q.-D.; Hong, Z.-S.; Tan, Y.-Y.; Chen, S.-D.; Jin, H.-J.; Tan, K.-S.; Wang, D.-Y.; Yan, Y. The Origin, Transmission and Clinical Therapies on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak – an Update on the Status. *Military Med Res* **2020**, *7*, 11, doi:[10.1186/s40779-020-00240-0](https://doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0).
- ²⁷⁷ Damas, J.; Hughes, G.M.; Keough, K.C.; Painter, C.A.; Persky, N.S.; Corbo, M.; Hiller, M.; Koepfli, K.-P.; Pfenning, A.R.; Zhao, H.; et al. Broad Host Range of SARS-CoV-2 Predicted by Comparative and Structural Analysis of ACE2 in Vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2020**, *117*, 22311–22322, doi:[10.1073/pnas.2010146117](https://doi.org/10.1073/pnas.2010146117).
- ²⁷⁸ Liwo, A.; Czaplewski, C.; Sieradzan, A.K.; Lubecka, E.A.; Lipska, A.G.; Golon, Ł.; Karczyńska, A.; Krupa, P.; Mozolewska, M.A.; Makowski, M.; et al. Scale-Consistent Approach to the Derivation of Coarse-Grained Force Fields for Simulating Structure, Dynamics, and Thermodynamics of Biopolymers. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier, 2020; Vol. 170, pp. 73–122 ISBN 978-0-12-821135-9.
- ²⁷⁹ UniProt Consortium, T. UniProt: The Universal Protein Knowledgebase. *Nucleic Acids Research* **2018**, *46*, 2699–2699, doi:[10.1093/nar/gky092](https://doi.org/10.1093/nar/gky092).
- ²⁸⁰ Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; et al. Clustal W and Clustal X Version 2.0. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 2947–2948, doi:[10.1093/bioinformatics/btm404](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404).
- ²⁸¹ Zisman, L.S.; Keller, R.S.; Weaver, B.; Lin, Q.; Speth, R.; Bristow, M.R.; Canver, C.C. Increased Angiotensin-(1-7)-Forming Activity in Failing Human Heart Ventricles: Evidence for Upregulation of the Angiotensin-Converting Enzyme Homologue ACE2. *Circulation* **2003**, *108*, 1707–1712, doi:[10.1161/01.CIR.0000094734.67990.99](https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000094734.67990.99).
- ²⁸² Camargo, S.M.R.; Singer, D.; Makrides, V.; Huggel, K.; Pos, K.M.; Wagner, C.A.; Kuba, K.; Danilczyk, U.; Skovby, F.; Kleta, R.; et al. Tissue-Specific Amino Acid Transporter Partners ACE2 and Collectrin Differentially Interact With Hartnup Mutations. *Gastroenterology* **2009**, *136*, 872–882.e3, doi:[10.1053/j.gastro.2008.10.055](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.055).

- ²⁸³ Pikora, M.; Gieldon, A. RASMOL AB, M.; Gieldon, A. RASMOL AB – New Functionalities in the Program for Structure Analysis. *Acta Biochim Pol* **2015**, *62*, 629–631, doi:[10.18388/abp.2015_972](https://doi.org/10.18388/abp.2015_972).
- ²⁸⁴ Liwo, A.; Lee, J.; Ripoll, D.R.; Pillardy, J.; Scheraga, H.A. Protein Structure Prediction by Global Optimization of a Potential Energy Function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 5482–5485, doi:[10.1073/pnas.96.10.5482](https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5482).
- ²⁸⁵ Khalili, M.; Liwo, A.; Jagielska, A.; Scheraga, H.A. Molecular Dynamics with the United-Residue Model of Polypeptide Chains. II. Langevin and Berendsen-Bath Dynamics and Tests on Model α -Helical Systems. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 13798–13810, doi:[10.1021/jp058007w](https://doi.org/10.1021/jp058007w).
- ²⁸⁶ Czaplewski, C.; Karczyńska, A.; Sieradzan, A.K.; Liwo, A. UNRES Server for Physics-Based Coarse-Grained Simulations and Prediction of Protein Structure, Dynamics and Thermodynamics. *Nucleic Acids Research* **2018**, *46*, W304–W309, doi:[10.1093/nar/gky328](https://doi.org/10.1093/nar/gky328).
- ²⁸⁷ Wang, J.; Xu, X.; Zhou, X.; Chen, P.; Liang, H.; Li, X.; Zhong, W.; Hao, P. Molecular Simulation of SARS-CoV-2 Spike Protein Binding to Pangolin ACE2 or Human ACE2 Natural Variants Reveals Altered Susceptibility to Infection. *Journal of General Virology* **2020**, *101*, 921–924, doi:[10.1099/jgv.0.001452](https://doi.org/10.1099/jgv.0.001452).
- ²⁸⁸ Zhai, X.; Sun, J.; Yan, Z.; Zhang, J.; Zhao, J.; Zhao, Z.; Gao, Q.; He, W.-T.; Veit, M.; Su, S. Comparison of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Spike Protein Binding to ACE2 Receptors from Human, Pets, Farm Animals, and Putative Intermediate Hosts. *J Virol* **2020**, *94*, e00831–20, doi:[10.1128/JVI.00831-20](https://doi.org/10.1128/JVI.00831-20).
- ²⁸⁹ El-Sayed, A.; Kamel, M. Coronaviruses in Humans and Animals: The Role of Bats in Viral Evolution. *Environ Sci Pollut Res* **2021**, *28*, 19589–19600, doi:[10.1007/s11356-021-12553-1](https://doi.org/10.1007/s11356-021-12553-1).
- ²⁹⁰ American Veterinary Medical Association (AVMA). COVID 19 Article. Available online: <https://www.avma.org/resources-tools/animal-health-and-welfare/covid-19> (accessed on 10 January 2023).
- ²⁹¹ Berka, K.; Laskowski, R.A.; Hobza, P.; Vondrášek, J. Energy Matrix of Structurally Important Side-Chain/Side-Chain Interactions in Proteins. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 2191–2203, doi:[10.1021/ct100007y](https://doi.org/10.1021/ct100007y).
- ²⁹² Nelson, G.; Buzko, O.; Bassett, A.; Spilman, P.; Niazi, K.; Rabizadeh, S.; Soon-Shiong, P. *Millisecond-Scale Molecular Dynamics Simulation of Spike RBD Structure Reveals Evolutionary Adaption of SARS-CoV-2 to Stably Bind ACE2*; Biophysics, 2020;
- ²⁹³ Vergara-Alert, J.; Rodon, J.; Carrillo, J.; Te, N.; Izquierdo-Useros, N.; Rodríguez De La Concepción, M.L.; Ávila-Nieto, C.; Guallar, V.; Valencia, A.; Cantero, G.; et al. Pigs Are Not Susceptible to SARS-CoV-2 Infection but Are a Model for Viral Immunogenicity Studies. *Transbound Emerg Dis* **2021**, *68*, 1721–1725, doi:[10.1111/tbed.13861](https://doi.org/10.1111/tbed.13861).
- ²⁹⁴ Shereen, M.A.; Khan, S.; Kazmi, A.; Bashir, N.; Siddique, R. COVID-19 Infection: Emergence, Transmission, and Characteristics of Human Coronaviruses. *Journal of Advanced Research* **2020**, *24*, 91–98, doi:[10.1016/j.jare.2020.03.005](https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005).

- ²⁹⁵ Serre, A.; Bascoul, S.; Vendrell, J.P.; Cannat, A. Human Immune Response to Brucella Infection. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie* **1987**, *138*, 113–117, doi:[10.1016/0769-2609\(87\)90088-3](https://doi.org/10.1016/0769-2609(87)90088-3).
- ²⁹⁶ Dolinsky, T.J.; Nielsen, J.E.; McCammon, J.A.; Baker, N.A. PDB2PQR: An Automated Pipeline for the Setup of Poisson–Boltzmann Electrostatics Calculations. *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*, W665–W667, doi:[10.1093/nar/gkh381](https://doi.org/10.1093/nar/gkh381).
- ²⁹⁷ DeLano, Warren L. "The PyMOL molecular graphics system." <http://www.pymol.org/> (2002).
- ²⁹⁸ Ali, A.; Vijayan, R. Dynamics of the ACE2–SARS–CoV–2/SARS–CoV Spike Protein Interface Reveal Unique Mechanisms. *Sci Rep* **2020**, *10*, 14214, doi:[10.1038/s41598-020-71188-3](https://doi.org/10.1038/s41598-020-71188-3).
- ²⁹⁹ Piplani, S.; Singh, P.K.; Winkler, D.A.; Petrovsky, N. In Silico Comparison of SARS–CoV–2 Spike Protein–ACE2 Binding Affinities across Species and Implications for Virus Origin. *Sci Rep* **2021**, *11*, 13063, doi:[10.1038/s41598-021-92388-5](https://doi.org/10.1038/s41598-021-92388-5).
- ³⁰⁰ Naderi, S.; Chen, P.E.; Murall, C.L.; Poujol, R.; Kraemer, S.; Pickering, B.S.; Sagan, S.M.; Shapiro, B.J. Zooanthroponotic Transmission of SARS–CoV–2 and Host–Specific Viral Mutations Revealed by Genome–Wide Phylogenetic Analysis. *eLife* **2023**, *12*, e83685, doi:[10.7554/eLife.83685](https://doi.org/10.7554/eLife.83685).
- ³⁰¹ Casalino, L.; Dommer, A.C.; Gaieb, Z.; Barros, E.P.; Sztain, T.; Ahn, S.–H.; Trifan, A.; Brace, A.; Bogetti, A.T.; Clyde, A.; et al. AI–Driven Multiscale Simulations Illuminate Mechanisms of SARS–CoV–2 Spike Dynamics. *The International Journal of High Performance Computing Applications* **2021**, *35*, 432–451, doi:[10.1177/10943420211006452](https://doi.org/10.1177/10943420211006452).
- ³⁰² Yu, A.; Pak, A.J.; He, P.; Monje–Galvan, V.; Casalino, L.; Gaieb, Z.; Dommer, A.C.; Amaro, R.E.; Voth, G.A. A Multiscale Coarse–Grained Model of the SARS–CoV–2 Virion. *Biophysical Journal* **2021**, *120*, 1097–1104, doi:[10.1016/j.bpj.2020.10.048](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.10.048).
- ³⁰³ Ma, B.; Zhang, Z.; Li, Y.; Lin, X.; Gu, N. Evaluation of Interactions between SARS–CoV–2 RBD and Full–Length ACE2 with Coarse–Grained Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Inf. Model.* **2022**, *62*, 936–944, doi:[10.1021/acs.jcim.1c01306](https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c01306).
- ³⁰⁴ Pak, A.J.; Yu, A.; Ke, Z.; Briggs, J.A.G.; Voth, G.A. Cooperative Multivalent Receptor Binding Promotes Exposure of the SARS–CoV–2 Fusion Machinery Core. *Nat Commun* **2022**, *13*, 1002, doi:[10.1038/s41467-022-28654-5](https://doi.org/10.1038/s41467-022-28654-5).
- ³⁰⁵ Benton, D.J.; Wrobel, A.G.; Xu, P.; Roustan, C.; Martin, S.R.; Rosenthal, P.B.; Skehel, J.J.; Gamblin, S.J. Receptor Binding and Priming of the Spike Protein of SARS–CoV–2 for Membrane Fusion. *Nature* **2020**, *588*, 327–330, doi:[10.1038/s41586-020-2772-0](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2772-0).
- ³⁰⁶ Yuan, Y.; Cao, D.; Zhang, Y.; Ma, J.; Qi, J.; Wang, Q.; Lu, G.; Wu, Y.; Yan, J.; Shi, Y.; et al. Cryo–EM Structures of MERS–CoV and SARS–CoV Spike Glycoproteins Reveal the Dynamic Receptor Binding Domains. *Nat Commun* **2017**, *8*, 15092, doi:[10.1038/ncomms15092](https://doi.org/10.1038/ncomms15092).
- ³⁰⁷ Sztain, T.; Ahn, S.–H.; Bogetti, A.T.; Casalino, L.; Goldsmith, J.A.; Seitz, E.; McCool, R.S.; Kearns, F.L.; Acosta–Reyes, F.; Maji, S.; et al. A Glycan Gate Controls Opening of the SARS–CoV–2 Spike Protein. *Nat. Chem.* **2021**, *13*, 963–968, doi:[10.1038/s41557-021-00758-3](https://doi.org/10.1038/s41557-021-00758-3).

- ³⁰⁸ Luisetto, M.; Khaled, E.; Mashori, G.; Yesvi, A.; Latyshev, O. OPEN and CLOSED State of SPIKE SARS–COV–2: Relationship with Some Integrin Binding. A Biological Molecular Approach to Better Understand the Coagulant Effect. *Arch Biotechnol Biomed* **2021**, *5*, 049–056, doi:[10.29328/journal.abb.1001028](https://doi.org/10.29328/journal.abb.1001028).
- ³⁰⁹ Ray, D.; Le, L.; Andricioaei, I. Distant Residues Modulate Conformational Opening in SARS–CoV–2 Spike Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2021**, *118*, e2100943118, doi:[10.1073/pnas.2100943118](https://doi.org/10.1073/pnas.2100943118).
- ³¹⁰ Brotzakis, Z.F.; Löhr, T.; Vendruscolo, M. Determination of Intermediate State Structures in the Opening Pathway of SARS–CoV–2 Spike Using Cryo–Electron Microscopy. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 9168–9175, doi:[10.1039/D1SC00244A](https://doi.org/10.1039/D1SC00244A).
- ³¹¹ Cai, Y.; Zhang, J.; Xiao, T.; Peng, H.; Sterling, S.M.; Walsh, R.M.; Rawson, S.; Rits–Volloch, S.; Chen, B. Distinct Conformational States of SARS–CoV–2 Spike Protein. *Science* **2020**, *369*, 1586–1592, doi:[10.1126/science.abd4251](https://doi.org/10.1126/science.abd4251).
- ³¹² Li, F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu. Rev. Virol.* **2016**, *3*, 237–261, doi:[10.1146/annurev-virology-110615-042301](https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301).
- ³¹³ Han, P.; Su, C.; Zhang, Y.; Bai, C.; Zheng, A.; Qiao, C.; Wang, Q.; Niu, S.; Chen, Q.; Zhang, Y.; et al. Molecular Insights into Receptor Binding of Recent Emerging SARS–CoV–2 Variants. *Nat Commun* **2021**, *12*, 6103, doi:[10.1038/s41467-021-26401-w](https://doi.org/10.1038/s41467-021-26401-w).
- ³¹⁴ Han, P.; Li, L.; Liu, S.; Wang, Q.; Zhang, D.; Xu, Z.; Han, P.; Li, X.; Peng, Q.; Su, C.; et al. Receptor Binding and Complex Structures of Human ACE2 to Spike RBD from Omicron and Delta SARS–CoV–2. *Cell* **2022**, *185*, 630–640.e10, doi:[10.1016/j.cell.2022.01.001](https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.001).
- ³¹⁵ Papanikolaou, V.; Chrysovergis, A.; Ragos, V.; Tsiambas, E.; Katsinis, S.; Manoli, A.; Papouliakos, S.; Roukas, D.; Mastronikolis, S.; Peschos, D.; et al. From Delta to Omicron: S1–RBD/S2 Mutation/Deletion Equilibrium in SARS–CoV–2 Defined Variants. *Gene* **2022**, *814*, 146134, doi:[10.1016/j.gene.2021.146134](https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.146134).
- ³¹⁶ Rotkiewicz, P.; Skolnick, J. Fast Procedure for Reconstruction of Full-atom Protein Models from Reduced Representations. *J Comput Chem* **2008**, *29*, 1460–1465, doi:[10.1002/jcc.20906](https://doi.org/10.1002/jcc.20906).
- ³¹⁷ Tian, C.; Kasavajhala, K.; Belfon, K.A.A.; Raguette, L.; Huang, H.; Miguez, A.N.; Bickel, J.; Wang, Y.; Pincay, J.; Wu, Q.; et al. ff19SB: Amino–Acid–Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution. *J. Chem. Theory Comput.* **2020**, *16*, 528–552, doi:[10.1021/acs.jctc.9b00591](https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00591).
- ³¹⁸ Mandal, N.; Padhi, A.K.; Rath, S.L. Molecular Insights into the Differential Dynamics of SARS–CoV–2 Variants of Concern. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2022**, *114*, 108194, doi:[10.1016/j.jmgm.2022.108194](https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2022.108194).
- ³¹⁹ Biskupek, I.; Geldon, A. Two–Stage Recognition Mechanism of the SARS–CoV–2 Receptor–Binding Domain to Angiotensin–Converting Enzyme–2 (ACE2). *IJMS* **2024**, *25*, 679, doi:[10.3390/ijms25010679](https://doi.org/10.3390/ijms25010679).