

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Lucie Rybová**

Mechanismy úniku viru SARS-CoV-2 před protivirovou vrozenou obranou hostitele

Mechanisms used by SARS-CoV-2 for escape from innate host defense

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Šárka Němečková, DrSc.

Praha, 2022

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 26. července 2022

Podpis: .....

Lucie Rybová

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Šárce Němečkové, DrSc. za rady při psaní bakalářské práce.

## Abstrakt

SARS-CoV-2 z čeledi *Coronaviridae* způsobuje u lidí nemoc zvanou Covid-19. Disponuje řadou strukturních, nestrukturních a pomocných proteinů, které interferují s imunitní odpovědí hostitele a napomáhají viru unikat této odpovědi a přežít v hostiteli. Nejvýznamnějším únikovým mechanismem je potlačení funkce interferonů hostitele. Molekuly způsobující inhibici vrozené imunity hostitele jsou kódovány z oblasti genomu viru ORF1a a ORF1ab. Tato práce poskytuje souhrn o charakteristice, morfologii, genomu, replikačním cyklu, mechanismech vrozené imunity uplatňující se při obraně hostitele před infekcí a únikových mechanismech SARS-CoV-2.

**Klíčová slova:** SARS-CoV-2, virus, morfologie SARS-CoV-2, genom SARS-CoV-2, strukturní proteiny, nestrukturní proteiny, únik před vrozeným imunitním systémem, dysregulace IFN odpovědi, TLRs, varianty SARS-CoV-2, Covid-19

## Abstract

SARS-CoV-2 of the *Coronaviridae* family causes the disease called Covid-19. It has a number of structural, non-structural and accessory proteins that interfere with the host's immune response and help the virus escape this response and survive in the host. The most important escape mechanism is suppression of host interferon function. Molecules causing inhibition of the host's innate immunity are encoded from the region of the virus genome ORF1a and ORF1ab. This work provides a summary of the characterization, morphology, genome, replication cycle, innate immunity mechanisms involved in host defense against infection, and escape mechanisms of SARS-CoV-2.

**Keywords:** SARS-CoV-2, virus, morphology of SARS-CoV-2, SARS-CoV-2 genome, structural proteins, nonstructural proteins, innate immune system escape, IFN dysregulation, TLRs, SARS-CoV-2 variants, Covid-19

# Obsah

ABSTRAKT .....	IV
OBSAH .....	V
SEZNAM ZKRATEK .....	VII
1 ÚVOD .....	1
1.1 CHARAKTERISTIKA SARS-CoV-2 .....	1
1.1.1 Po stopách původu SARS-CoV-2 .....	2
1.2 VARIANTY .....	3
1.3 ONEMOCNĚNÍ COVID-19.....	4
2 MORFOLOGIE.....	6
2.1 STRUKTURNÍ PROTEINY .....	6
3 STRUKTURA GENOMU.....	9
3.1 FUNKCE STRUKTURNÍCH A POMOCNÝCH PROTEINŮ.....	11
3.2 FUNKCE NESTRUKTURNÍCH PROTEINŮ .....	12
4 REPLIKAČNÍ CYKLUS .....	13
5 ROZPOZNÁVÁNÍ SARS-COV-2 VROZENÝM IMUNITNÍM SYSTÉMEM .....	16
5.1 TLRs (TOLL-LIKE RECEPTORY).....	16
5.2 RLRs (RIG-I-LIKE RECEPTORY).....	17
6 ÚNIKOVÉ MECHANISMY PŘED VIREM SARS-COV-2 .....	18
6.1 NARUŠENÍ INTERFERONOVÉ PRODUKCE.....	18
6.1.1 Nsp1.....	20
6.1.2 Nsp3.....	21
6.1.3 Nsp5.....	21
6.1.4 Nsp6.....	22
6.1.5 Nsp7.....	22
6.1.6 Nsp8, Nsp9.....	22
6.1.7 Nsp10, Nsp16.....	22
6.1.8 Nsp12.....	23
6.1.9 Nsp13.....	24
6.1.10 Nsp14.....	24
6.1.11 Nsp15.....	24
6.1.12 ORF3a .....	24

6.1.13	ORF3b .....	25
6.1.14	ORF6 .....	25
6.1.15	ORF7a, ORF7b.....	25
6.1.16	ORF9b .....	26
6.1.17	M protein .....	26
6.1.18	N protein.....	26
6.2	INTERFERENCE S DENDRITICKÝMI BUŇKAMI .....	28
6.3	INTERFERENCE S MAKROFÁGY A NEUTROFILY .....	28
6.4	NKG2A A APOPTÓZA NK BUNĚK.....	29
7	ZÁVĚR.....	31
8	LITERATURA.....	32

## Seznam zkratek

<b>Zkratka</b>	<b>Význam česky</b>	<b>Význam anglicky</b>
-	negativní	negative
+	pozitivní	positive
<b>ACE2</b>	angiotensin-konvertující enzym 2	angiotensin-converting enzyme 2
<b>ARDS</b>	syndrom akutní dechové tísně	acute respiratory distress syndrome
<b>Arg</b>	arginin	arginine
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát	adenosine triphosphate
<b>BTS-2</b>	antigen 2 kostní dřene	bone marrow stromal antigen 2
<b>cap</b>	čepička	cap
<b>CM</b>	konvolutní membrána	convolute membrane
<b>CTD</b>	C – koncová doména	C – terminal domain
<b>DAMP</b>	molekulární vzory asociované s poškozením	damage associated molecular patterns
<b>DMV</b>	dvojitý membránový váček	double-membrane vesicle
<b>ds</b>	dvojvláknová	double stranded (RNA)
<b>ER</b>	endoplasmatické retikulum	endoplasmatic reticulum
<b>ERGIC</b>	intermediární kompartment ER a GA	endoplasmic-reticulum-Golgi intermediate compartment
<b>ExoN doména</b>	exonukleázová doména	exonuclease domain
<b>FP</b>	fúzní peptid	fusion peptide
<b>GA, GK</b>	Golgiho aparát (komplex)	Golgi apparatus
<b>HR1, HR2</b>	sedmičlenná repeticie	heptad repeat 1 a 2
<b>IFN</b>	interferon	interferon
<b>IKKe</b>	IKKe kináza	I-kappa-B kinase epsilon
<b>IRAK1</b>	kináza 1 spojená s interleukinovým receptorem 1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1
<b>IRF3</b>	regulační faktor 3 interferonu	IFN regulatory factor 3

<b>ISG</b>	gen stimulovaný interferony	interferon-stimulated gene
<b>MAVS</b>	protivirový signalizační protein mitochondrie	mitochondrial antiviral-signaling protein
<b>MDA5</b>	protein 5 spojený s diferenciací melanomu	melanoma differentiation associated protein 5
<b>mRNA</b>	mediátorová RNA	messenger RNA
<b>MyD88</b>	protein 88 myeloidní diferenciacní primární odpovědi	myeloid differentiation primary response 88
<b>NF-κB</b>	jaderný faktor kappa B	nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells
<b>NK buňky</b>	„přirození zabíječi“	natural killer cells
<b>Nsp</b>	nestruturní protein	nonstructural protein
<b>NTD</b>	N – koncová doména	N – terminal domain
<b>ORF</b>	kódující oblast	open reading frame
<b>PAMP</b>	molekulární vzor typický pro patogenní organismy	pathogen-associated molecular pattern
<b>polyA</b>	polyA konec	polyadenylic acid tail
<b>pp</b>	polyprotein	polyprotein
<b>PRR</b>	receptor pro molekulární vzory	pattern recognition receptor
<b>PUN</b>	polyuridin	polyuridine
<b>RBD</b>	doména vázající receptor	receptor binding domain
<b>RdRp</b>	RNA dependentní RNA polymeráza	RNA-dependent RNA polymerase
<b>RLR</b>	RIG-I-like receptor	RIG-I-like receptor (retinoic acid inducible gene-I-like receptor)
<b>RO</b>	replikační organela	replication organelle
<b>Ser</b>	serin	serine
<b>sgRNA</b>	subgenová RNA	subgenomic RNA
<b>ss</b>	jednovláknová (RNA)	single stranded (RNA)
<b>TAK1</b>	transformující růstový faktor-β-aktivovaná kináza 1	transforming growth factor-β-activated kinase 1
<b>TBK1</b>	TANK-vázající kináza 1	TANK-binding kinase 1

<b>TIR doména</b>	toll-interleukin-1 receptor doména	toll-interleukin-1 receptor domain
<b>TIRAP</b>	adaptorový protein obsahující TIR doménu	TIR Domain Containing Adaptor Protein
<b>TLR</b>	Toll-like receptor	Toll-like receptor
<b>TMPRSS2</b>	transmembránová serinová proteáza 2	transmembrane serine protease 2
<b>TRAF6</b>	faktor 6 spojený s TNF receptorem	tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor 6
<b>TRIF</b>	adaptorový protein obsahující TIR doménu, indukující interferon $\beta$	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
<b>TRS</b>	transkripční regulační sekvence	transcriptional regulatory sequence
<b>UTR</b>	nepřekládaná oblast	untranslated region

# 1 Úvod

Virus SARS-CoV-2 z čeledi *Coronaviridae* je původcem onemocnění Covid-19, který zapříčinil vznik celosvětové pandemie. Kóduje řadu proteinů, které se účastní únikových mechanismů a umožňují tak vyhýbání lidskému imunitnímu systému. Mezi tyto proteiny se řadí strukturní, nestrukturní a pomocné proteiny. Každý z nich má řadu funkcí a některé vytvářejí komplexy a tím spolupracují při úniku imunitě. Rozšířený úvod poskytuje podkapitola Charakteristika SARS-CoV-2.

Cílem této práce je představit základní charakteristiku SARS-CoV-2, morfologii, strukturu genomu, kódované proteiny a jejich základní a dosud známé funkce, replikační cyklus, rozpoznávání viru vrozenou imunitou hostitele, hlavní únikové mechanismy a interference s buňkami vrozeného imunitního systému hostitele.

## 1.1 Charakteristika SARS-CoV-2

Hlavním tématem této práce je virus s názvem SARS-CoV-2 patřící do čeledi *Coronaviridae*, který způsobuje onemocnění Covid-19 (Kumar *et al.*, 2020).

**Tabulka 1:** Zařazení SARS-CoV-2 do taxonomického systému (Gorbalenya *et al.*, 2020).

Říše	<i>Riboviria</i>
Řád	<i>Nidovirales</i>
Podřád	<i>Coronavirineae</i>
Čeď	<i>Coronaviridae</i>
Podčeď	<i>Orthocoronavirinae</i>
Rod	<i>Betacoronavirus</i>
Podrod	<i>Sarbecovirus</i>
Druh	Severe acute respiratory syndrom – related coronavirus
Individuum	SARS-CoV-2

Velikost virionu se pohybuje mezi 70 až 90 nm. Uvnitř se nachází virový genom, který odpovídá přibližné délce 30 kb, což je mezi ssRNA viry, jeden z největších genomů. Právě tento velký genom umožňuje plasticitu a s tím spojené mutace nebo rekombinace. To následně vede k větší diverzitě a čím větší diverzita, tím má virus větší šanci na mezidruhový přeskok. Na diverzitu koronavirů má vliv

i povaha rezervoárů; ptáků a netopýrů. Jenom diverzita těchto zvířat je obrovská a létání jim umožňuje pohyb prakticky kdekoli a může docházet k dalším výměnám genetického materiálu virů s hostiteli.

Rody *Alfacoronavirus* (lidský virus 229E) a *Betacoronavirus* (viry SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, MERS-CoV) pocházejí původně z netopýrů a hlodavců. *Gammacoronavirus* (SW1) a *Deltacoronavirus* (HKU15) mají přirozený výskyt v ptácích.

Různé koronaviry způsobují různou patogenezi. Od mírných příznaků vyskytujících se při infekci člověka viry HKU1 nebo OC43 až po velmi závažné symptomy a onemocnění při infekcích SARS-CoV-1, MERS-CoV nebo SARS-CoV-2.

Již v roce 2002 v Číně způsobil virus SARS-CoV-1 epidemii, která byla následně zažehnána hlavně izolací obyvatel a kontrolou šíření. V roce 2004 byl u lidí objeven koronavirus NL63 (Fouchier *et al.*, 2004) a následující rok došlo k izolaci HKU1 ze vzorků pacientů s pneumonií (Woo *et al.*, 2009). O dalších sedm let později, v roce 2012, došlo k přenosu MERS-CoV na člověka z velbloudů (Chu *et al.*, 2018).

V roce 2019 se objevil v lidské populaci virus SARS-CoV-2. Kolem 29.12.2019 byla nahlášena spojitost s místním marketem ve Wuhanu. Byla provedena retrospektivní epidemiologická studie. K datu 31.12.2019 čínská vláda uvědomila WHO o propuknutí místních pneumonií. Z původních 41 hospitalizovaných bylo 27 z nich spojeno s marketem ve Wuhanu. Byli mezi nimi i lidé pracující jako prodáváči právě na tomto místě, návštěvníci trhů nebo lidé, kteří s nimi přišli do kontaktu (Worobey *et al.*, 2022).

Pandemie byla vyhlášena v březnu 2020 Světovou zdravotnickou organizací (WHO) s vysvětlením, že původ byl zjištěn v Číně a zdrojem byl nejspíše netopýr.

### **1.1.1 Po stopách původu SARS-CoV-2**

Důkazy nasvědčují tomu, že SARS-CoV-2 má přirozený rezervoár v netopýrech. Jelikož blízký kontakt mezi lidmi a netopýry není tak častý, je pravděpodobné, že k přeskoku došlo přes mezihostitele. Tím by mohlo být domestikované nebo divoké zvíře.

Problematika přenosů souvisí i s prodejem živých zvířat v Číně v městských oblastech, kde se s největší pravděpodobností udály první přenosy a šíření do lidské populace. Tento problém se vyskytuje hlavně na jihu Číny. Brzy po propuknutí SARSu v roce 2004 byl vydán zákaz prodeje zvířat v provincii Guangdong. Bohužel i dnes se vyskytují ilegální markety a obchodování s živými zvířaty stále probíhá (Worobey *et al.*, 2022).

Epidemiologické šetření odhalilo, že došlo minimálně ke dvěma přenosům SARS-CoV-2 ze zvířat na přelomu listopadu a prosince roku 2019 (Pekar *et al.*, 2022). Není ale úplně jisté, z jakého zvířete

se tento přenos uskutečnil. V podezření je psík mývalovitý (*Nycterotes procyonoides*). Ti jsou v Číně využíváni na maso a srst. Psíci byli prodáváni v oblasti Wuhanského marketu, kde docházelo k odběru vzorků, které byly následně pozitivní na SARS-CoV-2. Nicméně, market mohl být jen prostředkem, kde došlo k zesílení rozšíření SARS-CoV-2, a tudíž zde nemuselo dojít k přeskoku na člověka.

Dne 11. ledna 2020 byl market uzavřen a byly nasbírány vzorky ze zvířat (krokodýli, hadi, drůbež) a povrchů (toalety, klece). Následně bylo odhaleno, že z 200 odebraných vzorků od zvířat, nebyl ani jeden pozitivní. Zajímavé bylo, že ze vzorků odebraných z povrchů jich bylo 1 000 pozitivních. V dalším šetření se ukázalo, že právě původní dvě virové linie, které byly přítomné v počátku rozšiřování SARS-CoV-2, byly nalezeny i v místě marketu. Také prvních 156 případů bylo zaznamenaných v okolí trhů. V prošetřování bylo zmapováno 5 původních vzorků, které vedly k vystopování až ke konkrétnímu prodejnímu místu v marketu. Přesněji se jednalo o klec, ve které byla prodávána živá zvířata.

Co se týče výzkumu zaměřeného na koronaviry, tak je evidentní, že epidemie urychlují tento výzkum. Například v roce 2003 bylo dostupných pouze 10 genomů koronavirů. Po epidemii SARS-CoV-1 došlo k přečtení dalších 16 sekvencí genomů.

## 1.2 Varianty

SARS-CoV-2 je strukturně podobný RaTG13-koronaviru, což je netopýří virus z vrápence prostředního (*Rhinolophus affinis*). Dále byla nalezena homologie s izolovanými koronaviry z luskouna ostrovního (*Manis javanica*) v proteinech E (100% homologie), M (98%), N (96,7%) a S (90,4%). Zde se nabízí možnost rekombinace mezi nimi (Grudlewska-Buda *et al.*, 2021). Variabilita, která vychází z chemické struktury genomu, je mezi koronaviry velmi značná. Labilita RNA přispívá k tomuto ději stejně jako chybějící opravné mechanismy, a to může ovlivnit i patogenitu nebo adaptaci. RdRp nemá proofreadingovou aktivitu. Aby se její nepřesnost kompenzovala tak si viry kódují exoribonukleázu v Nsp14. Nsp14 má N-terminální ExoN doménu, která se účastní proofreadingové činnosti a C-terminální doménu N7, která se podílí na tvorbě čepičky mRNA viru (Moeller *et al.*, 2021). Během replikace dochází k 1 mutaci na každých 10 000 nukleotidů. Pro srovnání u DNA může být tato četnost mutací 1 za 100 000 nukleotidů, případně toto číslo může dosáhnout až na 1 mutaci na  $10^9$  nukleotidů u bakterií. SARS-CoV-2 musel prodělat mutace k tomu, aby mohl infikovat lidskou populaci (Benvenuto *et al.*, 2020). První výrazná změna vedla k mutaci vyskytující se na C – koncové oblasti S1 domény S proteinu. Odehrálo se to na začátku pandemie na přelomu března a dubna 2020. Jedná se o variantu D614G. Nastaly změny v aminokyselinách, které způsobily zefektivnění replikace a přenosové kapacity viru. Díky těmto vlastnostem začala varianta ve světě převládat. Mezi nejrozšířenější varianty patřila britská alfa (B.1.1.7.), která byla poprvé zaznamenána v září 2020 na jihu Spojeného království. V průběhu času došlo k jejímu ústupu a nahrazení agresivnějšími variantami. Jihoafrická varianta beta (501Y.V2) byla objevena v prosinci 2020 v jižní Africe. Je o 50 % více infekční než

předchozí varianta alfa. Brazilská varianta (P.1) byla identifikována v Manaus v severní Brazílii v červenci 2020. Další záznam byl zveřejněn o variantě delta (B.1.617.2) z Indie roku 2020, která převládala do nástupu omicronu (Karim *et al.*, 2021). Varianta delta byla dvakrát více infekční než předchozí a přenos je o 90 % efektivnější než u alfa varianty. Pro přehlednost WHO pojmenovala varianty podle řecké abecedy. Omikron (BA.1) byl dalším nástupcem s další subvariantou BA.2., která se šíří snadněji, ale BA.1 způsobuje vážnější symptomy. Záznam byl uveden v listopadu 2021 v Botswaně. Její infekčnost je vyšší než u delta varianty; v Africe nastal skok z 300 nakažených za den na 3 000 nakažených jedinců, a to vše během pouhých dvou týdnů. V současnosti na našem území dominuje varianta omikron BA.4 a BA.5, jejíž výskyt stoupá. Tyto zmíněné varianty patří k takzvaným „variantám k znepokojení“. Existují další „varianty bývalého zájmu“ jako například Epsilon, Eta, Iota, Kappa nebo Zeta. „Varianty zájmu“ jsou Lambda z Peru a Mu z Columbie.

### 1.3 Onemocnění Covid-19

Virus SARS-CoV-2 způsobuje onemocnění Covid-19, jehož jméno mu bylo přiděleno Světovou zdravotnickou organizací. Přenos probíhá hlavně kapénkovou infekcí na krátké vzdálenosti do 1,5 m; proto byly také nařízeny v době vrcholící epidemie 2m rozestupy. Dále hraje roli fyzický kontakt (Lovato *et al.*, 2020). Virová RNA byla dále prokázána i v krvi, moči nebo stolici infikovaných. Klinický průběh vykazuje výraznou heterogenitu v projevech pohybujících se na škále od velmi mírných až po velmi vážné. Onemocnění může být i letální.

**Inkubační doba** se pohybuje mezi 2–14 dny, přičemž průměr byl stanoven mezi 4–5 dny.

Prokázáno bylo také **riziko infekce** z povrchů. Například pokud se předměty nachází v domácnosti nemocného, je riziko přenosu z povrchu a následovné nakažení velké. Riziko infekce dále závisí na tom, jak bude onemocnění probíhat. Při závažném průběhu je pacient infekční déle než 20 dní. Naopak při průběhu mírném infekčnost trvá 2,5 dne před projevem symptomů s tím, že největší pravděpodobnost nákazy je v době nástupu příznaků. Riziko po desátém dni od nástupu symptomů u imunokompetentních lidí je nízké.

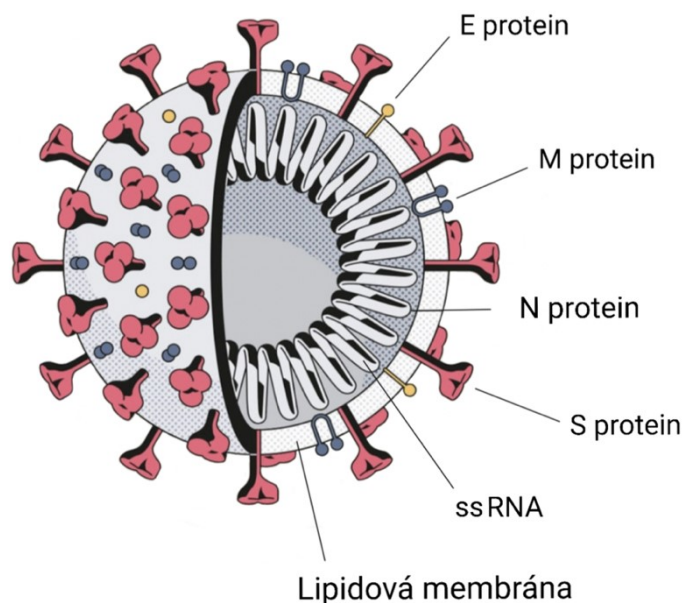
K **symptomům** se nejčastěji řadí subfebrilie (horečka v rozmezí 37–38 °C), únava, kašel, bolest v krku, bolesti hlavy a svalů, zvracení, nevolnost, dušnost, průjem, ztráty čichu a chuti (Çalica Utku *et al.*, 2020). Ztráty čichu byly nejdříve připisovány vlivu chemických prostředků a dezinfekce v závislosti zvýšené frekvence jejich používání při prevenci. Následně byly zaznamenány i případy ztráty chuti (Meinhardt *et al.*, 2021). V některých případech bylo oznámeno zhoršení zraku. Ke ztrátám čichu a chuti může dojít i u pacientů, kteří neprojevují jiné symptomy. SARS-CoV-2 infikuje buňky, které vyživují neurony v nosní dutině; podpůrné buňky sensorických neuronů (Brann *et al.*, 2020). V těchto buňkách se vyskytuje velké množství receptoru ACE2, na který SARS-CoV-2 cílí. Sensorické neurony tento receptor nemají a to znamená, že napadením podpůrných buněk zůstává neuron bez živin, a tím dochází

právě k uvedené snížené funkci a ztrátě čichu a chuti. Většinou dochází k obnovení čichu i chuti v řádu týdnů, někdy ale i za delší dobu. V některých případech může nastat parosmie, kdy se vůně mohou lišit od zapamatovaných představ. To se může řešit terapií vystavování známých vůní a přiřazování vjemů. V případě, kdy se čich nevrací po dobu měsíců je možné, že došlo k úmrtí senzorických neuronů kvůli nedostatečné výživě.

**Komplikace** onemocnění mohou být různé a jsou závislé i na imunitě a celkovém stavu pacienta. Může dojít k respirační insuficienci až syndromu akutní dechové tísně (ARDS); akutní forma postižení plic vlivem zánětlivé reakce v plicní tkáni. Dochází k poškození plicních alveol, hromadění tekutiny v plicích a prodloužení difúzní dráhy kyslíku. Dále také dochází k zvýšení propustnosti plicních kapilár, dušnosti, zrychlenému dýchání a snížené koncentraci kyslíku v krvi. Mezi další komplikace je řazena i například cévní mozková příhoda a plicní embolie. Hlavním rizikem těchto komplikací je kouření, kardiovaskulární onemocnění, obezita, diabetes mellitus, arteriální hypertenze, nádorové onemocnění a chronické onemocnění plic nebo ledvin (Vakili *et al.*, 2020). **Léčba** se odvíjí od závažnosti projevů. Izolace pacienta v domácím prostředí je doporučována v případech s mírným projevem. Při vážných obtížích je vhodným krokem hospitalizace s kyslíkovou podporou. Mezi hlavní preventivní opatření patří omezení kontaktu, používání dezinfekčních prostředků, zakrývání úst a nosu respirátorem či jinými ochrannými pomůckami a očkování. Možnosti léčby jsou velmi rozsáhlé (Stasi *et al.*, 2020). **Diagnostika** onemocnění je možná pomocí RT-PCR z nasofaryngeálního výtěru (Yüce *et al.*, 2021).

## 2 Morfologie

Virion SARS-CoV-2 má sférický tvar s charakteristickou korunou (tvořenou S proteiny) pozorovatelnou v elektronovém mikroskopu. Jedná se o obalené viry jejichž obal se skládá z lipidové dvojvrstvy a strukturních proteinů. Rozměr virionu je v rozmezí od 50 nm do 140 nm. Tomu odpovídá objem částice přibližně  $10^6 \text{ nm}^3$  s hmotností 1 fg (Bar-On *et al.*, 2020). Velikost +ssRNA genomu je v rozmezí 26 kb až 32 kb.



Obrázek 1: Virion SARS-CoV-2 (upraveno podle Manuel Bortoletti, 2020).

### 2.1 Strukturní proteiny

Tabulka 2: Shrnutí hlavních vlastností strukturních proteinů SARS-CoV-2.

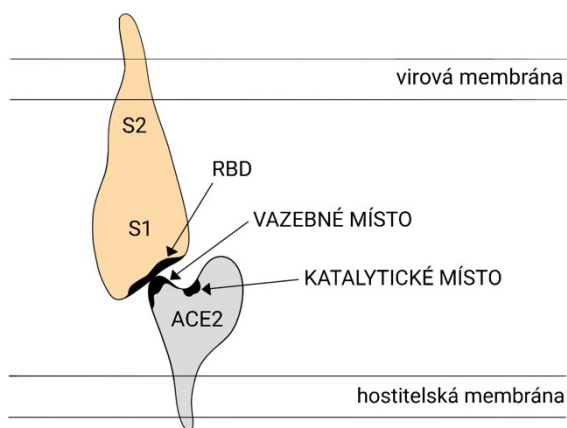
Strukturní protein	Vlastnosti
S	Spike protein, vazba na ACE2 receptor, důležitý pro vstup do hostitelské buňky (Walls <i>et al.</i> , 2020)
E	Obalový (envelope) protein, účastní se v morfogenezi viru, formuje pentamerické iontové kanály v hostitelských membránách ER, způsobuje nadměrnou expresi cytokinů (Cao <i>et al.</i> , 2021)
M	Membránový (membrane) protein, důležitý pro iniciaci zakřivení membrány, sbalení RNA a pučení virových částic (Thomas, 2020)
N	Nukleokapsidový fosfoprotein, váže se na virovou RNA, funkce při virové replikaci, balení RNA za vzniku ribonukleokapsidy, role při shromáždění virových částic (Wu <i>et al.</i> , 2021)

## **S protein (spike protein)**

Jedná se o glykoprotein vázající se na receptor hostitele. Je ve virionu obsažen v počtu 100 kopií. S proteiny jsou velké proteiny mající 1162 až 1376 aminokyselin a jsou syntetizovány v endoplasmatickém retikulu nebo ERGIC. Po syntéze následuje modifikace v Golgiho aparátu, a to glykosylace nebo palmitoylace. S proteiny mají konzervovanou strukturu i funkci. Například S protein SARS-CoV-2 má 76% podobnost aminokyselin s virem SARS-CoV-1.

Je tvořen podjednotkami S1 (hlava, zajišťuje vazbu receptoru) a S2 (stonek, umožňuje fúzi membrán). S protein tvoří homotrimery (s délkou 9–12 nm). Tím dochází ke kompletizaci S proteinu. Podjednotka S1 obsahuje receptor vazebnou doménu (RBD, receptor binding domain; Obrázek 2), která váže aminokyseliny na ACE2 receptoru (angiotensin-converting enzyme 2). Aby k této vazbě mohlo dojít, musí se odehrát štěpení podjednotek a následné nekovalentní spojení těchto podjednotek. S1 podjednotka dále obsahuje signální peptid, který leží na N – konci na NTD (N – terminal domain) (Wang *et al.*, 2020).

Vazba S1 podjednotky na ACE2 receptor slouží k zajištění vstupu do hostitelské buňky. Funguje na principu klíče a zámku, existující buď v konformaci „otevřeno“ nebo „zavřeno“. Tyto konformace jsou ovlivněny způsobem různých spojení mezi S1 a S2 podjednotek (Walls *et al.*, 2020). Otevřený stav znamená odhalení RBD a zavřený stav je důsledkem skrytí RBD domény.



**Obrázek 2:** Vazba S1 podjednotky a ACE2 receptoru (vytvořeno pro tuto práci, upraveno podle Prabakaran *et al.*, 2004).

S2 podjednotka ovlivňuje vstup viru do cílové buňky pomocí fúzního peptidu (FP) v ní a účastní se fúze membrány. SARS-CoV-2 na rozdíl od SARS-CoV-1 má další místo, které může být štěpeno hostitelským furinem, trypsinem, TMPRSS2 a dalšími proteázami a tím je SARS-CoV-2 více náchylný k fúzi membrán při vstupu do hostitelské buňky (Ou *et al.*, 2020). Dále jsou zde přítomny dvě

heptad-repeat domény (HR1, HR2; heptamery, jsou v koronaviru konzervované), transmembránová doména a C – terminální doména.

Síla vazby na ACE2 může být zvyšována palmitoylací S proteinu. Tropismus pro ACE2 je možné zprostředkovat i pomocí cholesterolu. Lipidové rafty zlepšují vstup, ale nejsou nutné.

Dále je zajímavé, že S protein je schopen aktivovat v časném stádiu infekce komplement, což by vysvětlilo brzký nástup cytokinů u pacientů.

### **E protein (envelope protein)**

Skládá se z 74 až 109 aminokyselin, skládá se v pentamery a ve virionu je zastoupen v počtu dvaceti kopií (100 monomerů) (Venkatagopalan *et al.*, 2015). Zastává funkci viroporinu, který modifikuje buněčné membrány hostitelské buňky a umožňuje lepší únik virů z infikovaných buněk hostitele. Na N – konci se nachází krátká hydrofilní oblast následovaná hydrofobním transmembránovým alfa helixem, který formuje kanál dostatečně velký pro ionty  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  nebo  $Ca^{2+}$ . Na C – konci je oblast hydrofilní.

Ne u všech koronavirů je nutný E protein k formování virionu, ale pokud není přítomen, tak se virionů tvoří méně. Mutace v E proteinu znamená nižší progresi onemocnění i mortalitu (DeDiego *et al.*, 2007). Právě iontová aktivita proteinu přispívá k zánětlivé odpovědi vedoucí až k cytokinové bouři nebo ARDS (Ye *et al.*, 2020).

Během infekce organismu je E protein produkován ve velkém množství, což je zajímavé, protože do maturovaného virionu je tento protein inkorporován jen v množství velmi malém. Pokud se vyskytne deleční mutace v proteinu, dochází většinou k produkci oslabených virionů, které nejsou schopny uniknout z buňky nebo mají problémy s pučením.

### **M protein (membránový protein)**

Ve virionu je zastoupen v nejvyšším počtu kopií (2000 v každém virionu) a také je nejvíce konzervovaný ze všech strukturních proteinů. Tato skutečnost je nejspíše způsobena faktem, že M protein vykonává spoustu podstatných funkcí.

Primární funkcí je sestavování nově vytvořených virových částic, poskytuje lešení pro vytvoření virionu. Má afinitu jednak sám k sobě, ale i k dalším strukturním proteinům a drží vše pohromadě. Mezi další funkce patří jeho antagonismus k IFN a interference s hostitelskou imunitní odpovědí, účast při zastavení hostitelského buněčného cyklu, účast na autofágii a abortivní apoptóze. K nejzajímavějším funkcím bych zařadila viroporinovou aktivitu. K té ale dochází jenom tehdy, pokud E protein není schopen tuto funkci vykonávat a v této chvíli M protein funkci přebírá a stává se viroporinem. Tento proces je zajištěn mutacemi v M proteinu vedoucími ke zkrácení C – konce (Thomas, 2020).

M protein se může nacházet ve dvou konformacích, a to buď jako prodloužený nebo více kompaktní. Druhá varianta je spojena s větší flexibilitou a nižší hustotou S proteinů. První prodloužená varianta je spojována s větším nahloučením S proteinů (Hu *et al.*, 2003).

### **N protein (nukleokapsidový protein)**

Je složen z 419 aminokyselin a je zastoupen ve virionu v počtu 1000 kopií. N protein je dosti konzervovaný, ale i přes tuto skutečnost se nachází určité variace mezi SARS-CoV-1 a SARS-CoV-2. Protein má 3 domény. Patří mezi ně N – koncová NTD doména, která zastává vazebné funkce. Dále centrální doména CTD bohatá na Ser/Arg a její funkce není ještě úplně objasněna. C – koncová doména je poslední ze tří domén N proteinu a její funkcí je formování dimeru nebo oligomeru sama sebe, což je nutné k formování virové kapsidy v ERGIC. Všechny 3 domény mají afinitu k RNA. Tato afinita je důležitá pro následné zabalení do virové partikule. N protein tvoří nukleokapsidu kolem virového genomu.

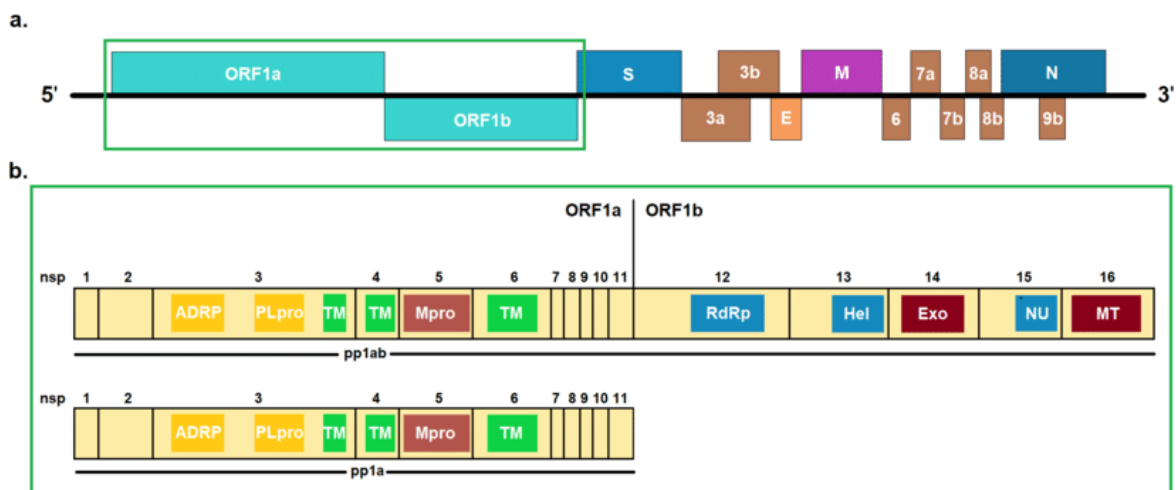
K dalším funkcím N proteinu se řadí interakce s M proteinem, kdy spolupracují na shromažďování virových částic uvnitř hostitelské buňky. Dále je důležitá interakce s Nsp3 k zajištění správného náboru N proteinu pro replikačně transkripční komplex. Také pomáhá separovat vlákna RNA při replikaci, a tím zvyšovat její efektivitu. Má vliv na produkci IFN hostitelem a podporuje apoptózu hostitelské buňky (Satarker *et al.*, 2020). Právě blokace vazby mezi N proteiny může být cílem léčiv u koronaviřů (například Cyclosporin A) (Ma-Lauer *et al.*, 2020).

## **3 Struktura genomu**

Genom SARS-CoV-2 je lineární, jednovláknová (ss) RNA s pozitivní polaritou. Délka je v rozmezí 26–32 kb přičemž původní izolát SARS-CoV-2 z Wuchanu byl stanoven na 29 903 nukleotidů (Raskin, 2021). Genom je sbalen do nukleokapsidy tvořené N proteiny. Na **5' konci** se nachází čepička typu 0 m<sup>7</sup>GpppA<sub>1</sub> (Viswanathan *et al.*, 2020). Dále obsahuje UTR (nepřekládanou oblast) o 265 nukleotidech, leader o délce 72 nukleotidů, TRS<sub>L</sub> (transkripční regulační sekvence) o struktuře ACGAAC (Miao *et al.*, 2021). Na **3' konci** je polyA sekvence o velikosti 30–60 nukleotidů, což zajišťuje stabilitu genomu a zabraňuje účinku exoribonukleáz, které mohou tuto strukturu genomu rozložit (Kim *et al.*, 2020). Polyadenylace je zajišťována pomocí adenyltransferázy neboli nestrukturního proteinu 8 (Nsp8). Dále se zde nachází UTR (nepřekládaná oblast) o délce 337 nukleotidů. (Rangan *et al.*, 2020). Genom kóduje 16 nestrukturních, 4 strukturní a 6 pomocných proteinů, jejichž translace probíhá hned po vstupu do buňky, což je umožněno díky pozitivní polaritě RNA kterou buňka může považovat za svoji mRNA (Raskin, 2021). Mezi strukturní proteiny patří S, M, N a E protein. K pomocným neboli akcesorním proteinům se řadí ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b a ORF10. Nestrukturní proteiny jsou označovány Nsp1 až Nsp16. Na 5' konci jsou

umístěny ORFs dávající vznik **polyproteinům**. Z ORF1a vzniká polyprotein pp1a a z ORF1a a ORF1b vzniká polyprotein pp1ab.

Tyto polyproteiny jsou poté rozštěpeny do konkrétních menších proteinů. Z pp1a vzniká Nsp 1–11. Z pp1ab vzniká Nsp 1–16. Další strukturní a pomocné proteiny jsou syntetizovány pomocí subgenomových mRNA. Mutační rychlost genomu je průměrně  $10^{-6}$  nt<sup>-1</sup> cyklus<sup>-1</sup>. Co se týče evolučních změn, odpovídají průměrné hodnotě  $10^{-3}$  nt<sup>-1</sup> rok<sup>-1</sup> (Grudlewska-Buda *et al.*, 2021).



**Obrázek 3:** Struktura genomu SARS-CoV-2. V obrázku a) je zeleně označená oblast, která zahrnuje ORF1 genomu. ORF1a dává vznik polyproteinu pp1a a ORF1b polyproteinu pp1b. Může dojít ke vzniku polyproteinu pp1ab při uklouznutí polymerázy a frameshiftu ORFs. Polyproteiny ORF1 jsou zobrazeny na obrázku b). Nestrukturní proteiny tedy vznikají z části blíže 5'konci a strukturní a pomocné proteiny pak blíže 3'konci, na obrázku neoznačené rámečkem (upraveno podle Lugo, 2020).

### 3.1 Funkce strukturních a pomocných proteinů

Tabulka 3: Strukturní a pomocné proteiny SARS-CoV-2 a jejich funkce (reference uvedeny v textu).

<b>S</b>	Spike protein, vazba na ACE2 receptor, důležitý pro vstup do hostitelské buňky
ORF3a	Aktivuje NLRP3 inflamazom, formuje homotetramery s charakterem iontových kanálů, vrozená imunita a IFN odpovědi, stimuluje apoptózu a ovlivňuje cyklus buňky
<b>E</b>	Obalový protein, účastní se v morfogenezi viru, formuje pentamerické iontové kanály v hostitelských membránách ER, způsobuje nadměrnou expresi cytokinů a přehnanou imunitní odpověď
<b>M</b>	Membránový protein, důležitý pro iniciaci zakřivení membrány, sbalení RNA a pučení virových částic
ORF6	Antagonista IFN typu 1, podporuje virovou replikaci
ORF7a	Stimuluje virem vyvolanou apoptózu, funguje proti uvazování na membránu pomocí vazby na BTS-2 (bone marrow stromal antigen 2)
ORF7b	Integrální transmembránový protein
ORF8	Pomocný protein, účast při virové replikaci
<b>N</b>	Nukleokapsidový fosfoprotein, váže se na virovou RNA, funkce při virové replikaci, balení RNA za vzniku ribonukleokapsidy, role při shromáždění viru (assembly)
ORF9b	Antagonista IFN typu 1, tlumí hostitelskou virovou odpověď pomocí stimulace degradace MAVS
ORF10	Doplňkový protein, role v útlumu ubikvitin-proteasomového systému

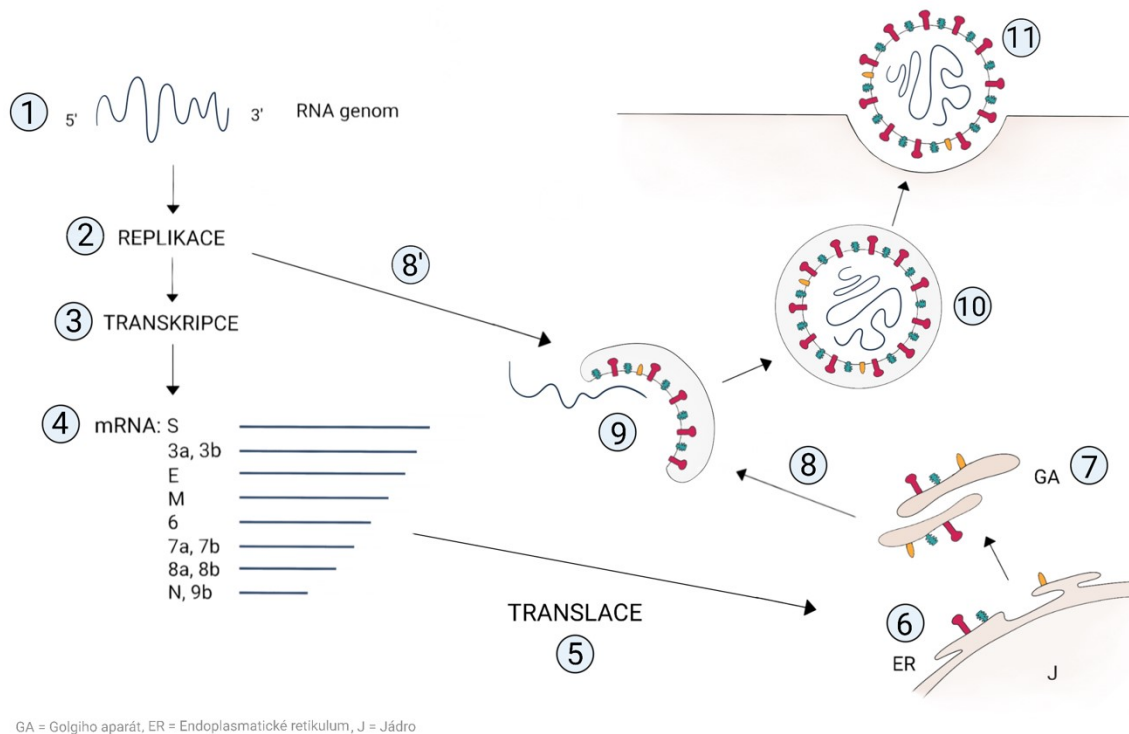
## 3.2 Funkce nestrukturních proteinů

**Tabulka 4:** Nestrukturní proteiny SARS-CoV-2 a jejich funkce (reference uvedeny v textu).

Nsp1	Inhibuje hostitelskou antivirovou odpověď, expresi a interferonovou signalizaci
Nsp2	Váže RNA, uplatnění při replikaci genomu, spoluúčast s dalšími proteiny
Nsp3	Fosfatázová aktivita, proteolytické štěpení polyproteinů, inhibuje NF-κB, interferon beta a p53 signalizaci, může se účastnit na přestavbách membrány spolu s Nsp4
Nsp4	Tvoří komplex spolu s Nsp3 a Nsp6, který má funkci ve virové replikaci, dále je nutný k přestavbě membrány při replikaci
Nsp5	Hlavní role spočívá v štěpení virového polyproteinu k tvorbě aktivních forem nestrukturních proteinů
Nsp6	Účast při přestavbách membrán a autofágii, komplex Nsp3-Nsp4-Nsp6 funkce při virové replikaci
Nsp7	Součástí replikačního komplexu Nsp7-Nsp8-Nsp12, formuje hexadekamerický komplex spolu s Nsp8 sloužící jako procesní svorka pro RNA dependentní RNA polymerázu
Nsp8	Replikační komplex s Nsp7 a Nsp12, společně s Nsp7 jako procesní svorka RdRp
Nsp9	Váže ssRNA, homodimery váží a chrání virový genom před degradací během replikace
Nsp10	Je nezbytný pro Nsp14 3'-5' exoribonukleázu a Nsp16 metyltransferázovou aktivitu, formuje komplexy s Nsp14 a Nsp16
Nsp11	Krátký peptid, účast při RNA syntéze
<b>Nsp12</b>	RdRp (RNA dependentní RNA polymeráza), jádro replikačního komplexu (Nsp7-Nsp8-Nsp12)
Nsp13	RNA helikáza; NTPázová, dNTPázová a RTpázová aktivita
Nsp14	3'-5' exonukleáza, proofreading aktivita
Nsp15	Endoribonukleáza (nidoviral RNA uridylate-specifická, NendoU)
Nsp16	2'-O-riboza metyltransferáza, spoluúčast s Nsp10 na tvorbě čepičky (capping) virové mRNA (kvůli protekci před degradací)

## 4 Replikační cyklus

Obalené viry obsahují glykoproteiny, které zprostředkují vstup do cílové buňky. U viru SARS-CoV-2 je tímto glykoproteinem S protein.



**Obrázek 4:** Replikační cyklus SARS-CoV-2. 1 – +ssRNA genom viru, 2 – replikace, 3 – transkripce, 4 – subgenová mRNA dává vzniku strukturním a doplňkovým proteinům, 5 – translace mRNA na hostitelských ribozomech, 6 – transport proteinů do ER, 7 – přesun do GA pomocí vesikul a postranlační úpravy proteinů, 8 – formování virové částice, 8' - replikace genomu, 9 – nově vzniklá ssRNA a vytvořené proteiny formují virion, 10 – hotový virion, 11 – exocytóza z hostitelské buňky (vytvořeno pro tuto práci).

Zahájení infekce započne při kontaktu S proteinu s povrchovým hostitelským receptorem. Tímto receptorem je **ACE2** (angiotenzin konvertující enzym 2), se kterým interaguje RBD struktura na S1 podjednotce virového S proteinu. ACE2 umožní navázání virionu a fúzi membrán a je tvořen v mnoha tkáních včetně pneumocytů v plicích, kde je často infekce lokalizována (Hofmann *et al.*, 2004). V S proteinu se nachází důležité struktury potřebné k fúzi. Jsou to dvě HR oblasti (HR1, HR2) fúzního peptidu. Tyto domény se nachází mezi fúzním peptidem a transmembránovou doménou S2 subjednotky. Během počáteční fáze fúze dochází k vložení fúzního peptidu do cílové buněčné membrány, dále se HR2 složí k HR1 a vytvoří se šesti – helixová struktura, která umožní přiblížení virového obalu a hostitelské membrány. Vlivem toho dojde ke spuštění samotné fúze membrán. Aktivace fúze může probíhat dvěma způsoby. Navázání na receptor aktivuje přímo fúzi membrán nebo v druhém případě

po vazbě následuje internalizace virových partikulí do endosomů. Zde dochází k fúzi membrány pomocí glykoproteinů. U SARS-CoV-2 nízké pH vyvolává fúzní aktivitu S proteinu, ale nízké pH není nutné a fúze může proběhnout i bez něj. Poté nastává uvolnění RNA genomu do cytoplasmy. Replikace i exprese sgRNA vyžadují replikační transkripci a produkci -RNA intermediátů. Prvním krokem je replikace RNA + vlákna na RNA – vlákno. Následovně toto vlákno je využito pro replikaci dalšího +RNA vlákna pro uspořádání nového virionu nebo pro transkripci subgenových mRNA, z kterých potom dochází k syntéze virových strukturních proteinů. Prvá fáze replikace začíná expresí časných genů *ORF1a* a *ORF1b* (případně *ORF1ab*) kódujících nestrukturní proteiny přímo z +RNA genomu. Vzniká kratší polyprotein pp1a a delší pp1ab z ORF1a a ORF1ab. Zde je uplatněn **frameshift** neboli posun čtecího rámce. Ribosomy „uklouznou“ o 1 nukleotid na kluzké sekvenci, která se nachází před stop kodonem ORF1a, a to vede k syntéze dvou **polypeptidů**. Nejprve dochází k syntéze RNA dependentní RNA polymerázy (RdRp, Nsp12) a dalších nestrukturních proteinů, které jsou pro následnou transkripci a replikaci genomu nezbytné (Zawilska *et al.*, 2021). V dalším kroku jsou polyproteiny štěpeny na kratší funkční úseky pomocí cysteinových papain-like a chymotrypsin-like Nsp3 a Nsp5 proteáz. Z kratšího pp1a vzniká 11 nestrukturních proteinů a z pp1ab vzniká 16 nestrukturních proteinů. Po expresi časných genů je virus vybaven na to, aby mohl ovládat buňku hostitele a modifikovat jeho organely a mašinerie pro vlastní replikaci a může začít překlad subgenových mRNA za vzniku strukturních proteinů (Long, 2021). V dalším kroku se uplatňují funkce Nsp 3, 4 a 6 při reorganizaci hostitelských membrán.

Virus si z ER nebo GA **reorganizuje „virové organely“** aby si oddělil replikační kroky a ochránil produkty před imunitním systémem hostitele. Organely se nazývají „replikační organely“ (ROs). Tvorba replikačních organel začne hned po expresi časných *Nsp* genů. Transmembránové nestrukturní proteiny se hromadí v membránách ER a započínají modifikace v perinukleárním prostoru buňky. Replikace i transkripce jsou spojeny s tvorbou dvojité membránové vakuoly (DMVs) a membránových struktur „convolute membrane“ (CMs) z ER. DMs obsahují dsRNA, která je intermediátem při genomové replikaci (Mohan *et al.*, 2021). Dále dochází ke vzniku vzájemně propojených sítí membrán. To umožňuje strukturám bez čepičky skrýt se před vrozenou imunitou hostitele (Knoops *et al.*, 2008).

Po 1 až 2 hodinách od infekce buňky jsou k vidění první DMVs. Až poté se formují CMs. Během 4 hodin DMVs zvětšují své počty a následně dochází k tvorbě sítě DMV-CM-ER, ke které se na konec připojí i GA. Mezi 5. a 7. hodinou po infekci jsou vidět nové pučící viriony v Golgiho cisternách. Po 7. hodině je ke spatření již kolem 300 DMVs. Ty se spojují až vznikne velká propojená síť s ERGIC; retikulovesikulární síť. (Knoops *et al.*, 2010). Až po 10. hodině od infekce se objevují nové viriony, které pučí z nově modifikovaného lumen systému ERGIC (Doyle *et al.*, 2019). Vyřazením Nsp3 a Nsp4 se snižuje tvorba retikulovesikulárních sítí a replikace viru.

Dále bylo zjištěno, že Nsp3 tvoří pór v DMVs a tím se otevírá do cytosolu. Má RNA vazebnou funkci, ale sám nemá funkci katalytickou. Špatně vytvořené transkripty tak nejsou exportovány, ale jsou ponechány v DMVs kvůli limitaci velikosti póru (Hypotéza póru) (Wolff *et al.*, 2020).

**Replikačně transkripční komplex** se skládá z Nsp12 (RdRp), faktorů procesivity Nsp 7 a Nsp 8, replikační proofreading 3'-5' endonukleázy Nsp14 (tvoří komplex s Nsp10), helikázy Nsp13 (odvíjí dsRNA), Nsp9 (chrání ss oblasti RNA) a metylázy Nsp16 (podílí se na vytvoření Cap struktury). Kromě virových produktů jej tvoří i hostitelské faktory.

Transkripce polymerázou Nsp12 není přesná a kvůli tomu jsou potřebné opravné mechanismy zajišťované pomocí Nsp14. Tím je následně dosaženo potřebné přesnosti. Díky proofreadingové aktivitě koronaviry mutují méně (Moeller *et al.*, 2021). Transkripce je **diskontinuální proces** mezi RNA viry. Během syntézy negativně polarizovaného (-) vlákna se polymerázový replikační komplex pozastavuje/terminuje na specifických místech podél genomu nazývaných transkripční regulační sekvence (TRS) (Fehr *et al.*, 2015). TRS jsou přítomny po směru od společné vedoucí sekvence na 5'konci (TRS-L; leader) a na 5'konci každého virového ORF v těle genomu (TRS-B; body) na nově syntetizovaném (-) řetězci. TRS-L umožňuje transkripčnímu komplexu přepínat templát a účinně přeskakovat z daného TRS-B na TRS-L na 5'konci. Transkripce pak pokračuje a kopíruje leader sekvenci k dokončení negativního řetězce (transkripce sgRNA vláken se nezastaví, dokud RdRp nedosáhne poslední TRS u leader sekvence na 5'konci). Diskontinuální transkripce je jedním z mechanismů mutagenese. Při koinfekci buňky dvěma různými koronaviry může dojít k přeskočení RdRp z TRS jednoho genomu na TRS genomu druhého a tím dochází k **rekombinaci**. Negativní řetězce plné genomové délky i subgenomové (-)RNA slouží jako templáty pro kontinuální syntézu nových +ssRNA genomů a subgenomových mRNA (Zawilska *et al.*, 2021). **Subgenomové mRNA** tedy vznikají diskontinuálním procesem z původního genomu přeskoky mezi TRS oblastmi. Nově vzniklá subgenomová mRNA dává poté vznik strukturálním a doplňkovým proteinům. Všechny tyto mRNA mají na začátku 5'konci leader sekvenci z původního genomu a na 3'konci jsou polyadenylovány (Long, 2021). Všechny RNA genomu jsou chráněny **čepičkou** na 5'konci. To zajišťuje Nsp14 N7 cap metyltransferáza. Čepička zajišťuje stabilitu a správnou translaci a chrání před degradací hostitelskými nukleázami (Tagliabracci *et al.*, 2022). Translace RNA kódující N protein probíhá v cytoplasmě. N protein poté obklopuje nově vzniklé +RNA vlákno a dojde k formování nukleokapsid, které se shromažďují v intermediárním kompartmentu ER a GK – v ERGIC. Proteiny S, M, a E jsou kotranslačně ukládány do membrán ER a sekreční dráhou dopraveny do oblasti ERGIC a následně jsou umístěny do membrány nových virionů.

**Nový virion** se skládá z +ssRNA genomu obaleného nukleokapsidou a obsahuje na povrchu strukturální proteiny S, M a E. Takto zformované viriony jsou sbaleny do Golgiho váčků, které poté fúzíjí s plasmatickou membránou a jsou **exocytovány ven** z buňky.

**Tabulka 5:** Fáze replikačního cyklu SARS-CoV-2.

1	Vazba na receptor
2	Fúze membrán
3	Fúze membrán – endosom
4	Transport genomu viru do cytoplasmy
5	Translace virové RNA, exprese nestrukturních proteinů z polyproteinů pp1a a pp1ab. Migrace Nsp3 do ER, vznik RdRp (Nsp12)
6	Reorganizace membrán pomocí Nsp3, Nsp4 a Nsp6
7	Syntéza strukturních proteinů, postranlační modifikace v ER a GA; replikace genomů
8	Formování nukleokapsidy
9	Lipidové obaly obsahující proteiny S, M, E
10	Maturace virionů pučících z ERGIGu
11	Exocytóza virionu z hostitelské buňky

## 5 Rozpoznávání SARS-CoV-2 vrozeným imunitním systémem

Odpověď vrozeného imunitního systému předchází reakci systému adaptivního. Tudíž pro rozvinutí adekvátní imunitní reakce rozhoduje již první odpověď vrozené imunity. Tato odpověď je zprostředkována několika efektorovými buňkami. Patří mezi ně například makrofágy, epitelové buňky nebo buňky dendritické. K jejich funkcím se řadí rozeznávání **PAMPs** (Pathogen associated molecular patterns, molekulární vzory asociované s patogeny) a **DAMPs** (Damage associated molecular patterns, molekulární vzory asociované s poškozením). Příkladem PAMP může být virová ssRNA. Mezi příklady DAMP může zařadit alarminy jako extracelulární ATP. Tyto molekuly jsou typické pro patogeny a jsou rozeznávány pomocí receptorů pro molekulární vzory neboli **PRRs** (Pattern recognition receptors). Receptory pro molekulární vzory rozdělujeme do dvou podskupin: vázané na membránu (příkladem jsou TLRs) a cytoplazmatické (příkladem RIG-I-like receptor).

### 5.1 TLRs (Toll-like receptory)

TLRs mohou být buď na plazmatické membráně buňky nebo součástí membrány endosomu. V lidském organismu se vyskytuje takovýchto receptorů 10 typů a odlišují se typem ligandu (Lester *et al.*, 2014). Jsou jimi TLR1 až TLR10. Mezi důležité ve spojitosti se SARS-CoV-2 se řadí TLR2, TLR3, TLR4 a TLR7.

**Tabulka 6:** Ligandy a odpověď TLRs významných pro SARS-CoV-2. TLR2 (Zheng *et al.*, 2021), TLR3 (Christopher *et al.*, 2011), TLR4 (Choudhury *et al.*, 2020), TLR7 (Bortolotti *et al.*, 2021).

Toll-like receptor	Ligand	Indukce odpovědi
TLR2	S protein, E protein	IFN typu 1 a 3
TLR3	dsRNA	IFN typu 1 a 3
TLR4	S protein	IFN typu 1 a 3
TLR7	ssRNA	IFN typu 1 a 3

Zajímavostí u TLR7 je, že gen pro něj se nachází na chromozomu X, a tudíž může jeho exprese hrát roli při pohlavních rozdílech v závažnosti onemocnění Covid-19. Muži mají dvakrát vyšší pravděpodobnost vzniku respiračního selhání v této souvislosti (Klein *et al.*, 2020).

Leukocyty vrozeného imunitního systému zahrnující neutrofile, monocyty a NK buňky jsou závislé na **TLR signalizaci**; aby mohly lokalizovat místo infekce a začít cílit na virus.

Interakce Toll-like receptoru se specifickým PAMP vytváří signál zprostředkovaný přes TIR-doménu a adaptorovou molekulu MyD88, TIRAP nebo molekulu TRIF.

Dráha závislá na **MyD88** je spuštěna pomocí TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, a TLR9. Následně dochází k zapojení molekuly IRAK4, na kterou se váží další molekuly, a to IRAK1 a IRAK2. Tím dochází k vytvoření signalizačního komplexu, který interaguje s TRAF6. Po navázání dochází k aktivaci TAK1 molekuly a spouští se produkce prozánětlivých cytokinů.

Molekula **TIRAP** zde slouží jako zprostředkovatel mezi TIR doménou TLR a MyD88.

Navázáním ligandu na TLR3 a TLR4 dochází k zapojení molekuly **TRIF**. V případě této aktivace dojde k zúčastnění molekuly IRF3 a v pozdní fázi molekuly NFκB. Výsledkem je indukce interferonu prvního typu (IFN typu 1; alfa a beta).

## 5.2 RLRs (Rig-I-like receptory)

Jedná se o intracelulární receptory, které rozpoznávají virovou ssRNA nebo dsRNA (nejvíce krátké dsRNA s odhalenými 5' konci) (Yang *et al.*, 2021). Pokud buňka není infikována, nacházejí se v inaktivované formě – jejich CARD domény jsou maskovány interakcí s CTD. Po vazbě RNA dochází ke konformační změně, kdy CARD domény přestávají být nedostupné pro signalizaci. V aktivním stavu interagují s CARD doménami MAVS, které se nacházejí na vnější straně mitochondrií. Dochází k formování shluků MAVS a TRAF3 a poté je rekrutován komplex IKKε/TBK1. To spouští aktivaci IRF3 a IRF7, což indukuje IFN typu 1 a 3. Interferon typu 1 váže IFN1 receptory

na povrchu buněk. Dále dochází k aktivaci Jak-Stat signalizace vedoucí ke stimulaci mnoha ISGs (IFN stimulované geny) a dochází ke znásobení IFN odpovědi. Celý tento proces je příčinou smrti infikované buňky a aktivace antigen-specifické odpovědi. Virus SARS-CoV-2 může být inhibován i jiným mechanismem RIG1; využití C – koncové domény (Yamada *et al.*, 2021). **MDA5** patří mezi RIG-I-like receptory a rozpoznává dlouhé dsRNA.

Vrozený neboli nespecifický imunitní systém je evolučně starší než systém adaptivní. Jeho hlavní vlastností je, že pracuje pohotově, ale nemá paměť. Mezi obranu vrozeného imunitního systému tedy můžeme řadit buněčné složky jako neutrofily, makrofágy, dendritické buňky, žírné buňky, NK buňky nebo basofily. Do složky humorální řadíme například komplement a interferony.

Shrnutím lze konstatovat, že po rozeznání molekuly specifické pro SARS-CoV-2 dochází k mechanismům vedoucím ke spuštění interferonové odpovědi a tím navození antivirového stavu buněk.

## 6 Únikové mechanismy před virem SARS-CoV-2

Při virové infekci se nejdříve uplatňuje vrozený imunitní systém jako první linie obrany. Poté následuje obrana adaptivního imunitního systému závislá na předchozí reakci vrozené imunity. Neadaptivní obrana zahrnuje fyzikální bariéry jako kůže, slzy a slizniční sekrety nebo žaludeční kyseliny. Dalšími složkami jsou makrofágy, NK buňky, dendritické buňky, interferony a cytokiny. Například plíce jsou často vystaveny virům a první linií obranou je zde vrstva hlenu, epitelové buňky, makrofágy a dendritické buňky. Pokud virus projde přes tyto bariéry, snaží se ho rozpoznat PRRs, které jsou také součástí vrozené imunity. Po tomto rozeznání může nastat adekvátní reakce organismu, například produkce interferonů 1. typu. To se ovšem virus snaží obejít a nechce být rozpoznán, a tak vznikají únikové mechanismy před neadaptivní imunitou hostitele, které viru zvyšují šanci na replikaci, šíření a infekci dalších hostitelů. Virus SARS-CoV-2 obchází vrozený imunitní systém mnohými cestami a různými mechanismy. Tím, že je virus pro lidský organismus novým patogenem, je náš imunitní systém méně schopen rozeznat infekci a tím viru umožňuje jednodušší šíření, působení onemocnění a v některých případech i letalitu. Mezi hlavní mechanismy, jak se virus vyhýbá lidské vrozené imunitě patří dysregulace IFN produkce, ovlivnění funkce dendritických buněk, makrofágů, NK buněk, neutrofilů, inhibice NLRP3 inflamasomu a obcházení PRRs. Ne všechny mechanismy jsou zcela objasněny a ne všechny objeveny.

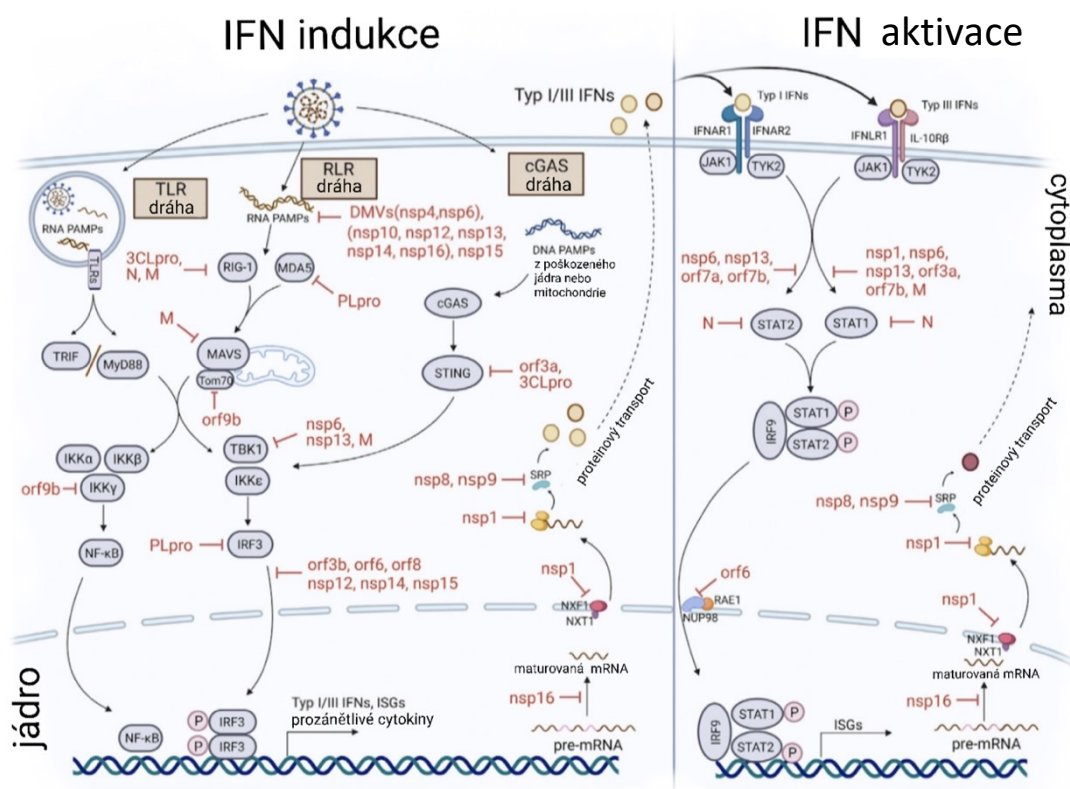
### 6.1 Narušení interferonové produkce

Vrozený imunitní systém je v časných fázích infekce důležitý pro její kontrolu. Jakmile hostitelské buňky rozpoznají patogen tak spouštějí signální kaskády vedoucí k transkripci interferonů 1. a 3. typu. Tato obrana je nezbytná v boji se SARS-CoV-2 a pokud virus naruší tuto signalizaci, vznikají případy se závažným průběhem nemoci. Hlavním znakem je pak nízká produkce IFN gama (Chen *et al.*, 2020).

Signalizace IFN typu 1 je nutná pro nábor imunitních buněk do plic a ISG expresi. Naopak není hlavní příčinou vyčištění buňky od viru a nezabrání virové replikaci. Hlavním mechanismem, který způsobuje vysokou patogenitu je tedy narušení IFN signalizace.

### Inhibice IFN produkce

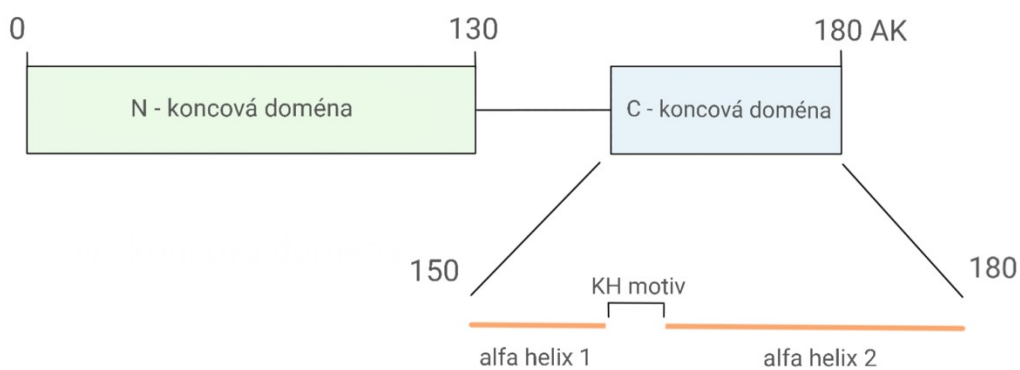
Rozpoznávání PAMPs vyvolá produkci IFN typu 1 a 3, kterou virus blokuje. Omezení interferonové signalizace vede k zhoršení průběhu onemocnění Covid-19. Se zvláště vážným průběhem je spojena nízká produkce IFN gama (Chen *et al.*, 2020). Při replikaci vzniká dsRNA, která je rozeznávána hostitelem. Tomu se SARS-CoV-2 vyhýbá tvorbou DMVs a propojení membránových struktur, kde intermediáty před hostitelem schová. Dále využívá endonukleázu k blokaci rozpoznávání dsRNA pomocí MDA5 (Min *et al.*, 2021). Tím dochází k snížené produkci IFN alfa nebo beta. Virus umí inhibovat molekuly, které jsou součástí signálních drah IFNů. Možným terčem je molekula IRF3, což způsobí dysregulaci nebo nefunkčnost dráhy. Opožděné signalizace vedou k vysoké replikaci viru v plicích v časných stádiích.



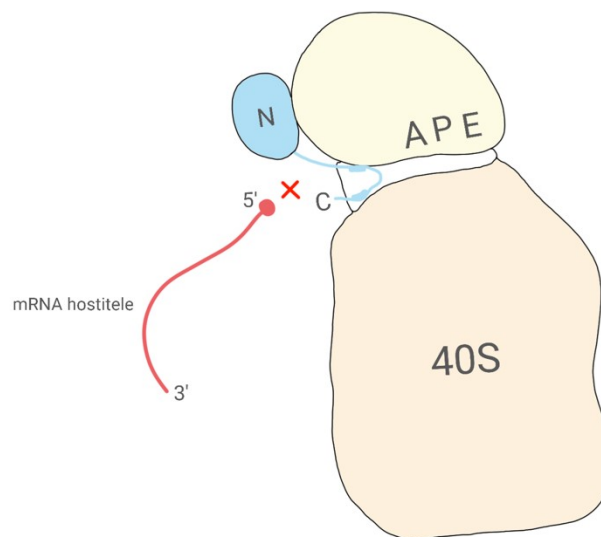
**Obrázek 5:** Interferonový systém hostitele a shrnutí antagonismu SARS-CoV-2 ve dvou fázích; IFN indukce a IFN aktivace (upraveno podle Min *et al.*, 2021).

### 6.1.1 Nsp1

Nestrukturní protein 1 tlumí translaci hostitelských proteinů vlivem interakce s 40S podjednotkou ribosomu a blokáci vstupního kanálu pro mRNA hostitele (Obrázek 7). Dále inhibuje formování 80S struktury. Interakce probíhá za pomoci Lys164 – His165 dipeptidového motivu na Nsp1. C – terminální konec Nsp1 se skládá do dvou helixů a ty se vkládají do vstupního kanálu pro mRNA. První helix tvoří hydrofobní interakce s 40S proteiny uS3 a uS5. Druhý helix interaguje se eS30 proteinem ribosomu a helixem h18 18S rRNA. Mezi těmito helixy je KH dipeptid a formuje vazby s h18. Tyto popsané struktury jsou zobrazeny v Obrázku 6. Dále probíhají elektrostatické interakce mezi K164 a bázemi rRNA G625 a U630 (Schubert *et al.*, 2020).



**Obrázek 6:** Struktura Nsp1 o délce 180 aminokyselin (vytvořeno pro tuto práci, upraveno podle Simeoni *et al.*, 2021).



**Obrázek 7:** Hostitelský ribosom a jeho vstupní kanál pro mRNA blokováný helixy C – koncové domény Nsp1(modře) (vytvořeno pro tuto práci, upraveno podle Simeoni *et al.*, 2021).

Pokud virus chce translatovat vlastní proteiny, musí tuto blokaci ve vstupním kanálu obejít. To uskutečňuje pomocí interakce s N – koncovou doménou Nsp1. K tomu je důležitá 5'UTR virové mRNA, která interakci zprostředkovává (Thoms *et al.*, 2020).

Další funkcí Nsp1 je schopnost odstranit hostitelské mRNA její čepičku na 5'konci a tím zajistit její degradaci. Virus přepíná translaci ve svůj prospěch, ale jeho cílem není vypnout hostitelskou translaci úplně, protože potřebuje některé hostitelské faktory a proteiny k vlastní replikaci. Autoregulační vlastnost Nsp1 zajišťuje tuto optimální bilanci mezi translacemi virových a hostitelských proteinů (Schubert *et al.*, 2020). Inhibicí globální translace hostitelských proteinů tlumí syntézu i IFN – stimulovaných proteinů důležitých pro obranu hostitelské buňky proti viru. Dále blokuje IFN signalizaci. Nsp1 společně s Nsp13 snižuje množství vzniku kaspázy-1 a interleukinu (IL)-1beta mRNAs. Tlumení hostitelské translace tedy vede i k inhibici kaspázy a jejímu rozložení na podjednotky p20. Proteiny jsou antagonisté NLRP3 inflamasomu, který aktivuje kaspázu-1, a ta konvertuje neaktivní formy interleukinů na formy aktivní; například IL-1beta. Nsp1 a Nsp13 tedy inhibují aktivaci inflamasomu pomocí inhibice aktivity kaspázy-1 (Kim *et al.*, 2021).

### 6.1.2 Nsp3

Je to papain-like proteáza (PL<sup>pro</sup>) a štěpí Nsp1 až Nsp4 z nově vznikajícího polyproteinu. Pomocí inaktivace částí signálních drah (RIG-I, STING, TBK1, IRF3, TRAF3/TRAF6) inhibuje IFN odpověď hostitele a také umí tlumit funkci p53 (Ma-Lauer *et al.*, 2016) (Moustaqil *et al.*, 2021).

Způsobuje antagonismus ISG15-dependentní MDA5 signalizace; Nsp3 blokuje MDA5 signalizaci skrze de-ISGylaci. Tímto způsobem nedochází k produkci IFN a virus se vyhne imunitní reakci hostitele. Nsp3 aktivuje NLRP3 signalizaci.

### 6.1.3 Nsp5

Nsp5 je hlavní proteáza viru SARS-CoV-2. Může se označovat také jako M<sup>pro</sup> nebo 3CL<sup>pro</sup>. Inhibuje fosforylaci TBK1 a IRF3 a tím blokuje signalizaci IFN 1. typu (Wu *et al.*, 2020).

Interakce viru s RIG-I je následovná; RIG-I po rozpoznání virové RNA prochází K63-linked polyubikvitinací zprostředkovanou molekulou TRIM25. Poté je obnovena aktivní forma RIG-I pomocí uvolnění CARD domén. Nsp5 působí tlumivě právě na K63 polyubikvitinaci a touto interakcí způsobí ovlivnění produkce interferonů. INF1 se po sekreci váže na IFN receptory a vznikne transkripce ISGs skrze STAT (signal transducer and activator of transcription factors) protein a nastane antivirový stav v buňce hostitele. Nsp5 interaguje se STAT1 a podněcuje jeho degradaci; ovlivňuje Jak-Stat signalizaci.

#### 6.1.4 Nsp6

Protein Nsp6 inhibuje fosforylaci IRF3 a váže se na TBK1 bez ovlivnění jeho fosforylace. Interakce TBK1-Nsp6 ale snižuje fosforylaci IRF3, což vede ke snížené produkci interferonu beta (Xia *et al.*, 2020).

#### 6.1.5 Nsp7

Protein Nsp7 inhibuje signalizaci IFN alfa (Xia *et al.*, 2020). Další studie nebyly dohledány, ale v budoucnu jistě bude probádán detailní mechanismus tohoto nestrukturního proteinu; studie mohou probíhat a být nedokončené, ale to mi není známo.

#### 6.1.6 Nsp8, Nsp9

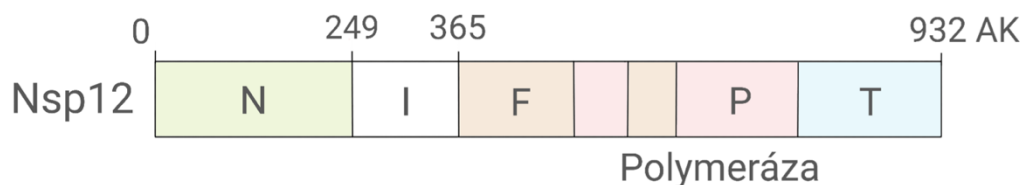
Tyto proteiny se váží na S doménu 7SL SRP. SRP je komplex vázající 80S ribozom a čte vznikající peptidy a hledá signální peptidy. Pokud je najde umožní translokaci ribosomu do ER k zajištění správného transportu proteinu k buněčné membráně. Nsp8 interaguje s 7SL v oblasti, kde se váže SRP54 (protein zodpovědný za rozpoznání signálního peptidu, vazby na receptor pro SRP a ribozomovou translokaci). Nsp9 se na 7SL váže na oblast, která obsahuje SRP19 protein důležitý pro složení SRP. Oba nestrukturní proteiny se váží na kotranslační SRP komplex. Vazbou na SRP znemožňují jeho funkci a inhibují membránový proteinový transport v infikované buňce. Narušením proteinového transportu dochází k útlumu IFN odpovědi hostitele, jelikož sekrece interferonů je závislá na SRP komplexu pro jejich správnou sekreci (Banerjee *et al.*, 2020).

#### 6.1.7 Nsp10, Nsp16

Nsp16 je nestabilní protein, který v komplexu s Nsp10 tvoří heterodimer. Nsp10 stimuluje enzymatickou aktivitu proteinu Nsp16 následovně; komplex Nsp16 s Nsp10 přeměňuje strukturu čepičky typu Cap-0 na strukturu Cap-1. To se odehrává pomocí metylace ribózy 2'-O prvního nukleotidu mRNA viru, kterým většinou bývá adenosin. K tomu využívá komplex S-adenosyl methionin (SAM) jako donor methylu. Interakce Nsp10 a Nsp16 vede ke stabilizaci SAM vazebného místa, které se nachází v core oblasti proteinu Nsp16. Core je centrální katalytická oblast s 2'-O-MTázovou funkcí (Viswanathan *et al.*, 2020). Vytváří se čepička: Probíhá spolupráce mezi Nsp13, RNA/NTP trifosfatázou, helikázou; Nsp14, 3'-5' exonukleázou, mRNA cap guanin-N7 metyltransferázou; Nsp16, cap ribózou 2'-O metyltransferázou, guanylyl tranferázou (Chen *et al.*, 2011). Nsp10 společně s Nsp16 metylují 5' konec virové mRNA a napodobují tak hostitelskou mRNA. **Formováním čepičky** typu 1 u virové RNA umožní proteiny vyhnout se hostitelskému imunitnímu systému pomocí **zabránění rozpoznání virové mRNA v hostitelské dráze RIG-I a MDA5 (RLR)**. Nsp16 interaguje s U1 a U2 snRNAs (spliceosom). Při virové infekci se lokalizuje do jádra buňky a přerušuje splicing (vystřihování intronů) nově transkribovaných genů. Tím tlumí celkovou produkci proteinů v buňce. Transkripty většiny genů stimulovaných interferonem jsou sestřihány; proto Nsp16 má takto vliv na IFN odpověď hostitele (Banerjee *et al.*, 2020).

### 6.1.8 Nsp12

Protein Nsp12 se skládá z 932 aminokyselin. Obsahuje doménu NiRAN (nidovirus RdRp – asociovaná nukleotidyltransferáza) (Gao *et al.*, 2020) o velikosti 249 AK. NiRAN je spojena pomocí interfázové domény s RdRp-doménou, která se nachází mezi 249. a 365. aminokyselinou.



**Obrázek 8:** Struktura Nsp12. N = NiRAN doména, I = interfázová doména, F = „fingers“ prsty polymerázy, P = „palm“ dlaň polymerázy, T = „thumb“ palec polymerázy (vytvořeno pro tuto práci, upraveno podle Wang *et al.*, 2021).

Od aminokyseliny 365 do konce proteinu se nachází RdRp doména. Polymeráza se skládá z prstů, dlaně a palce (přirovnáno k lidské ruce kvůli podobnosti, zobrazeno v Obrázku 9).



**Obrázek 9:** Podobnost polymerázy s lidskou rukou. F = prsty, P = dlaň, T = palec (vytvořeno pro tuto práci, upraveno podle Beard *et al.*, 2003).

Nsp12 je schopna ovlivňovat produkci interferonů typu 1 pomocí inhibice translokace molekuly IRF3 do jádra buňky. Společně s Nsp7 a Nsp8 formuje Nsp12 polymerázový komplex. Bylo zjištěno, že tyto faktory se neúčastní inhibice interferonové produkce. Doména NiRAN byla v této souvislosti také vyloučena jako spoluúčastník. Nsp12 se tedy podílí na inhibici IFN samostatně bez účasti dalších faktorů. Také bylo vyloučeno působení na fosforylaci IRF3 (Wang *et al.*, 2021). Mechanismus inhibice translokace molekuly IRF3 do jádra zůstává ale zatím neobjasněn. Může vyvolat aktivaci RIPK1 a nasměrovat organismus k systémové zánětlivé odpovědi – cytokinová bouře, která může vyústit až ve smrt organismu.

### 6.1.9 Nsp13

Výsledky studie (Vazquez *et al.*, 2021) naznačují, že Nsp13 se váže a inhibuje fosforylaci kinázy TBK1, která je schopna zprostředkovávat signalizaci skrze fosforylaci molekul IRF3 a NF- $\kappa$ B (Xia *et al.*, 2020). Tyto molekuly v důsledku toho nejsou aktivovány a nemohou se translokovat do jádra hostitelské buňky a zprostředkovat produkci interferonů. Další molekulou, které Nsp13 zabraňuje v aktivaci je STAT1 (STAT2) (Xia *et al.*, 2020) a výsledkem je opět neúspěšná produkce IFN beta.

### 6.1.10 Nsp14

Protein Nsp14 má 3'-5' exoribonukleázovou (ExoN) aktivitu a guanin-N7-metyltransferázovou aktivitu. Na N – terminálním konci je ExoN doména, která má schopnost proofreadingu a opravuje špatně přiřazené nukleotidy virovou RdRp (Ferron *et al.*, 2017). C – terminální doména obsahuje SAM-závislou N7-metyltransferázu. Nsp14 formuje komplex spolu s Nsp10. Nsp10 interaguje s ExoN doménou a tím zvyšuje její aktivitu. Další funkcí je schopnost tlumení hostitelské proteosyntézy. Vytvořením komplexu Nsp14-Nsp10 se zvýší inhibice translace proteinem Nsp14. Tato blokáce translace vede k inhibici indukce ISG závislé na IFN vedoucí k útlumu produkce antivirových proteinů. V porovnání, Nsp14 má vyšší schopnost inhibice hostitelské translace (75%) než protein Nsp1 (50%) (Thoms *et al.*, 2020). Expres Nsp14 způsobí tlumení produkce jak IFN beta tak i IFN stimulovaných genů (ISG) (Yuen *et al.*, 2020). Inhibuje syntézu antivirových proteinů viperin, TRIM21, ISG15. Tlumí fungování ISGs v rozpoznávání virové RNA pomocí RIG-I, MDA5, STING.

### 6.1.11 Nsp15

Protein Nsp15 je uridin specifická endoribonukleáza (uridin je nukleosid složený z uracilu a ribózy spojených beta-N<sub>1</sub>-glykosidickou vazbou), která má enzymatickou aktivitu na svých C – koncových (EndoU) doménách (Ricagno *et al.*, 2006). Na Nsp15 je aktivní místo sloužící k rozpoznávání následně štěpené virové RNA. Toto místo se skládá z triád (His, His, Lys) s katalytickou funkcí. SARS-CoV-2 využívá Nsp15 ke štěpení své RNA, konkrétně PUN (polyuridin) RNA, kterou Nsp15 přednostně štěpí mezi sekvencemi U-A a C-A. Štěpení PUN RNA je důležité proto, že PUN RNA umí spouštět aktivitu MDA5, která by vedla k interferonové odpovědi a aktivaci imunitního systému hostitele (Frazier *et al.*, 2021). Aktivita proteinu je tedy důležitá pro zabránění aktivace dsRNA senzorů hostitele a tím zabránění antivirové odpovědi na virus v hostitelské buňce. Nsp15 ale umí štěpit celou řadu substrátů mimo PUN RNA jako například TRS. Dalšími interakcemi s molekulou RNF41 (E3 ligáza spojená s aktivací IRF3) ovlivňuje produkci interferonů 1. typu. Mechanismus této inhibice ale zůstává zatím neobjasněn (Xia *et al.*, 2020).

### 6.1.12 ORF3a

ORF3a interaguje spolu s cGAS-STING za jeho inhibice, která způsobí blokádu translokace NF- $\kappa$ B do jádra a tím se sníží produkce interferonů (Rui *et al.*, 2021). Naopak inhibice rozpoznávání RIG-I se protein neúčastní. Dále je protein schopen vázat molekulu TRIM59 a inhibovat STAT1 fosforylaci

(Gordon *et al.*, 2020). Tyto interakce vedou také k inhibici interferonové odpovědi a jejich mechanismy dosud nejsou objasněny. Podpůrný protein je spojen s virulencí a patogenitou působením aktivace inflamazomu.

### **6.1.13 ORF3b**

Skládá se z pouhých 22 aminokyselin, 69 bp. Pro srovnání u SARS-CoV-1 se tento protein skládá z 465bp a na C – terminálním konci má NSL (jaderný lokalizační signál), který SARS-CoV-2 na svém ORF3b nemá (Yuan *et al.*, 2010). Funguje jako antagonist IFN odpovědi tak, že inhibuje translokaci IRF3 do jádra. Bylo zjištěno, že pokud se vytvoří delší deriváty proteinu (57, 79, 119 AK) vedou k vyšší anti-IRF-1 aktivitě než WT SARS-CoV-2 ORF3b (Konno *et al.*, 2020). Délka tedy ovlivňuje jeho schopnost tlumit interferonové odpovědi hostitele. Ztrátou stop kodonů může dojít k vytvoření takových variant, kdy mají vyšší schopnost antagonismu vůči produkci interferonů.

### **6.1.14 ORF6**

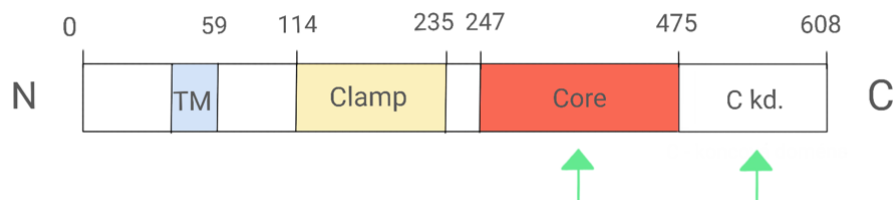
Je to malý protein o velikosti přibližně 7 kDa (Yuen *et al.*, 2020). Blokuje translokaci do jádra molekuly IRF3 pomocí vazby KPNA2, což je důležitý faktor pro přesuny molekul do jádra. Interferuje s IFNAR signalizací pomocí vazby KPNA2 a KPNA1 na ER nebo GA. Tím blokuje import STAT1 do jádra (Frieman *et al.*, 2007). Při zvýšené expresi ORF6 tedy dochází k zabránění RIG-I rozpoznání a útlumu produkce interferonů blokací IFN signalizačních drah (Yuen *et al.*, 2020). ORF6 se dále nachází na NPC (jaderný pórový komplex) a váže se na Nup98-Rae1 komplex pomocí C – terminální domény. Touto vazbou dochází k jeho inhibici. Nup98 je periferní nukleoporin z obou stran NPC (Gordon *et al.*, 2020). Interakcí s komplexem Nup98 a ORF6 dochází k blokaci jaderné translokace molekuly STAT1 a proces vede ke snížené produkci interferonů (Miorin *et al.*, 2020).

### **6.1.15 ORF7a, ORF7b**

Je pravděpodobné, že SARS-CoV-2 zneužívá ubikvitinový systém hostitele ke svému prospěchu a to působením proti IFN odpovědi (Xia *et al.*, 2020). ORF7a je posttranslačně ubikvitinován, což zvyšuje schopnost inhibice interferonové signalizace skrze fosforylaci STAT2. Ubikvitinovanými místy je sedm Lys zbytků. Ubikvitinace na K119 zbytku je důležitá pro optimální antagonismus interferonové signalizace. Nejčastějším zbytkem pro formaci ubikvitinového řetězce je K63. Dalšími virovými proteiny, které jsou ubikvitinovány jsou ORF3a a Nsp13 (Cao *et al.*, 2021). ORF7b inhibuje fosforylaci STAT2 a působí také proti interferonové odpovědi (Xia *et al.*, 2020).

### 6.1.16 ORF9b

Aktivaci dráhy rozpoznávání virové RNA pomocí RIG-I nebo MDA5 může být aktivován i adaptorový protein nacházející se na vnější membráně mitochondrií; TOM70. Při aktivaci se spouští produkce interferonu beta. Protein ORF9b cílí na TOM70 a interakce probíhá v částí core a C – koncové domény tohoto proteinu. Bylo zjištěno (Jiang *et al.*, 2020), že dalších částí v TOM70 není k interakci potřeba.



**Obrázek 10:** Struktura TOM70. N = N – terminální konec, C = C – terminální konec, C kd. = C – koncová doména. Šipky naznačují, že tyto části se účastní interakce s virovým ORF9b (vytvořeno pro tuto práci, upraveno podle Jiang *et al.*, 2020).

Mechanismus inhibice produkce IFN typu 1 vlivem ORF9b:

TOM70 interaguje s molekulou HSP90, která má také roli v interferonové odpovědi. ORF9b soupeří s HSP90 o vazbu na TOM70. Jelikož má TOM70 vliv na metabolismus mitochondrie, dochází při abnormální funkci tohoto proteinu k laktátové acidóze. Interakce ORF9b-TOM70 vede k produkci kyseliny mléčné, která má inhibiční účinek na produkci právě interferonu 1. typu (Zhang *et al.*, 2019). Tím tedy virový ORF9b ovlivňuje hostitelskou odpověď a imunitní systém nebude dostatečně aktivován a virus se mu vyhne.

### 6.1.17 M protein

Protein snižuje vazebnou schopnost molekul TBK1-TRAF3, RIG-I-MAVS a MAVS-TBK1. Tím ovlivňuje formování multiproteinového komplexu RIG-I-MAVS-TRAF3-TBK1. Dále snižuje fosforylaci IRF3 a brání tím jeho translokaci do jádra. Ve výsledku inhibuje produkci IFN typu 1 i 3 (Zheng *et al.*, 2020).

### 6.1.18 N protein

Inhibuje produkci IFN pomocí cílení na RIG-I. Inhibuje fosforylaci IRF3 a jadernou translokaci. RIG-I má tři domény; CARD, DExD/H, RD. Bylo zjištěno (Chen *et al.*, 2021), že vazebnou doménou pro N protein je právě DExD/H doména. S ostatními dvěma protein nereguluje.

**Tabulka 7:** Shrnutí funkcí proteinů viru podílejících se na interakci s vrozenou imunitou (reference k jednotlivým proteinům v textu, upraveno podle Beyer *et al.*, 2022).

<b>Protein</b>	<b>Funkce</b>
Nsp1	Vypíná hostitelskou translaci mRNA, interakce s podjednotkou ribosomu, NXF1
Nsp3	Papain-like proteáza, štěpí polyproteiny, interakce s MDA5, IRF3, cílí na ISGylaci
Nsp5	3C-like proteáza, štěpí polyproteiny, interakce s RIG-I, STAT1, inhibice K63 polyubikvitinace
Nsp6	Účast na membránových reorganizacích, interakce s TBK1, inhibice IRF3, STAT 1 a 2 fosforylace
Nsp7	Podjednotka RdRp, neenzymatická, inhibice signalizace IFN typu 1
Nsp8	Podjednotka RdRp, primáza, interakce s 7SL RNA, SRP19, SRP54, SRP72, inhibice proteinového transportu
Nsp9	Neenzymatické RBP, interakce s 7SL RNA, inhibice proteinového transportu
Nsp10	RNA capping, vyhýbání se RLR
Nsp12	RdRp, IRF3 inhibice jaderné translokace
Nsp13	RNA helikáza, interakce TBK1, TBKBP1, vyhýbání se RLR; inhibice NF- $\kappa$ B, TBK1, IRF3, STAT1/2, fosforylace
Nsp14	RNA capping, vyhýbání se RLR, blokáce mRNA transkripce hostitele, antagonist IFNAR1
Nsp15	Uridylát specifická endoribonukleáza, interakce RNF41, vyhýbání se RLR
Nsp16	RNA capping, interakce s U1 a U2 snRNA, RLR vyhýbání, inhibice splicesomu
ORF3a	Viroporin, interakce s TRIM59, inhibice STAT1 fosforylace
ORF3b	Inhibice IRF3 jaderné translokace
ORF6	Interakce KPNA1/2, Nup98, Rae1, inhibice jaderného importu a exportu
ORF7a	Inhibice STAT2 fosforylace
ORF7b	Inhibice STAT2 fosforylace
ORF9b	Interakce s NEMO, TOM70, RIG-I, MDA5, MAVS, TBK1, STING, TRIF, blokáce TOM70-HSP90 interakce; inhibice TBK1 fosforylace, K63 poly-ub NEMA
M	Interakce s RIG-I, MDA5, MAVS, TBK1, TRAF3, blokuje MAVS agregaci, inhibice TRAF3-TANK-TBK1-IKKe komplex formací
N	Interakce s RIG-I, inhibice RIG-I ubikvitinace

## 6.2 Interference s dendritickými buňkami

Při infekci SARS-CoV-2 dochází k snížené expresi molekul MHC II třídy, přes které dendritické buňky prezentují antigeny T lymfocytům. Tím dochází k nedostatečné imunitní odpovědi. Také dochází k snížení počtu dendritických buněk a zhoršení jejich funkcí. Následkem je malá produkce interferonů. Akutní infekce vede k snížení počtu dendritických buněk (DCs), hlavně u pacientů s projevy ARDS (Wilk *et al.*, 2020). Ztráta funkčnosti těchto buněk může vést k opožděné imunitní reakci T lymfocytů a nízké produkci IFN 1. a 3. typu. Infikované dendritické buňky neprodukují antivirové cytokiny ani neprochází maturací, aby mohly prezentovat antigen T lymfocytům (Zhou *et al.*, 2020). Interakce SARS-CoV-2, monocytů, makrofágů a DC sítě v tkáních sliznic poskytuje únikový mechanismus před vrozenou imunitou a možnost šíření viru. Většina uzdravených pacientů SARS si vytvořila T buněčnou imunitu na S protein viru; konkrétně na RBD oblast (T lymfocyty reagují na jeden epitop). U SARS-CoV-2 nevzniká tato silná odpověď na RBD oblast S proteinu. Tato nedostatečná odpověď může být jedním z mechanismů úniku imunitní kontrole. Reakce T buněk na RBD se projevuje opožděně po 2 týdnech po projevu symptomů. Přesný mechanismus není ale zatím znám (Zhou *et al.*, 2020). SARS-CoV-2 také snižuje expresi ACE2 v moDCs (dendritické buňky odvozené z monocytů). Buňky moDC jsou permissivní pro infekci, ale virus se v nich nemůže množit. SARS-CoV-2 tlumí imunitní odpověď v moDCs skrze antagonizaci STAT1 fosforylace. Virus zvyšuje produkci STAT1 proteinu v moDCs. Infekce zabraňuje signalizaci IFN v moDC prostřednictvím působení proti fosforylaci STAT1 proteinu. Konkrétní virový protein, který by tuto funkci vykonával zatím není znám (Zhou *et al.*, 2020).

## 6.3 Interference s makrofágy a neutrofily

Makrofágy a neutrofily fungují jako prozánětlivé imunitní buňky podílející se na nadměrném zánětu při infekci SARS-CoV-2, který může vést k dysfunkcím i více orgánů při závažných infekcích. Jejich hyperaktivace vede právě k ARDS. MF produkují prozánětlivé cytokiny po detekování PAMPs, které rozpoznávají receptory jako TLRs. Podjednotka S1 proteinu S indukuje produkci IL-6, IL-1beta aktivací TLR4, který signalizuje přes c-Jun N – terminální kinázu (JNK) a jadernou translokaci NF- $\kappa$ B. Infikované neutrofily mají narušené HLA-DR a PD-L1 exprese vzroste, což vede k poklesu antigenní prezentace. Snížení antigenní prezentace byla pozorována i u monocytů při infekci (Qin *et al.*, 2021). Důležitou roli má interakce s CD147, jež vede k aktivaci Jak-Stat dráhy, která směřuje reakci vedoucí k expresi CyPa (cyclophilin A). Váže CD147 a spouští MAPK dráhu, která reguluje expresi chemokinů vedoucí až k cytokinové bouři. Aktivací RIG-I a MDA5 spouští silnou odpověď. Zánětlivé mediátory vznikající při infekci epitelových buněk mohou stimulovat MF k produkci cytokinů.



Mechanismus, jakým způsobem SARS-CoV-2 ovládá NK buňky není zatím objasněn (Bortolotti *et al.*, 2020). V **závažných případech** infekce dochází ke snížení počtu T (počet naivních T<sub>H</sub> stoupá, ale paměťových klesá) a NK buněk. B lymfocyty jsou na spodní hranici normy. Další charakteristikou je vyšší poměr neutrofilů vůči lymfocytům (NLR) a nižší počty monocytů, eozinofilů a basofilů. Je tedy možné z NLR hladin určit, jestli jde o zhoršující se stav pacienta (Lagunas-Rangel, 2020). Dalšími zvýšenými faktory jsou cytokiny například IL-6, IL-8, IL-10, které mohou indukovat zvyšování exprese NKG2A (Qin *et al.*, 2020). IL-6 a IL-8 narušují v časně fázi infekce funkci NK buněk skrze STAT3-dependentní mechanismus a tím se podílejí na snížené cytotoxicitě buněk. Interakce obsahující neutrofilů a NK buňky mohou stimulovat k produkci IFN gama, který inhibuje hromadění neutrofilů. Zvýšenou produkcí IFN gama dochází poté k obnově antivirové aktivity (Antonioli *et al.*, 2020).

## 7 Závěr

Virus SARS-CoV-2 je bezpochyby významným patogenem dnešní doby. Onemocnění jím způsobené vyvolalo globální pandemii a nejen zdravotní, ale i ekonomické a mnohé další problémy. Proto význam studia takovýchto patogenů je nutné podporovat a prohlubovat, pokud v budoucnu chceme proti obdobným pandemiím bojovat. Se stále rostoucím počtem obyvatel lze předpokládat, že takovýto scénář ve formě dalších globálních pandemií jistě nastane. Prohloubení znalostí umožní efektivní obranu a vývoje dostupných léčiv pro lidskou populaci. Právě zmíněný dopad na lidstvo pomohl urychlit vývoj vakcín v závislosti na zkušenostech z minulých studiích například z období onemocnění SARS.

Viry po dobu koexistence s hostitelem vytvářejí stále nové způsoby, jak přežít v hostiteli, aniž by došlo k jejich detekci. SARS-CoV-2 disponuje značným počtem známých unikových mechanismů před vrozeným imunitním systémem hostitele. Blokace hostitelské translace vedoucí k potlačení syntézy interferonů, inhibice funkčnosti imunitních buněk nebo blokace signálních drah receptorů a drah interferonů jsou jedněmi z nich. Ne všechny tyto mechanismy jsou do dnešní doby zcela prozkoumány a je potřeba hlubšího studia. Seznam všech dosud známých mechanismů nebude jistě konečný. Mnoho z nich není zatím objeveno a mohou vznikat v závislosti na situaci hostitele a viru další mechanismy k obelstění našeho imunitního systému.

Tento pozoruhodný virus se jistě dočká dalšího zkoumání a poskytne pro nás tak cenné znalosti a zkušenosti do budoucna.

## 8 Literatura

- Akopian, D., Shen, K., Zhang, X., & Shan, S. O. (2013). Signal recognition particle: An essential protein-targeting machine. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 82, pp. 693–721).
- Antonioli, L., Fornai, M., Pellegrini, C., & Blandizzi, C. (2020). NKG2A and COVID-19: another brick in the wall. In *Cellular and Molecular Immunology* (Vol. 17, Issue 6, pp. 672–674). Springer Nature.
- Banerjee, A. K., Blanco, M. R., Bruce, E. A., Honson, D. D., Chen, L. M., Chow, A., Bhat, P., Ollikainen, N., Quinodoz, S. A., Loney, C., Thai, J., Miller, Z. D., Lin, A. E., Schmidt, M. M., Stewart, D. G., Goldfarb, D., de Lorenzo, G., Rihn, S. J., Voorhees, R. M., ... Guttman, M. (2020). SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses. *Cell*, 183(5), 1325-1339.e21.
- Bar-On, Y. M., Flamholz, A., Phillips, R., & Milo, R. (2020). Sars-cov-2 (Covid-19) by the numbers. *ELife*, 9.
- Beard, W. A., & Wilson, S. H. (2003). Structural insights into the origins of DNA polymerase fidelity. In *Structure* (Vol. 11, Issue 5, pp. 489–496). Cell Press.
- Benvenuto, D., Giovanetti, M., Ciccozzi, A., Spoto, S., Angeletti, S., & Ciccozzi, M. (2020). The 2019-new coronavirus epidemic: Evidence for virus evolution. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 455–459.
- Beyer, D. K., & Forero, A. (2022). Mechanisms of Antiviral Immune Evasion of SARS-CoV-2. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 434, Issue 6). Academic Press.
- Bortoletti, M. (2020). Understanding SARS-CoV-2 and the drugs that might lessen its power. *The Economist*.
- Bortolotti, D., Gentili, V., Rizzo, S., Rotola, A., & Rizzo, R. (2020). SARS-CoV-2 Spike 1 Protein Controls Natural Killer Cell Activation via the HLA-E/NKG2A Pathway. *Cells*, 9(9).
- Bortolotti, D., Gentili, V., Rizzo, S., Schiuma, G., Beltrami, S., Strazzabosco, G., Fernandez, M., Caccuri, F., Caruso, A., & Rizzo, R. (2021). Tlr3 and tlr7 rna sensor activation during sars-cov-2 infection. *Microorganisms*, 9(9).
- Bouvet, M., Debarnot, C., Imbert, I., Selisko, B., Snijder, E. J., Canard, B., & Decroly, E. (2010). In vitro reconstitution of sars-coronavirus mRNA cap methylation. *PLoS Pathogens*, 6(4), 1–13.
- Brann, D. H., Tsukahara, T., Weinreb, C., Lipovsek, M., van den Berge, K., Gong, B., Chance, R., Macaulay, I. C., Chou, H.-J., Fletcher, R. B., Das, D., Street, K., Roux de Bezieux, H., Gi Choi, Y., Risso, D., Dudoit, S., Purdom, E., Mill, J., Abi Hachem, R., ... Robert Datta, S. (2020). Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia. In *Sci. Adv* (Vol. 6).
- Çalıcı Utku, A., Budak, G., Karabay, O., Güçlü, E., Okan, H. D., & Vatan, A. (2020). Main symptoms in patients presenting in the COVID-19 period. *Scottish Medical Journal*, 65(4), 127–132.

- Cao, Y., Yang, R., Lee, I., Zhang, W., Sun, J., Wang, W., & Meng, X. (2021). Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors. In *Protein Science* (Vol. 30, Issue 6, pp. 1114–1130). John Wiley and Sons Inc.
- Cao, Z., Xia, H., Rajsbaum, R., Xia, X., Wang, H., & Shi, P. Y. (2021). Ubiquitination of SARS-CoV-2 ORF7a promotes antagonism of interferon response. In *Cellular and Molecular Immunology* (Vol. 18, Issue 3, pp. 746–748). Springer Nature.
- Cottam, E. M., Whelband, M. C., & Wileman, T. (2014). Coronavirus NSP6 restricts autophagosome expansion. *Autophagy*, *10*(8), 1426–1441.
- DeDiego, M. L., Álvarez, E., Almazán, F., Rejas, M. T., Lamirande, E., Roberts, A., Shieh, W.-J., Zaki, S. R., Subbarao, K., & Enjuanes, L. (2007). A Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus That Lacks the E Gene Is Attenuated In Vitro and In Vivo. *Journal of Virology*, *81*(4), 1701–1713.
- DiPiazza, A. T., Graham, B. S., & Ruckwardt, T. J. (2021). T cell immunity to SARS-CoV-2 following natural infection and vaccination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *538*, 211–217.
- Doyle, N., Hawes, P. C., Simpson, J., Adams, L. H., & Maier, H. J. (2019). The porcine deltacoronavirus replication organelle comprises double-membrane vesicles and zippered endoplasmic reticulum with double-membrane spherules. *Viruses*, *11*(11).
- Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis. In *Coronaviruses: Methods and Protocols* (pp. 1–23). Springer New York.
- Ferron, F., Subissi, L., de Moraes, A. T. S., Le, N. T. T., Sevajol, M., Gluais, L., Decroly, E., Vonnheim, C., Bricogne, G., Canard, B., & Imbert, I. (2017). Structural and molecular basis of mismatch correction and ribavirin excision from coronavirus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(2), E162–E171.
- Fouchier, R. A. M., Hartwig, N. G., Bestebroer, T. M., Niemeyer, B., de Jong, J. C., Simon, J. H., & Osterhaus, A. D. M. E. (2004). *A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans.*
- Frazier, M. N., Dillard, L. B., Krahn, J. M., Perera, L., Williams, J. G., Wilson, I. M., Stewart, Z. D., Pillon, M. C., Deterding, L. J., Borgnia, M. J., & Stanley, R. E. (2021). Characterization of SARS2 Nsp15 nuclease activity reveals it's mad about U. *Nucleic Acids Research*, *49*(17), 10136–10149.
- Frieman, M., Yount, B., Heise, M., Kopecky-Bromberg, S. A., Palese, P., & Baric, R. S. (2007). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus ORF6 Antagonizes STAT1 Function by Sequestering Nuclear Import Factors on the Rough Endoplasmic Reticulum/Golgi Membrane. *Journal of Virology*, *81*(18), 9812–9824.
- Gao, Y., Yan, L., Huang, Y., Liu, F., Zhao, Y., Cao, L., Wang, T., Sun, Q., Ming, Z., Zhang, L., Ge, J., Zheng, L., Zhang, Y., Wang, H., Zhu, Y., Zhu, C., Hu, T., Hua, T., Zhang, B., ... Rao, Z. (2020). *Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus.*
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber, C., Leontovich, A. M., Neuman, B. W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L. L. M., Samborskiy, D. v., Sidorov, I. A., Sola, I., & Ziebuhr, J. (2020). The species Severe acute respiratory

syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. In *Nature Microbiology* (Vol. 5, Issue 4, pp. 536–544). Nature Research.

Gordon, D. E., Jang, G. M., Bouhaddou, M., Xu, J., Obernier, K., White, K. M., O’Meara, M. J., Rezelj, V. v., Guo, J. Z., Swaney, D. L., Tummino, T. A., Hüttenhain, R., Kaake, R. M., Richards, A. L., Tutuncuoglu, B., Foussard, H., Batra, J., Haas, K., Modak, M., ... Krogan, N. J. (2020). A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*, *583*(7816), 459–468.

Grudlewska-Buda, K., Wiktorczyk-Kapischke, N., Wałęcka-Zacharska, E., Kwiecińska-Piróg, J., Buszko, K., Leis, K., Juszczyk, K., Gospodarek-Komkowska, E., & Skowron, K. (2021). Sars-cov-2—morphology, transmission and diagnosis during pandemic, review with element of meta-analysis. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 10, Issue 9). MDPI.

Hofmann, H., & Pöhlmann, S. (2004). Cellular entry of the SARS coronavirus. In *Trends in Microbiology* (Vol. 12, Issue 10, pp. 466–472).

Hu, Y., Wen, J., Tang, L., Zhang, H., Zhang, X., Li, Y., Wang, J., Han, Y., Li, G., Shi, J., Tian, X., Jiang, F., Zhao, X., Wang, J., Liu, S., Zeng, C., Wang, J., & Yang, H. (2003). The M protein of SARS-CoV: basic structural and immunological properties. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics / Beijing Genomics Institute*, *1*(2), 118–130.

Huang, C., Lokugamage, K. G., Rozovics, J. M., Narayanan, K., Semler, B. L., & Makino, S. (2011). SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs: Viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage. *PLoS Pathogens*, *7*(12).

Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., Wang, T., Zhang, X., Chen, H., Yu, H., Zhang, X., Zhang, M., Wu, S., Song, J., Chen, T., Han, M., Li, S., Luo, X., Zhao, J., & Ning, Q. (2020). Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *Journal of Clinical Investigation*, *130*(5), 2620–2629.

Chen, K., Xiao, F., Hu, D., Ge, W., Tian, M., Wang, W., Pan, P., Wu, K., & Wu, J. (2021). Sars-cov-2 nucleocapsid protein interacts with rig-i and represses rig-mediated ifn- $\beta$  production. *Viruses*, *13*(1).

Chen, Y., Su, C., Ke, M., Jin, X., Xu, L., Zhang, Z., Wu, A., Sun, Y., Yang, Z., Tien, P., Ahola, T., Liang, Y., Liu, X., & Guo, D. (2011). Biochemical and structural insights into the mechanisms of sars coronavirus RNA ribose 2'-O-methylation by nsp16/nsp10 protein complex. *PLoS Pathogens*, *7*(10).

Choudhury, A., & Mukherjee, S. (2020). In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. *Journal of Medical Virology*, *92*(10), 2105–2113.

Christopher, M. E., & Wong, J. P. (2011). Use of Toll-Like Receptor 3 Agonists Against Respiratory Viral Infections. In *Allergy Agents in Medicinal Chemistry* (Vol. 10).

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., Fassi-Fihri, O., Ali, A., Demissié, G. F., Muth, D., Chan, M. C. W., Nicholls, J. M., Meyerholz, D. K., Kuranga, S. A., Mamo, G., ... Peiris, M. (2018). MERS coronaviruses from camels in Africa exhibit region-dependent genetic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(12), 3144–3149.

- Jiang, H. wei, Zhang, H. nan, Meng, Q. feng, Xie, J., Li, Y., Chen, H., Zheng, Y. xiao, Wang, X. ning, Qi, H., Zhang, J., Wang, P. H., Han, Z. G., & Tao, S. ce. (2020). SARS-CoV-2 Orf9b suppresses type I interferon responses by targeting TOM70. In *Cellular and Molecular Immunology* (Vol. 17, Issue 9, pp. 998–1000). Springer Nature.
- Karim, S. S. A., & Karim, Q. A. (2021). Omicron SARS-CoV-2 variant: a new chapter in the COVID-19 pandemic. In *The Lancet* (Vol. 398, Issue 10317, pp. 2126–2128). Elsevier B.V.
- Kim, D., Lee, J. Y., Yang, J. S., Kim, J. W., Kim, V. N., & Chang, H. (2020). The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*, *181*(4), 914-921.e10.
- Klein, S. L., Dhakal, S., Ursin, R. L., Deshpande, S., Sandberg, K., & Mauvais-Jarvis, F. (2020). Biological sex impacts COVID-19 outcomes. *PLoS Pathogens*, *16*(6).
- Knoops, K., Kikkert, M., van den Worm, S. H. E., Zevenhoven-Dobbe, J. C., van der Meer, Y., Koster, A. J., Mommaas, A. M., & Snijder, E. J. (2008). SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biology*, *6*(9), 1957–1974.
- Knoops, K., Swett-Tapia, C., van den Worm, S. H. E., te Velhuis, A. J. W., Koster, A. J., Mommaas, A. M., Snijder, E. J., & Kikkert, M. (2010). Integrity of the Early Secretory Pathway Promotes, but Is Not Required for, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus RNA Synthesis and Virus-Induced Remodeling of Endoplasmic Reticulum Membranes. *Journal of Virology*, *84*(2), 833–846.
- Konno, Y., Kimura, I., Uriu, K., Fukushi, M., Irie, T., Koyanagi, Y., Sauter, D., Gifford, R. J., Nakagawa, S., & Sato, K. (2020). SARS-CoV-2 ORF3b Is a Potent Interferon Antagonist Whose Activity Is Increased by a Naturally Occurring Elongation Variant. *Cell Reports*, *32*(12).
- Kumar, S., Nyodu, R., Maurya, V. K., & Saxena, S. K. (2020). *Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)* (pp. 23–31).
- Lagunas-Rangel, F. A. (2020). Neutrophil-to-lymphocyte ratio and lymphocyte-to-C-reactive protein ratio in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis. In *Journal of Medical Virology* (Vol. 92, Issue 10, pp. 1733–1734). John Wiley and Sons Inc.
- Lei, J., Kusov, Y., & Hilgenfeld, R. (2018). Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. In *Antiviral Research* (Vol. 149, pp. 58–74). Elsevier B.V.
- Lester, S. N., & Li, K. (2014). Toll-like receptors in antiviral innate immunity. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 426, Issue 6, pp. 1246–1264). Academic Press.
- Liu, G. Q., Lee, J. H., Parker, Z. M., Acharya, D., Chiang, J. J., van Gent, M., Riedl, W., Davis-Gardner, M. E., Wies, E., Chiang, C., & Gack, M. U. (2021). ISG15-dependent activation of the sensor MDA5 is antagonized by the SARS-CoV-2 papain-like protease to evade host innate immunity. *Nature Microbiology*, *6*(4), 467–478.
- Long, S. (2021). Sars-cov-2 subgenomic rnas: Characterization, utility, and perspectives. In *Viruses* (Vol. 13, Issue 10). MDPI.
- Lovato, A., de Filippis, C., & Marioni, G. (2020). Upper airway symptoms in coronavirus disease 2019 (COVID-19). In *American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery* (Vol. 41, Issue 3). W.B. Saunders.

- Lugo, F. S. (2020). General aspects about the structure of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Aspectos generales sobre la estructura del coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2). In *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* (Vol. 39, Issue 3).
- Ma-Lauer, Y., Carbajo-Lozoya, J., Hein, M. Y., Müller, M. A., Deng, W., Lei, J., Meyer, B., Kusov, Y., von Brunn, B., Bairad, D. R., Hünten, S., Drosten, C., Hermeking, H., Leonhardt, H., Mann, M., Hilgenfeld, R., & von Brunn, A. (2016). P53 down-regulates SARS coronavirus replication and is targeted by the SARS-unique domain and PLpro via E3 ubiquitin ligase RCHY1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(35), E5192–E5201.
- Ma-Lauer, Y., Zheng, Y., Malešević, M., von Brunn, B., Fischer, G., & von Brunn, A. (2020). Influences of cyclosporin A and non-immunosuppressive derivatives on cellular cyclophilins and viral nucleocapsid protein during human coronavirus 229E replication. *Antiviral Research*, *173*, 104620.
- Ma, Y., Wu, L., Shaw, N., Gao, Y., Wang, J., Sun, Y., Lou, Z., Yan, L., Zhang, R., & Rao, Z. (2015). Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14-nsp10 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(30), 9436–9441.
- Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C., Franz, J., Thomas, C., Mothes, R., Laue, M., Schneider, J., Brünink, S., Greuel, S., Lehmann, M., Hassan, O., Aschman, T., Schumann, E., Chua, R. L., Conrad, C., Eils, R., Stenzel, W., Windgassen, M., ... Heppner, F. L. (2021). Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nature Neuroscience*, *24*(2), 168–175.
- Miao, Z., Tidu, A., Eriani, G., & Martin, F. (2021). Secondary structure of the SARS-CoV-2 5'-UTR. *RNA Biology*, *18*(4), 447–456.
- Min, Y. Q., Huang, M., Sun, X., Deng, F., Wang, H., & Ning, Y. J. (2021). Immune evasion of SARS-CoV-2 from interferon antiviral system. In *Computational and Structural Biotechnology Journal* (Vol. 19, pp. 4217–4225). Elsevier B.V.
- Miorin, L., Kehrer, T., Teresa Sanchez-Aparicio, M., Zhang, K., Cohen, P., Patel, R. S., Cupic, A., Makio, T., Mei, M., Moreno, E., Danziger, O., White, K. M., Rathnasinghe, R., Uccellini, M., Gao, S., Aydillo, T., Mena, I., Yin, X., Martin-Sancho, L., ... García-Sastre, A. (2020). SARS-CoV-2 Orf6 hijacks Nup98 to block STAT nuclear import and antagonize interferon signaling.
- Moeller, N. H., Shi, K., Demir, O., Belica, C., Banerjee, S., Yin, L., Durfee, C., Amaro, R. E., Aihara, H., & Cheng, R. H. (2021). Structure and dynamics of SARS-CoV-2 proofreading exoribonuclease ExoN.
- Mohan, J., & Wollert, T. (2021). Membrane remodeling by SARS-CoV-2 – double-enveloped viral replication. *Faculty Reviews*, *10*.
- Moustaqil, M., Ollivier, E., Chiu, H. P., van Tol, S., Rudolffi-Soto, P., Stevens, C., Bhumkar, A., Hunter, D. J. B., Freiberg, A. N., Jacques, D., Lee, B., Sierecki, E., & Gambin, Y. (2021). SARS-CoV-2 proteases PLpro and 3CLpro cleave IRF3 and critical modulators of inflammatory pathways (NLRP12 and TAB1): implications for disease presentation across species. *Emerging Microbes and Infections*, *10*(1), 178–195.
- Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., Ren, L., Guo, L., Guo, R., Chen, T., Hu, J., Xiang, Z., Mu, Z., Chen, X., Chen, J., Hu, K., Jin, Q., Wang, J., & Qian, Z. (2020). Characterization of spike glycoprotein

of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Communications*, 11(1).

Prabakaran, P., Xiao, X., & Dimitrov, D. S. (2004). A model of the ACE2 structure and function as a SARS-CoV receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314(1), 235–241.

Pekar, J. E., Magee, A., Parker, E., Moshiri, N., Izhikevich, K., Havens, J. L., Gangavarapu, K., Malpica Serrano, L. M., Crits-Christoph, A., Matteson, N. L., Zeller, M., Levy, J. I., Wang, J. C., Hughes, S., Lee, J., Park, H., Park, M.-S., Ching, K. Z. Y., Lin, R. T. P., ... Wertheim, J. O. (2022). The molecular epidemiology of multiple zoonotic origins of SARS-CoV-2. *Science (New York, N.Y.)*, eabp8337.

Qin, C., Zhou, L., Hu, Z., Zhang, S., Yang, S., Tao, Y., Xie, C., Ma, K., & Shang, K. (2020). *Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China*.

Qin, S., Jiang, Y., Wei, X., Liu, X., Guan, J., Chen, Y., Lu, H., Qian, J., Wang, Z., & Lin, X. (2021). Dynamic changes in monocytes subsets in COVID-19 patients. *Human Immunology*, 82(3), 170–176.

Rangan, R., Zheludev, I. N., Hagey, R. J., Pham, E. A., Wayment-Steele, H. K., Glenn, J. S., & Das, R. (2020). *RNA genome conservation and secondary structure in SARS-CoV-2 and SARS-related viruses: a first look*.

Raskin, S. (2021). Genetics of COVID-19. In *Jornal de Pediatria* (Vol. 97, Issue 4, pp. 378–386). Elsevier Editora Ltda.

Ricagno, S., Egloff, M.-P., Ulferts, R., Coutard, B., Nurizzo, D., Rie Campanacci, V., Cambillau, C., Ziebuhr, J., Canard, B., Cases (2006). *Crystal structure and mechanistic determinants of SARS coronavirus nonstructural protein 15 define an endoribonuclease family*.

Rosas-Lemus, M., Minasov, G., Shuvalova, L., Inness, N. L., Kiryukhina, O., Wiersum, G., Kim, Y., Jedrzejczak, R., Maltseva, N. I., Endres, M., Jaroszewski, L., Godzik, A., Joachimiak, A., & Satchell, K. J. F. (2020). The crystal structure of nsp10-nsp16 heterodimer from SARS-CoV-2 in complex with S-adenosylmethionine. *BioRxiv : The Preprint Server for Biology*.

Rui, Y., Su, J., Shen, S., Hu, Y., Huang, D., Zheng, W., Lou, M., Shi, Y., Wang, M., Chen, S., Zhao, N., Dong, Q., Cai, Y., Xu, R., Zheng, S., & Yu, X. F. (2021). Unique and complementary suppression of cGAS-STING and RNA sensing- triggered innate immune responses by SARS-CoV-2 proteins. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1).

Satarker, S., & Nampoothiri, M. (2020). Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. In *Archives of Medical Research* (Vol. 51, Issue 6, pp. 482–491). Elsevier Inc.

Schubert, K., Karousis, E. D., Jomaa, A., Scaiola, A., Echeverria, B., Gurzeler, L. A., Leibundgut, M., Thiel, V., Mühlemann, O., & Ban, N. (2020). SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 27(10), 959–966.

Simeoni, M., Cavinato, T., Rodriguez, D., & Gatfield, D. (2021). I(nsp1)ecting SARS-CoV-2–ribosome interactions. In *Communications Biology* (Vol. 4, Issue 1). Nature Research.

Siu, K. L., Chan, C. P., Kok, K. H., Chiu-Yat Woo, P., & Jin, D. Y. (2014). Suppression of innate antiviral response by severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein is mediated through the first transmembrane domain. *Cellular and Molecular Immunology*, 11(2), 141–149.

- Stasi, C., Fallani, S., Voller, F., & Silvestri, C. (2020). Treatment for COVID-19: An overview. *European Journal of Pharmacology*, 889.
- Tagliabracci, V., Park, G., Osinski, A., Hernandez, G., Eitson, J., Majumdar, A., Tonelli, M., Henzler-Wildman, K., Pawłowski, K., Chen, Z., Li, Y., & Schoggins, J. (2022). *The mechanism of RNA capping by SARS-CoV-2*.
- Thomas, S. (2020). The structure of the membrane protein of sars-cov-2 resembles the sugar transporter semisweet. *Pathogens and Immunity*, 5(1), 342–363.
- Thoms, M., Buschauer, R., Ameisemeier, M., Koepke, L., Denk, T., Hirschenberger, M., Kratzat, H., Hayn, M., Mackens-Kiani, T., Cheng, J., Straub, J. H., Stürzel, C. M., Fröhlich, T., Berninghausen, O., Becker, T., Kirchhoff, F., J Sparrer, K. M., & Beckmann, R. (2020). *Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2*.
- Vakili, K., Fathi, M., Pezeshgi, A., Mohamadkhani, A., Hajiesmaeili, M., Rezaei-Tavirani, M., & Sayehmiri, F. (2020). Critical complications of COVID-19: A descriptive meta-analysis study. In *Reviews in Cardiovascular Medicine* (Vol. 21, Issue 3, pp. 433–442). IMR Press Limited.
- Vazquez, C., Swanson, S. E., Negatu, S. G., Dittmar, M., Miller, J., Ramage, H. R., Cherry, S., & Jurado, K. A. (2021). SARS-CoV-2 viral proteins NSP1 and NSP13 inhibit interferon activation through distinct mechanisms. *PLoS ONE*, 16(6 June).
- Venkatagopalan, P., Daskalova, S. M., Lopez, L. A., Dolezal, K. A., & Hogue, B. G. (2015). Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly. *Virology*, 478, 75–85.
- Viswanathan, T., Arya, S., Chan, S. H., Qi, S., Dai, N., Misra, A., Park, J. G., Oladunni, F., Kovalskyy, D., Hromas, R. A., Martinez-Sobrido, L., & Gupta, Y. K. (2020). Structural basis of RNA cap modification by SARS-CoV-2. *Nature Communications*, 11(1).
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281–292.e6.
- Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., Zhang, Z., Lu, G., Qiao, C., Hu, Y., Yuen, K. Y., Wang, Q., Zhou, H., Yan, J., & Qi, J. (2020). Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell*, 181(4), 894–904.e9.
- Wang, W., Zhou, Z., Xiao, X., Tian, Z., Dong, X., Wang, C., Li, L., Ren, L., Lei, X., Xiang, Z., & Wang, J. (2021). SARS-CoV-2 nsp12 attenuates type I interferon production by inhibiting IRF3 nuclear translocation. *Cellular and Molecular Immunology*, 18(4), 945–953.
- Wilk, A. J., Rustagi, A., Zhao, N. Q., Roque, J., Martínez-Colón, G. J., McKechnie, J. L., Ivison, G. T., Ranganath, T., Vergara, R., Hollis, T., Simpson, L. J., Grant, P., Subramanian, A., Rogers, A. J., & Blish, C. A. (2020). A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nature Medicine*, 26(7), 1070–1076.
- Wolff, G., Limpens, R. W. A. L., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Laugks, U., Zheng, S., de Jong, A. W. M., Koning, R. I., Agard, D. A., Grünewald, K., Koster, A. J., Snijder, E. J., & Bárcena, M. (2020). *A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle*.
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Huang, Y., & Yuen, K. Y. (2009). Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. In *Experimental Biology and Medicine* (Vol. 234, Issue 10, pp. 1117–1127).

- Worobey, M., Levy, J. I., Serrano, L. M. M., Crits-Christoph, A., Pekar, J. E., Goldstein, S. A., Rasmussen, A. L., Kraemer, M. U. G., Newman, C., Koopmans, M. P. G., Suchard, M. A., Wertheim, J. O., Lemey, P., Robertson, D. L., Garry, R. F., Holmes, E. C., Rambaut, A., Andersen, K. G., & Feinstone, W. H. (2022). *The Huanan market was the epicenter of SARS-CoV-2 emergence*.
- Wu, C., Qavi, A. J., Hachim, A., Kavian, N., Cole, A. R., Moyle, A. B., Wagner, N. D., Sweeney-Gibbons, J., Rohrs, H. W., Gross, M. L., Peiris, J. S. M., Basler, C. F., Farnsworth, C. W., Valkenburg, S. A., Amarasinghe, G. K., & Leung, D. W. (2021). Characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein reveals multiple functional consequences of the C-terminal domain. *IScience*, 24(6).
- Wu, Y., Ma, L., Zhuang, Z., Cai, S., Zhao, Z., Zhou, L., Zhang, J., Wang, P. H., Zhao, J., & Cui, J. (2020). Main protease of SARS-CoV-2 serves as a bifunctional molecule in restricting type I interferon antiviral signaling. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 5, Issue 1). Springer Nature.
- Xia, H., Cao, Z., Xie, X., Zhang, X., Chen, J. Y. C., Wang, H., Menachery, V. D., Rajsbaum, R., & Shi, P. Y. (2020). Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. *Cell Reports*, 33(1).
- Yamada, T., Sato, S., Sotoyama, Y., Orba, Y., Sawa, H., Yamauchi, H., Sasaki, M., & Takaoka, A. (2021). RIG-I triggers a signaling-abortive anti-SARS-CoV-2 defense in human lung cells. *Nature Immunology*, 22(7), 820–828.
- Yang, D., Geng, T., Harrison, A. G., & Wang, P. (2021). *Differential roles of RIG-I-like receptors in SARS-CoV-2 infection*.
- Ye, Q., Wang, B., & Mao, J. (2020). The pathogenesis and treatment of the ‘Cytokine Storm’ in COVID-19. In *Journal of Infection* (Vol. 80, Issue 6, pp. 607–613). W.B. Saunders Ltd.
- Yuan, J., Hon, C. C., Li, Y., Wang, D., Xu, G., Zhang, H., Zhou, P., Poon, L. L. M., Lam, T. T. Y., Leung, F. C. C., & Shi, Z. (2010). Intraspecies diversity of SARS-like coronaviruses in *Rhinolophus sinicus* and its implications for the origin of SARS coronaviruses in humans. *Journal of General Virology*, 91(4), 1058–1062.
- Yüce, M., Filiztekin, E., & Özkaya, K. G. (2021). COVID-19 diagnosis —A review of current methods. *Biosensors and Bioelectronics*, 172.
- Yuen, C. K., Lam, J. Y., Wong, W. M., Mak, L. F., Wang, X., Chu, H., Cai, J. P., Jin, D. Y., To, K. K. W., Chan, J. F. W., Yuen, K. Y., & Kok, K. H. (2020). SARS-CoV-2 nsp13, nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists. *Emerging Microbes and Infections*, 9(1), 1418–1428.
- Zawilska, J. B., Lagodzinski, A., & Berezinska, M. (2021). COVID-19: from the structure and replication cycle of SARS-CoV-2 to its disease symptoms and treatment. In *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society* (Vol. 72, Issue 4). NLM (Medline).
- Zhang, W., Wang, G., Xu, Z. G., Tu, H., Hu, F., Dai, J., Chang, Y., Chen, Y., Lu, Y., Zeng, H., Cai, Z., Han, F., Xu, C., Jin, G., Sun, L., Pan, B. S., Lai, S. W., Hsu, C. C., Xu, J., ... Lin, H. K. (2019). Lactate Is a Natural Suppressor of RLR Signaling by Targeting MAVS. *Cell*, 178(1), 176-189.e15.
- Zheng, M., Gao, Y., Wang, G., Song, G., Liu, S., Sun, D., Xu, Y., & Tian, Z. (2020). Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. In *Cellular and Molecular Immunology* (Vol. 17, Issue 5, pp. 533–535). Springer Nature.

Zheng, M., Karki, R., Williams, E. P., Yang, D., Fitzpatrick, E., Vogel, P., Jonsson, C. B., & Kanneganti, T. D. (2021). TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nature Immunology*, 22(7), 829–838.

Zheng, Y., Zhuang, M. W., Han, L., Zhang, J., Nan, M. L., Zhan, P., Kang, D., Liu, X., Gao, C., & Wang, P. H. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) membrane (M) protein inhibits type I and III interferon production by targeting RIG-I/MDA-5 signaling. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1).

Zhou, R., To, K. K. W., Wong, Y. C., Liu, L., Zhou, B., Li, X., Huang, H., Mo, Y., Luk, T. Y., Lau, T. T. K., Yeung, P., Chan, W. M., Wu, A. K. L., Lung, K. C., Tsang, O. T. Y., Leung, W. S., Hung, I. F. N., Yuen, K. Y., & Chen, Z. (2020). Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses. *Immunity*, 53(4), 864-877.e5.