



بررسی و مروری بر پروتئین‌های سطحی ویروس SARS-CoV-2 عامل بیماری کووید ۱۹

بهار سعدایی جهرمی: کارشناسی ارشد، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، گروه زیست‌فناوری سامانه‌ای، تهران، ایران

غلامرضا احمدیان: دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، گروه زیست‌فناوری سامانه‌ای، تهران، ایران

نجف الهیاری فرد: استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، گروه زیست‌فناوری سامانه‌ای، تهران، ایران (* نویسنده مسئول) allahyar@nigeb.ac.ir

چکیده

کلیدواژه‌ها

پروتئین‌های سطحی،
ویروس،
SARS-CoV-2،
کووید ۱۹

سندرم تنفسی حاد که حاصل بیماری‌زایی ویروس SARS-CoV-2 می‌باشد، با شدت سرایت، موجب پاندمی در سراسر دنیا شده و تمامی جنبه‌های زندگی‌های فردی، اجتماعی و اقتصادی انسان‌ها را تحت تأثیر قرار داده است. تا به امروز، میلیون‌ها ابتلا و هزاران مورد مرگ‌ومیر در بیش از ۲۰۰ کشور جهان گزارش شده است و روند شیوع بیماری همچنان رو به گسترش است. هرگونه اقدامات پیشگیرانه، طراحی دارو، طراحی واکسن و تهیه برنامه‌های مقابله با این بیماری، نیازمند شناخت دقیق ماهیت، بخش‌ها و عملکرد ویروس؛ به‌ویژه پروتئین‌های سطحی ویروس SARS-CoV-2 است. لذا در این مقاله بر اساس آخرین یافته‌های علمی منتشرشده در سال‌های ۲۰۲۰ و ۲۰۲۱ در پایگاه‌های داده PubMed, Scopus, ScienceDirect, Google Scholar تنوع، ساختار و مکانیسم‌های مرتبط با پروتئین‌های سطحی SARS-CoV-2 مورد بررسی قرار گرفته و ارائه شده است.

نتایج بررسی نشان می‌دهد SARS-CoV-2 دارای چهار پروتئین سطحی شامل گلیکوپروتئین سطحی به نام پروتئین S، پروتئین نوکلئوکپسید N، پروتئین ماتریکس M و پروتئین پوششی به نام E است. پروتئین S دارای دو دامنه S1 و S2 بوده و بیشترین اهمیت را در برهمکنش با پروتئین گیرنده و ورود به میزبان دارد. ویروس SARS-CoV-2 از پروتئین آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین ۲ (ACE2) به‌عنوان گیرنده اصلی و از پروتئین CD209L به‌عنوان گیرنده جانبی برای ورود به سلول میزبان استفاده می‌کند. پروتئین N به RNA ویروس متصل می‌شود و در فرآیندهای مرتبط به ژنوم ویروس نظیر همانندسازی ژنوم و پاسخ‌دهی به عفونت‌زایی نقش دارد. پروتئین M به همراه پروتئین N در سرهم‌سازی ذرات ویریون و آزادسازی آن نقش دارد. پروتئین E کوچک‌ترین پروتئین در ساختمان این ویروس است. این پروتئین پوششی فعالیت کانال یونی داشته و فعالیت اصلی آن در سرهم‌سازی و آزادسازی ویروس است. امید است بررسی و معرفی با جزئیات بیشتر این پروتئین‌های سطحی با اهداف و فرضیات مختلف دانش پژوهان، در جهت تعمیق و غنابخشی دانش تخصصی آن‌ها مفید واقع شود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Saedaei Jahromi B, Ahmadian Gh, Allahyari Fard N. Review of surface proteins of SARS-CoV-2 virus causing COVID-19. Razi J Med Sci. 2021;28(9):104-117.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

Review of surface proteins of SARS-CoV-2 virus causing COVID-19

Bahar Saedaei Jahromi: Master of Science, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Systems Biotechnology Department, Tehran, Iran

Gholamreza Ahmadian: Associate Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Systems Biotechnology Department, Tehran, Iran

Najaf Allahyari Fard: Assistant Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Systems Biotechnology Department, Tehran, Iran (* Corresponding author) allahyar@nigeb.ac.ir

Abstract

The COVID-19 pandemic is an urgent global health emergency and is an infectious disease caused by the SARS-CoV-2 virus. Severe Acute Respiratory Syndrome, which is the result of SARS-CoV-2 virus pathogenicity, has caused a worldwide pandemic and has affected all aspects of individual, social, and economic life. To date, millions of cases and thousands of deaths have been reported in more than 200 countries, and the outbreak continues.

Preventive measures, drug design, vaccine design, and preparation of programs to combat the disease, require accurate knowledge of the nature, parts, and function of the surface proteins of SARS-CoV-2. Therefore, in this article, the diversity, structure, and mechanisms related to SARS-CoV-2 surface proteins were reviewed and presented based on the latest scientific findings published in the Web of Science, PubMed, Scopus, ScienceDirect, Google Scholar databases in 2020 and 2021.

Results and Conclusion: Coronaviruses (CoV) mainly cause infections of the respiratory and gastrointestinal tracts and are genetically classified into four genera, Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus, and Deltacoronavirus. human CoV can damage various tissues and activate apoptotic cascades. SARS-CoV, MERS-CoV, and some human CoV, including HCoV-OC43 and HCoV-HKU1, belong to the genus Betacoronavirus. SARS-CoV-2 particles have a spherical shape that their diameters are approximately 100 nm. Coronaviruses have the largest genome of all RNA viruses. SARS-CoV-2 has a positive single-stranded RNA of approximately 30 Kb. The first reading frame, which accounts for about 67% of the total genome, with approximately 20 Kb, encodes 16 nonstructural proteins (NSPs), and the remaining 10 Kb frames encode structural and peripheral proteins. SARS-CoV-2 has four surface proteins including surface glycoprotein called S protein, nucleocapsid protein (N), matrix protein (M), and coating protein named E. The S protein plays an important role in the first step of infections. The S protein has two domains, S1 and S2, and is most important in interacting with the receptor protein and the host entrance. The SARS-CoV-2 virus uses the Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as the major receptor and the CD209L protein as the lateral receptor to enter the host cell. RBD is the part of S1 that binds to the host receptor. Also, the RBM or receptor binding motif has an important role in the binding. These proteins can be found in influenza viruses, human immunodeficiency virus (HIV), and Ebola virus. These proteins have 1273 amino acids and a molecular weight of 180-200 kDa. Furin protease binds S protein with

Keywords

Surface proteins,
Virus,
SARS-CoV-2,
COVID-19

Received: 10/09/2021

Published: 10/12/2021

high affinity and cleaves the S protein into S1 and S2 domains. Spike proteins also have a polysaccharide coating that deprives the host immune system of the ability to identify itself as a foreign agent. The S protein is a trimmer protein that has two distinct structural modes, including pre-binding and post-binding. Pre-accession detection by the immune system, which is based on the glycosylated coating of the viral protein spike surface, is critical to eliciting an effective immune response. In the S domain, RBD, NTD, and CTD regions are known. One or both NTD and CTD domains have the potential to bind to the receptor and act as the RBD region. The N-terminal region binds to polysaccharide molecules. The role of the CTD region is to identify ACE2 and DPP4 receptors. The S2 domain consists of five domains that are responsible for fusion and entry into the host cell. These five domains include the FP, HR1, HR2, TM peptides, and the cytoplasmic region. The supplement peptide contains 15 to 20 protected amino acids. This amino acid is generally hydrophobic and glycine and alanine are among the many amino acids of this peptide. The nucleocapsid N protein is a structural protein. This protein binds to the RNA virus and is involved in processes related to the virus genome, such as genome replication and response to infectivity. This protein binds the RNA virus to the replicase-transcriptase (RTC) complex, which eventually encapsulates the genome after virions are prepared and help release virion particles. These proteins are highly phosphorylated, thereby increasing the strength of the protein to bind to RNA. M protein is another vital part of the virus that is involved in determining the structure of the virus coat. This protein can bind to all other structural proteins. M Protein, along with N protein, is involved in the assembly and release of virion particles. This protein is a dimer and can have two different structures. Since this protein is not similar in the human vital system and plays a role in the cell cycle of the virus, it can be a good target for drug design. In the SARS-CoV-2 construct, the smallest protein is protein E. In terms of number, these proteins are small in number, the coating proteins have ion channel activity and are membrane proteins. The main activity of this protein is in the assembly and release of the virus and it has no role in genome replication. By improving our understanding of the surface proteins of SARS-CoV-2, we may facilitate the development of appropriate antiviral drugs and vaccines to control and prevent diseases caused by known and potentially emerging Coronaviruses.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Saedaei Jahromi B, Ahmadian Gh, Allahyari Fard N. Review of surface proteins of SARS-CoV-2 virus causing COVID-19. Razi J Med Sci. 2021;28(9):104-117.

***This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.**

مقدمه

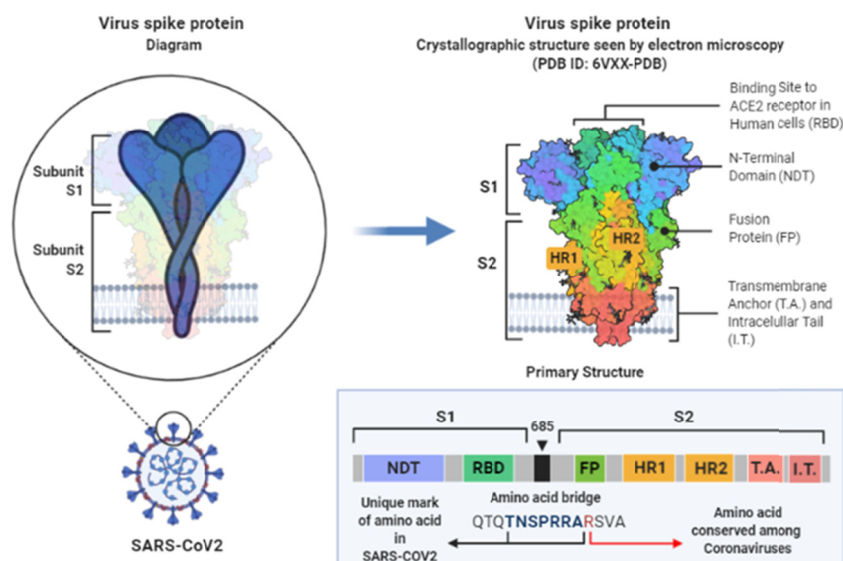
بیماری کرونا به‌عنوان بزرگ‌ترین چالش قرن ۲۱ هزینه‌های هنگفتی را در بخش‌های سلامت، بهداشت، اقتصاد، صنعت و امور اجتماعی و فرهنگی جوامع مختلف جهان ایجاد کرده است (۱، ۲). کروناویروس‌ها عمدتاً باعث ایجاد عفونت در سیستم تنفسی و گوارشی هستند و از نظر ژنتیکی به چهار گروه تقسیم می‌شوند: آلفاکروناویروس، بتاکروناویروس، گاما‌کروناویروس و دلتاکروناویروس؛ به صورتی که دو گونه اول عمدتاً پستانداران را آلوده می‌کند و دو گونه دیگر باعث ایجاد آلودگی در مرغ‌سانان هستند (۳). تا به حال شش گونه کروناویروسی انسانی شناسایی شده است؛ شامل HCoV-NL63 و HCoV-229E که متعلق به گونه آلفاکروناویروس می‌باشند و HCoV-OC43، HCoVHKU1، SARS، MERS که جزء گونه بتاکروناویروس هستند (۴). از بین چندین کروناویروس که در انسان بیماری‌زایی می‌کنند اکثراً دارای علائم خفیفی هستند به غیر از دو سویه سارس و مرس که منجر به بروز علائم شدیدی می‌شوند (۵) و بسیار محتمل است که این دو ویروس از خفاش به انسان منتقل شده باشند (۶-۸). خانواده کروناویروس قبل از سال ۲۰۰۲ که اپیدمیک سارس اتفاق افتاد چندان مورد توجه نبود تا اینکه بیش از ۸۰۰۰ نفر آلوده و ۷۷۴ مورد مرگ از خود بر جای گذاشت و ۳۷ کشور را درگیر کرد (۹).

کروناویروس‌ها دارای یک تک‌رشته‌ای حدود ۳۰ Kb است. اولین فریم خوانش که حدود ۶۷٪ از کل ژنوم، تقریباً معادل ۲۰ Kb را به خود اختصاص می‌دهد ۱۶ پروتئین غیر ساختاری (NSPs) را کد می‌کند و مابقی معادل ۱۰ Kb فریم مربوط به کد کردن پروتئین‌های ساختاری و جانبی است. چهار پروتئین اصلی SARS-CoV-2 شامل گلیکوپروتئین سطحی به نام پروتئین S، پروتئین پوششی به نام پروتئین E، پروتئین ماتریکس M و پروتئین نوکلئوکپسید N است. پروتئین S نقش بسیار مهمی در اتصال ویروس به سطح سلول‌های میزبان دارد. مشخص شده این پروتئین در سارس و مرس به رسپتورهای مختلف و دومین‌های مختلف آن‌ها متصل می‌شود. کروناویروس از آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین

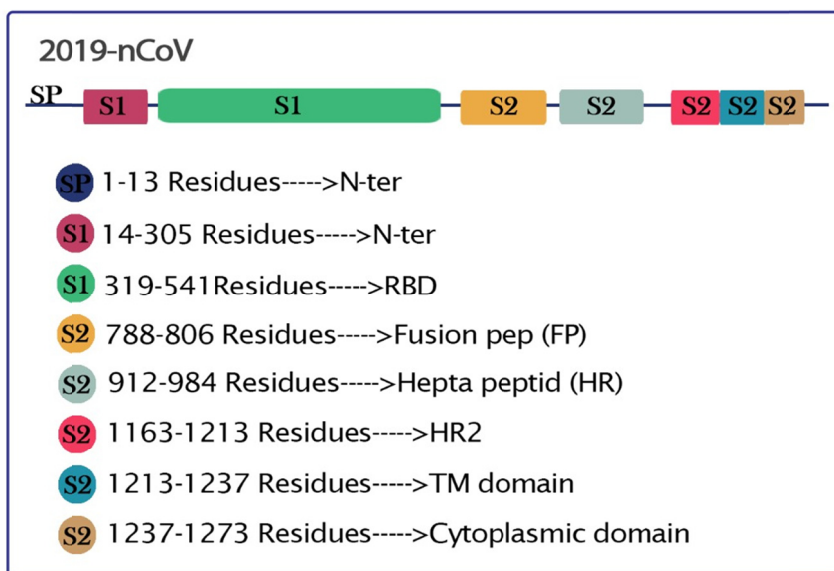
۲ (ACE2) به‌عنوان یکی از رسپتورهای اصلی و از CD209L به‌عنوان رسپتور جانبی استفاده می‌کند (۱۰) در حالی که ویروس مرس از دی‌پپتیدیل پپتیداز ۴ (DPP4 یا CD26) به‌عنوان رسپتور اصلی خود استفاده می‌کند (۱۱، ۱۲). تحقیقات اولیه نشان داد که ویروس کووید ۱۹ ارتباط نزدیکی با سارس خفاشی دارد (۱۳، ۱۴). ژنوم تایید شده برای کووید-۱۹ با ژنوم کروناویروس سارس انسانی، سارس خفاشی و مرس انسانی که توسط پایگاه داده ویروس پاتوژن (ViPR) و NCBI در ژانویه ۲۰۲۰ منتشر شدند، مقایسه شدند (۱۵). مقایسه ژنوم آن‌ها نشان داد که تقریباً یکسان هستند و تنها در برخی نوکلئوتیدها با یکدیگر تفاوت دارند (۱۶). با توجه به اهمیت پروتئین‌های سطحی در طراحی دارو و طراحی واکسن، بر اساس آخرین یافته‌های علمی، بررسی و مروری بر این پروتئین‌ها انجام می‌شود.

پروتئین‌های سطحی (Spike protein S)

S پروتئین‌ها یا پروتئین‌های سطحی SARS-CoV-2، پروتئین‌هایی کلیدی در مکانیسم شناسایی و ورود به سلول هدف می‌باشند. پروتئین‌های اسپایک به‌عنوان پروتئین‌های الحاقی غشای ویروسی کلاس یک شناخته شده‌اند. این پروتئین‌ها را می‌توان در ویروس‌های آنفولانزا، نقص ایمنی انسانی (HIV) و ویروس ابولا یافت. از ویژگی‌های این پروتئین‌ها می‌توان به داشتن ۱۲۷۳ آمینواسید و وزن مولکولی ۱۸۰-۲۰۰ کیلو دالتون اشاره نمود (۱۷). S پروتئین‌ها در مواجهه با آنزیم شبه فورین سلولی شکسته شده و دو زیر واحد S1 و S2 آن از یکدیگر مجزا می‌شوند. همچنین اسپایک پروتئین‌ها روکشی از جنس پلی ساکارید دارند که در نتیجه آن توانایی شناسایی خود را به‌عنوان عامل بیگانه از سیستم ایمنی بدن میزبان سلب می‌نماید (۱۸، ۱۹). زیر واحد S1، شامل دامنه N-ترمینال (NTD) و یک دامنه اتصال به گیرنده (RBD) است (۲۰، ۲۱). پروتئین S یک پروتئین تریمر است که دو حالت ساختاری متمایز شامل پیش الحاقی و پس الحاقی دارد. تشخیص حالت پیش الحاقی توسط سیستم ایمنی بدن که بر اساس پوشش گلیکوزیله سطح اسپایک پروتئین ویروس می‌باشد،



شکل ۱- ساختمان پروتئین S و ترتیب قرارگرفتن توالی‌های آمینواسیدی آن (۶۷)



شکل ۲- ترتیب قرارگیری نواحی مختلف پروتئین اسپایک به تفکیک شماره آمینواسید (۲۱)

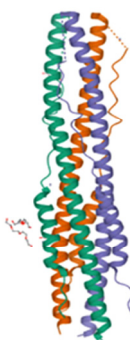
آمینواسید شماره ۱ تا ۱۳ این پروتئین، پپتید نشانه‌ای بوده که ناحیه N- ترمینال را نیز شامل می‌شود. آمینواسیدهای شماره ۱۴ تا ۶۸۵ دامنه S1 را شکل می‌دهند. از آمینواسید شماره ۶۸۶ تا ۱۲۷۳ ناحیه S2 است. به‌طور دقیق‌تر آمینواسید ۱۴ تا ۳۰۵ ناحیه N- ترمینال می‌باشد و از آمینواسید ۳۱۹ تا ۵۴۱ ناحیه RBD است. در زیر واحد S2 نیز آمینواسید ۷۷۸ تا ۸۰۶ پپتید فیوژن می‌باشد. نواحی تکرارهای هپتا پپتید ۱ و ۲ (HR1, HR2) از

برای ایجاد پاسخ ایمنی مؤثر بسیار مهم است (۲۲). در زمان همجوشی ویروس دامنه S1 به گیرنده سطحی سلول میزبان به نام ACE2 متصل می‌شود و در این زمان دامنه S2 به غشای سلول میزبان جوش خورده و در نتیجه غشای سلول میزبان و ویروس با یکدیگر در تماس قرار می‌گیرند. در ادامه ژنوم ویروس وارد سلول میزبان می‌گردد. مرحله اتصال و همجوشی از مراحل آغازی و به‌شدت حیاتی برای ویروس است که تمامی مراحل پس از آن را می‌تواند تحت تأثیر قرار دهد.

هیدروفوبیک - قطبی - قطبی - هیدروفوبیک -
باردار - قطبی - باردار (۲۵).

در ساختار این هپتا پپتیدها ۷ آمینواسید با ترتیب فوق تکرار می‌شوند و ساختمان مارپیچ ۶ تایی (6- HB) را شکل می‌دهند. این ساختار در فرآیند همجوشی و ورود نقش حیاتی بر عهده دارد (۲۷) (شکل ۳). از آنجائی که پپتید همجوشی و هپتا پپتیدها از آمینواسیدهای مشخص و محافظت شده تشکیل شده‌اند، می‌توانند هدف خوبی برای طراحی دارو واقع شوند (۲۸).

به‌طور کلی می‌توان گفت ویروس سارس دو محل اثر آنزیم شبه فورینی بیشتری در مقایسه با ویروس سارس یک دارد، در نتیجه احتمال بیماری‌زایی SARS-CoV-2 در مقایسه با ویروس پیشین بیشتر است (۲۹).



شکل ۳- ساختمان بسته HR2 و HR1 (PDB: 6LVN) (۲۶)



شکل ۴- ساختمان مولکولی تریمر پروتئین اسپایک (PDB: 7BNM) (۳۰)

آمینواسید ۹۱۲ تا ۹۸۴ و ۱۱۶۳ تا ۱۲۱۳ به ترتیب است. پس از آن آمینواسید ۱۲۱۳ تا ۱۲۳۷ دامنه TM بوده و از این آمینواسید تا آخرین آمینواسید دامنه سیتوپلاسمی می‌باشد (شکل ۱ و ۲).

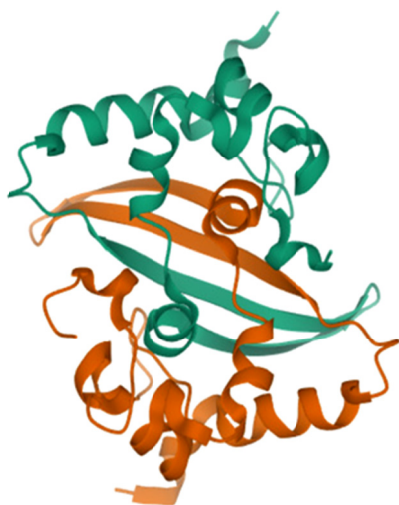
دامنه S1: در این دامنه نواحی RBD، NTD و CTD شناخته شده است. یک یا هر دو نواحی NTD و CTD به‌صورت بالقوه توانایی اتصال به گیرنده و فعالیت به‌عنوان ناحیه RBD را دارد. ناحیه N-ترمینال نقش اتصال به مولکول‌های پلی‌ساکارید را داراست. نقش ناحیه CTD شناسایی رسپتورهای ACE2 و DPP4 می‌باشد. این ناحیه دو زیر دامنه دارد که شامل یک ساختار هسته‌ای و یک موتیف متصل شونده به گیرنده است. ساختمان هسته‌ای شامل پنج صفحه غیر موازی بتاشیت می‌باشد. موتیف متصل شونده نیز دو رشته غیر موازی بتاشیت است. بر اساس مطالعات انجام شده ویروس سارس دو آمینواسیدهای بیشتری در ناحیه CTD نسبت به ویروس سارس یک دارد. لذا ویروس سارس دو توانایی بیشتری در اتصال به گیرنده‌های میزبان دارد. بر همین اساس ناحیه بیشتری از گیرنده توسط ویروس سارس دو پوشیده می‌شود. از آنجائی که دامنه S1 دستخوش جهش‌ها و تغییرات مختلفی شده است کمتر به‌عنوان دارو مورد تحقیق قرار می‌گیرد، مگر اینکه تمرکز بر نقاط و اسیدآمینوهای کمتر تغییر یافته انجام شود.

دامنه S2: دامنه S2 از پنج دامنه تشکیل شده است که وظیفه همجوشی و ورود به سلول میزبان را بر عهده دارد، این پنج دامنه شامل پپتید الحاقی (FP)، HR1، HR2، TM و ناحیه سیتوپلاسمیک است (۲۳). پپتید الحاقی شامل ۱۵ تا ۲۰ آمینواسید محافظت شده می‌باشد، عموماً این آمینواسید هیدروفوبیک بوده و بر اساس مطالعات انجام شده گلايسين و آلانين از آمینواسیدهای فراوان این پپتید است. در طی مراحل همجوشی، زمانی که پروتئین اسپایک ساختار پیش سنجاق سری می‌گیرد این پپتید به غشای میزبان متصل شده و نقش لنگر را ایفا می‌کند. همچنین پس از اتصال غشای دولایه سلول میزبان را تخریب می‌کند (۲۴).

پپتیدهای تکرارشونده ۷ تایی یا HR1 و HR2 شامل آمینواسیدهای تکرارشونده‌ای و به ترتیب زیر می‌باشد.

نوکلئوکپسید (N)

پروتئین نوکلئوکپسید N یک پروتئین ساختاری است. این پروتئین به RNA ویروس متصل می‌شود و در فرآیندهای مرتبط به ژنوم ویروس نظیر همانندسازی ژنوم و پاسخ‌دهی به عفونت‌زایی نقش دارد (۳۱، ۳۲). این پروتئین RNA ویروس را به کمپلکس رپلیکاز-ترنس کریپتاز (RTC) افسار می‌کند (۳۳) و در نهایت پس از آماده شدن ویریون‌ها ژنوم را کپسول‌دار کرده و به آزادسازی ذرات ویریون کمک می‌کند (۳۲). این پروتئین‌ها به شدت فسفریله بوده و در نتیجه موجب افزایش قدرت پروتئین در اتصال به RNA می‌شود (۳۴) (شکل ۵).



شکل ۵- ساختار پروتئین N (PDB: GIB2) (۳۵)

پروتئین غشایی (M)

این پروتئین از دیگر بخش‌های حیاتی ویروس است که در تعیین ساختمان پوشش ویروس دخالت دارد. این پروتئین می‌تواند به تمامی پروتئین‌های ساختاری دیگر متصل شود. پروتئین M به همراه پروتئین N در سرهم‌سازی ذرات ویریون و آزادسازی آن نقش دارد (۳۶). این پروتئین به صورت دایمر است و دو ساختار متفاوت می‌تواند داشته باشد در نتیجه این پروتئین ویروس شکل کروی شده و از داخل به نوکلئوکپسید متصل می‌شود. از آنجائی که این پروتئین مشابهی در سیستم حیاتی انسان ندارد و در چرخه سلولی ویروس ایفا نقش می‌کند می‌تواند هدف مناسبی برای طراحی دارو قرار گیرد (۳۷).



شکل ۶- پروتئین پوششی E (PDB: 7K3G) (۴۰)

پروتئین پوششی (E)

در ساختمان SARS-CoV-2 کوچک‌ترین پروتئین، پروتئین E است. از نظر تعداد نیز این پروتئین‌ها از تعداد کمی برخوردارند، پروتئین‌های پوششی فعالیت کانال یونی داشته و از پروتئین‌های غشایی می‌باشند (۳۸). فعالیت اصلی این پروتئین در سرهم‌سازی و آزادسازی ویروس است و نقشی در همانندسازی ژنوم ندارد (۳۹) (شکل ۶).

پروتئین دایمر هم آگلوتینین استراز (HE)

این پروتئین‌ها اختصاصی بتاکرونا ویروس‌ها بوده و به سیالیک اسید موجود در سطح گلیکوپروتئین‌ها

متصل می‌شوند. این پروتئین پس از ورود به سلول میزبان و افزایش میزان S پروتئین فعال می‌شود و به انتشار ویروس از طریق موکوز کمک می‌کند (۴۱).

مکانیسم ورود ویروس SARS-CoV-2 به درون سلول میزبان

به‌طور کلی ویروس‌ها به دو روش اندوسیتوز و یا

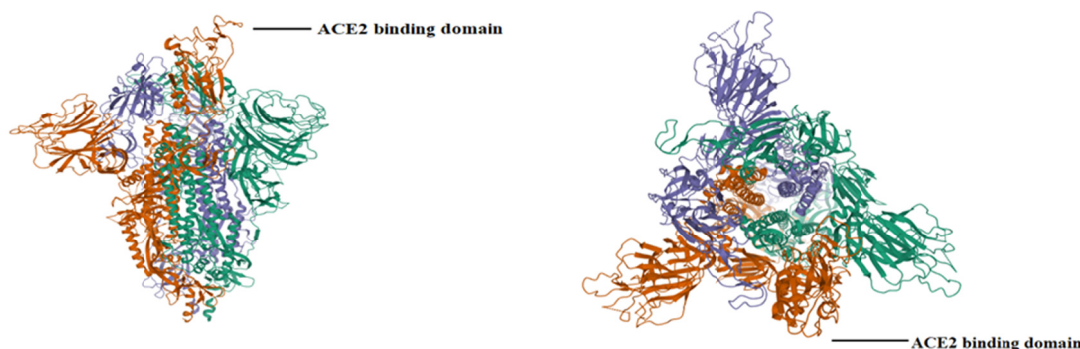
(۲۱). بر اساس تحقیقات انجام شده، هرچه میزان جایگاه‌های شکست در پروتئین سطحی ویروس بیشتر باشد، میزان عفونت‌زایی آن نیز بیشتر است (۵۱). همچنین ثابت شده است که علاوه بر سرین پروتئاز، آنزیم تریپسین نیز توانایی شکستن پروتئین S را دارد (۵۲).

چرخه ورود ویروس SARS-CoV-2

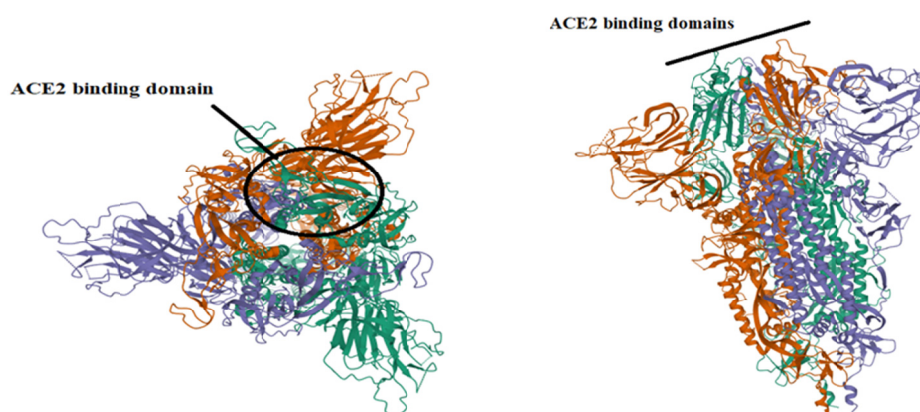
روند ورود ویروس سارس ۲ به سلول میزبان از طریق اتصال گلیکوپروتئین S به گیرنده ACE2 که بر روی سلول‌های میزبان (مانند پنوموسیت‌های نوع II در ریه‌ها) قرار دارند، آغاز می‌شود (۵۳). RBD که در CTD پروتئین S قرار دارد، وظیفه شناسایی گیرنده ACE2 را بر عهده دارد. مطالعه ساختاری RBD نشان داده است که RBD دارای یک هسته و یک موتیف اتصال‌دهنده گیرنده (RBM) می‌باشد. وظیفه RBM واسطه تماس پروتئین S با ACE2 است. سطح ACE2 شامل دو کانون اتصال‌دهنده ویروس است که برای اتصال SARS-CoV-2 ضروری است (۵۴). چندین جهش طبیعی انتخاب شده در RBM این نقاط داغ را احاطه کرده و عفونت، بیماری‌زایی و انتقال متقابل گونه‌ها و انسان به انسان از SARS-CoV-2 را تنظیم می‌کند (۵۵، ۵۶).

hACE2 شامل یک ناحیه فعال N-ترمینال پپتیداز با دو لوب است و ساختاری شبیه به یک ساختار پنجه مانند و یک حوزه کلکتورین ترمینال C دارد و می‌تواند ساختارهای باز و بسته را شکل دهد (۵۷). ناحیه RBD SARS-CoV-2 صرف‌نظر از ساختمان باز یا

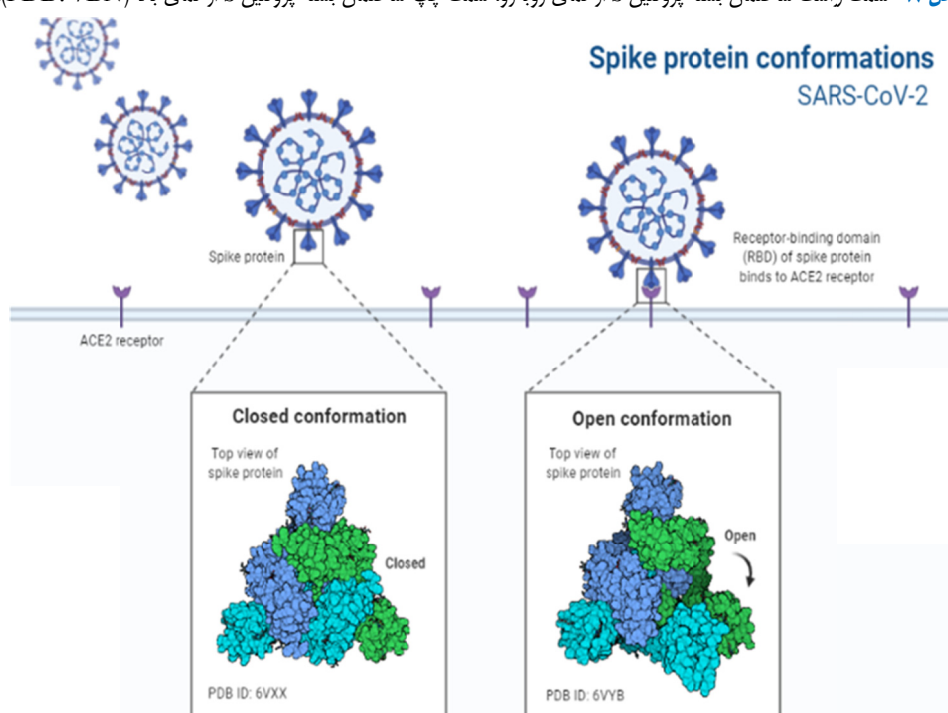
همجوشی وارد سلول میزبان خود می‌شوند. در روش همجوشی، پروتئین‌های سطحی ویروس که در اینجا پروتئین S است، با گیرنده‌های سطحی سلول میزبان اتصال برقرار کرده و در نهایت با اتصال به غشای میزبان، ایجاد کمپلکسی می‌نماید که نسبت به سیستم ایمنی مقاوم بوده و همانند کانال غشایی عمل می‌کند. سپس ویروس مهاجم ماده ژنتیکی خود را از طریق این کانال غشایی به سلول میزبان تزریق می‌کند (۴۲). در مقابل، در اندوسیتوز به واسطه گیرنده، ذره ویریون گلیکوپروتئین‌های S به عنوان عامل متصل‌کننده به غشای سلول متصل می‌شود و ویروس توسط غشای سلولی به صورت یک وزیکول غوطه‌ور می‌شود (۴۳). هرچند ویروس SARS-CoV-2 برای ورود به سلول میزبان از طریق اتصال به گیرنده که ACE2 (۴۴) و یا DPP4 (۲۱، ۴۵) است استفاده می‌کند، اما به‌طور کلی این ویروس برای ورود روش اندوسیتوز را به کار می‌گیرد. فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-فسفات ۵-کیناز (PIKfyve) (۴۶)، ۲ کانال حفره‌ای (TPC2) و کاتپسین L برای ورود ویروس SARS-CoV-2 حیاتی می‌باشند (۴۷). مرحله اصلی در اندوسیتوز و همجوشی غشاها در ورود ویروس SARS-CoV-2 شکستن پروتئین S توسط آنزیم غشایی سرین پروتئاز ۲ (TMPRSS2) می‌باشد (۴۸). SARS-CoV-2 دارای یک محل تجزیه غنی از آرژنین که به عنوان محل تجزیه فوری نیز شناخته می‌شود، بوده و به فوری که آنزیمی است که در سلول‌های میزبان وجود دارد، حساس است (۴۹، ۵۰). در اثر فعالیت این آنزیم، پروتئین S به دو زیر واحد S1 و S2 می‌شکند (۲۰)



شکل ۷- سمت چپ: ساختمان پروتئین S در حالت باز از نمای بالا در این حالت جایگاه اتصال به گیرنده ACE2 مشخص است. سمت راست: ساختمان پروتئین S در حالت باز از نمای روبه‌رو (PDB: 7BNM) (۳۰).



شکل ۸- سمت راست ساختمان بسته پروتئین S از نمای روبه‌رو، سمت چپ ساختمان بسته پروتئین S از نمای بالا (PDB: 7BN).

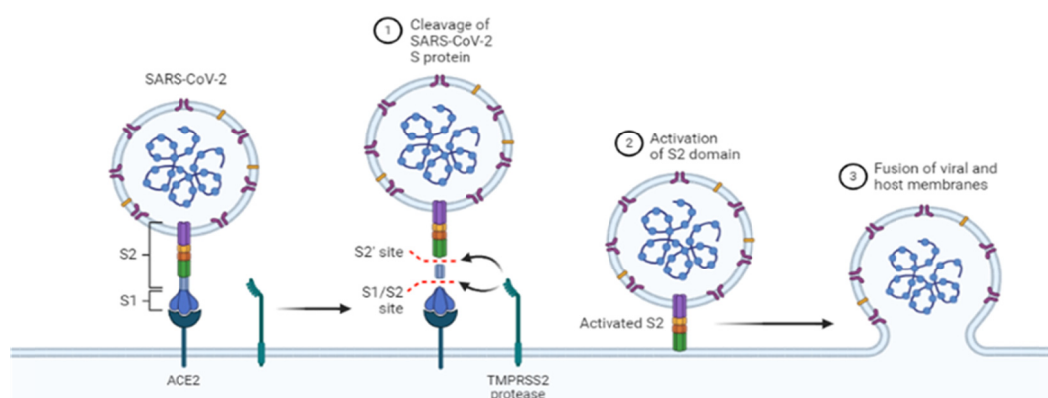


شکل ۹- شکل‌گیری فضایی پروتئین S بصورت باز (راست) و بسته (چپ) (۶۹)

۱۲۲، ۱۴۹، ۱۶۵، ۲۳۴ و ۲۸۲) و RBD (در موقعیت‌های ۳۳۱، ۳۴۱، و ۳۴۳) پخش شده است (۵۸).

تجزیه و تحلیل ساختارهای اشعه X و Cryo-EM مربوط به RBD به‌عنوان منطقه کلیدی تعامل با hACE2 اشاره دارد و در صورت عدم حضور آن، پروتئین S قادر به اتصال به گیرنده نخواهد بود. ناحیه RBD متشکل از پنج صفحه $\beta 1$ ، $\beta 2$ ، $\beta 3$ ، $\beta 4$ و $\beta 7$ غیر موازی و دو رشته کوتاه $\beta 5$ و $\beta 6$ واقع در بین $\beta 4$ و $\beta 7$ است که به مارپیچ‌های کوتاه ($\alpha 4$ و $\alpha 5$) و

بسته hACE2 می‌تواند به hACE2 متصل شود (۵۶). چهار آمینواسید اصلی در hACE2 که ناظر بر تعامل میان گیرنده hACE2 و RBD هستند شامل - Lys31، Glu35، Asp38 و Lys353 می‌باشند. آمینواسید Glu35 در گونه‌های مختلف، آمینواسید محافظت شده است. (به‌عنوان مثال در گربه‌های خانگی، موش خرماها، میمون‌ها و راکن‌ها) (۵۵). S-glycoprotein های ویروس سارس ۲ دارای ۲۲ سایت گلیکوزیلاسیون متصل به N ترمینال است که در مناطق مختلف از جمله NTD (در موقعیت‌های ۱، ۴،



شکل ۱۰- مکانیسم ورود ویروس به درون سلول هدف (۷۰)

در ادامه چرخه ورود، پس از اثر آنزیم TMPRSS2 و شکستن S1 و S2، از آنجایی که ناحیه NTD و TM در غشای سلول ویروس قرار دارد، S2 خم شده و با خم شدن آن، ویروس به غشای سلول میزبان نزدیک می‌گردد. سپس اندوسیتوز رخ داده و ویروس به صورت یک وزیکول وارد سلول هدف می‌گردد (۶۴، ۶۵).

به دنبال ورود ویروس به سلول میزبان، RNA ویروسی در سیتوپلاسم از غشا ویروس خارج می‌گردد. ORF1a و ORF1ab ترجمه شده و به تولید پروتئین‌های pp1a و pp1ab می‌پردازند که توسط پروتئازهای RTC شکسته می‌شوند (۶۶). در طول همانندسازی، RTC تولید نسخه‌های RNA (-) تمام طول ژنوم را هدایت می‌کند و به‌عنوان الگو تمام طول ژنوم های RNA + استفاده می‌شود. در حین رونویسی، یک مجموعه تودرتو از RNA های زیر ژنومی (sgRNA)، به روشی از رونویسی ناپیوسته (رونویسی تکه‌تکه) تولید می‌شود (۶۷). علیرغم اینکه این sgrRNA ها ممکن است چندین قاب خواندن باز (ORF) داشته باشند، فقط نزدیک‌ترین ORF (به انتهای ۵) ترجمه می‌شود. به دنبال تولید پروتئین‌های ساختاری SARS-CoV-2، نوکلئوکپسیدها در سیتوپلاسم جمع می‌شوند و به دنبال آن جوانه زده و وارد لومن شبکه آندوپلاسمی (ER) - محفظه میانی - گزری می‌شوند. سپس ویروس‌ها جهت عفونت‌زایی مجدد آزاد می‌شوند.

نتیجه‌گیری

ویروس SARS-CoV-2 عامل بیماری کرونا بوده که

حلقه‌ها متصل هستند (۳۰). بیشتر آمینواسیدهای واکنش‌دهنده hACE2 در ناحیه اتصال، توسط هلیکاز $\alpha 4$ و $\alpha 5$ ، صفحات $\beta 5$ و $\beta 6$ و حلقه‌های اتصال نهفته است که در مجموع به‌عنوان موتیف اتصال گیرنده (RBM) نام‌گذاری شده‌اند (۳۰، ۵۹، ۶۰).

پس از آنکه گلیکوپروتئین S به ACE2 متصل می‌شود، پروتئین تریمر S توسط پروتئیناز سرم غشایی مرتبط با سطح سلول (TMPRSS2) و کاتپسین شکسته می‌شود. S1 دامنه میزبان و تروپیسیم سلولی را تعیین می‌کند و اتصال ویروسی به سلول‌های هدف را تسهیل می‌کند. S2 زیر واحدی است که واسطه همجوشی غشاهای ویروسی و سلولی است. پروتئولیز پروتئین S می‌تواند مستقیماً به همجوشی غشا منجر شود و در نتیجه به‌عنوان محرک اصلی همجوشی غشا عمل کند (۶۱، ۶۲). پروتئازهای میزبان که پروتئین S ویروس کرونا را می‌شکافند، عمدتاً از چهار مرحله مختلف چرخه عفونت ویروس ناشی می‌شوند:

الف) در زمان بسته‌بندی ویروس در سلول‌های تولیدکننده ویروس توسط کانورتازهای پیش پروتئینی مثل فورین، (ب) توسط پروتئازهای خارج سلولی (به‌عنوان مثال الاستاز) پس از انتشار ویروس در فضای خارج سلول، (ج) پروتئازهای سطح سلول به‌عنوان مثال پروتئیناز سرین غشایی نوع دو TMPRSS2 پس از اتصال ویروس به هدف‌گیری ویروس سلول‌ها و (د) پروتئازهای لیزوزومی (به‌عنوان مثال، کاتپسین L و کاتپسین B) پس از اندوسیتوز ویروس در سلول‌های هدف (۶۳).

کوچک‌ترین پروتئین در ساختمان SARS-CoV-2 است. فعالیت اصلی پروتئین E در سرهم سازی و آزادسازی ویروس است. امید است بررسی و معرفی این پروتئین‌های سطحی در جهت تعمیق و غنابخشی دانش تخصصی دانش پژوهان با اهداف و فرضیات مختلف به‌منظور کشف و طراحی دارو یا طراحی واکسن‌ها و پپتیدهای دارویی مفید واقع شود.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از حمایت‌ها و ارائه تسهیلات مناسب توسط پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری با طرح پژوهشی مرتبط در تهیه و ارائه این مقاله قدردانی می‌شود.

References

1. Koh HK, Geller AC, VanderWeele TJ. Deaths from COVID-19. *JAMA*. 2021;325(2):133-4.
2. Ganesh B, Rajakumar T, Malathi M, Manikandan N, Nagaraj J, Santhakumar A, et al. Epidemiology and pathobiology of SARS-CoV-2 (COVID-19) in comparison with SARS, MERS: An updated overview of current knowledge and future perspectives. *Clin Epidemiol Glob Health*. 2021;100694.
3. Kim C, Ryu DK, Lee J, Kim YI, Seo JM, Kim Y-G, et al. A therapeutic neutralizing antibody targeting receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein. *Nat Commun*. 2021;12(1):1-10.
4. Zhan GF, Wang Y, Yang N, Luo AL, Li SY. Digestive system involvement of infections with SARS-CoV-2 and other coronaviruses: *World J Gastrointest*. 2021;27(7):561.
5. Barua R, Datta S, Roychowdhury A, Datta P. The Study of the Epidemiology and Clinical Features of the Novel Coronavirus (COVID-19). *Epidemiological Research Applications for Public Health Measurement and Intervention: IGI Global*; 2021. p. 25-39.
6. Wacharapluesadee S, Tan CW, Maneorn P, Duengkae P, Zhu F, Joyjinda Y, et al. Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia. *Nat Commun*. 2021;12(1):1-9.
7. Rasmussen AL. On the origins of SARS-CoV-2. *Nat Med*. 2021;27(1):9-.
8. Liu K, Tan S, Niu S, Wang J, Wu L, Sun H, et al. Cross-species recognition of SARS-CoV-2 to bat ACE2. *PNAS*. 2021;118(1).
9. Ezhilan M, Suresh I, Nesakumar N. SARS-CoV,

با شدت سرایت، موجب پاندمی در سراسر دنیا شده و بر جنبه‌های مختلف زندگی‌های فردی، اجتماعی، اقتصادی و بهداشت و سلامت تأثیر گذاشته است. همچنین به دلیل آمار بالای مرگ‌ومیر، مهارناپذیری و تنوع واریانت‌ها بزرگ‌ترین چالش قرن نام گرفته است. از آنجا که هرگونه اقدامات پیشگیرانه، طراحی دارو، طراحی واکسن و تهیه برنامه‌های مقابله با این بیماری، نیازمند شناخت دقیق ماهیت، بخش‌ها و عملکرد ویروس؛ به‌ویژه پروتئین‌های سطحی آن است، در این مقاله تلاش شد تا بر اساس آخرین یافته‌های علمی منتشرشده در سال‌های ۲۰۲۰ و ۲۰۲۱ در پایگاه‌های داده PubMed, Scopus, ScienceDirect, Google Scholar پروتئین‌های سطحی ویروس و مکانیسم مواجهه ویروس و ورود به میزبان مورد بررسی قرار گرفته و ارائه شود. چهار پروتئین اصلی ویروس کرونا شامل گلیکوپروتئین سطحی به نام پروتئین S، پروتئین پوششی به نام پروتئین E، پروتئین ماتریکس M و پروتئین نوکلئوکپسید N است. پروتئین S دارای دو دومین S1 و S2 بوده و نقش بسیار مهمی در مکانیسم شناسایی، ورود و اتصال ویروس به سطح سلول‌های میزبان دارد. RBD از دومین S1 بخش اتصال دهنده با گیرنده میزبان و RBM یا موتیف اتصال دهنده گیرنده اهمیت کلیدی در اتصال دارند. گیرنده‌های میزبان شامل پروتئین آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین ۲ (ACE2) به‌عنوان رسپتور اصلی و پروتئین CD209L به‌عنوان رسپتور جانبی است. پروتئین N به RNA ویروس متصل می‌شود و در فرآیندهای مرتبط به ژنوم ویروس نظیر همانندسازی ژنوم و پاسخ‌دهی به عفونت‌زایی نقش دارد و در نهایت پس از آماده شدن ویریون‌ها ژنوم را کپسول‌دار کرده و به آزادسازی ذرات ویریون کمک می‌کند. پروتئین M به همراه پروتئین N در سرهم سازی ذرات ویریون و آزادسازی آن نقش دارد. این پروتئین به‌صورت دایمر است و دو ساختار متفاوت می‌تواند داشته باشد در نتیجه این پروتئین ویروس شکل کروی شده و از داخل به نوکلئوکپسید متصل می‌شود. پروتئین M مشابهی در سیستم حیاتی انسان ندارد و در چرخه سلولی ویروس ایفای نقش می‌کند، لذا می‌تواند هدف مناسبی برای طراحی دارو قرار گیرد. پروتئین E

- MERS-CoV and SARS-CoV-2: A Diagnostic Challenge. *Measurement*. 2021;168:108335.
10. Amraei R, Rahimi N. COVID-19, renin-angiotensin system and endothelial dysfunction. *Cells*. 2020;9(7):1652.
 11. Ge XY, Li JL, Yang XL, Chmura AA, Zhu G, Epstein JH, et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*. 2013;503(7477):535-8.
 12. Lu G, Hu Y, Wang Q, Qi J, Gao F, Li Y, et al. Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26. *Nature*. 2013;500(7461):227-31.
 13. Wang Q, Qi J, Yuan Y, Xuan Y, Han P, Wan Y, et al. Bat origins of MERS-CoV supported by bat coronavirus HKU4 usage of human receptor CD26. *Cell Host Microbe*. 2014;16(3):328-37.
 14. El Zowalaty ME, Järhult JD. From SARS to COVID-19: A previously unknown SARS-related coronavirus (SARS-CoV-2) of pandemic potential infecting humans—Call for a One Health approach. *One Health*. 2020;9:100124.
 15. Pickett BE, Sadat EL, Zhang Y, Noronha JM, Squires RB, Hunt V, et al. ViPR: an open bioinformatics database and analysis resource for virology research. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(D1):D593-D8.
 16. Chang TJ, Yang DM, Wang ML, Liang KH, Tsai PH, Chiou SH, et al. Genomic analysis and comparative multiple sequences of SARS-CoV2. *J Chin Med Assoc*. 2020;83(6):537-43.
 17. Huang Y, Yang C, Xu XF, Xu W, Liu SW. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin*. 2020;1-9.
 18. Bosch BJ, Van der Zee R, De Haan CA, Rottier PJ. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol*. 2003;77(16):8801-11.
 19. Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*. 2020.
 20. Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah N, Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res*. 2020;176:104742.
 21. Srinivasan S, Cui H, Gao Z, Liu M, Lu S, Mkandawire W, et al. Structural genomics of SARS-CoV-2 indicates evolutionary conserved functional regions of viral proteins. *Viruses*. 2020;12(4):360.
 22. Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Ann Rev Virol*. 2016;3:237-61.
 23. Xia S, Zhu Y, Liu M, Lan Q, Xu W, Wu Y, et al. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cell Mol Immunol*. 2020;1-3.
 24. Millet JK, Whittaker GR. Physiological and molecular triggers for SARS-CoV membrane fusion and entry into host cells. *Virology*. 2018;517:3-8.
 25. Chambers P, Pringle CR, Easton AJ. Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J Gen Virol*. 1990;71(12):3075-80.
 26. Berman H, Henrick K, Nakamura H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat Struct Mol Biol*. 2003;10(12):980-.
 27. Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol*. 2016;3(1):237-61.
 28. Lu G, Wang Q, Gao GF. Bat-to-human: spike features determining 'host jump' of coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond. *Trends Microbiol*. 2015;23(8):468-78.
 29. Van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med*. 2020;382(16):1564-7.
 30. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020;581(7807):215-220.
 31. Schoeman D, Fielding BC. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virol J*. 2019;16(1):1-22.
 32. Tai W, He L, Zhang X, Pu J, Voronin D, Jiang S, et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(6):613-20.
 33. Santerre M, Arjona SP, Allen CN, Shcherbik N, Sawaya BE. Why do SARS-CoV-2 NSPs rush to the ER? *J Neurol*. 2020;1-10.
 34. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Coronaviruses: Springer*; 2015. p. 1-23.
 35. Ero R, Dimitrova VT, Chen Y, Bu W, Feng S, Liu T, et al. Crystal structure of Gib2, a signal-transducing protein scaffold associated with ribosomes in *Cryptococcus neoformans*. *Sci Rep*. 2015;5(1):8688.
 36. Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, Xu J, Obernier K, White KM, et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*. 2020;583(7816):459-68.
 37. Amanat F, Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines: status report. *Immunity*. 2020;52(4):583-9.
 38. Zeng W, Liu G, Ma H, Zhao D, Yang Y, Liu M, et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;527(3):618-23.
 39. Duarte G, Garcia-Murria MJ, Grau B, Acosta-

- Cáceres JM, Martínez-Gil L, Mingarro I. SARS-CoV-2 envelope protein topology in eukaryotic membranes. *Open Biol.* 2020;10(9):200-209.
40. Mandala VS, McKay MJ, Shcherbakov AA, Dregni AJ, Kolocouris A, Hong M. Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. *Nat Struct Mol Biol.* 2020;27(12):1202-8.
41. Cai Y, Zhang J, Xiao T, Peng H, Sterling SM, Walsh RM, et al. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science.* 2020;369(6511):1586-92.
42. Astuti I. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clin Res Rev.* 2020;14(4):407-12.
43. Chou T. Stochastic entry of enveloped viruses: fusion versus endocytosis. *Biophys J.* 2007;93(4):1116-23.
44. Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):562-9.
45. Wang N, Shi X, Jiang L, Zhang S, Wang D, Tong P, et al. Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Res.* 2013;23(8):986-93.
46. Kumar V. Understanding the complexities of SARS-CoV2 infection and its immunology: A road to immune-based therapeutics. *Int Immunopharmacol.* 2020;106980.
47. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun.* 2020;11(1):1-12.
48. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell.* 2020;181(2):271-80. e8.
49. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020;367(6483):1260-3.
50. Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell.* 2020.
51. Hasan A, Paray BA, Hussain A, Qadir FA, Attar F, Aziz FM, et al. A review on the cleavage priming of the spike protein on coronavirus by angiotensin-converting enzyme-2 and furin. *J Biomol Struct Dyn.* 2020:1-9.
52. Wicht O, Li W, Willems L, Meuleman TJ, Wubbolts RW, van Kuppeveld FJ, et al. Proteolytic activation of the porcine epidemic diarrhea coronavirus spike fusion protein by trypsin in cell culture. *J Virol.* 2014;88(14):7952-61.
53. Hamming I, Timens W, Bulthuis M, Lely A, Navis Gv, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *The Journal of Pathology: Rev Med Microbiol.* 2004;203(2):631-7.
54. Li X, Giorgi EE, Marichanegowda MH, Foley B, Xiao C, Kong XP, et al. Emergence of SARS-CoV-2 through recombination and strong purifying selection. *Sci Adv.* 2020;6(27):eabb9153.
55. Li F. Structural analysis of major species barriers between humans and palm civets for severe acute respiratory syndrome coronavirus infections. *J Virol.* 2008;82(14):6984-91.
56. Li F, Li W, Farzan M, Harrison SC. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science.* 2005;309(5742):1864-8.
57. Towler P, Staker B, Prasad SG, Menon S, Tang J, Parsons T, et al. ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis. *J Biol Chem.* 2004 Apr 23;279(17):17996-8007.
58. Kang S, Yang M, Hong Z, Zhang L, Huang Z, Chen X, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta Pharm Sin B.* 2020;10(7):1228-38.
59. Wang Q, Zhang Y, Wu L, Niu S, Song C, Zhang Z, et al. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell.* 2020.
60. Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature.* 2020;581:221-224.
61. Heald-Sargent T, Gallagher T. Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses.* 2012;4(4):557-80.
62. Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses.* 2012;4(6):1011-33.
63. Millet JK, Whittaker GR. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res.* 2015;202:120-34.
64. Glebov OO. Understanding SARS-CoV-2 endocytosis for COVID-19 drug repurposing. *FEBS J.* 2020;287(17):3664-71.
65. Wang H, Yang P, Liu K, Guo F, Zhang Y, Zhang G, et al. SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin-and caveolae-independent endocytic pathway. *Cell Res.* 2008;18(2):290-301.
66. Khan S, Liu J, Xue M. Transmission of SARS-CoV-2, required developments in research and associated public health concerns. *Front Med.* 2020;7:310.
67. Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN,

Chang H. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome. *cell*. 2020;181(4):914-21. e10.

68. BioRender (2021). An In-depth Look into the Structure of the SARS-CoV2 Spike Glycoprotein. Retrieved from <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/5e99f5395fd61e0028682c01/t-5f1754e62baea000ace86904-an-in-depth-look-into-the-structure-of-the-sars-cov2-spike-g>

69. BioRender (2021). SARS-CoV-2 Spike Protein Conformations. Retrieved from <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/5e99f5395fd61e0028682c01/t-5e7dfb4c02d98200a9ec35f4-sars-cov-2-spike-protein-conformations>

70. BioRender (2021). Mechanism of SARS-CoV-2 Viral Entry. Retrieved from <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/5e99f5395fd61e0028682c01/t-5f99eb1307ef9a009f1c61e0-mechanism-of-sars-cov-2-viral-entry>