



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΑΓΡΟΔΙΑΤΡΟΦΗ»

"Μοριακή δομή του ιού SARS-CoV-2: ξεκλειδώνοντας τα μυστικά της παθογένειας, της υψηλής μεταδοτικότητας, και της αντιμετώπισής του".

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

της

Δήμητρας Στάθης

Υπεύθυνος καθηγητής : Μιχαηλίδης Θεολόγος

ΙΩΑΝΝΙΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2021

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΑΓΡΟΔΙΑΤΡΟΦΗ»

"Μοριακή δομή του ιού SARS-CoV-2: ξεκλειδώνοντας τα μυστικά της παθογένειας, της υψηλής μεταδοτικότητας, και της αντιμετώπισής του".

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

της

Δήμητρας Στάθης

**Επιβλέπων Καθηγητής:** Θεολόγος Μιχαηλίδης, Αναπληρωτής, Καθηγητής του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

1. Θεολόγος Μιχαηλίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής της σχολής Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Αμαλία-Σοφία Αφένδρα, Επίκουρη Καθηγήτρια της σχολής Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Ήρα Καραγιάννη, Επίκουρη Καθηγήτρια της σχολής Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΙΩΑΝΝΙΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2021

Στάθη Δήμητρα,

## Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την παρούσα διπλωματική εργασία, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους αυτούς που συνέβαλαν στην πραγματοποίησή της.

Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέπων καθηγητή μου κ. Θεολόγο Μιχαηλίδη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, το χρόνο που αφιέρωσε, την συνεχή βοήθεια, τα επικοδομητικά σχόλια και τις υποδείξεις που συνέβαλλαν ώστε να ολοκληρωθεί ως προς το μέγιστο η παρούσα εργασία.

Ευχαριστώ πολύ τα υπόλοιπα μέλη της επιτροπής κα. Αμαλία-Σοφία Αφένδρα και κα. Έρα Καραγιάννη για τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις και που με τίμησαν με την συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή παρά τον βαρύ τους πρόγραμμα.

Τέλος ευχαριστώ τον σύζυγό μου Ευθύμιο Κ., για την συνεχή στήριξη στις δύσκολες στιγμές ώστε να ολοκληρωθεί η διπλωματική εργασία μου.

Αφιερωμένο στη οικογένειά μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γονιδίωμα του SARS-COV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus-2) και η μελέτη του είναι το κλειδί για την παραγωγή των εμβολίων και τη θωράκιση του κόσμου απέναντι στην νέα απειλή. Σε αυτή την εργασία, περιέλαβα στοιχεία για την μοριακή του δομή, ποια είναι εκείνα τα οποία μελετούν οι επιστήμονες, πως γίνεται η ιογενής σύντηξης και ποια είναι εκείνα τα στοιχεία που τον κάνουν πιο μεταδοτικό από άλλους κορωνοϊούς ή καθώς και τι είναι αυτό που χαρακτηρίζει την μεγάλη μεταδοτικότητά του. Τι νέες πληροφορίες έχουμε στα χέρια μας σχετικά με τις γνωστές ως μη δομικές πρωτεΐνες για την δημιουργία νέων αντικών φαρμάκων ή εμβολίων. Και τι γίνεται με τις μεταλλάξεις/παραλλαγές του νέου ιού.

Ο SARS-COV-2 είναι ένας RNA ιός, με γονιδίωμα μονόκλωνου RNA (ssRNA) θετικής πολικότητας που αποτελείται από 29.903 ζεύγη βάσεων. Κωδικοποιεί 4 δομικές πρωτεΐνες, την πρωτεΐνη N (νουκλεοκαψίδιο) η οποία συγκρατεί το γονιδίωμα RNA στο εσωτερικό του ιού, και τις πρωτεΐνες S (ακίδα), E (φάκελο) και M (μεμβράνη) οι οποίες φτιάχνουν το περίβλημα του ιού, το καψίδιο ή ικό φάκελο. Τα γονίδια που κωδικοποιούν για αυτές τις πρωτεΐνες είναι διατεταγμένα διαδοχικά στο γονιδίωμα ακολουθώντας την τυπική σειρά S, E, M, N στην κατεύθυνση 5'-3'. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα υπόλοιπα αναγνωστικά πλαίσια (Orfs), π.χ Orf3a, Orf3b κλπ., οι αλληλουχίες των οποίων είναι διάσπαρτες ανάμεσα στα δομικά γονίδια, αντιπροσωπεύουν τις βοηθητικές ή μη δομικές πρωτεΐνες (Non Structural Proteins, NSPs), και από κοινού παρέχουν ένα συλλογικό πλεονέκτημα στη μόλυνση και την παθογένεση του ιού. Οι πρωτεΐνες αυτές αριθμούνται με τα νούμερα από 1 έως 16 (NSP1 έως NSP16) και έχουν με σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή του ιού και στην αποφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Οι συνεχείς έρευνες πάνω στους μηχανισμούς λειτουργίας τους, μας δίνουν πληροφορίες για την δημιουργία νέων αντικών φαρμάκων ή εμβολίων.

Ο νέος ιός που εμφανίστηκε είναι λιγότερο θανατηφόρος από τον προηγούμενο SARS αλλά πιο μεταδοτικός και για αυτό μεταδόθηκε ταχύτατα σε όλη την υφήλιο. Ο κορωνοϊός έχει κοινά χαρακτηριστικά και γενετικές ομοιότητες με τον SARS και τον MERS προκαλώντας το οξύ αναπνευστικό σύνδρομο (Middle East Respiratory Syndrome). Πολλοί επιστήμονες θεωρούν ότι ο ιός αυτός, έχει προέλθει από τις νυχτερίδες και μεταδόθηκε στον άνθρωπο μέσω κάποιου ενδιάμεσου ξενιστή.

Μεταδίδεται κυρίως με την αναπνευστική οδό μέσω των σταγονιδίων μολυσμένων ανθρώπων (βήχας, φτέρνισμα, έντονη ομιλία), οι οποίοι μπορεί να εμφανίζουν συμπτώματα (συμπτωματικοί) ή και όχι (ασυμπτωματικοί). Μπορεί όμως να μεταδοθεί και με έμμεσο τρόπο, μέσω μολυσμένων επιφανειών.

Όταν εισέρχεται ο ιός στον οργανισμό, προσπαθεί να προσκολληθεί στα κύτταρα του ξενιστή με την πρωτεΐνη S (spike). Επειδή πρωτεΐνη αυτή έχει μεγάλη αγγιστεία προς το ένζυμο μετατροπής αγγειοτενσίνης 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2), την χρησιμοποιεί ως υποδοχέα για να εισέλθει στο κύτταρο. Επειδή το ένζυμο (ACE2) βρίσκεται κυρίως στους πνεύμονες, την καρδιά τα νεφρά και το έντερο, προσβάλλει κυρίως αυτά τα μέρη. Ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο είτε με ενδοκυττάρωση ή είτε μέσω σύντηξης με την κυτταρική μεμβράνη. Η πρώτη οδός εξαρτάται άμεσα από την ACE2 και μπορεί να γίνεται μέσω του μονοπατιού της κλαθρίνης (clathrin-dependent) ή μέσω εξειδικευμένων λιπιδίων (lipid-raft dependent). Για την δεύτερη οδό, απαραίτητη προϋπόθεση για την σύντηξη είναι η πρωτεολυτική τροποποίηση της πρωτεΐνης S από πρωτεάση TMPRSS2 (transmembrane protease serine 2). Και σε αυτή την οδό, η ACE2 έχει έμμεσο αλλά σημαντικό ρόλο. Επίσης, υπάρχουν και άλλες οδοί εισόδου του ιού στους ξενιστές του, όπως για παράδειγμα ο υποδοχέας CD147, μια πρωτεΐνη της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών. Γι' αυτό και η παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης S με τους υποδοχείς αυτούς αξιοποιείται ως ελπιδοφόρα θεραπευτική στρατηγική. Για παράδειγμα η χλωροκίνη (chloroquine) μπορεί να παρεμποδίσει την πρόσδεση της πρωτεΐνης S με την ACE2 ενώ το meplazumab, ένα αντίσωμα έναντι του CD147 αναστέλλει αποτελεσματικά την είσοδο του ιού στα κύτταρα.

Όταν γίνει η ιική σύντηξη, ο ιός απελευθερώνει το RNA του και χρησιμοποιώντας αρχικά τη μεταφραστική μηχανή (για να συνθέσει την RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, γνωστή και ως RNA ρεπλικάση) και στη συνέχεια την μεταγραφική και αντιγραφική μηχανή του κυττάρου ξενιστή, το αναγκάζει να παράγει και να διαδίδει αντίγραφα του που με την σειρά τους μολύνουν άλλα κύτταρα.

Μία από τις δυσκολίες που αντιμετωπίζει ο ιατρικός κόσμος είναι οι πολλές μεταλλάξεις που έχουν εμφανιστεί και τον κάνουν πιο μεταδοτικό ή πιο επικίνδυνο, αλλά και το κατά πόσο τα εμβόλια που υπάρχουν ως τώρα μας προφυλάσσουν ή θα εξακολουθούν να μας προφυλάσσουν στο μέλλον.

Υπάρχει συνεχής έρευνα και παρακολούθηση πάνω στο ζήτημα SARS-COV-2, και σε αυτή την εργασία επισημαίνεται ο θεμελιώδης ρόλος που έχει η διερεύνηση της οργάνωσης των γονιδίων του ιού, καθώς και της ρύθμισης της έκφρασης και της λειτουργίας των δομικών και μη δομικών πρωτεϊνών, για την κατανόηση αυτής της υψηλής μεταδοτικότητας και τον εντοπισμό πιθανών μοριακών στόχων για την ανάπτυξη καινοτόμων θεραπευτικών φαρμάκων και την αντιμετώπισή του.

# Molecular structure of SARS-CoV-2 virus: unlocking the secrets of its pathogenicity, high transmissibility, and treatment

By Dimitra Stathi

## SUMMARY

Understanding the secrets of SARS-COV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus-2*) genome is the key to produce vaccines and shield the world from this outbreak. In this work we have attempted to review the current knowledge on its molecular structure, also, which are the critical questions for researchers to address, what do we know about viral fusion and entry, which are the elements that make SARS-CoV-2 more contagious than other coronaviruses, and what characterizes its high transmissibility. Furthermore, what new information do we have about the non-structural proteins which are being used to make new antiviral drugs or vaccines? And finally, what is the risk from the emergence of new variants of this virus?

SARS-CoV-2 is an RNA virus, with a positive sense, single-stranded RNA (+ssRNA) genome consisting of 29,903 base pairs. It encodes 4 structural proteins, the nucleocapsid (N) protein which holds the RNA genome inside the virus, the proteins S (spike) which is essential for the viral entry in target cells, and the proteins E (envelope) and M (membrane) which help in viral assembly and the release of the virions. The genes encoding these proteins are arranged sequentially in the genome following the standard arrangement S, E, M, N in the 5'-3' direction. The proteins which are encoded by the other known open reading frames (ORFs), e.g., ORF3a, ORF3b, etc., whose sequences are dispersed between the structural genes, represent accessory or non-structural proteins (Non-Structural Proteins, NSPs,) that together, they provide a cooperative advantage for virus infection and pathogenesis. These proteins are numbered from 1 to 16 (NSP1 to NSP16) and play an important role in viral replication and in the escape of the host's immune system. Continuous research on the mechanisms of their function is expected to provide important information for the development of new antiviral drugs or vaccines.

The new virus that emerged is less lethal than the previous SARS-CoV but more contagious and therefore it spread rapidly around the world. It shares several common characteristics and significant genetic similarities to SARS-CoV and MERS-CoV, causing the so-called Middle East

Acute Respiratory Syndrome. Many scientists believe that SARS-CoV-2 is originated from bats and was transmitted to humans through an intermediate host.

It is transmitted mainly via the respiratory route through droplets of infected people (coughing, sneezing, loud speech), who may show symptoms (symptomatic) or may not (asymptomatic). However, it can also be transmitted indirectly, through contamination of surfaces.

When the virus enters the body, it tries to attach to the host cells with its S protein (spike). As this protein has a high binding affinity towards angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), it uses it as a receptor to enter the cell. Because the enzyme ACE2 is mainly found in the lungs, heart, kidneys, and intestine, the virus mainly affects these organs. It enters the cell either by endocytosis or by fusion with the cell membrane. The first route is directly dependent on ACE2 and can proceed via the clathrin-mediated pathway or through lipid-raft-dependent endocytosis. For the second route, the fusion, a crucial step is the proteolytic modification of protein S from the protease TMPRSS2 (transmembrane protease serine 2). In this route, ACE2 also plays an indirect but important role. There are also other ways for the entry of the virus into its hosts cells, such as the CD147 receptor, a protein that belongs to the immunoglobulin family. That is why the inhibition of the interaction of protein S with these receptors has been proved to be a promising therapeutic strategy. For example, *chloroquine* can inhibit the binding of S protein to ACE2 while *meplazumab*, an antibody against CD147, effectively inhibits virus entry into the cells.

During viral fusion with the host's target cell, the virus releases its RNA, and initially, it uses the translation machinery of the cell (to synthesize the RNA-dependent RNA polymerase, also known as RNA replicase) and then the transcription and replication machineries of the host cell, thereby forcing it to produce and spread viral copies that in turn infect other cells.

One of the major difficulties that the medical world faces, is the multiple mutations that continuously occur on the genome of SARS-CoV-2 and produce more variants, thus making it more contagious or dangerous, and whether the existed vaccines can currently protect us or will continue to protect us in the future.

There is intensive ongoing research on the biology of the virus and constant monitoring of its epidemiology. In this study, we have attempted to highlight the critical role that plays rigorous investigation of the organization of the viral genes, and of the regulation of the expression and function of the structural and non-structural proteins, in order to understand the high transmissibility of this virus and to identify potential molecular targets for the development and treatment of innovative therapeutic strategies for COVID-19.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
SUMMARY.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
2. ΚΟΡΩΝΟΪΟΙ (CORONAVIRUSES).....	10
2.1 Ιικό σωματίδιο (virion) και ριβονουκλεοπρωτεΐνη.....	12
2.2 Γλυκοπρωτεΐνη ακίδα (s).....	14
2.3 Πρωτεΐνη Μembrάνης (M) Membrane.....	15
2.4 Πρωτεΐνη φάκελος (E) Envelope.....	16
2.5 Πρωτεΐνη νουκλεοκαψίδιο (N) Nucleocapsid.....	18
2.6 Κύκλος ζωής κορωνοϊών.....	19
3. SARS-COVID 19.....	21
3.1 Δομή του γονιδιώματος του SARS-COV-2.....	22
3.2 Μη δομικές πρωτεΐνες του γονιδιώματος sars-cov-2.....	27
3.3 Δομικές πρωτεΐνες sars-cov-2.....	35
3.3.1 Πρωτεΐνη ακίδα (s) spike - SARS-CoV-2.....	36
3.3.2 Πρωτεΐνη νουκλεοκαψίδιο (N) Nucleocapsid- SARS-CoV-2.....	42
3.3.3 Πρωτεΐνη Μembrάνη (M) Membrane -SARS-CoV-2.....	43
3.3.4 Πρωτεΐνη φάκελος (E) Envelope- SARS-CoV-2.....	45
4 ΜΟΛΥΝΣΗ ΑΠΟ SARS-CoV-2.....	49
4.1 Κύκλος ζωής κορωνοϊού SARS-CoV-2.....	49
4.2 Ο μηχανισμός της σύντηξης των μεμβρανών.....	52
4.3 Σύντηξη μεμβράνης της S πρωτεΐνης ακίδας.....	54
4.4 Προ-ενεργοποίηση από τις πρωτεάσες των ξενιστών.....	56
4.5 Πως το sars-cov-2 προσπαθεί να αποφύγει την ανοσολογική άμυνα.....	58
5. ΕΜΦΑΝΙΣΗ SARS-CoV-2.....	59
5.1 Τρόποι μετάδοσης.....	60



5.2	<i>Περιβαλλοντικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην μετάδοση του ιού Sars-CoV-2</i>	62
5.3	<i>Άλλοι παράγοντες που παίζουν ρόλο στην μετάδοση και την μεταδοτικότητα</i>	64
5.4	<i>Μεταλλάξεις και μεταδοτικότητα Sars-CoV-2</i>	65
6.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:	72
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:	74

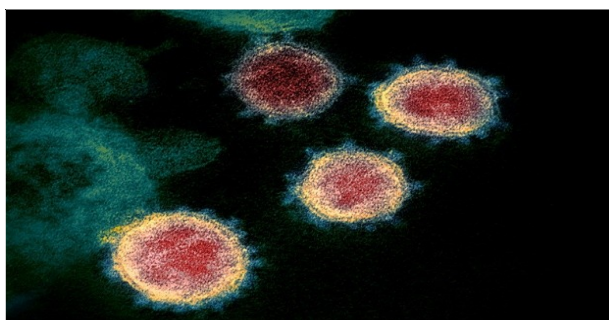
## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τον Νοέμβριο του 2002 μέχρι τον Ιούλιο του 2003 καταγράφεται μία επιδημία του SARS-CoV, προκαλώντας το γνωστό σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο στην νότια Κίνα, με τα περισσότερα περιστατικά στο Χόνγκ Κόνγκ. Η επιδημία εξαπλώθηκε σε 37 χώρες (μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα) με 8.098 περιστατικά και 774 επιβεβαιωμένους θανάτους δηλαδή 1 στους 10 (wikipedia, 2021). Οι περισσότερες χώρες κατασκευάζουν χώρους απομόνωσης στα αεροδρόμια και τα νοσοκομεία και ξεκινούν αυστηρούς ελέγχους στις εισόδους των χωρών με θερμομετρήσεις με την τελευταία εμφάνισή του το 2004. Δυστυχώς δεν μάθαμε πολλά για εκείνον τον κορωνοϊό, όπως με ποιους μηχανισμούς μεταπήδησε από τις νυχτερίδες στους ανθρώπους. Μετά από 17 χρόνια έμελλε να ξαναεμφανιστεί ένας άλλος κορωνοϊός. Τον Δεκέμβρη του 2019 στην Wuhan της Κίνας, καταγράφεται ο ιός 2019-n CoV ή αλλιώς SARS-CoV-2, ένας θανατηφόρος RNA ιός που ανήκει στην ίδια οικογένεια με τον SARS-COV και τον MERS-COV, με μικρότερο ποσοστό θνητότητας αλλά με μεγαλύτερη μεταδοτικότητα. Το τελευταίο συνέβαλλε στην ραγδαία εξάπλωσή του σε ολόκληρο τον κόσμο σε μικρό σχετικά χρονικό διάστημα, με κρούσματα πάνω από 240 εκατομμύρια, και θανάτους, πάνω από 4,8 εκατομμύρια μέχρι στιγμής, βάζοντας ολόκληρο τον κόσμο σε συναγερμό. Εδώ και μερικούς μήνες οι επιστήμονες απ' όλο τον κόσμο ψάχνουν να βρουν περισσότερες πληροφορίες για τον συγκεκριμένο ιό, στοχεύοντας σε ένα αποδοτικό εμβόλιο που να προσφέρει ανοσία και για τις αναδυόμενες παραλλαγές αλλά και σε μία καλύτερη θεραπευτική αγωγή που θα θέσουν την λήξη του συναγερμού.

## 2. ΚΟΡΩΝΟΪΟΙ (CORONAVIRUSES)

Οι κορωνοϊοί ανήκουν στην οικογένεια *Coronaviridae*, της τάξης των *Nidovirales* (Chan, et al., 2020). Οι συγκεκριμένοι εγκαψιδιωμένοι ιοί (enveloped viruses, ιοί με περίβλημα), διαθέτουν γονιδιώματα με την μορφή μονόκλωνου RNA θετικής πολικότητας. Μέχρι στιγμής, είναι γνωστά, τέσσερα γένη: οι άλφα- κορωνοϊοί, οι βήτα- κορωνοϊοί, οι γάμμα- κορωνοϊοί και οι δέλτα-κορωνοϊοί (*Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, *Deltacoronavirus*). Από αυτούς, οι άλφα και οι βήτα κορωνοϊοί, έχουν αναγνωριστεί ότι προσβάλλουν θηλαστικά όπως τον άνθρωπο, προκαλώντας τους νόσο με αρχικές πηγές τις νυχτερίδες και τα τρωκτικά, ενώ οι γάμμα και οι δέλτα θεωρούνται ότι προσβάλλουν τα ζώα προκαλώντας τους νόσο με πρωταρχικές πηγές διάφορα είδη πουλιών (Artika, et al., 2020; Masters, 2006; Chan, et al., 2020).

Οι ανθρώπινοι κορωνοϊοί (HCoV) αντιπροσωπεύουν μια μεγάλη ομάδα κορωνοϊών (CoVs) που σχετίζονται με πολλαπλές αναπνευστικές ασθένειες ποικίλης σοβαρότητας, συμπεριλαμβανομένου του κοινού κρυολογήματος, της πνευμονίας και της βρογχίτιδας και θεωρούνται από τους ταχύτερα εξελισσόμενους ιούς λόγω των υψηλών ποσοστών υποκατάστασης και του ανασυνδυασμού των γονιδιωματικών τους νουκλεοτιδίων. Εκτός από αναπνευστικές ασθένειες, μπορεί επίσης να προκαλέσουν εντερικές και νευρολογικές ασθένειες (Lim, et al., 2016). Τα τελευταία χρόνια, η εξέλιξη των HCoV επιταχύνθηκε επίσης από παράγοντες όπως η αστικοποίηση και η εκτροφή πουλερικών. Αυτά επέτρεψαν τη συχνή ανάμιξη ειδών και διευκόλυναν τη διέλευση των φραγμών ειδών και τον γονιδιωματικό ανασυνδυασμό αυτών των ιών (Jones, et al., 2013). Οι CoV ιοί, μπορούν να μολύνουν μια μεγάλη ποικιλία ξενιστών, συμπεριλαμβανομένων των πτηνών, των χοίρων και των ανθρώπων (Lim, et al., 2016).



Το όνομά τους, το οφείλουν στην χαρακτηριστική τους εμφάνιση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (εικόνα 1), όπου διακρίνονται περιμετρικά των ιικών σωματιδίων, εξογκώματα που μοιάζουν σαν στέμμα (solarcorona) .

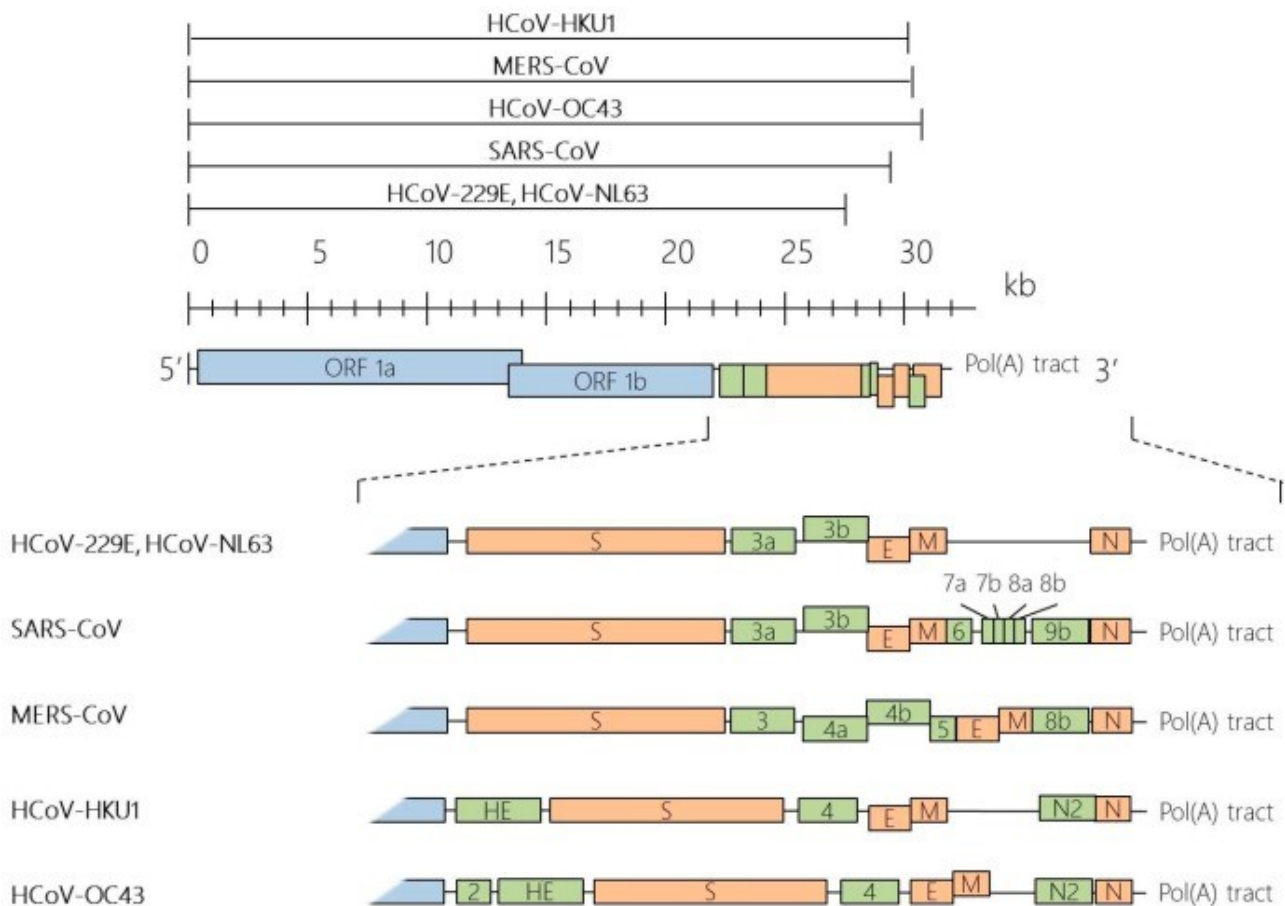
*Εικόνα 1: « Ο κορωνοϊός στο μικροσκόπιο » Πηγή:*

(wikipedia, 2021)

Είναι σχετικά σφαιρικοί ιοί με μέση διάμετρο 80-120 nm. Ο κορωνοϊός έχει ένα μονόκλωνο, θετικής πολικότητας RNA γονιδίωμα περίπου 30 kb, το οποίο κωδικοποιεί 4-5 δομικές πρωτεΐνες, όπως η πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου (N), η πρωτεΐνη μεμβράνης (M), η μικρή πρωτεΐνη φάκελος (E), η γλυκοπρωτεΐνη ακίδα (S) και για ορισμένους βήτα-κορωνοϊούς, την πρωτεΐνη της εστεράσης

αιμοσυγκολλητίνης (HE) (Gui, et al., 2017). Πιο συγκεκριμένα, σε όλους τους κορωνοϊούς το γονίδιο της ρεπλικάσης αποτελεί περίπου τα 2/3 του γονιδιώματος κοντά στο (5') άκρο και αποτελείται από δύο επικαλυπτόμενα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), ORF1a και ORF1b, τα οποία κωδικοποιούν 16 μη-δομικές πρωτεΐνες. Το τελευταίο ένα τρίτο του γονιδιωματικού RNA CoV κωδικοποιεί το σύνολο των τεσσάρων γονιδίων της δομικής πρωτεΐνης CoV, δηλαδή (S), (E), (M) και (N). Κατά μήκος των γονιδίων της δομικής πρωτεΐνης, πολλά βοηθητικά ORFs διασπείρονται, ενώ ο αριθμός και η θέση τους ποικίλει ανάλογα με το είδος του κορωνοϊού (εικόνα 2) (Lim, et al., 2016).

Την δεκαετία του 1960, ταυτοποιήθηκαν 2 νέοι ιοί, οι κορωνοϊοί HCoV-OC43 και HCoV-229E. Το 2002 ταυτοποιήθηκε ένας νέος ακόμα ιός, ο SARS-CoV. Έπειτα οι επιστήμονες επιδόθηκαν στην αναζήτηση άλλων αντίστοιχων ιών ανακαλύπτοντας τον HCoV-NL63 το 2004 και τον HCoV-HKU1 το 2005.



**Εικόνα 2:** Οργάνωση γονιδιώματος ανθρώπινων κορωνοϊών (HCoVs). Τα γονιδιώματα HCoV κυμαίνονται από περίπου 26 έως 32 kilobases (kb) σε μέγεθος, όπως υποδεικνύεται από τις μαύρες γραμμές πάνω από την κλίμακα. Το γονιδίωμα Coronavirius (CoV) είναι συνήθως διατεταγμένο 5'-ORF1a-ORF1b-S-E-M-N-3'. Τα επικαλυπτόμενα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF) ORF1a και ORF1b περιλαμβάνουν τα δύο τρίτα του γονιδιώματος του κορωνοϊού, το οποίο κωδικοποιεί όλα τα ιικά συστατικά που απαιτούνται για τη σύνθεση ιικού RNA. Το άλλο ένα τρίτο του γονιδιώματος στο άκρο 3' κωδικοποιεί ένα σύνολο δομικών (πορτοκαλί) και μη-δομικών πρωτεϊνών (πράσινο) (Lim, et al., 2016; Liu, et al., 2014).

Σύμφωνα με τον Artika M. και τους συνεργάτες του, αναφέρω παρακάτω μια λίστα με σημαντικούς κορωνοϊούς (πίνακας 1).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΚΟΡΩΝΟΙΟΙ				
ΙΟΣ	ΓΕΝΟΣ	ΦΥΣΙΚΟΣ ΞΕΝΙΣΤΗΣ	ΧΡΟΝΟΛΟΓΙΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ	ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ
HCoV-229E	α-coronavirus	Νυχτερίδες	1966	Ήπιες λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος
HCoV-NL63	α-coronavirus	Νυχτερίδες	2004	Ήπιες λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος
HCoV-OC43	β-coronavirus	Βοοειδή	1967	Ήπιες λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος
HCoV-HKU1	β-coronavirus	Τρωκτικά	2005	Πνευμονία
SARS-CoV	β-coronavirus	Νυχτερίδες	2003	Σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο, ποσοστό θνησιμότητας 10%
MERS-CoV	β-coronavirus	Νυχτερίδες, καμήλες	2012	Σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο, ποσοστό θνησιμότητας 37%
SARS-CoV-2	β-coronavirus	Νυχτερίδες?	2019	Σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο, ποσοστό θνησιμότητας 3,7%

*Πίνακας 1. « Οι πιο σημαντικοί κορωνοϊοί». Πηγή : (Artika, et al., 2020; WHO, World Health Organization, 2020; Lim, et al., 2016)*

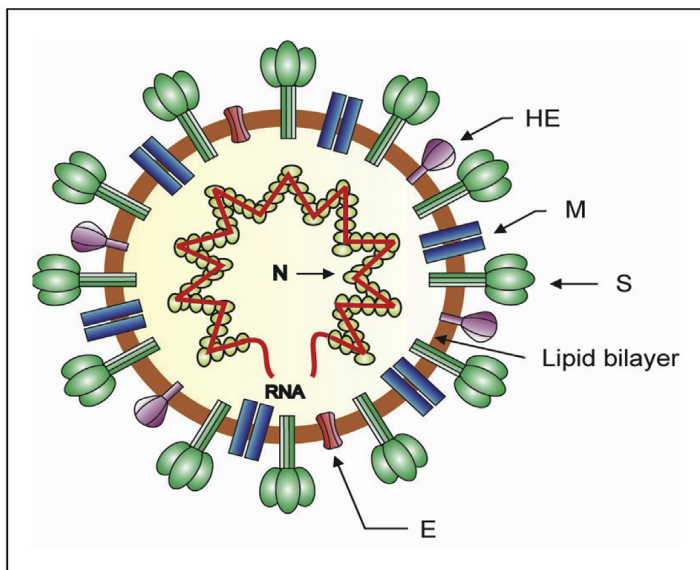
Η πλειοψηφία, αν όχι όλοι οι κορωνοϊοί που πιστεύεται ότι μολύνουν τους ανθρώπους, προέρχεται από κορωνοϊούς νυχτερίδων που μεταδίδονται στον άνθρωπο άμεσα ή έμμεσα, μέσω ενός ενδιάμεσου φορέα (Hu, et al., 2015).

### **2.1 Ιικό σωματίδιο (virion) και ριβονουκλεοπρωτεΐνη.**

Κατά την μόλυνση σε ένα οργανισμό, το σωματίδιο του ιού (virion) εξυπηρετεί 3 σημαντικές λειτουργίες για το γονιδίωμα του. Πρώτον, παρέχει το μέσο ώστε να μεταφερθεί το ιικό γονιδίωμα μέσω της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου ξενιστή. Δεύτερον, χρησιμεύει ως μέσο διαφυγής για το νεοσυνθετικό γονιδίωμα και τρίτον, το ιικό σωματίδιο λειτουργεί σαν ανθεκτικό αγγείο που προστατεύει την ακεραιότητα του γονιδιώματος όταν μεταφέρεται μεταξύ των κυττάρων (Neuman & Buchmeier, 2016). Μελέτες που έγιναν για την διερεύνηση της δομικής οργάνωσης του SARS-COV με την χρήση μικροσκοπία κρυο-ηλεκτρονίων, έδειξαν ότι τα σωματίδια της ριβονουκλεοπρωτεΐνης, σχηματίζουν μια σπειροειδή μορφή, συσκευασμένη σε σφαιρικό σχήμα χωρίς ένδειξη εικοσαεδρικής συμμετρίας (icosahedral symmetry) (Chang, et al., 2014). Επίσης και

σε άλλες ηλεκτρονικές μελέτες που έγιναν ριβονουκλεοπρωτεΐνης πάνω στον ιό της ηπατίτιδας του ποντικού (MHV, βήτα-κορωνοϊός), έδειξαν ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι είτε σε χαλαρή νηματώδη μορφή είτε σε συμπαγές σχήμα/συγκρότημα που μοιάζει σαν λουλούδι (in a compact flower-like assembly) (Artika, et al., 2020)

Ο κορωνοϊός, έχει μεγάλο μέγεθος γονιδίωμα ενώ το μέγεθός του είναι σχεδόν το ίδιο με αντίστοιχων RNA ιών. Έτσι λοιπόν, φαίνεται πως ο χώρος μέσα στο καψίδιο του ιού δεν είναι επαρκής για τις ριβονουκλεοπρωτεΐνες για να τις ενσωματώσει. Για αυτό το λόγο, οι κορωνοϊοί συσκευάζουν το γονιδίωμά τους παρόμοια με αυτών των ευκαρυωτικών κυττάρων. Με την μορφή μιας υπερ-σπειροειδούς δομής. (Gui, et al., 2017). Η πρωτεΐνη N, είναι η μόνη που παίζει κυρίως ρόλο στην σύνδεση με το ιικό RNA γονιδίωμα για να σχηματιστεί η νουκλεοπρωτεΐνη. Επίσης, η ενσωμάτωση του γονιδιώματος εξαρτάται από τις πρωτεΐνες N (Artika, et al., 2020; Cong, et al., 2017).



**Εικόνα 3:** Σχήμα κορωνοϊού μαζί με την πρωτεΐνη μεμβράνη (M), τις πρωτεΐνες διαμεμβρανικού φακέλου (E), την ακίδα πρωτεΐνη (S) που προεξέχει από μια διπλή στιβάδα λιπιδίων που προέρχεται από κύτταρα ξενιστές, δίνοντας στο ιικό σωματίδιο χαρακτηριστική εμφάνιση. Η εστεράση αιμοσυγκολλητίνης (HE) σχηματίζει μικρές αιχμές που εμφανίζονται κάτω από τις ψηλές αιχμές πρωτεΐνης S. Το θετικής πολικότητας ιογενές γονιδιωματικό RNA σχετίζεται με τη φωσφοπρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου (N) που σχηματίζει τη ριβονουκλεοπρωτεΐνη με ελικοειδή δομή. ΠΗΓΗ: (Artika, et al., 2020; Masters, 2006).

Το γονιδίωμα των κορωνοϊών όπως αναφέραμε, κωδικοποιεί τέσσερις κύριες δομικές πρωτεΐνες, τις (S), (E), (M), (N), καθεμία από τις οποίες παίζει πρωταρχικούς ρόλους στη δομή του σωματιδίου του ιού καθώς και στον κύκλο αναπαραγωγής του ιού. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες χρειάζονται προκειμένου να σχηματίσουν ένα δομικά ολόκληρο ιικό σωματίδιο (virion) ωστόσο, ορισμένοι κορωνοϊοί δεν χρειάζονται την πλήρη συναρμολόγηση των δομικών πρωτεϊνών για την παραγωγή ενός αέριου, μολυσματικού ιικού σωματιδίου. Αυτό δείχνει ότι ορισμένες δομικές πρωτεΐνες είναι πιθανώς αναλώσιμες ή ότι αυτοί οι ιοί ενδέχεται να κωδικοποιούν επιπλέον πρωτεΐνες με αντισταθμιστικούς ρόλους (Schoeman & Fielding, 2019; Artika, et al., 2020)

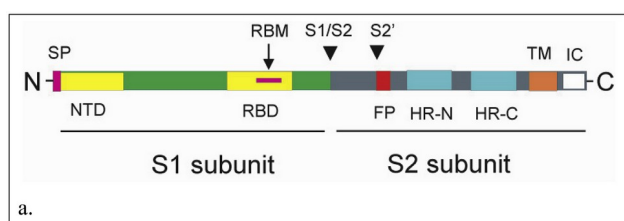
## 2.2 Γλυκοπρωτεΐνη ακίδα (s)

Η γλυκοπρωτεΐνη S είναι μια μεγάλη πρωτεΐνη η οποία συνήθως απαρτίζεται από 1162 έως 1452 αμινοξέα. Προεξέχει περίπου 17-20 nm από την επιφάνεια του σωματιδίου του ιού, όπου η βάση είναι μια λεπτή προεξοχή που διογκώνεται σε πλάτος περίπου 10 nm στο άκρο. Είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση του ιού με τους υποδοχείς του κυττάρου, για την πρόκληση αιμοσυγκόλλησης και τη συγχώνευση μεμβρανών κυττάρου-ιού αλλά και για την παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Η γλυκοπρωτεΐνη S αποτελεί εκείνο το αντιγόνο το οποίο εμπλέκεται στην εξουδετέρωση του ιού από την άμυνα του οργανισμού και πιο συγκεκριμένα, η S1 υποπεριοχή στο N-άκρο του μορίου της, περιέχει τους κύριους επιτόπους (epitopes) προς την διέγερση της χημικής και κυτταρικής ανοσίας. Δηλαδή, η πρωτεΐνη S αποτελεί στόχο των εξουδετερωτικών αντισωμάτων του οργανισμού και για αυτό μπορεί να αποτελέσει μία λύση για τον σχεδιασμό ενός εμβολίου. Λόγω της υψηλής παραλλακτικότητας που εμφανίζει η συγκεκριμένη περιοχή επιτρέπει τη διαφυγή στελεχών του ιού από τους μηχανισμούς της ανοσίας (Murphy, et al., 1995).

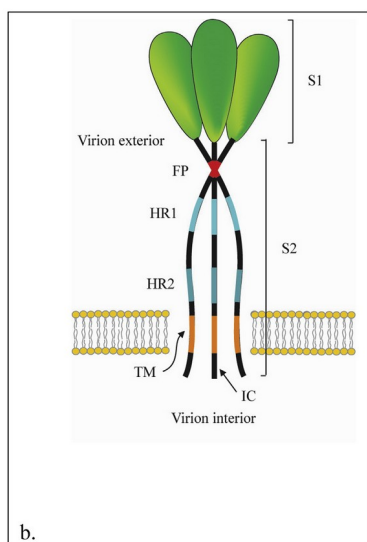
Η πρωτεΐνη S, εισάγεται μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω ενός αμινο-τελικού (amino-terminal) πεπτιδίου που έχει το ρόλο σήματος. Η περιοχή που εκτείνεται στο εξωτερικό τμήμα του ιού (εξωτερικό ιικό σωματίδιο) ονομάζεται ectodomain και αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του μορίου με μόνο ένα μικρό τμήμα (από 71 κατάλοιπα ή λιγότερα) που αποτελεί την διαμεμβρανική περιοχή TN και την εσωτερική περιοχή (endo-domain) που είναι γνωστή και ως ενδοκυτταρική ουρά (intracellular tail IC). Αυτή βρίσκεται στον εσωτερικό χώρο του ιού (εσωτερικό ιικό σωματίδιο) (Masters, 2006; Artika, et al., 2020). Επίσης, η πρωτεΐνη S μπορεί να χωριστεί σε δύο λειτουργικά διακριτές υπομονάδες (subunits): τις υπομονάδες S1 και S2 (**εικόνα 4α**). Η υπομονάδα S1 είναι κρίσιμη για την αναγνώριση των υποδοχέων, ενώ η S2 είναι σημαντική για την σύντηξη μεμβράνης και για την αγκίστρωση της πρωτεΐνης S στην ιική μεμβράνη (Hulswit, et al., 2016; Artika, et al., 2020). Η υπομονάδα S1 αποτελείται από δύο κύριες περιοχές, την N-τελική περιοχή (S1-NTD) και την C-τελική περιοχή (S1-CTD). Η υπομονάδα S2 είναι πολύ συντηρημένη και περιέχει τμήματα που παίζουν ρόλο στη διευκόλυνση της σύντηξης ιών-κυττάρων όπως είναι το πεπτίδιο σύντηξης (FP), δύο περιοχές επαναλήψεων επτάδων (two heptad repeat regions) την περιοχή 1 (HR1 ή HR-N) και την περιοχή 2 (HR2 ή HR-C), την εξαιρετικά διατηρημένη διαμεμβρανική περιοχή (TM) και την ενδοκυτταρική ουρά (Hulswit, et al., 2016).

Τα τριμερή της πρωτεΐνης S σχηματίζουν τις ακίδες μήκους 18-23 nm που διακοσμούν την επιφάνεια της μεμβράνης του σωματιδίου CoV (**εικόνα 4β**). Ο πρωταρχικός καθοριστικός παράγοντας στον τροπισμό και την παθογένεση του ξενιστή από τον CoV είναι η πρωτεΐνη S (Hulswit, et al., 2016).

Μετά τη σύνθεσή της η πρωτεΐνη S του κορωνοϊού υφίσταται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που περιλαμβάνουν τη γλυκοζυλίωση, το σχηματισμό δισουλφιδικού δεσμού και την παλμιτοϋλίωση. Το εξωτερικό μέρος της πρωτεΐνης S (ectodomain) είναι υψηλά γλυκοζυλιωμένο και αυτή η τροποποίηση γίνεται αποκλειστικά στην N τελική περιοχή (NTD). Οι περιοχές της ectodomain της πρωτεΐνης S έχουν δυναμικό 19 έως 39 περιοχές ακολουθίας γλυκοσυλίωσης (Artika, et al., 2020). Επιπλέον, αυτή η εξωτερική περιοχή της πρωτεΐνης S περιλαμβάνει 30-50 κατάλοιπα κυστεΐνης, τα οποία είναι υψηλά συντηρημένα σε όλους του κορωνοϊούς (Masters, 2006). Στους περισσότερους ιούς κορωνοϊούς, η πρωτεΐνη S διασπάται από μία πρωτεάση του ξενιστή (τύπου θρυψίνης) σε δύο πολυπεπίδια, S1 και S2, περίπου στο ίδιο μέγεθος (Masters, 2006).



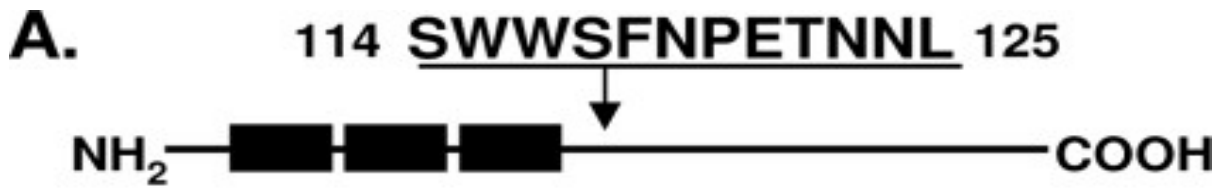
**Εικόνα 4:** Χάρτης και μοντέλο της μεμβράνης της πρωτεΐνης (S). α). Χάρτης πρωτεΐνης ακίδας του κορωνοϊού (S). Η πρωτεΐνη S μπορεί να χωριστεί σε δύο λειτουργικά διακριτές υπο-μονάδες: τις υπο-μονάδες S1 και S2. Η υπο-μονάδα S1 αποτελείται από δύο κύριες περιοχές, την N-τελική περιοχή (S1-NTD) και την C-τελική περιοχή (S1-CTD). Η υπο-μονάδα S1 περιέχει έναν τομέα δέσμησης υποδοχέα (RBD). Το RBD περιέχει ένα μοτίβο δέσμησης υποδοχέα (RBM). Τα βέλη, σημαδεύουν τη θέση διάσπασης για την πρωτεΐνη S από την κυτταρική πρωτεάση. Το πεπτίδιο σήματος (SP), η N-τελική περιοχή (NTD) και οι περιοχές RBD και RBM εμφανίζονται στο S1. Η υπο-μονάδα S2 περιέχει δύο περιοχές επαναλήψεων επτάδων (HR1 και HR2), ένα πεπτίδιο σύντηξης (FP), μία διαμεμβρανική περιοχή (TM) και μια ενδοκυτταρική ουρά (IC) όπως απεικονίζεται. β). Μοντέλο της τριμερούς ακίδας -πρωτεΐνης S και διάγραμμα της τοπολογίας της μεμβράνης. Η πρωτεΐνη S είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία συναρμολογείται σε ένα ομοτρίμερες. Οι υπο-μονάδες S1 αποτελούν το τμήμα του βολβού της ακίδας, στο εξωτερικό τμήμα (virion). Οι υπο-μονάδες S2 αγκιστρώνουν τις πρωτεΐνες S μέσα στην ιική μεμβράνη. Οι υπο-μονάδες S2 περιέχουν τμήματα που περιλαμβάνουν τα πεπτίδια σύντηξης (FP), HR1, HR2 και τις πολύ συντηρημένες διαμεμβρανικές περιοχές. Οι περιοχές HR2 εντοπίζονται κοντά στο C-τελικό άκρο στο εξωτερικό τμήμα της S ακίδας. Οι ενδοκυτταρικές ουρές (ICs) και τα C-τελικά άκρα των ακίδων S πρωτεϊνών βρίσκονται στο εσωτερικό του ιικού σωματιδίου (Masters, 2006; Artika, et al., 2020).



### 2.3 Πρωτεΐνη Μεμβράνης (M) Membrane

Η πρωτεΐνη M είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία βρίσκεται άφθονα στους κορωνοϊούς με μήκος περίπου 217-230 αμινοξέα, παίζοντας κρίσιμο ρόλο στην μορφοποίηση του ιού μέσω των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών M-M, M-S, και M-N (Arndt, et al., 2010; Artika, et al., 2020). Είναι μία τριπλής έκτασης μεμβρανική πρωτεΐνη (έχουν 3 περιοχές TM) με μια βραχεία αμινοτελική περιοχή που βρίσκεται στο εξωτερικό χώρο του ιού και με ένα μακρύ καρβοξυ-τελικό άκρο στο εσωτερικό χώρο του ιού (εικόνα 5) (Masters, 2006). Οι πρωτεΐνες M των CoV διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την περιεκτικότητά τους σε αμινοξέα, αλλά έχουν τα ίδια βασικά δομικά χαρακτηριστικά.





*Εικόνα 5: Ένα γραμμικό σχήμα της πρωτεΐνης M που απεικονίζει τις σχετικές θέσεις των τριών περιοχών TM (μαύρα κουτιά) και τη θέση του CD στην ουρά. ΠΗΓΗ: ( Arndt, et al., 2010).*

Τα νέα πολυπεπτίδια, σε προ-γλυκοσυλιωμένη μορφή, είναι περίπου 25-30 kDalton (221-226 αμινοξέα) και οι ανιχνεύσιμες γλυκοσυλιωμένες μορφές έχουν τα υψηλότερα μοριακά βάρη (Artika, et al., 2020; Masters, 2006).

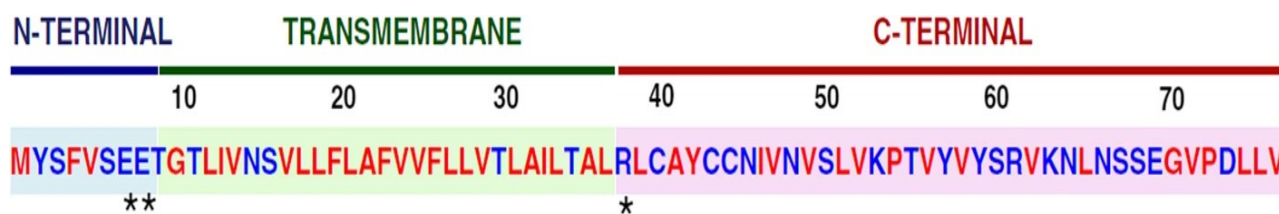
Όταν η πρωτεΐνη M εκφράζεται σε συνδυασμό με τη πρωτεΐνη E δημιουργούνται σωματίδια που μοιάζουν με το ιικό σωματίδιο (virion) σε σχήμα και μέγεθος (virus-like particles, VLPs) πράγμα που δείχνει ότι αυτές οι πρωτεΐνες είναι οι ελάχιστες απαιτήσεις για την βιοσύνθεση του φακέλου. Επίσης η χρήση του συστήματος VLPs θεωρείται ότι είναι κρίσιμη για τον σχηματισμό του ιού και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεμβρανών παίζουν ρόλο στο σχηματισμό του καψιδίου (Neuman, et al., 2011). Η πρωτεΐνη M είναι επίσης σημαντική για τη συναρμολόγηση της πρωτεΐνης S στον ιικό φάκελο (Hulswit, et al., 1999). Οι πρωτεΐνες M επίσης αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους αποτελώντας την βάση/σκαλωσιά για τον ιικό φάκελο. Στο ώριμο ιικό σωματίδιο η πρωτεΐνη S και μερικά μόρια από την E, διασπείρονται μέσα σε ένα πλέγμα πρωτεϊνών M (Arndt, et al., 2010). Άλλη μία αλληλοεπίδραση της, είναι αυτή με το νουκλεοκαψίδιο (N) κατά την συγκρότηση των ιών (Hulswit, et al., 1999).

#### **2.4 Πρωτεΐνη φάκελος (E) Envelope**

Είναι ένα μικρό πολυπεπτίδιο με μοριακό βάρος 8,4-12 kDa το οποίο αποτελείται από 76-109 κατάλοιπα αμινοξέων, παίζοντας σημαντικό ρόλο στον κύκλο αντιγραφής του ιού πχ στην παθογένεση, στον σχηματισμό καψιδίου και στην μορφοποίηση του ιικού σωματιδίου. Η κύρια και δευτερεύουσα δομή του δείχνει ότι η πρωτεΐνη E έχει ένα μικρό υδρόφοβο N άκρο με 7-12 κατάλοιπα αμινοξέων, ακολουθούμενο από μία διαμεμβρανική περιοχή (TMD) 25 αμινοξέων και τελειώνει με ένα μακρύ υδρόφιλο καρβοξυτελικό άκρο C (Masters, 2006).

Φιλοξενεί συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης στην υδρόφιλη περιοχή αποτελώντας στόχο για παλμιτουλίωση και διατηρημένα κατάλοιπα προλίνης στην C-τελική ουρά (Ruch & Machamer, 2012). Η αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης, δείχνει πως ένα μεγάλο μέρος του TMD αποτελείται από 2 μη πολικά αμινοξέα, τη βαλίνη και την λευκίνη, οι οποίες δίνουν μια ισχυρή υδροφοβία στην πρωτεΐνη. Η συνολική φόρτιση του μορίου είναι σχεδόν μηδέν αφού η μεσαία

περιοχή είναι μη φορτισμένη, το καρβοξυτελικό άκρο C έχει κάποια θετικά φορτισμένα κατάλοιπα και η αμινοτελική περιοχή έχει αρνητικά κατάλοιπα (Schoeman & Fielding, 2019).



*Εικόνα 6: Αλληλουχία αμινοξέων και οι περιοχές της πρωτεΐνης SARS-CoV E. Η πρωτεΐνη SARS-CoV E αποτελείται από τρεις περιοχές, δηλ. Την αμινο (N)-τελική περιοχή, τη διαμεμβρανική περιοχή (TMD) και την καρβοξυ (C)-τελική περιοχή. Οι ιδιότητες αμινοξέων υποδεικνύονται: υδρόφοβο (κόκκινο), υδρόφιλο (μπλε), πολικά φορτισμένο (αστερίσκοι) ΠΗΓΗ: (Schoeman & Fielding, 2019)*

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι η E πρωτεΐνη περιέχει ένα δεσμευτικό μοτίβο (PDZ) γνωστό ως μετασυναπτική πρωτεΐνη πυκνότητας 95 (PSD95), το οποίο βρίσκεται στα τελευταία 4 αμινοξέα της C περιοχής. Η περιοχή αυτή είναι μια ενότητα αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης με πρωτεΐνη που μπορεί να συνδεθεί με το C-άκρο των πρωτεϊνών στόχων όπως είναι οι πρωτεΐνες κυτταρικού προσαρμοστή που εμπλέκονται σε διεργασίες κυττάρων, σημαντικές για ιογενή λοίμωξη. Το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης E εντοπίζεται στο ενδιάμεσο διαμέρισμα του ενδοπλασματικού δικτύου (ERGIC) (endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment) όπου παίζει ρόλο στην συναρμολόγηση, στην αναπαραγωγή και μετακίνηση του νέου ιικού σωματιδίου και συγκεντρώνεται κυρίως στην περιοχή cis-Golgi και στις μέσες περιοχές αυτού του οργανιδίου. Η εντόπισή της είναι σημαντική για την κατανόηση του ρόλου της στην παθογένεια και μορφοποίηση του ιού (Schoeman & Fielding, 2019; Venkatagopalan, et al., 2015). Η παλμιτοϋλίωση (προσθήκη παλμιτικού οξέους) της πρωτεΐνης E, είναι υψίστης σημασίας για την ική συναρμολόγηση καθώς επίσης και στην υποκυτταρική μετακίνηση πρωτεϊνών και την διαμόρφωση της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Η παλμιτοϋλίωση αυξάνει την υδροφοβικότητα της πρωτεΐνης που μπορεί να διευκολύνει τη σύνδεση πρωτεϊνών και την αγκύρωση τους στην ική μεμβράνη. Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να οδηγήσει σε περισσότερο σταθερή σύνδεση της πρωτεΐνης με τη μεμβράνη. Επειδή ενσωματώνεται μόνο ένα μικρό μέρος της πρωτεΐνης E μέσα στον ικό φάκελο θεωρείται ότι η πρωτεΐνη έχει επιπρόσθετες λειτουργίες γύρω από το ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου ξενιστή και την περιοχή Golgi. (Schoeman & Fielding, 2019).

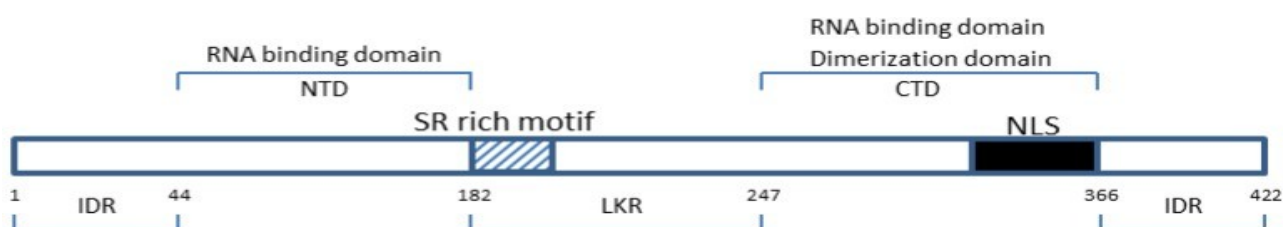
Άλλο ένα στοιχείο αυτής της πρωτεΐνης είναι η ικανότητά της να σχηματίζει ομοτυπική αλληλεπίδραση (homotypic interaction) που οδηγεί σε ολιγομερισμό και παραγωγή ιο-πορινών (viroporins). Οι ιοπορίνες είναι υδρόφοβες ικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν πόρους στις μεμβράνες των κυττάρων-ξενιστών και επηρεάζουν το σύστημα κυστιδίων των κύτταρων του ξενιστή όπως επίσης επηρεάζουν την μετακίνηση των γλυκοπρωτεϊνών και αυξάνουν την κυτταρική μεμβρανοδιαπερατότητα, πράγμα που οδηγεί στην απελευθέρωση των νέων ιικών σωματιδίων

(progeny virus particle release) (Artika, et al., 2020). Επιπλέον, θεωρούνται πως παίζουν ρόλο στην παθογένεια του ιού. Η απουσία τους αποδυναμώνει ή εξασθενεί τον ιό μειώνοντας την παθογονικότητα του. Φαίνεται επίσης ότι μεταφέρουν επιλεκτικά θετικά φορτισμένα ιόντα όπως υδρογόνο, κάλιο, νάτριο, ασβέστιο και διοχετεύουν επιλεκτικά μονοσθενή κατιόντα νατρίου και καλίου (Schoeman & Fielding, 2019). Ένας τρόπος για να παραχθεί ένα εμβόλιο είναι ο αποκλεισμός της δραστηριότητας του καναλιού της ιο-πορίνης. Οπότε το γονίδιο που κωδικοποιεί την Ε πρωτεΐνη, ήταν στόχος για μοριακή ανίχνευση του κορωνοϊού (Artika, et al., 2020) .

## 2.5 Πρωτεΐνη νουκλεοκαψίδιο (N) Nucleocapsid

Είναι μία δομική φωσφο-πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 43-46 kDa. Η κύρια λειτουργία της είναι να συσκευάζει το ιικό γονιδίωμα σε ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σωματίδιο (RNP) για την προστασία του γονιδιωματικού RNA και την ενσωμάτωση της σε βιώσιμο ιό (virion) παίζοντας κρίσιμο ρόλο στην αποτελεσματικότητα της μεταγραφής και συναρμολόγησης του ιού. Η πρωτεΐνη N υφίσταται ταχεία φωσφορυλίωση μετά την σύνθεσή της και εντοπίζεται σε διαφορετικά σημεία στους κορωνοϊούς. Ο ρόλος της είναι ασαφής. Η πρωτεΐνη N σχετίζεται δυναμικά με το σύμπλοκο αντιγραφής-μεταγραφής RTC (replication - transcription complex) (Masters, 2006; Artika, et al., 2020).

Η πρωτεΐνη N έχει τρεις διακριτές και εξαιρετικά διατηρημένες περιοχές, δηλαδή η N-τελική περιοχή (NTD), η περιοχή σύνδεσης (LKR) που ονομάζεται επίσης ενδογενώς διαταραγμένη μεσαία περιοχή (disordered middle region) και η C-τελική περιοχή (CTD) (McBride, et al., 2014).



**Εικόνα 7:** Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης N με τις 3 περιοχές του SARS-CoV. IDR (περίπου 1-44, 182-247, 366-422) —ενδογενώς διαταραγμένες περιοχές · NTD (π.χ. 45-181) —N τελική περιοχή; LKR (182-247) - περιοχή σύνδεσης. CTD (248-365) C-τελική περιοχή. Εμφανίζονται τα μοτίβα πλούσια σε SR (ραβδωτό κουτί) και τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS, solid box) ΠΗΓΗ: (McBride, et al., 2014).

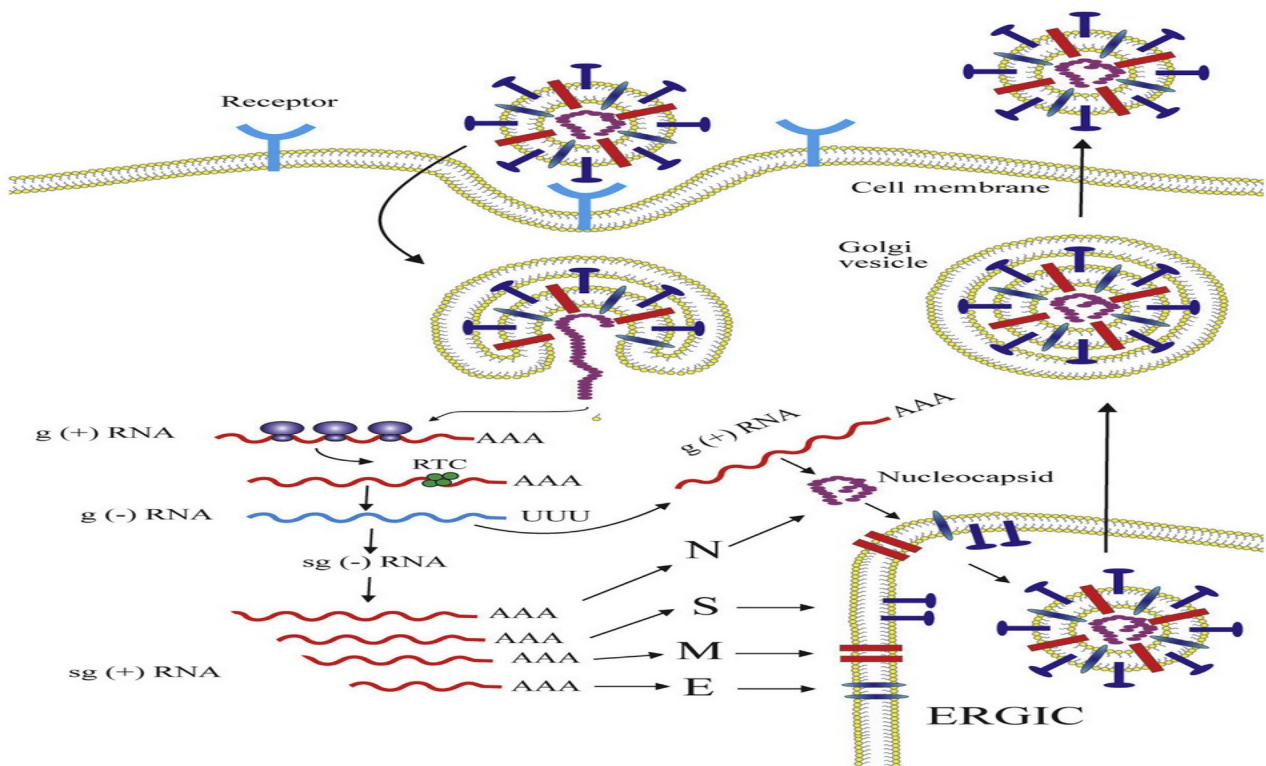
Η αυτό-αλληλεπίδραση (Self-association) της πρωτεΐνης N έχει παρατηρηθεί σε πολλούς ιούς και απαιτείται για να σχηματιστεί το ιικό καψίδιο (σημαντικό για την ικανότητα δέσμευσης του RNA) που παρέχει προστασία στο ιικό γονιδίωμα από εξωκυτταρικούς παράγοντες. Η περιοχή CTD φιλοξενεί οκτώ θετικά φορτισμένα κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης, σχηματίζοντας μια θετικά φορτισμένη αυλάκωση, μια από τις πιο θετικά φορτισμένες περιοχές της πρωτεΐνης N. Η θέση των επικρατειών σύνδεσης RNA κοντά στην CTD, είναι σημαντική για το σχηματισμό ενός μεγάλου ελικοειδούς νουκλεοκαψιδικού πυρήνα. Και η σύνδεση των διμερών N πρωτεΐνης είναι απαραίτητη

για περαιτέρω συναρμολόγηση του πυρήνα. Η περιοχή NTD είναι εμπλουτισμένη σε αρωματικά και βασικά κατάλοιπα και το διπλωμένο σχήμα μοιάζει με ένα χέρι με βασικά δάχτυλα που εκτείνονται πολύ πέρα από τον πυρήνα της πρωτεΐνης, μια υδρόφοβη παλάμη και ένα όξινο «καρπό». Υπάρχουν αρκετά κοινά χαρακτηριστικά των περιοχών NTDs των πρωτεϊνών N των CoV (McBride, et al., 2014).

## 2.6 Κύκλος ζωής κορωνοϊών

Όταν ο ιός εισέρχεται σε έναν οργανισμό τότε αυτός συνδέεται στους κυτταρικούς υποδοχείς του κυττάρου και ακολουθεί η ιογενής σύντηξη (fusion) των κυτταρικών μεμβρανών του ιού και του ξενιστή. Αυτή επιτρέπει την απελευθέρωση του ιικού γονιδιώματος στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων ξενιστών η οποία καθιστά το ιικό γονιδίωμα διαθέσιμο για μετάφραση (εικόνα 8). Η γλυκοπρωτεΐνη (S) διευκολύνει την είσοδο του ιού καθώς αυτή δεσμεύεται με τους υποδοχείς και έπειτα έχουμε την σύντηξη των μεμβρανών του ιού και ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα αυτή που συνδέεται με τον υποδοχέα είναι η S1 υπομονάδα (subunit) η οποία δείχνει και τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία μεταξύ των ιών CoV (Masters, 2006). Ο υποδοχέας των ιών αυτών διαφέρει, για παράδειγμα ο ιός CoV-229E χρησιμοποιεί ανθρώπινη αμινοπεπτιδάση N ως υποδοχέα, ο ιός NL63 χρησιμοποιεί τις πρωτεογλυκάνες θεικής ηπαράνης, ο CoV-HKU1 και ο CoV-OC43 χρησιμοποιούν το 9- O-ακετυλιωμένο σιαλικό οξύ (9- O -Ac-Sia) σαν υποδοχέα, ο MERS-CoV χρησιμοποιεί την Διπεπτιδυλο- πεπτιδάση 4 (DPP4; CD26) και οι SARS-CoV και SARS-CoV 2 χρησιμοποιούν το ανθρώπινο ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2) (Artika, et al., 2020). Μετά τη δέσμευση του υποδοχέα, η σύντηξη μεταξύ του ιικού περιβλήματος και των κυτταρικών μεμβρανών του ξενιστή λαμβάνει χώρα με τη μεσολάβηση των ιικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών σύντηξης, που ονομάζονται fusogens τα οποία με βάση τη δομή τους διαχωρίζονται σε 4 κατηγορίες ( I, II, III, IV). Στην κατηγορία I ανήκει η ακίδα (S) η οποία έχει παρόμοια λειτουργία με τις πρωτεΐνες σύντηξης ιών που είναι φυλογενετικώς απομακρυσμένοι RNA ιοί όπως ο ιός της γρίπης, ο ιός HIV και ο ιός Ebola (Artika, et al., 2020; Masters, 2006). Η πρωτεάση των ξενιστών ενεργοποιεί τον διαχωρισμό της πρωτεΐνης S1 από το S2. Αυτό το στάδιο πρωτεολυτικής ενεργοποίησης επιτρέπει την ελεγχόμενη απελευθέρωση του πεπτιδίου σύντηξης σε κυτταρικές μεμβράνες στόχους. Οι πρωτεάσες αυτές μπορεί να είναι κάποια φουρίνη ή θρυψίνη ή ελαστάση ή λυσοσωμική καθεψίνη L ή και καθεψίνη B κλπ. Σύνδεση ιού με ξενιστή έχουμε και με χαμηλό pH (Millet & Whittaker, 2015). Επίσης, η πρωτεΐνη S του SARS-CoV-2 διαθέτει μια πιθανή θέση διάσπασης φουρίνης στην περιοχή S1 / S2, η οποία είναι μοναδική για τους κορωνοϊούς τύπου SARS. Η σύντηξη μεμβράνης δεν είναι μια αυθόρμητη διαδικασία, καθώς χρειάζεται υψηλή ενέργεια για να φέρει κοντά τις μεμβράνες. Σε αυτήν τη διαδικασία, η ιική πρωτεΐνη σύντηξης παίζει έναν κρίσιμο ρόλο ως καταλύτης παρέχοντας την απαιτούμενη ενέργεια για να οδηγήσει την

αντίδραση (Tang, et al., 2020). Προτείνεται ότι όλοι οι κορωνοϊοί χρειάζονται τη θέση διάσπασης στο S2 ' για την ολοκλήρωση της μεμβρανικής σύντηξης (Hulswit, et al., 2016). Η δέσμευση υποδοχέα και η πρωτεολυτική διάσπαση προκαλούν αλλαγές διαμόρφωσης μεγάλης κλίμακας οι οποίες ξεκινούν την αντίδραση σύντηξης που περιλαμβάνει την εισαγωγή του υδρόφοβου πεπτιδίου σύντηξης στη μεμβράνη του ξενιστή. Αυτή η μη αναστρέψιμη αναδίπλωση του μηχανήματος σύντηξης παρέχει την ενέργεια που απαιτείται για να φέρει η μεμβράνη ιού και ξενιστή κοντά μεταξύ τους οδηγώντας σε σύντηξη μεμβράνης μέσω της περιοχής S2. Η κατάσταση διαμόρφωσης μετά τη σύντηξη της πρωτεΐνης S αντιπροσωπεύει την πιο σταθερή διαμόρφωσή της με το χαμηλότερο σημείο ενέργειας (Artika, et al. , 2020; Lim, et al., 2016).



**Εικόνα 8:** Το διάγραμμα του κύκλου ζωής του κορωνοϊού. Η μόλυνση από κορωνοϊό ξεκινά με τη δέσμευση των σωματιδίων του ιού με τους κυτταρικούς υποδοχείς που οδηγούν σε ιογενή είσοδο ακολουθούμενη από τη σύντηξη της κυτταρικής μεμβράνης ιού και ξενιστή. Μετά τη σύντηξη μεμβράνης, το ιικό RNA είναι χωρίς περίβλημα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων ξενιστών. Τα ORF1a και ORF1ab μεταφράζονται για να παράγουν pp1a και pp1ab, τα οποία στη συνέχεια υποβάλλονται σε επεξεργασία από τις πρωτεάσες που κωδικοποιούνται από το ORF1a για να παράγουν 16 μη δομικές πρωτεΐνες (nsps) μερικές από τις οποίες σχηματίζουν το σύμπλοκο (RTC). Αυτό το σύμπλοκο εντοπίζεται σε τροποποιημένες ενδοκυτταρικές μεμβράνες που προέρχονται από το τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) στην περι-πυρηνική περιοχή, και οδηγεί τη δημιουργία RNAs (-) RNA αρνητικού φορτίου μέσω της αντιγραφής και της μεταγραφής. Κατά την αντιγραφή, τα αντίγραφα πλήρους μήκους (-) RNA του γονιδιώματος συντίθενται και χρησιμοποιούνται ως πρότυπα για την παραγωγή γονιδιωμάτων RNA πλήρους μήκους (+). Κατά τη διάρκεια της μεταγραφής, ένα υποσύνολο 7-9 υπογονιδιωματικών RNA, συμπεριλαμβανομένων αυτών που κωδικοποιούν όλες τις δομικές πρωτεΐνες, παράγεται μέσω ασυνεχούς μεταγραφής. Σε αυτήν τη διαδικασία, τα υπογονιδιωματικά (-) RNA συντίθενται συνδυάζοντας διαφορετικά μήκη του 3' άκρου του γονιδιώματος με την ακολουθία του 5'-υποκινητή (leader) που είναι απαραίτητη για μετάφραση. Αυτά τα υπογονιδιωματικά (-) RNA μεταγράφονται σε υπογονιδιωματικά (+) mRNAs. Στη συνέχεια μεταφράζονται τα υπογονιδιωματικά mRNA. Οι παραγόμενες δομικές πρωτεΐνες συναρμολογούνται στο ριβονουκλεοκαμίδιο και στον ιικό φάκελο στο ενδιάμεσο ενδοπλασματικό διαμέρισμα ER-Golgi (ERGIC), μετά έχουμε την παραγωγή ώριμου ιικού σωματιδίου το οποίο απελευθερώνεται από το μολυσμένο κύτταρο (Artika, et al., 2020; Masters, 2006).

### 3. SARS-COVID 19

Το Δεκέμβριο του 2019 στην πόλη Wuhan της Κίνας εμφανίστηκε ένα νέο στέλεχος κορωνοϊού που ανήκει στην ίδια οικογένεια με των ιών που προκαλούν το Σύνδρομο Σοβαρής Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας (SARS). Ονομάζεται SARS-CoV-2, ενώ η ασθένεια που προκαλεί ονομάζεται COVID-19. Ο ιός θεωρείται ότι μεταδόθηκε από τα ζώα στον άνθρωπο και μετά από άνθρωπο σε άνθρωπο με ταχεία εξάπλωση σε ολόκληρο τον κόσμο προσβάλλοντας μέχρι στιγμής πάνω από 240 εκατομμύρια ανθρώπους και 4,8 εκατομμύρια θανάτους. Το SARS-COV-2 σε σύγκριση με άλλους κορωνοϊούς έχει το υψηλότερο ποσοστό μετάδοσης αλλά ένα χαμηλό ποσοστό θνησιμότητας γύρω στο 2,3 % ενώ ο SARS -COV έχει 9,6% και ο MERS-COV 35% (B.Laguירו, 2021).

Τα συμπτώματα του ιού μπορεί να ποικίλουν από άτομο σε άτομο και να εμφανίζονται από ήπια/μέτριας μορφής συμπτώματα όπως είναι τα περισσότερα, έως πιο σοβαρά, που μπορεί να οδηγήσουν σε θάνατο. Τα πιο συχνά είναι ο πυρετός, ξηρός βήχας, κούραση και τα πιο σπάνια συμπτώματα, πονόλαιμος, διάρροια, επιπεφυκίτιδα, πονοκέφαλος, απώλεια γεύσης ή όσφρησης, δερματικό εξάνθημα ή αποχρωματισμός στα δάχτυλα των χεριών ή των ποδιών, δύσπνοια (WHO, World Health Organization, 2020). Μεταδίδεται κυρίως μέσω των αερομεταφερόμενων σταγονιδίων (airborne), τα οποία παράγονται κατά τη διάρκεια του βήχα, του φταρνίσματος, ή της ομιλίας αλλά και με το άγγιγμα μιας μολυσμένης από σταγονίδια επιφάνειας και στη συνέχεια το άγγιγμα του προσώπου (μύτη, στόμα, οφθαλμοί) με άπλυτα χέρια, πράγμα σημαντικό γιατί ο ιός για παράδειγμα πάνω σε πλαστικές και μεταλλικές επιφάνειες διατηρείται ζωντανός ως 3 μέρες. Από την ημέρα της έκθεσης έως την εμφάνιση συμπτωμάτων (χρόνος επώασης) μεσολαβούν 2 έως 14 ημέρες (συχνότερα είναι 4-5 ημέρες) (wikipedia, 2021).

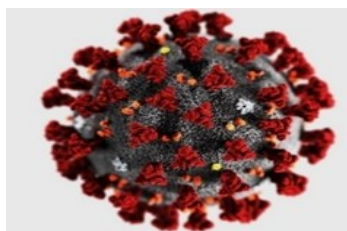
Εδώ και πάνω από ένα χρόνο από την πρώτη καταγραφή του κρούσματος έχουν σημειωθεί αρκετές μεταλλάξεις του ιού με 2 σημαντικές μέχρι τώρα αυτή που προέρχεται από το Ηνωμένο Βασίλειο και αυτή από την Νότια Αφρική, καθώς χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη μεταδοτικότητα. Αυτές οι δύο παραλλαγές παρουσιάζουν και οι ίδιες πολλές μεταλλάξεις και μία από αυτές που ονομάζεται N501Y, βρίσκεται στο επίκεντρο της προσοχής. Βρίσκεται στην πρωτεΐνη ακίδα του κορωνοϊού, η οποία του επιτρέπει να προσκολλάται στον υποδοχέα ACE2 των ανθρώπινων κυττάρων για να κατορθώσει να διεισδύσει στο εσωτερικό τους και, κατά συνέπεια, διαδραματίζει ρόλο κλειδί στην προσβολή του οργανισμού από τον ιό (capital.gr, 2021).

Το Γενάρη του 2021 ξεκίνησαν οι πρώτοι εμβολιασμοί ξεκινώντας από το υγειονομικό προσωπικό και από ηλικιακά ευπαθείς ομάδες. Πέρα από την θωράκιση του κόσμου και μέχρι να ολοκληρωθούν οι εμβολιασμοί, πρέπει να τηρούνται οι κανόνες υγιεινής όπως η χρήση μάσκας, η

αποφυγή συγχρωτισμού και καλό πλύσιμο χεριών ενώ παράλληλα έχουν μπει σε εφαρμογή διάφορες θεραπευτικές αγωγές για τον περιορισμό των συμπτωμάτων π.χ Καναδική μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση κολχικίνης σε ασθενείς μείωσε κατά 44% την θνητότητα (wikipedia, 2021).

### 3.1 Δομή του γονιδιώματος του SARS-COV-2

Ο ιός του κορωνοϊού είναι ένα σφαιρικό περιβεβλημένο σωματίδιο που περιέχει ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας για γονιδίωμα. Ο φάκελος/καψίδιο του ιού φέρει κάποιες προβολές γλυκοπρωτεΐνης ενώ μερικοί κορωνοϊοί περιέχουν τη πρωτεΐνη συγκολλητίνης-εστεράσης (HE) (Mousavizadeh & Ghasemi, 2020). Το γονιδίωμα του SARS-COV-2 έχει μήκος 29,891 bp (Naqvi, et al., 2020). Οι διάμετροι των ιικών σωματιδίων κυμαίνονται από 60-140nm και οι ακίδες τους από 9-12nm δείχνοντάς μας την χαρακτηριστική μορφή που όλοι είμαστε γνώριμοι πια (εικόνα 9).

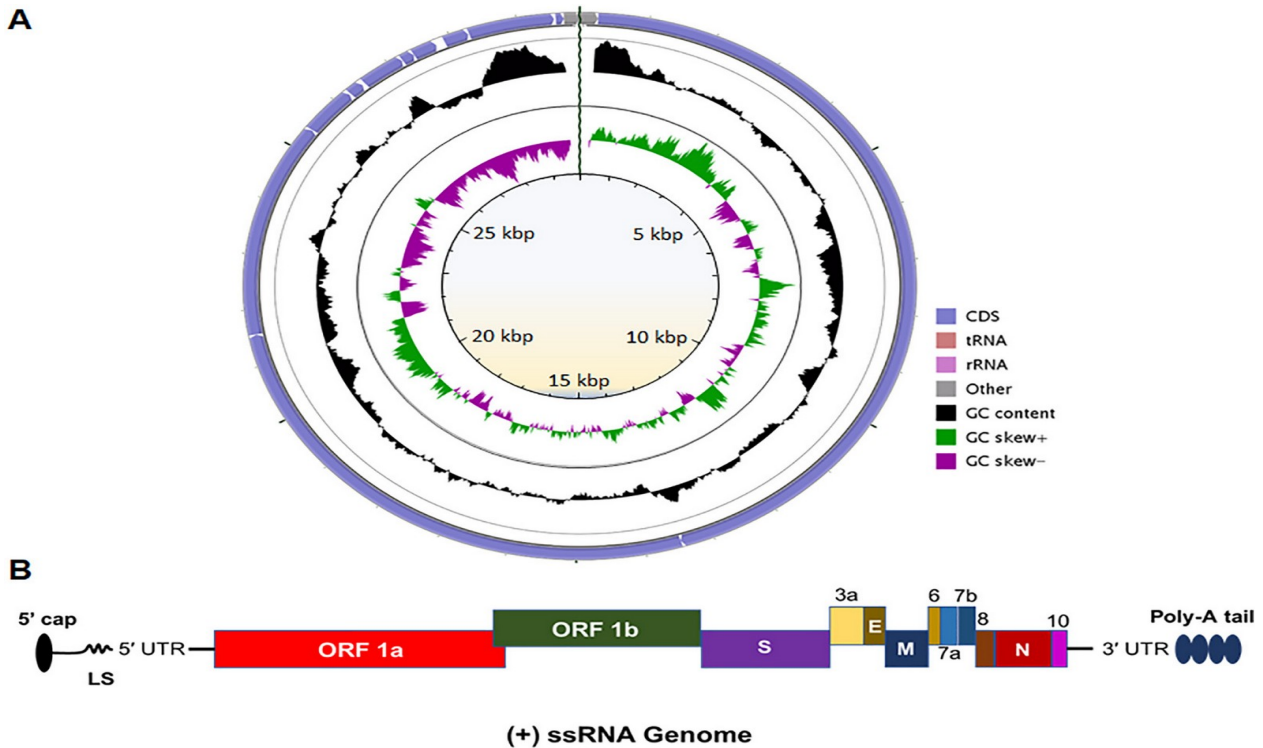


**Εικόνα 9:** Σχήμα κορωνοϊού με τις χαρακτηριστικές του ακίδες. ΠΗΓΗ: (Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2020).

Το γονιδίωμα των CoV έχει διάταξη 5'-ORF1a-ORF1b-S-E-M-N-3' (Dhama, et al., 2020). Η γενετική σύνθεση του SARS-CoV-2 αποτελείται από 13-15 (12 λειτουργικά) ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) που περιέχουν περίπου ~ 30.000 νουκλεοτίδια και μοιράζεται γενετικές ομοιότητες με τον SARS-CoV και τον MERS-CoV. Τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) ταξινομούνται ως ρεπλικάση και πρωτεάση (1a – 1b) και οι κύριες δομικές S, E, M, N πρωτεΐνες, ακολουθούν την τυπική σειρά εμφάνισης 5'-3' (Naqvi, et al., 2020). Αυτά τα ORF ανήκουν στις αλληλουχίες RNA που περιλαμβάνει ένα κωδικόνιο έναρξης (AUG), ένα κωδικόνιο τερματισμού (UAG, UAA ή UGA) και τα κωδικόνια μεταξύ τους. Αυτή η μεταβλητή προέλευση ακολουθιών μεταγραφής επιτρέπει στον ιό SARS-CoV-2 να κωδικοποιεί περίπου 50 πρωτεΐνες που έχουν μη δομικές, δομικές και βοηθητικές λειτουργίες (Raskin, 2020). Τα δομικά γονίδια και τα πλαίσια ανάγνωσης στο γονιδίωμα ανιχνεύονται ως: περιοχή 5' UTR (1 έως 265) nt, Orf1ab (266 έως 21,555) nt, Orf3a (25,393 έως 26,220) nt, E (26,245 έως 26,572) nt, M ( 26,523 έως 27,191) nt, Orf6 (27,202 έως 27,387) nt, Orf7a (27,394 έως 27,759) nt, Orf7b (27,756 έως 27,887) nt, Orf8 (27,894 έως 28,259) nt, N (28,274 έως 29,533) nt, Orf10 (29,558 έως 29,558 29,674) nt και 3'UTR (29,675 έως 29,903) nt.

Το Orf8 και τα πρόσθετα Orf9b και Orf9c αποκαλύφθηκαν πρόσφατα στο γονιδίωμα του SARS-CoV-2. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το γονίδιο S, E, M και N αντιπροσωπεύουν τις

δομικές πρωτεΐνες και τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα Orf3a, Orf3b, Orf6, Orf7a, Orf7b, Orf8, Orf9b, Orf9c και Orf10 στο SARS-CoV-2 αντιπροσωπεύουν τις βοηθητικές πρωτεΐνες, οι οποίες παρέχουν ένα συλλογικό πλεονέκτημα στη μόλυνση και την παθογένεση του ιού (Das, et al., 2021).



**Εικόνα 10:** ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ SARS-COV-2. Α. Αναπαράσταση του γονιδιώματος αναφοράς του SARS-CoV-2 που δείχνει τις κωδικοποιημένες περιοχές των πρωτεϊνών (protein-coding regions) και το περιεχόμενο G-C του γονιδιώματος.

Β. Η αναπαράσταση του 5' καλυμμένου mRNA έχει ακολουθία υποκινητή (LS), UTR (untranslated region) στο 5' άκρο και UTR στο 3' άκρο με μια Poly-A-tail. Αποτελείται από ORF1a, ORF1b, ακίδα (S), ORF3a, Φάκελος (E), Μembrάνη (M), ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, νουκλεοκαψίδιο (Nucleocapsid) (N) και ORF10. ΠΗΓΗ : (Naqvi, et al., 2020).

Το γονιδίωμα θεωρείται μεγάλο, με 29.903 ζεύγη βάσεων (Raskin, 2020). Όλο το γονιδίωμα του SARS-CoV-2 κωδικοποιεί περίπου 7096 υπολείμματα μακράς πολυπρωτεΐνης που αποτελείται από πολλές δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες (NSPs). Το νουκλεοτιδικό περιεχόμενο του ιικού γονιδιώματος διατηρείται κυρίως από 2 μη δομικές πρωτεΐνες, την ORF1a και την ORF1ab ακολουθούμενο από δομικές πρωτεΐνες. Οι πολυπρωτεΐνες ιογενούς ρεπλικάσης (rps) rpl1a και rpl1ab κωδικοποιούνται από τις ORFs 1a και 1b, όπου η πολυπρωτεΐνη rpl1ab κωδικοποιείται από τον μηχανισμό ριβοσωματικής μετατόπισης του γονιδίου 1b. Αυτές οι πολυπρωτεΐνες υφίστανται περαιτέρω ική επεξεργασία από ικές κωδικοποιημένες πρωτεΐνες παράγοντας τις 16 (NSPs) μη δομικές πρωτεΐνες οι οποίες είναι καλά διατηρημένες σε όλους τους CoV ιούς της ίδιας οικογένειας (Naqvi, et al., 2020).



Υπάρχουν επιπλέον βοηθητικά γονίδια, όπως τα 3a / b, 4a / b όπου φαίνεται να αναμιγνύονται με τα δομικά γονίδια. Αυτές οι ώριμες πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για αρκετές σημαντικές λειτουργίες για την διατήρηση του γονιδιώματος και την αναπαραγωγή του ιού (Mousavizadeh & Ghasemi, 2020).

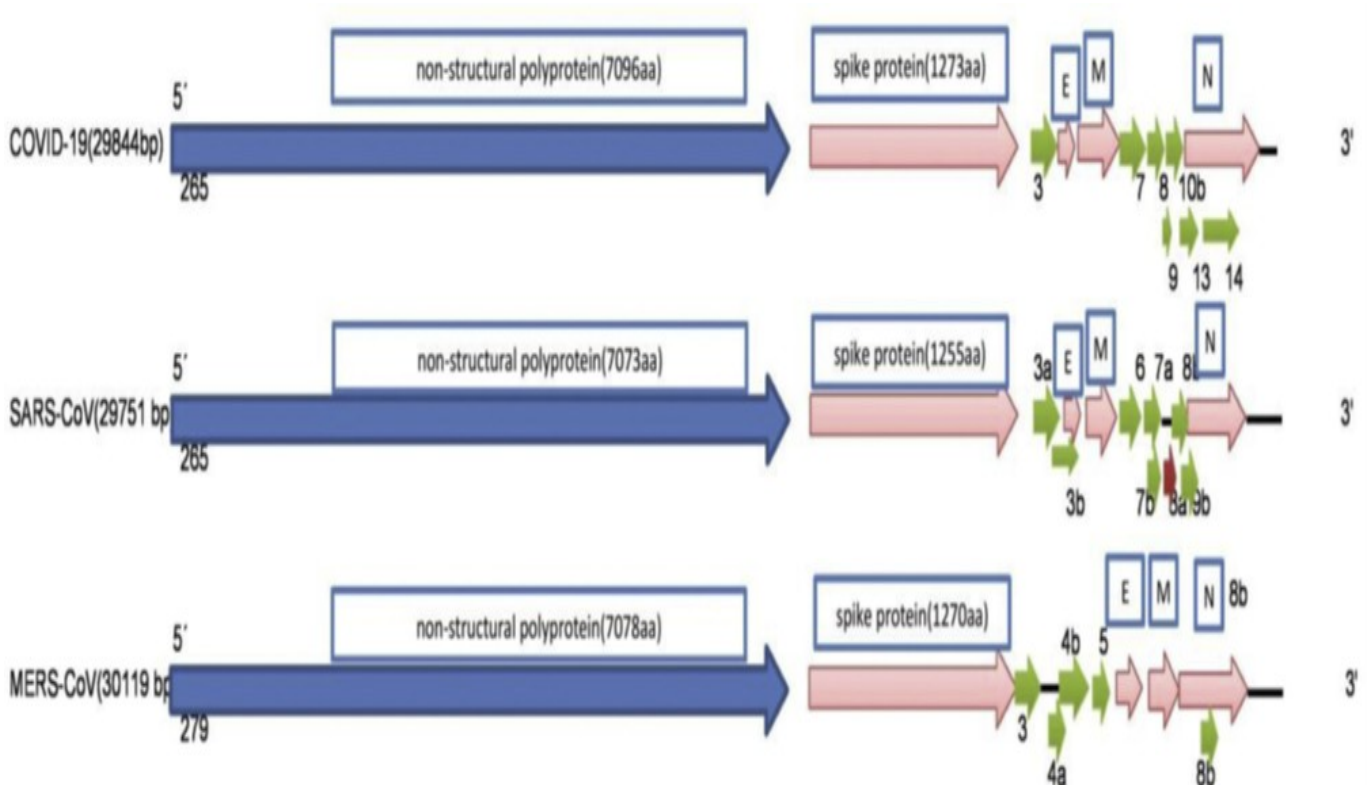
Επίσης σε επίπεδο αμινοξέων ο SARS-CoV-2 δεν διαφέρει πολύ από τον SARS-CoV αλλά έχουν κάποιες διαφορές όπως η πρωτεΐνη 8a υπάρχει στο SARS-CoV και απουσιάζει από τον SARS-CoV-2. Η πρωτεΐνη 8b είναι 84 αμινοξέα στο SARS-CoV, αλλά στον SARS-CoV-2 είναι 121 αμινοξέα. Η πρωτεΐνη 3b είναι 154 αμινοξέα στο SARS-CoV αλλά στον SARS-CoV-2 μόνο με 22 αμινοξέα. *Αυτές οι διαφορές που υπάρχουν χρειάζονται περαιτέρω μελέτη για να δούμε πως επηρεάζουν την λειτουργία και την παθογένεση του SARS-CoV-2* (Wu, et al., 2020) .

Ο SARS-CoV-2 έχει επίσης βρεθεί ότι κωδικοποιεί πολλές βοηθητικές πρωτεΐνες, αν και στερείται το HE, το οποίο είναι χαρακτηριστικό ορισμένων βητακορωνοϊών (betacoronaviruses) .

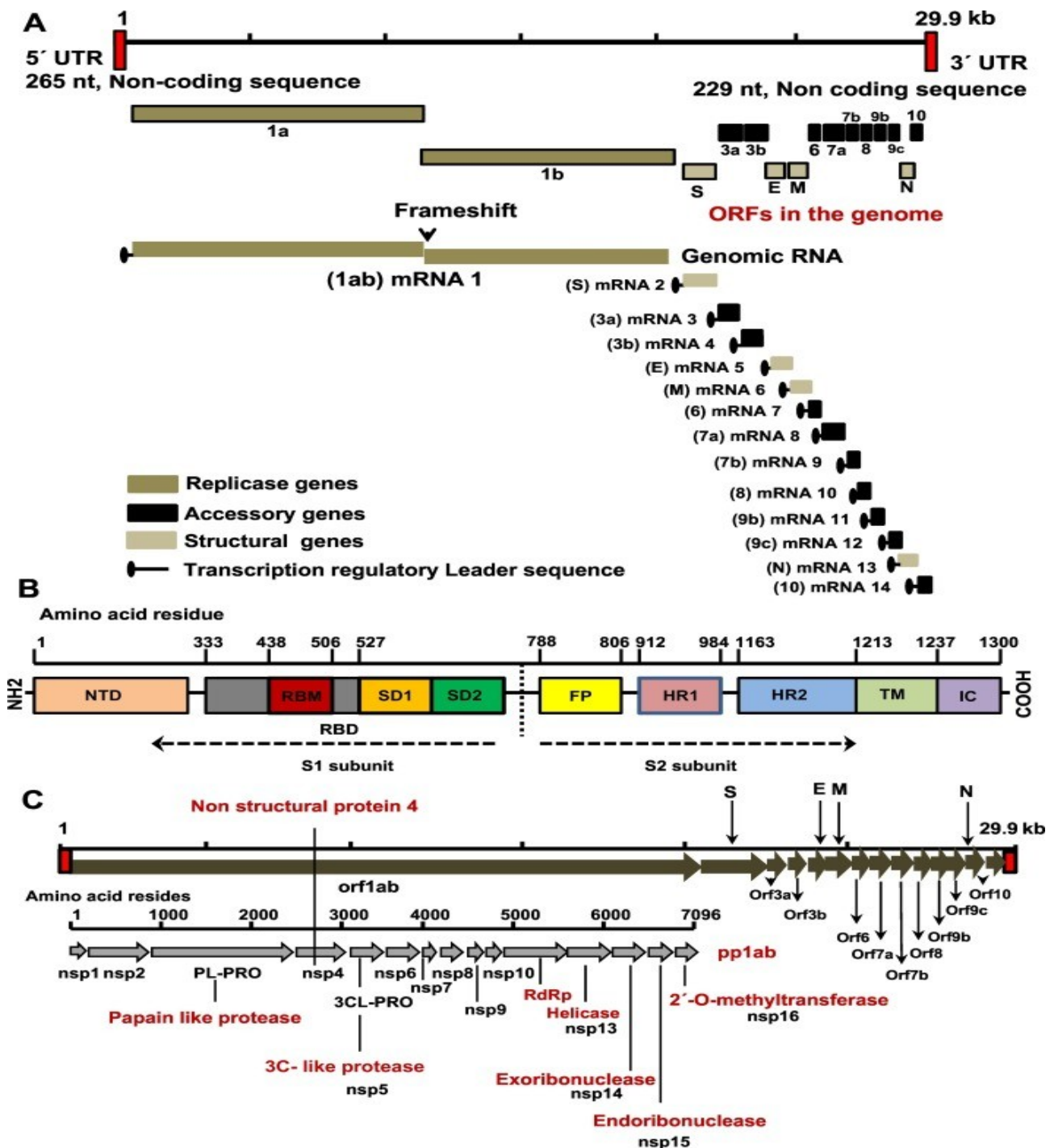
Το θετικής πολικότητας γονιδίωμα των CoVs χρησιμεύει όπως το mRNA και μεταφράζεται έως πολυπρωτεΐνη 1a / 1ab (pp1a / 1ab). Ένα σύμπλοκο αντιγραφής-μεταγραφής (RTC) σχηματίζεται σε κυστίδια διπλής μεμβράνης (DMVs) από μη δομικές πρωτεΐνες (nsps), κωδικοποιημένες από το γονίδιο πολυπρωτεΐνης. Στη συνέχεια, το RTC συνθέτει ένα ένθετο σύνολο υπογονιδιωματικών RNA (sgRNAs) μέσω ασυνεχούς μεταγραφής (Dhama, et al., 2020). Όλες οι δομικές και βοηθητικές πρωτεΐνες μεταφράζονται από τα sgRNAs. Οι δομικές πρωτεΐνες S, M, E, N κωδικοποιούνται από τα ανοιχτά πλαίσια ORFs 10, 11 στο ένα τρίτο του γονιδιώματος κοντά στο 3' άκρο. (Mousavizadeh & Ghasemi, 2020).

Μια φυλογενετική ανάλυση των δομικών γονιδίων αποκάλυψε ότι ο SARS-COV-2 είναι πιο κοντά στο CoV που σχετίζεται με το ιό BAT-SARS άρα είναι πολύ πιθανόν ο SARS-COV-2 να προήλθε από νυχτερίδες ενώ άλλοι ξενιστές μπορεί να ενίσχυσαν την μετάδοση της νόσου στους ανθρώπους και συγκεκριμένα για SARS και MERS αυτοί οι ξενιστές -ενισχυτές μπορεί να είναι η καμήλα και η μοσχογαλή (civetcat) (Dhama, et al., 2020). Υπάρχουν επίσης στοιχεία, που υποδηλώνουν τις νυχτερίδες ως τις φυσικές δεξαμενές των CoV που μοιάζουν με SARS, συμπεριλαμβανομένου του SARS-CoV-2 ενώ για να μεταδοθούν οι ιοί αυτοί στους ανθρώπους χρειάζονται ενδιάμεσους ξενιστές. Κάποιες μελέτες δείχνουν ότι τα σκυλιά μπορούν να μολυνθούν με τον ιό. Το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτασίνης (ACE2, angiotensin-converting enzyme) υπάρχει και στα σκυλιά και έχει μεγάλη ομοιότητα όσον αφορά τις αλληλουχίες με αυτό των ανθρώπων (13 στα 18) και συνεπώς η δέσμευσή τους στην ακίδα RBD του SARS-CoV-2 είναι αρκετά παρόμοια, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να υπάρξει μετάδοση από άνθρωπο σε ζώο (Naqvi, et al., 2020).

Η ρύθμιση της νουκλεοπροτεΐνης (N), της πρωτεΐνης φακέλου (E) και της πρωτεΐνης/μεμβράνης (M) μεταξύ των βητακοροναϊών (betacoronaviruses) είναι διαφορετική και απεικονίζεται παρακάτω (Mousavizadeh & Ghasemi, 2020).



**Εικόνα 11:** Η περιοχή 5' UTR και 3' UTR και η περιοχή κωδικοποίησης COVID-19, SARS-CoV και MERS-CoV. Εμφανίζονται οι αριθμοί ζευγών βάσεων μεταξύ των ιών betacoronavirus. Αυτός ο αριθμός τροποποιείται από τη σύγκριση αλληλουχίας και τη γονιδιωματική οργάνωση του 2019-nCoV, 2020.9. Οι διαφορές στη διάταξη του φακέλου (E), της μεμβράνης (M) και της νουκλεοπροτεΐνης (N) μεταξύ των COVID-19, SARS-CoV και MERS-CoV εμφανίζονται στο 3' άκρο (Mousavizadeh & Ghasemi, 2020).



**Εικόνα 12:** Α) Οργάνωση γονιδιώματος και σύνθεση RNA του SARS-CoV-2. Το γονίδιο αντιγραφής περιλαμβάνει ORF 1a και 1b που απαιτούνται για την αντιγραφή του γονιδιώματος και τη σύνθεση των sgRNA. Απεικονίζονται τα δομικά γονίδια, τα βοηθητικά γονίδια στο γονιδίωμα και η αλληλουχία υποκινητή που προέρχονται από το 5' πρώτο άκρο του γονιδιώματος. Β) Δομή της πρωτεΐνης ακίδα S SARS-CoV-2. Ακίδα πρωτεΐνης 1300 αμινοξέων. Περιέχει την N τελική περιοχή (NTD), την περιοχή δέσμευσης υποδοχέα (RBD), το μοτίβο δέσμευσης υποδοχέα (RBM), υποπεριοχή SD1, την υποπεριοχή SD2 τα οποία είναι τα συστατικά της υπομονάδας S1 που βλέπουμε στην αριστερή πλευρά (μπορεί να διαιρεθεί σε S1A, S1B και S1C/D). Τα συστατικά της υπομονάδας S2 στην δεξιά πλευρά είναι το FP (πεπτιδίο σύντηξης) 1 περιοχή επαναλήψεων επτάδων HR1, και άλλη μία περιοχή επαναλήψεων επτάδων HR2, την διαμεμβρανική περιοχή TM και την ενδοκυτταρική περιοχή IC. Γ) Επισκόπηση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας του SARS-CoV-2. Πολυπρωτεΐνη της ρεπλικάσης pp1ab (740-810 kDa) η οποία υποβάλλεται σε επεξεργασία σε μη δομικές πρωτεΐνες (nsps). Η πρωτεάση που μοιάζει με 3C (3CL-PRO, επισημασμένη με κόκκινο χρώμα) στο SARS-CoV-2, μπορεί να είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση του C-άκρου της πολυπρωτεΐνης pp1ab. Οι πολυπρωτεΐνες υποβάλλονται σε επεξεργασία με πρωτεάση όπως η παπαΐνη (παρουσιάζεται με κόκκινο χρώμα). Η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp), η οποία είναι υπεύθυνη για την αντιγραφή και τη μεταγραφή του ιού του γονιδιώματος, υποδεικνύεται σε κόκκινο χρώμα (Das, et al., 2021).

### 3.2 Μη δομικές πρωτεΐνες του γονιδιώματος *sars-cov-2*

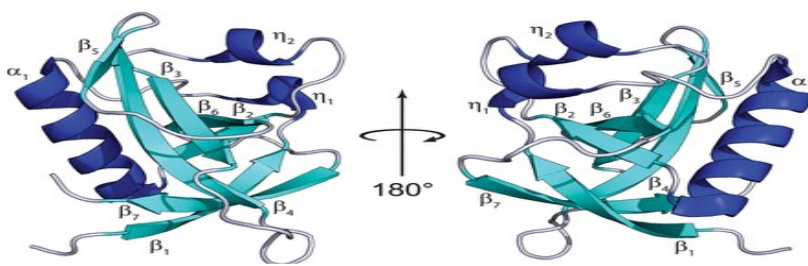
Όπως προαναφέραμε, περίπου τα δύο τρίτα του γονιδιώματος, βρίσκονται στην 5' γονιδιωματική περιοχή και περιέχουν το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 1a (ORF1a) και το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 1b (ORF1b). Τα ORF1a και ORF1b κωδικοποιούν τις μη δομικές πρωτεΐνες (nsps) 1 έως 11 και 1 έως 16 αντίστοιχα, και μεταφράζονται σε μεγάλες πολυπρωτεΐνες οι οποίες στη συνέχεια διασπώνται σε μεμονωμένες μη δομικές πρωτεΐνες (nsps) από ικές κωδικοποιημένες πρωτεάσες ενώ τα γονίδια που κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες (ακίδα, φάκελος, μεμβράνη και νουκλεοκαψίδιο) βρίσκονται στο υπόλοιπο τρίτο του γονιδιώματος με μεταβλητό αριθμό εξαρτώμενων στελεχών βοηθητικών πρωτεϊνών ORF (strain-dependent ORF accessory proteins) που υπάρχουν μεταξύ των δομικών γονιδίων (Clark, et al., 2021). Μερικές μη δομικές πρωτεΐνες (Nsps) μαζί με μερικούς παράγοντες των ξενιστών σχηματίζουν ένα σύμπλοκο αντιγραφής-μεταγραφής (RTC) μέσα σε κυστίδια διπλής μεμβράνης (DMV). Τα RTCs είναι ο κεντρικός κόμβος για την αντιγραφή και μεταγραφή του ιού γονιδιώματος (Arya, et al., 2021; Helmy, et al., 2020).

Οι μη δομικές πρωτεΐνες (Nsps) εκτελούν πολλούς ρόλους στην αναπαραγωγή (αντιγραφή, διόρθωση σφαλμάτων αντιγραφής) στην μετάφραση, στην καταστολή πρωτεϊνών του ξενιστή, στον αποκλεισμό της ανοσοαπόκρισης, στην σταθεροποίηση RNA και στη διαδικασία συναρμολότητας ιών (Raskin, 2020; Turab Naqvi, et al., 2020). Στον covid-2 εμπλέκονται στην αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος, στην επεξεργασία πρωτεϊνών, την μεταγραφή και την πρωτεόλυση. Εμπλέκονται και στην σύνδεση RNA, στην δραστηριότητα ενδοπεπτιδάσης, στην δραστηριότητα μεταφοράς, στην σύνδεση ATP, στην σύνδεση ιόντων ψευδαργύρου, στη δραστηριότητα RNA-πολυμεράση 5'-3' directed RNA, στη δραστηριότητα εξορριβονουκλεάσης και στη δραστηριότητα μεθυλτρανσφεράσης (Naqvi, et al., 2020).

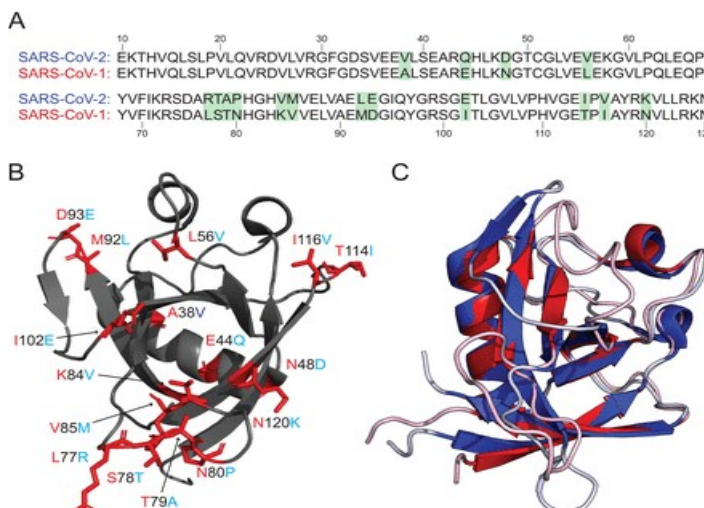
Μία πρωτεΐνη που είναι γνωστό ότι παίζει κρίσιμο ρόλο στον κύκλο ζωής του κορωνοϊού είναι η μη δομική πρωτεΐνη 1 (**NSP1**). Η κατανόηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας της NSP1 σε μελέτες, ήταν να αξιοποιηθεί πλήρως τόσο για την ανάπτυξη αντικών όσο και για το σχεδιασμό εμβολίων (Clark, et al., 2021). Αυτή η μη δομική πρωτεΐνη υπάρχει μόνο στους Alphacoronavirus και Betacoronavirus με διαφορετικό μέγεθος και αλληλουχία (~ 9 kDa για Alphacoronavirus και ~ 20 kDa για Betacoronavirus), ενώ λείπει από τους Gamma και Delta (Al-Qaaneh, et al., 2021). Περιλαμβάνει μια σφαιρική περιοχή καταλοίπων από 13 έως 121, που βρίσκεται ανάμεσα στις διαταραγμένες περιοχές που αποτελούνται από τις περιοχές 1 έως 12 και 122 έως 179 (Clark, et al., 2021). Η Nsp1 είναι το N-τελικό προϊόν διάσπασης που απελευθερώνεται από την πολυπρωτεΐνη pp1ab από την ιογενώς κωδικοποιημένη πρωτεΐνη που μοιάζει με παπαΐνη /papain-like (nsp3d, PLpro). Έχει δειχθεί ότι προάγει την κυτταρική αποικοδόμηση του mRNA, μπλοκάρει τη

μετάφραση του κύτταρου ξενιστή και αναστέλλει την άμεση ανοσολογική αντίδραση στην ιογενή μόλυνση (Huang, et al., 2011). Η διαγραφή της περιοχής κωδικοποίησης NSP1 σε μολυσματικούς κλώνους εμπόδισε τον ιό να μολύνει παραγωγικά καλλιεργημένα κύτταρα (Brockway & Denison, 2005). Επίσης οι μεταλλάξεις που εμποδίζουν την απελευθέρωση της NSP1 από την εκκολαπτόμενη πολυπρωτεΐνη ORF1a ουσιαστικά περιόρισαν τη βιωσιμότητα του ιού (Galan, et al., 2005).

Μια σύγκριση της δομής της SARS-CoV-2 NSP1 με τη δομή SARS-CoV-1 NSP1 αποκαλύπτει πώς οι μεταλλάξεις αλλάζουν τη διαμόρφωση των εύκαμπτων βρόχων. Αυτές οι αλλαγές στη διαμόρφωση προκαλούν την αναδίπλωση νέων δευτερευόντων δομικών στοιχείων που με τη σειρά τους, δημιουργούν επιφάνειες που διακρίνονται από αυτές της SARS-CoV-1 nsp1 τόσο στο περίγραμμα όσο και στα χαρακτηριστικά. Η σύγκριση με τις δομές α-CoV nsp1 δείχνει ότι ο σφαιρικός τομέας nsp1 έχει κοινή δομική ομολογία ενώ έχει χαμηλή ομοιότητα αλληλουχίας (Clark, et al., 2021).



**Εικόνα 13:** Κρυσταλλική δομή SARS-CoV-2 nsp1. Διάγραμμα κορδέλας του SARS-CoV-2 nsp1 10–126 με τις α-έλικες σε μπλε, β-κλώνους σε κυανό και βρόχους σε γκρι χρώμα. Όλα τα δευτερεύοντα δομικά στοιχεία φέρουν σήμανση (Clark, et al., 2021).



**Εικόνα 14:** Σύγκριση των δομών SARS-CoV-2 και SARS-CoV-1 nsp1. (A) Ευθυγράμμιση ακολουθίας μεταξύ των δομών nsp1 που προέρχονται από SARS-CoV-2 και SARS-CoV-1 με διαφορές αμινοξέων που επισημαίνονται με πράσινο χρώμα (B) Διάγραμμα κορδέλας του SARS-CoV-2 nsp1 10–127 με διαφορές αμινοξέων με το SARS-CoV-1 nsp1 12–127. Η θέση του αμινοξέος επισημαίνεται με μαύρο χρώμα με την ταυτότητα αλληλουχίας του SARS-CoV-1 σε αυτήν τη θέση επισημασμένη με κόκκινο χρώμα και του SARS-CoV-2 σε ανοιχτό μπλε χρώμα. (Γ) Επικάλυψη των δομών του nsp1 που προέρχονται από SARS-CoV-1 (κόκκινο) και SARS-CoV-2 (μπλε). PDBID 2HSX για SARS-CoV-1 nsp1 12–127 και 7K7P για SARS-CoV-2 nsp1 10–127 (Clark, et al., 2021).

Ενώ το γονιδίωμα ssRNA θετικής πολικότητας είναι μολυσματικό για τα μέλη του γένους Alphacoronavirus, Betacoronavirus, και Gammacoronavirus έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση της ιικής νουκλεοπρωτεΐνης και της NSP3 μπορεί μαζί ή ξεχωριστά να προάγει μόλυνση (Neuman & Buchmeier, 2016).

Η διάσπαση πολυπρωτεϊνών ξεκινά από την απελευθέρωση των NSP1, NSP2 και NSP3 που καταλύεται από την NSP3 (Hancourt, et al., 2004). Η NSP2 συνδέεται με πρωτεΐνες των ξενιστών και διαταράσσει το περιβάλλον των κυττάρων των ξενιστών. Η NSP3 είναι μια πρωτεάση που μοιάζει με παπαΐνη και έχει μέγεθος 1.945 αμινοξέα, παίζοντας πολλαπλούς ρόλους (Angeletti, et al., 2020). Ένας από αυτούς είναι η ρύθμιση της σηματοδότησης IRF3 (=ρυθμιστικός παράγοντας 3 ιντερφερόνης) και του NF-kappa B (πυρηνικός παράγοντας kappa-ελαφριάς αλυσίδας-ενισχυτής ενεργοποιημένων B κυττάρων / πρωτεϊνικό σύμπλοκο που ελέγχει τη μεταγραφή του DNA, την παραγωγή κυτοκίνης και την επιβίωση των κυττάρων) (Frieman, et al., 2009; Brasier, 2006). Οι NSP3, NSP4, NSP6 παίζουν ρόλο στην αναδιάταξη της μεμβράνης του ξενιστή που είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιού (Angelini, et al., 2013).

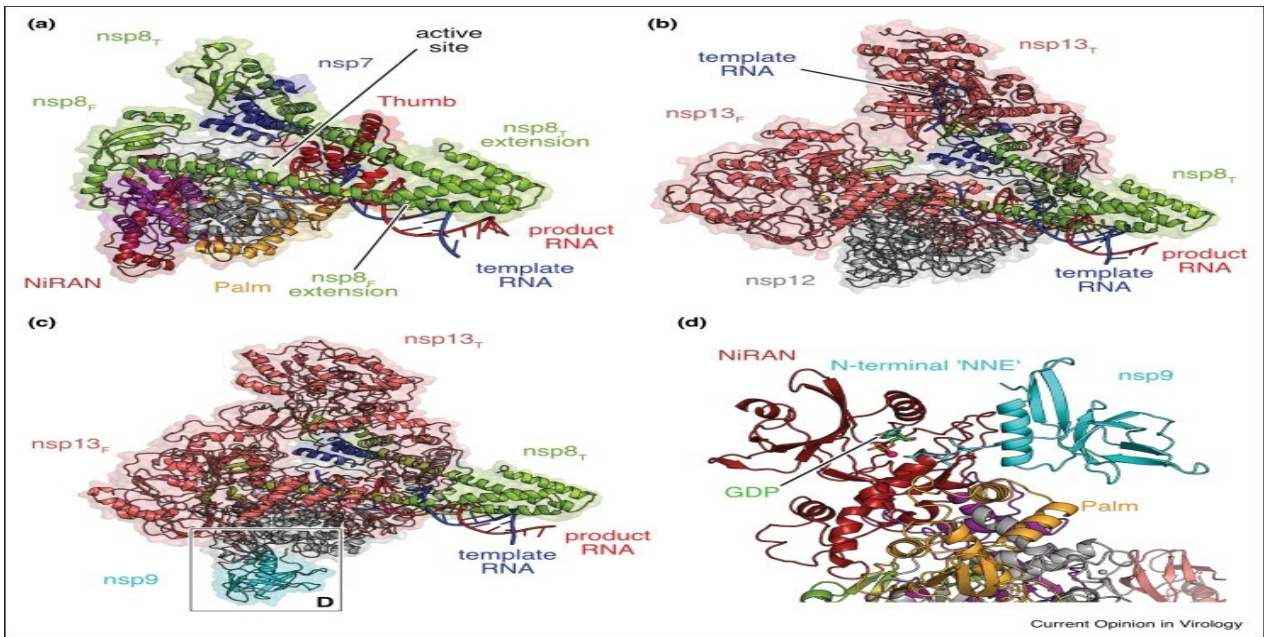
Η NSP5 είναι μια πρωτεάση (που μοιάζει με την 3C) και διασπά σε 11 ξεχωριστές θέσεις την πολυπρωτεΐνη για να δώσει άλλες μη δομικές πρωτεΐνες (Muramatsu, et al., 2016). Αυτή διασπά τις υπόλοιπες πρωτεολυτικές θέσεις στις pp1a και pp1b για να απελευθερώσει την NSP4 και είναι απαραίτητη για την αντιγραφή των ιών (Anand, et al., 2003). Μεταξύ των ανθρώπινων κορωνοϊών η αλληλουχία των αμινοξέων της NSP5 αποκλίνει ενώ οι δραστικές θέσεις πρωτεάσης κυστεΐνης διατηρούνται σε υψηλό βαθμό (Roe, et al., 2021). Σε μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι υπάρχει ένας νέος μηχανισμός με τον οποίο οι πρωτεΐνες NSP5 που κωδικοποιούνται από SARS-CoV και SARS-CoV-2 ανταγωνίζονται την παραγωγή IFN (ιντερφερόνη I) διατηρώντας φωσφορυλιωμένο IRF3 στο κυτόπλασμα, εύρημα που θα βοηθήσει στην ανάπτυξη αντικών παραγόντων κατά της ασθένειας του SARS-CoV-2 (Fung, et al., 2021). Η ιντερφερόνη τύπου 1 παράγεται από κάθε κύτταρο του σώματος και είναι βασικό συστατικό της αρχικής ανταπόκρισης έναντι των ιών προκαλώντας την παραγωγή άλλων πρωτεϊνών που επιτίθενται στον ιό, κινητοποιούν το ανοσοποιητικό και προειδοποιούν τα μη μολυσμένα κύτταρα (Capital.gr, 2020). Ουσιαστικά, οι πρωτεΐνες της NSP5 καταστέλλουν την παραγωγή INF (1) που προκαλείται από το SeV (protein sevenless). Επίσης, η NSP5 ούτε διασπά τον ενδογενή IRF3, ούτε αναστέλλει την επαγόμενη από SeV φωσφορυλίωση του IRF3. *Τελικά επειδή είναι σημαντικός στόχος η NSP5 για την ανάπτυξη των αντικών παραγόντων δόκιμο είναι να γίνουν περαιτέρω αναλύσεις και έρευνες πάνω σε αυτήν* (Fung, et al., 2021).

Η NSP6 (υπάρχει και στους α και β κορωνοϊούς) εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και δημιουργεί αυτοφαγοσώματα (Forni, et al., 2016). Η εμφάνιση μεταλλάξεων στο NSP6 αφορούν κυρίως το 3<sup>ο</sup> κωδικόνιο και δεν επηρεάζουν το συνολικό πρωτεϊνικό στοιχείο του ιού. Στις αμινοξικές θέσεις 3691 (θέση NSP6 37) και 9659 σε ανάλυση που έγινε, έδειξε ότι οι μεταλλάξεις σε αυτά τα σημεία οδηγούν σε χαμηλότερη σταθερότητα των πρωτεϊνικών δομών (Benvenuto, et al., 2020). Η παρουσία πολλαπλών καταλοίπων φαινυλαλανίνης στην περιοχή της εξωτερικής

μεμβράνης του NSP6 μπορεί να ευνοεί τη συγγένεια μεταξύ αυτής της περιοχής και της μεμβράνης του ER προκαλώντας μια πιο σταθερή σύνδεση της πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και αυτή η δέσμευση μπορεί να ευνοεί την μόλυνση με τον ιό, διακυβεύοντας την ικανότητα των αυτοφαγοσωμάτων να απελευθερώνουν ιικά συστατικά στα λυσοσώματα για την αποικοδόμηση (Zhou, et al., 2015; Benvenuto, et al., 2020).

Για να αναπαράγουν και να εκφράσουν το γονιδίωμά τους οι CoV χρησιμοποιούν μια RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp) (την χρησιμοποιεί σαν καλούπι για να φτιάξει αντίγραφα από το αρχικό RNA) η οποία σχετίζεται με πρόσθετες μη δομικές πρωτεΐνες για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο αντιγραφής-μεταγραφής (RTC) που αυτό με την σειρά του πραγματοποιεί την σύνθεση RNA, την επικάλυψη αλλά και την διόρθωση (capping and proofreading) (Hillen, 2021). Στην καρδιά του RTC βρίσκεται η NSP12 και το οποίο φιλοξενεί την ενεργή θέση RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp) (Cheng, et al., 2005; Hillen, 2021). Το RTC για να είναι ενζυμικά ενεργό χρειάζεται τις NSP7 και NSP8 που μαζί με την NSP12, σχηματίζουν τον πυρήνα του συμπλόκου RdRp (Hillen, 2021) (Subissi, et al., 2014). Επίσης, πιστεύεται πως η NSP13 (πρωτεΐνη διπλής λειτουργίας με δραστηριότητας ελικάσης και τριφωσφατάσης), η μεθυλοτρανσφεράση NSP16, η NSP14, η NSP9 και η NSP10, δεσμεύονται σε αυτό σύμπλοκο για να σχηματίσουν το RTC (Snijder, et al, 2016). Στην μελέτη του Hillen H.S, αποκαλύπτει πως η NSP13 αλληλεπιδρά με το RNA. Παρά το μεγάλο εύρος μελετών που υπάρχει στη λειτουργία, λείπει μια μοριακή κατανόηση του RTC και του τρόπου με τον οποίο ενσωματώνει τα διαφορετικά στάδια της έκφρασης του ιικού γονιδίου εν μέρει λόγω της απουσίας κάποιων δομικών δεδομένων.

*Θα πρέπει μελλοντικά να καθοριστεί ο τρόπος με τον οποίο οι διάφορες μη δομικές πρωτεΐνες συνδέονται με τον πυρήνα RdRp για το σχηματισμό του RTC καθώς και την εκτέλεση διεργασιών όπως η κάλυψη και η διόρθωση (capping and proofreading). Ούτε είναι γνωστοί οι μηχανισμοί με τους οποίους η πολυμεράση ξεκινά την σύνθεση RNA και πως αλλάζει τις μήτρες-καλούπια (templates) κατά τη διάρκεια της σύνθεσης m RNA (nested mRNA synthesis). Τέλος, δεν ξέρουμε τον ακριβή ρόλο της NSP13 αλλά γνωρίζουμε ότι απαιτείται για την αντιγραφή του κορωνοϊού (Hillen, 2021).*



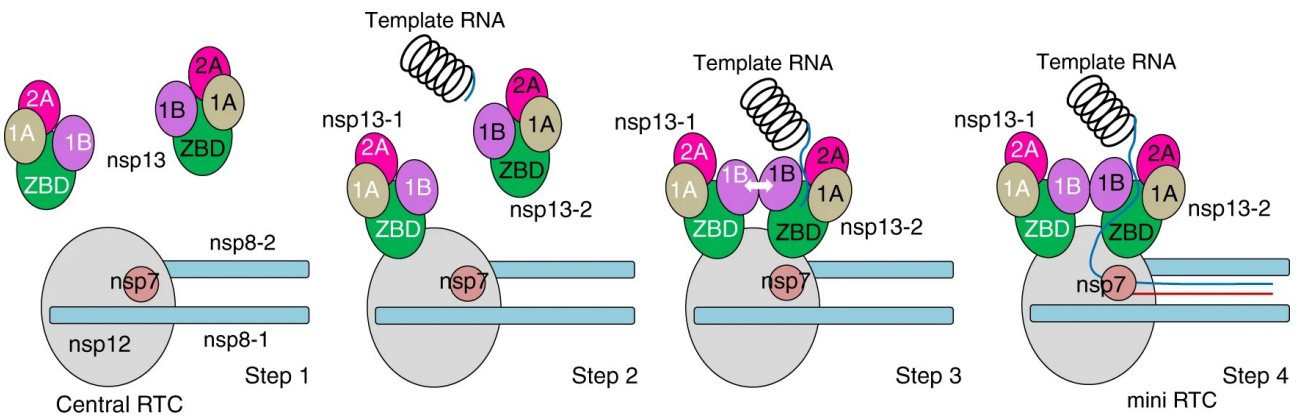
**Εικόνα 15:** Δομές λειτουργικών συμπλοκών SARS-CoV-2 RdRp.

(a) Δομή αναπαραγωγής SARS-CoV-2 RdRp με δεσμευμένο RNA (PDB 6YYT) [ 24 •• ]. Το RNA εμφανίζεται χωρίς επιφάνεια, με τον κλώνο του προτύπου σε μπλε χρώμα και τον κλώνο του προϊόντος με κόκκινο χρώμα.

(b) Δομή SARS-CoV-2 RdRp σε σύμπλοκο με nsp13 (PDB 7CXN) [ 50 •• ]. Απεικόνιση όπως στο (a). Η Nsp13 έχει χρώμα σολομού. Υποδεικνύεται το μητρικό RNA που δεσμεύεται στην nsp13.

(c) Δομή του SARS-CoV-2 RdRp σε σύμπλοκο με nsp13 και nsp9 (PDB 7CYQ) [ 56 • ]. Απεικόνιση όπως στο (a). Η Nsp9 εμφανίζεται σε κυανό.

(d) Κλείσιμο προβολής της αλληλεπίδρασης μεταξύ της nsp9 και της περιοχής NiRAN στη δομή που φαίνεται στο (c). Οι πρωτεΐνες εμφανίζονται ως κινούμενα σχέδια και χρωματίζονται. Το N-τερματικό μοτίβο «NNE» της nsp9 και το δεσμευμένο GDP εμφανίζεται ως ραβδιά (Hillen, 2021).



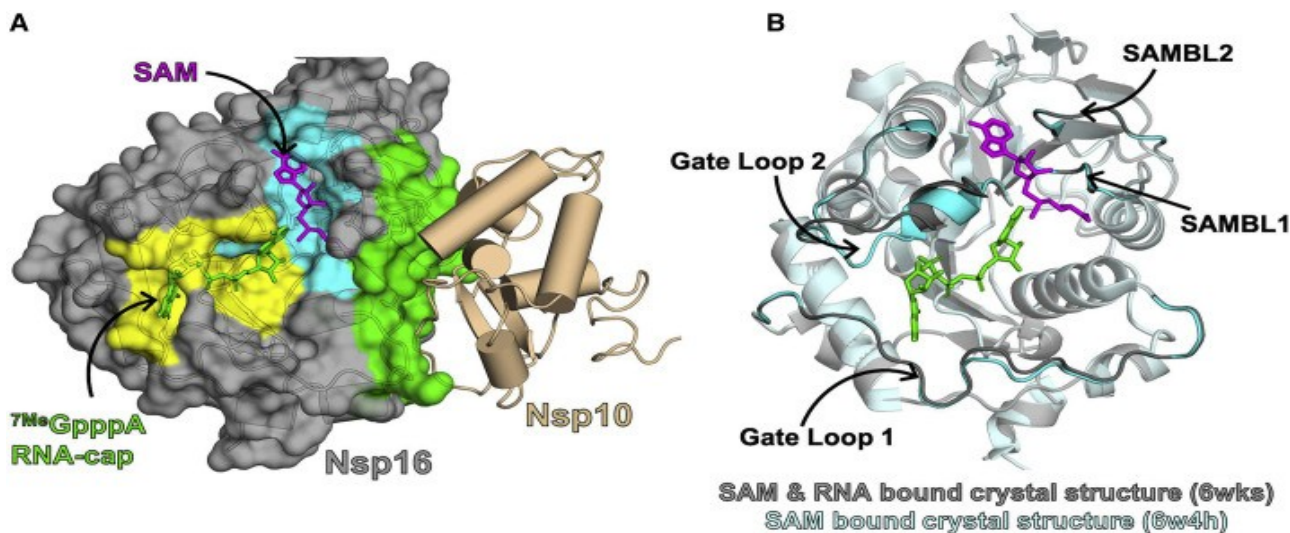
**Εικόνα 16:** Ένα προτεινόμενο μοντέλο για τη σύζευξη ελικάσης-πολυμεράσης στο σχηματισμό του SARS-CoV-2 RTC. Οι μη δομικές πρωτεΐνες Nsps που φτιάχνουν το mini RTC και το μητρικό RNA εμφανίζονται στα ακόλουθα σχήματα. Βήμα 1, η nsp12 δεσμεύεται με την nsp7 και την nsp8 αποτελώντας το κεντρικό RTC, περιμένοντας ένα μητρικό RNA για να ξετυλιχθεί (unwinding). Το μόριο nsp13 διατηρείται σε ανενεργή κατάσταση. Βήμα 2, μία nsp13 (nsp13-1) έρχεται σε επαφή με το κεντρικό RTC για να σχηματίσει μια πλατφόρμα για την πρόσληψη της nsp13-2. Βήμα 3, η nsp13-2 συναρμολογείται σε mini RTC και έρχεται σε επαφή με την nsp13-1, επιτρέποντας στο δεσμευμένο RNA να μετατοπίζεται προς (translocating towards) το κέντρο δραστηριότητας του nsp12. Βήμα 4, το μη τυλιγμένο μονόκλωνο μητρικό (template) RNA περνά μέσω του καναλιού δέσμευσης RNA της nsp13-2 και εκτείνεται στο ενεργό κέντρο nsp12 για την επακόλουθη αναδύομηνη σύνθεση RNA (subsequent nascent RNA synthesis) (Yan L., et al., 2020).

Οι κορωνοϊοί για να πραγματοποιήσουν την αντιγραφή /αναπαραγωγή τους και την ανοσοδιαφυγή τους, χρησιμοποιούν 20 με 30 πρωτεΐνες και μεταξύ αυτών, μια 2'-Ο-μεθυλοτρανσφεράση (2'-O-MTase), που αποτελείται από 2 υποομάδες, την Nsp16 και την Nsp10 και παίζει ουσιαστικό ρόλο



στην αποφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος. Η μη δομική πρωτεΐνη Nsp16 μιμείται το ανθρώπινο ομόλογό του το CMTr1 το οποίο μεθυλιώνει το ειδικό mRNA της ανθρώπινης πρωτεΐνης (νουκλεοσίδη - 2' - O - ) - μεθυλοτρανσφεράση (CMTr1), προκειμένου να βελτιώσει την αποτελεσματικότητά της μετάφρασης και να διακρίνει τον εαυτό του από το άλλο (Vithani, et al., 2021; Chen, et al., 2011). Πιο συγκεκριμένα, διευκολύνει τη μεταφορά μεθυλομάδας από τον συμπαράγοντα της S-αδενοσυλομεθειονίνης (SAM) στην 2' υδροξυριβόζη σακχάρου του ιικού mRNA (Decroly, et al., 2011; Chen, et al., 2011; Vithani, et al., 2021). Προκειμένου όμως να διατηρήσει τον ενζυμικό του ρόλο ενεργό, χρειάζεται το δεσμευτικό του συνεργάτη, την NSP10. Ο ρόλος της NSP10 είναι να προάγει την NSP16 ώστε να δεσμεύει το καλυμμένο υπόστρωμα RNA και τον δότη μεθυλίου S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνη (SAM). Η σύνδεση αυτή είναι μοναδική για τους CoV ιούς και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη αντικών φαρμάκων (Chen, et al., 2011).

Στην μελέτη της Vithani και των συνεργατών της, βρήκαν πως η Nsp10 μετατοπίζει το σύνολο διαμόρφωσης της Nsp16 για να σταθεροποιήσει πιο ανοιχτές τσέπες σύνδεσης SAM και RNA (open-binding pockets). Εντόπισαν 10 δομές που αλλάζουν από ανενεργές σε ενεργές όταν συνδέεται με την Nsp10 και παρατήρησαν ότι ο βρόγχος πύλης RNA 2 απομακρύνεται από τον βρόγχο πύλης RNA 1, δημιουργώντας μια πιο ανοιχτή τσέπη σύνδεσης RNA σε ενεργές καταστάσεις σε σύγκριση με τις ανενεργές καταστάσεις (**εικόνα 17 A**) ενώ ο βρόγχος σύνδεσης RNA 2 και ο βρόγχος δέσμευσης SAM 2 απομακρύνονται ο ένας από τον άλλο στην ενεργή κατάσταση η οποία διευρύνει την τσέπη, δημιουργώντας χώρο για την τσέπη σύνδεσης SAM. Συμπερασματικά, η Nsp10 μπορεί να ενεργοποιήσει τη Nsp16 αυξάνοντας την τάση της να σχηματίζει μια πιο ανοιχτή τσέπη σύνδεσης RNA καθώς και την τάση να είναι ανοιχτές και οι δυο τσέπες σύνδεσης SAM και RNA. Επίσης η παρουσία της Nsp10, σταθεροποιεί τις ανοιχτές δομές των θυλάκων σύνδεσης SAM και RNA και οδηγεί σε σημαντική μείωση ευκαμψίας σε σημαντικά συστατικά σύνδεσης με SAM και RNA ενώ δεν έρχεται σε άμεση επαφή μαζί τους υποδηλώνοντας μιας ισχυρής αλλοστερικής σύνδεσης. Αυτά τα ευρήματα μπορεί να βοηθήσουν στην ανάπτυξη φαρμάκων όπως φάρμακα με αναστολείς μικρών μορίων που στοχεύουν σε αυτές τις κοιλότητες σύνδεσης και κυρίως σε μια τσέπη που σχηματίζεται μεταξύ β3 και β4 (εικόνα 18) της Nsp16 που καταρρέει (collapses) την τσέπη σύνδεσης SAM όταν είναι ανοιχτή (Vithani, et al., 2021) .



**Εικόνα 17:** Τσέπες σύνδεσης υποστρώματος και διασύνδεση της Nsp10 με τη Nsp16, παρατηρούνται στην κρυσταλλική δομή του συμπλόκου Nsp16 / Nsp10. ( A ) Αναπαράσταση επιφάνειας της Nsp16 που δείχνει την τσέπη δέσμευσης SAM (κυανό), τον θύλακα δέσμευσης RNA (κίτρινο) και τη διεπαφή σύνδεσης (binding interface) της Nsp10 (πράσινο). ( B ) Επικάλυψη δομών Nsp16 από δομές του συμπλόκου Nsp16 / Nsp10 με RNA (εμφανίζεται με γκρι χρώμα) και χωρίς RNA (εμφανίζεται σε κυανό), δείχνοντας δομική ετερογένεια στη θέση σύνδεσης RNA. Επισημαίνεται ο βρόχος πύλης 1 και ο βρόχος πύλης 2 της θήκης σύνδεσης του RNA και ο βρόχος δέσμευσης SAM 1 (SAMBL1) και ο βρόχος σύνδεσης SAM 2 (SAMBL2) που ευθυγραμμίζουν την τσέπη σύνδεσης SAM (Vithani, et al., 2021).

**Εικόνα 18:** Η δέσμευση Nsp10 μετατοπίζει το σύνολο διαμόρφωσης της Nsp16, αυξάνοντας την τάση του να υιοθετεί δομικές καταστάσεις που είναι συμβατές για πρόσδεση συμπλόκου (ligand binding). ( A ) 10 δομές της Nsp16 (που αντιπροσωπεύουν την πρόβλεψη DiffNet) που αλλάζουν από ανενεργή σε ενεργή κατάσταση ( λευκό σε μωβ ). Η ετικέτα εξόδου DiffNet κλιμακώνεται από 0 έως 1 ( λευκό έως μωβ ) αντικατοπτρίζοντας την έκταση που το DiffNet προβλέπει ότι μια δομή θα συσχετιστεί με την ενεργοποίηση της Nsp16. ( B ) Σύγκριση των προβλεπόμενων DiffNet ενεργών και ανενεργών καταστάσεων (μωβ συν λευκό, αντίστοιχα) με την αρχική κατάσταση προσομοίωσης ( κίτρινη ), μια γνωστή SAM- και RNA-δεσμευμένη δομική κατάσταση (πορτοκαλί), και μια γνωστή SAM- (αλλά όχι RNA-) δεσμευμένη κατάσταση (γαλαζοπράσινο). Όλες οι δομές είναι ευθυγραμμισμένες με 6wks (πορτοκαλί) ( Vithani, et al., 2021) .

**Εικόνα 19:**

Κρυφό άνοιγμα τσέπης σε SARS-CoV-2 Nsp16. ( A ) Διαρθρωτικές καταστάσεις με την κρυφή τσέπη κλειστή και ανοιχτή. Τα ένθετα δείχνουν την επιφανειακή όψη της κλειστής και ανοιχτής τσέπης. Τα κατάλοιπα που εκτίθενται κατά το άνοιγμα της τσέπης εμφανίζονται με κυανό και οι περιοχές που υποβάλλονται στην κίνηση ανοίγματος εμφανίζονται με μπλε χρώμα. Η κατάρρευση της τσέπης σύνδεσης SAM μετρίεται ως η απόσταση μεταξύ SAMBL2 και βρόχου πύλης 2, που εμφανίζεται με κίτρινο χρώμα. (Vithani et al., 2021)

Τέλος, θα δούμε έναν συγκεντρωτικό πίνακα των λειτουργιών των μη δομικών πρωτεϊνών

NSPS	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
<b>Nsp1</b> (απουσιάζει από γάμμα και δέλτα -κορωνοϊούς)	Αποικοδόμηση του κυτταρικού mRNA Αποκλείει τη μετάφραση των κυττάρων και την έμφυτη ανοσοαπόκριση
<b>Nsp2</b>	Συνδέεται με πρωτεΐνες ξενιστές και διαταράσσει το περιβάλλον των κυττάρων των ξενιστών. Συμμετέχει στη διακοπή της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης ξενιστή κατά τη διάρκεια μολύνσεων SARS-CoV. Η ακριβής λειτουργία παραμένει άγνωστη
<b>Nsp3</b>	Μεγάλες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με πολλαπλούς τομείς- Ubiquitin (ουβικουιτίνη) όπως ο τομέας Ub1 και ο όξινος (AC) τομέας που αλληλεπιδρά με το N τερματικό της πολυπρωτεΐνης Δραστηριότητα ADP-ριβόζης-1'-φωσφατάσης (ADRP) που προάγει την έκφραση κυτοκινών Τομέας PLpro / deubiquitinase που σχετίζεται με την αποκοπή της ιικής πολυπρωτεΐνης και τον αποκλεισμό της έμφυτης ανοσοαπόκρισης του ξενιστή Τομείς με άγνωστες λειτουργίες - Ubiquitin όπως η περιοχή 2 Ub12, περιοχή δεσμευτικού νουκλεϊκού οξέος NAB, SARS περιοχή SUD και περιοχή Y, με άγνωστη λειτουργία
Nsp4	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη υπεύθυνη για το σχηματισμό κυστιδίων διπλής μεμβράνης
Nsp5	3CLpro / Κύρια ιική πρωτεάση υπεύθυνη για τη διάσπαση της ιικής πολυπρωτεΐνης
Nsp6	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη
Nsp7	Συμμετέχει στο σχηματισμό εξαδεκαμερών nsp7-nsp8 για να βοηθήσει την παραγωγικότητα RdRp
Nsp8	Ο σχηματισμός Hexadecamer μαζί με τη Nsp7, χρησιμεύει ως πιθανό ένζυμο πριμάσης (primase)
Nsp9	Μονόκλωνη υπομονάδα δέσμευσης RNA
Nsp10	Ενεργοποιεί την Nsp16
Nsp12	Βρίσκεται στο κέντρο του RdRp
Nsp13	Ελικάση, παθογένεση του ήπατος μαζί με Nsp1 και πρωτεΐνη μεμβράνης (M), δραστηριότητα RNA 5'-τριφωσφατάσης που σχετίζεται με ιική επίστρωση RNA (capping)

Nsp14	<p>Δυσλειτουργικό ένζυμο:</p> <p>Δραστηριότητα 3'-5' εξορριβονουκλεάσης (ExoN)</p> <p>Γουανίνη-N7- μεθυλτρανσφεράση (δραστηριότητες N7-MTase) για κάλυψη ιικού m-RNA</p>
Nsp15	<p>Ιική ενδονουκλεάση</p> <p>Αποφυγή/διαφυγή αισθητήρων dsRNA ξενιστή σε μακροφάγους</p>
Nsp16	<p>Δραστηριότητα νουκλεοσιδίου-2'Ο-μεθυλοτρανσφεράσης για ανοσοδιαφυγή.</p>

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2 :** Συγκεντρωτικός πίνακας NSPs ΠΗΓΗ: (Sahu, et al., 2021).

### 3.3 Δομικές πρωτεΐνες sars-cov-2

Όπως αναφέραμε, κοντά στο 3' άκρο του mRNA στο γονιδίωμα του SARS-CoV-2 βρίσκονται οι δομικές πρωτεΐνες του. Το γονιδίωμα των κορωνοϊών κωδικοποιεί τέσσερις κύριες δομικές πρωτεΐνες: την πρωτεΐνη ακίδα (spike) (S), την πρωτεΐνη-νουκλεοκασιδίου (N), την πρωτεΐνη μεμβράνης (M) και την πρωτεΐνη φακέλου (E), καθεμία από τις οποίες παίζει πρωταρχικούς ρόλους στη δομή του σωματίδιο του ιού καθώς και σε άλλες πτυχές του κύκλου αναπαραγωγής του ιού, για αυτό καλύτερα ας εξετάσουμε πιο ειδικά αυτές τις πρωτεΐνες του SARS-CoV-2.

#### 3.3.1 Πρωτεΐνη ακίδα (s) spike - SARS-CoV-2

Η ακίδα (S) πρωτεΐνη του SARS-CoV-2 είναι μία διαμεμβρανική ομοτριμερής (trans membrane homotrimeric) γλυκοπρωτεΐνη ~180 kDa ανήκοντας στην κατηγορία I των τριμερών πρωτεϊνών σύντηξης (trimeric fusion proteins) που βρίσκονται και σε άλλους ιούς όπως ο MERS-CoV και ο SARS-CoV. Η N τελική περιοχή της μεμβράνης βλέπει στον εξωκυτταρικό χώρο, που συγκρατείται στην ιική μεμβράνη μέσω του διαμεμβρανικού πεδίου της, ενώ το κοντό τμήμα η C-τελική περιοχή βλέπει στον ενδοκυτταρικό χώρο. Η εξωκυτταρική περιοχή της χωρίζεται σε δύο υπομονάδες (subunit), την υπομονάδα S1, που φιλοξενεί ένα μοτίβο αναγνώρισης ACE2 ανά μονομερές (το πεδίο δέσμευσης υποδοχέα, RBD), και την υπομονάδα S2 που απαιτείται για τη σύντηξη (fusion) των ιογενών και κυτταρικών μεμβρανών αλλά αφού υποβληθεί σε επεξεργασία από μία πρωτεάση του κυττάρου-ξενιστή σε μια πολυβασική θέση (polybasic cleavage site) διάσπασης (με ένθεση/εισαγωγή τεσσάρων υπολειμμάτων αμινοξέων, RRAR, στις θέσεις 681–684) και που φιλοξενεί πολλά υπολείμματα αργινίνης και βρίσκεται στο όριο μεταξύ της υπομονάδας S1 και S2 (Naujokat & Sternberg, 2020). Οπτικά, τα τριμερή πρωτεΐνης S σχηματίζουν ένα

χαρακτηριστικό βολβοειδές φωτοστέφανο που περιβάλλει το ικό σωματίδιο (Tang, et al., 2020). Η πολυβασική θέση διάσπασης του S μπορεί να συμβάλει στην υψηλή μολυσματικότητα του SARS-CoV-2, επειδή όμως οι φουρίνες και οι πρωτεάσες (που φέρονται σαν φουρίνες) που απαιτούνται για την πρωτεολυτική ενεργοποίηση της S εκφράζονται παντού στους ανθρώπους και παρέχει ένα εκτεταμένο τροπισμό (Hoffmann, et al., 2020).

Γενικά οι CoV έχουν την υπομονάδα S1, που περιέχει δύο υποπεριοχές, την N-τελική περιοχή (NTD) και την C-τελική περιοχή (CTD). Τόσο ο SARS-CoV όσο και ο SARS-CoV-2 χρησιμοποιούν την CTD για να δεσμεύσουν το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2) για την πρόσδεσή του ιού με το κύτταρο, πράγμα που θα ασχοληθούμε πιο διεξοδικά σε επόμενη ενότητα. Ένας ή και οι δύο υποπεριοχές μπορούν να χρησιμεύσουν ως περιοχή δέσμησης υποδοχέα (RBD). Το κομμάτι της RBD που έρχεται σε άμεση επαφή με τον υποδοχέα ονομάζεται μοτίβο δέσμησης υποδοχέα (RBM). Ένας γενικός κανόνας είναι ότι η NTD μεσολαβεί στη δέσμηση του ιού σε υποδοχείς με βάση το σάκχαρο, ενώ η CTD μεσολαβεί στη δέσμηση με υποδοχέα με βάση πρωτεΐνες, αν και υπάρχουν εξαιρέσεις, για παράδειγμα, ο ιός της ηπατίτιδας ποντικού NTD αναγνωρίζει το πρωτεϊνούχο CEACAM1 ως υποδοχέα του (Peng, et al., 2011). Η ομοιότητα αλληλουχίας των αμινοξέων στην RBM περιοχή μεταξύ των SARS-CoV και SARS-CoV-2 είναι περίπου ~ 50% (Yan R, et al., 2020). Ο SARS-CoV-2 S δεσμεύει το ένζυμο ACE2 με 10 έως 20 φορές υψηλότερη συγγένεια από τον SARS-CoV S (Wrapp, et al., 2020).

Η πρωτεΐνη S είναι πυκνά διακοσμημένη με γλυκάνες που προεξέχουν από την επιφάνεια της και οι οποίες επηρεάζουν την αναδίπλωση της πρωτεΐνης S, την αλληλεπίδραση με τις πρωτεάσες των κυττάρων ξενιστών και την πρόκληση της χυμικής ανοσοαπόκρισης. Στην υπομονάδα S2 οι γλυκάνες είναι 9 σε αριθμό. Και οι 9 N-συνδεδεμένες γλυκάνες που προεξέχουν από την επιφάνεια της S2 (**Σχ. 20A, δεξιά, Σχ. 20B, δεξιά**) διατηρούνται μεταξύ των SARS-CoV και SARS-CoV-2. Οι N-συνδεδεμένες αλληλουχίες γλυκοσυλίνωσης στο S2 είναι ως επί το πλείστον διατηρημένες στις γλυκοπρωτεΐνες ιών που σχετίζονται με SARS-CoV, υποδηλώνοντας ότι αυτές οι δομές της S2 παρεμβαίνουν στην πρόκληση εξουδετερωτικών αντισωμάτων και προάγουν την ανοσοδιαφυγή (Naujokat & Sternberg, 2020).

Σε μελέτη που έγινε πάνω σε 5 σημαντικές παραλλαγές D614G, Cluster 5, VOC 202012/01, 501Y.V2 και P.1 πάνω στην N-τελική περιοχή της πρωτεΐνης S αναζητήθηκε ο αντίκτυπος που έχουν πάνω στην μετάδοση και την παθογένεια του ιού καθώς και της αποτελεσματικότητας σε κάποιο εμβόλιο (Guo, et al., 2021). Στην παραλλαγή D614G έχουμε αντικατάσταση του ασπαρτικού οξέος από μια γλυκίνη στην θέση 614 της ακίδας η οποία βοηθά τα ιικά σωματίδια να διεισδύσουν στα κύτταρα. Οι ασθενείς με αυτήν την παραλλαγή εμφάνιζαν υψηλότερο ιικό φορτίο στην άνω αναπνευστική οδό από τον αρχικό ιό (Redondo, et al., 2020). Επίσης εμφανίζει

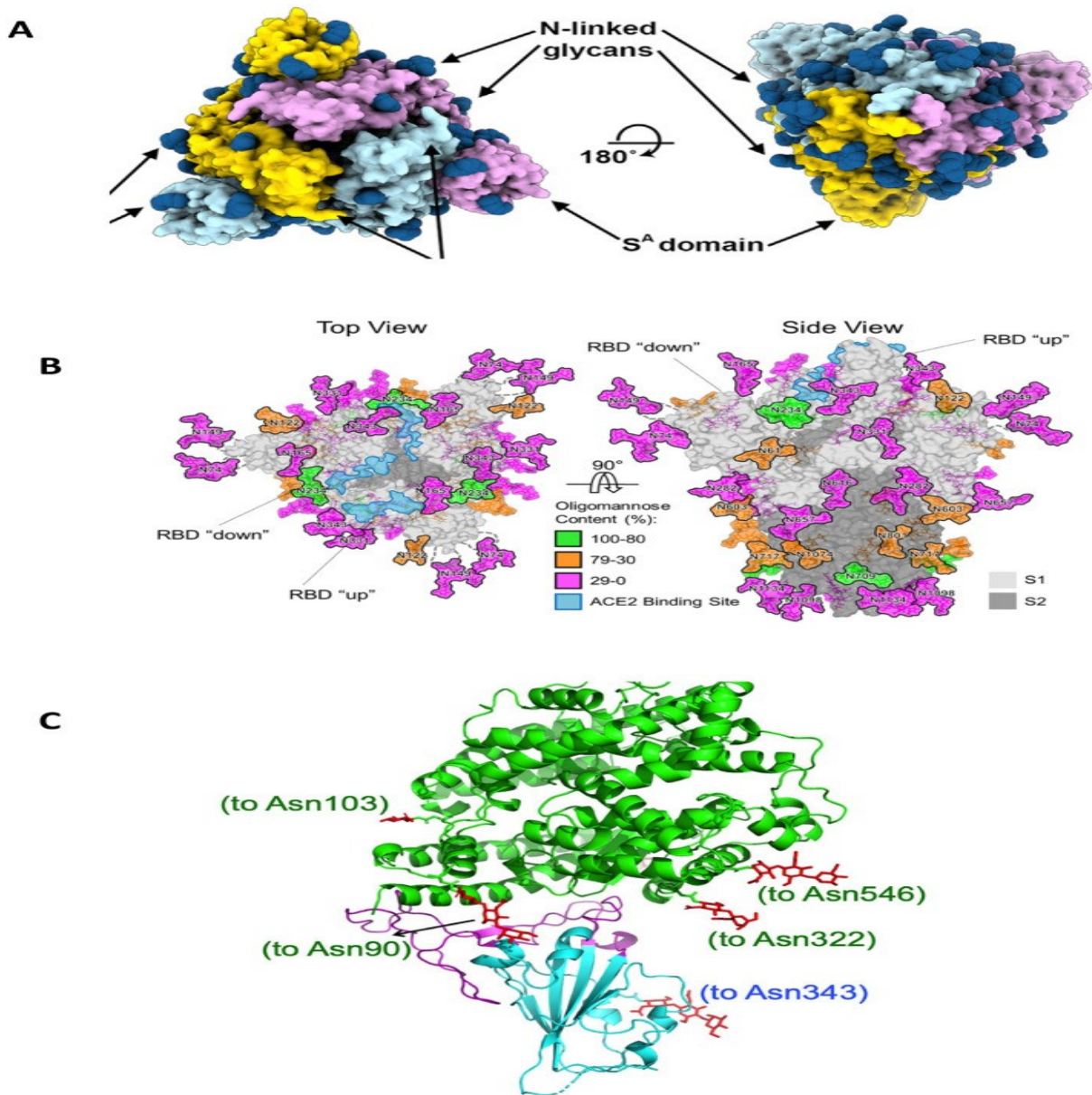
βελτιωμένες ικανότητες για λοίμωξη και μεταδοτικότητα (Korber, et al., 2020) και συσχετίζεται με νεότερης ηλικίας λοίμωξη χωρίς αυξημένη θνησιμότητα. Θεωρείται ότι δεν θέτει σε κίνδυνο την αποτελεσματικότητα των εμβολίων (Guo, et al., 2021).

Για την παραλλαγή του συμπλόκου 5 (Cluster 5) έχουμε 5 μεταλλάξεις στην ακίδα συμπεριλαμβανομένων των Y453F, διαγραφή H69 / V70 (ΔH69 / ΔV70), I692V, S1147L και M1229I (Guo, et al., 2021). Η μετάλλαξη Y453F εντοπίζεται στην RBD που έρχεται σε άμεση επαφή με το ACE2 στο αμινοξύ 34 (Wang, et al., 2020). Η μετάλλαξη I692V εμφανίζεται επτά αμινοξέα μετά (downstream) της θέσης διάσπασης της φουρίνης, ενώ τα S1147L και M1229I εντοπίζονται στην υπομονάδα S2, και οι μεταλλάξεις των ΔH69 / ΔV70 και Y453F βρέθηκαν επίσης σε πολλές άλλες παραλλαγές που σχετίζονται στενά με το σύμπλοκο 5 με υψηλή συχνότητα. Η ανοσογονικότητα της παραλλαγής συμπλόκου 5 σχετίζεται με μια μειωμένη αναγνώριση του ιού από αντισώματα που αποκτήθηκαν από λοίμωξη ή εμβολιασμό SARS-CoV-2 (Guo, et al., 2021).

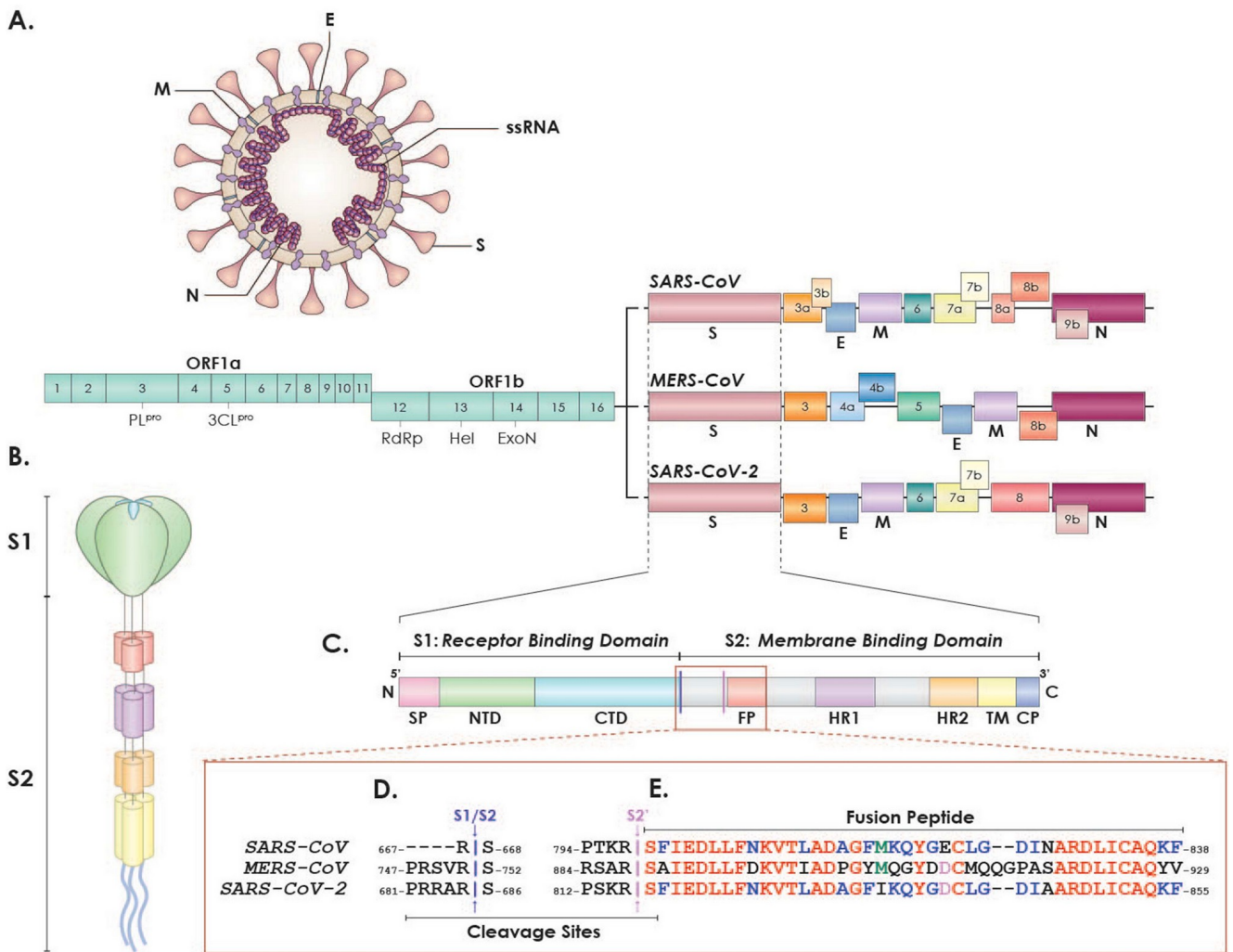
Το στέλεχος Variant of Concern (VOC) 202012/01 (ονομάστηκε επίσης ως B.1.1.7 ή 20I / 501Y.V1), φέρει 17 μεταλλάξεις και 8 από αυτές βρίσκονται στην ακίδα (6 υποκατάστατα/substitutes και 2 διαγραφές στην πρωτεΐνη S, 4 μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη ORF1ab, 3 μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη ORF8 και 2 μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη N ) (Leung, et al., 2021). Το μεταλλαγμένο N501Y έχει δείξει σημαντική αύξηση στη συγγένεια δέσμευσης με ACE2. Η μετάλλαξη του ΔH69 / ΔV70 φαίνεται απίθανο να αυξήσει τον κίνδυνο διαφυγής του ιού από εξουδετερωτικά αντισώματα (Guo, et al., 2021) (Kemp, et al., 2021). Η λειτουργία της μετάλλαξης του P681H είναι ασαφής, αλλά εντοπίζεται κοντά στη θέση διάσπασης της φουρίνης η οποία είναι σημαντική για την καταχώριση SARS-CoV-2 (Davies, et al., 2021). Το VOC 202012/01 βρέθηκε ότι είναι 56% πιο μεταδοτικό από άλλες παραλλαγές του SARS-CoV-2 (Davies, et al., 2021) και δεν φαίνεται να θέτει σε κίνδυνο την εξουδετέρωση των αντισωμάτων που αναπτύχθηκαν από προηγούμενη μόλυνση ή εμβολιασμό (Shen, et al., 2021).

Το 501Y.V2 (ονομάζεται επίσης και B.1.351 ή 20H / 501Y.V2) είναι ένα άλλο εξαιρετικά μεταδοτικό στέλεχος του SARS-CoV-2. Η παραλλαγή 501Y.V2 χαρακτηρίζεται από μεταφορά εννέα μεταλλάξεων σε πρωτεΐνες S (L18F, D80A, D215G, R246I, Δ242-244, K417N, E484K, N501Y, A701V), τρία από τα οποία (K417N, E484K και N501Y) εντοπίζονται στην RBD της πρωτεΐνης S. Οι μεταλλάξεις τόσο των N501Y όσο και E484K εντοπίζονται στο μοτίβο δέσμευσης υποδοχέα (RBM) στην RBD περιοχή. Η μετάλλαξη K417 εντοπίζεται εκτός της RBM. Σχηματίζει μια αλληλεπίδραση γέφυρας αλατιού με το N30 του ACE2. Φαίνεται να έχει αυξημένη μεταδοτικότητα (Guo, et al., 2021). Η μετάλλαξη στο σημείο 484 φαίνεται να μειώνει σημαντικά την εξουδετέρωση από αρκετά μονόκλωνα αντισώματα και ορούς (Weisblum, et al., 2020; Guo, et

al., 2021). Πολλές από αυτές τις παραλλαγές πρέπει να διερευνηθούν όσον αφορά την προστασία που προσφέρουν τα υπάρχοντα εμβόλια και κυρίως η 501Y.V2 (Guo, et al., 2021).

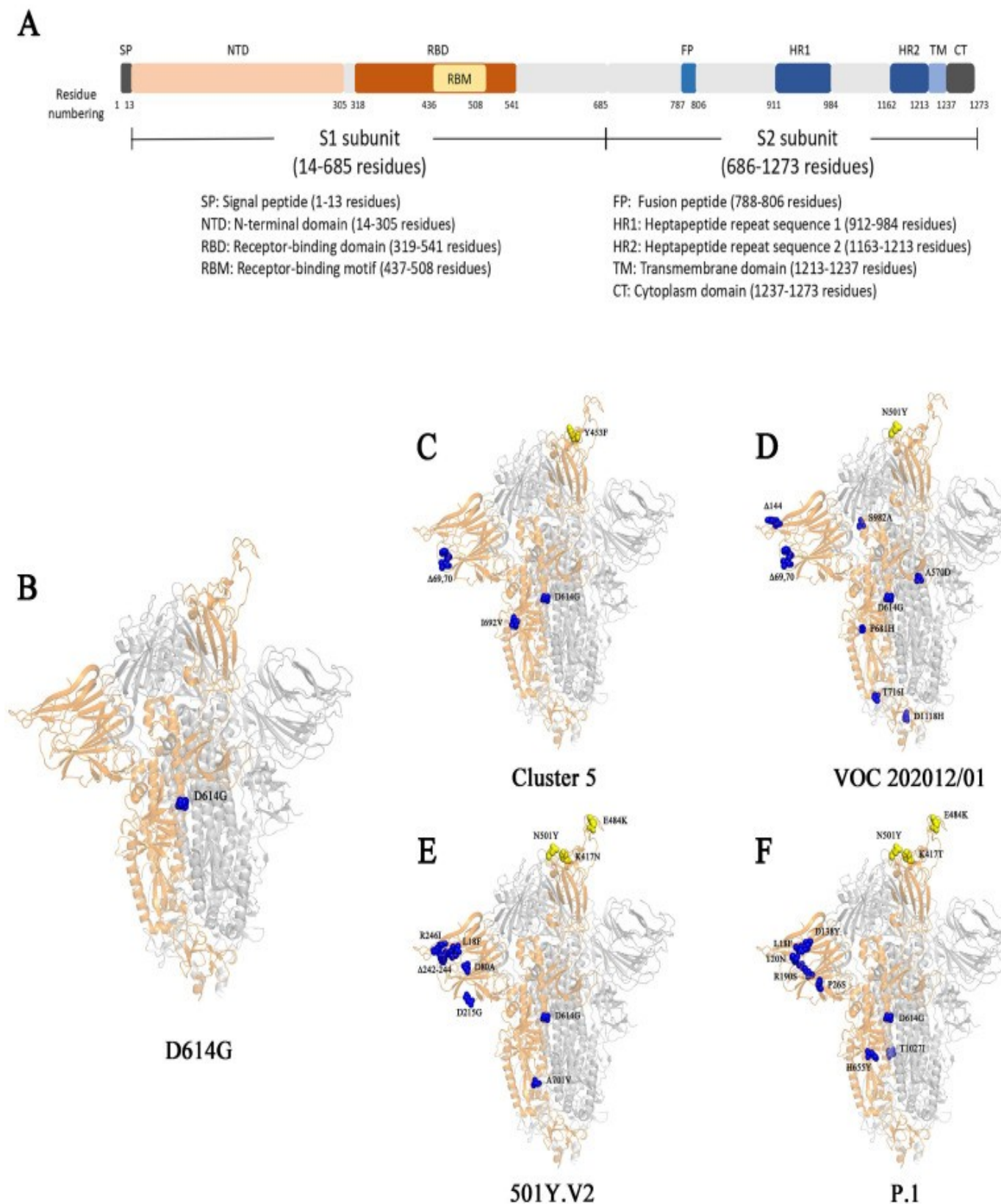


**Εικόνα 20:** N-συνδεδεμένη γλυκοζυλίωση του S, και η RBD του S δέσμευση στο ACE2. (Α) αριστερά: κάτοψη του S1 ομοτριμερές, με N-συνδεδεμένες γλυκάνες ως σκούρες μπλε σφαίρες. (Α) δεξιά: κάτω όψη του S2 ομοτριμερές (homotrimer), με N-συνδεδεμένες γλυκάνες ως σκούρες μπλε σφαίρες. (Β) Αριστερά: κάτοψη του S1 ομοτριμερές, με N-συνδεδεμένες γλυκάνες χρωματισμένες σύμφωνα με την περιεκτικότητά τους σε ολιγομαννόζη (πράσινο έως ροζ), με τη θέση σύνδεσης ACE2 σε γαλάζιο. (Β) Δεξιά: πλάγια όψη του S ομοτριμερές (homotrimer), με N-συνδεδεμένες γλυκάνες χρωματισμένες σύμφωνα με την περιεκτικότητά τους σε ολιγομαννόζη (πράσινο έως ροζ), με τη θέση δέσμευσης ACE2 σε γαλάζιο, και το S1 (ανοιχτό γκρι) και S2 (σκούρο γκρι υπομονάδες. (Γ) Η RBD περιοχή (ανοιχτό μπλε), με το στριφογυριστό πεντακλωνικό αντιπαράλληλο φύλλο β των κλώνων β1, β2, β3, β4 και β7, συνδέεται στην κάτω πλευρά του μικρού λοβού του ACE2 (πράσινες έλικες) (Naujokat & Sternberg, 2020).



**Εικόνα 21:** Πρωτεΐνη ακίδα S: A) Σχήμα ιού CoV με το γονιδίωμα του από κάτω. Οι CoV έχουν ένα περίβλημα λιπιδίων με τρεις δομικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες: ακίδα (S), μεμβράνη (M) και περίβλημα- φάκελος (E). Το εσωτερικό του ιού περιέχει το ιικό γονιδίωμα που εγκλείεται από την πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου (N). Το CoV μονόκλωνο γονιδίωμα κωδικοποιεί 16 μη δομικές πρωτεΐνες, όπως η πρωτεάση που μοιάζει με παπαΐνη (PL<sub>pro</sub>), 3C-like πρωτεάση (3CL<sub>pro</sub>), RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp), ελικάση (Hel) και εξωνουκλεάση (ExoN). Τα υπογονιδιωμικά RNA κωδικοποιούν τέσσερις δομικές πρωτεΐνες: ακίδα (S; σκούρο ροζ), φάκελο (E; σκούρο μπλε), μεμβράνη (M; μωβ) και νουκλεοκαψιδίου (N) και έναν αριθμό βοηθητικών πρωτεϊνών (Emmie de Wit, 2016) (Tang, Bidon, Jaimes, Whittaker, & Daniel, 2020). B) Σχήμα της τριμερούς πρωτεΐνης CoV S. Γ) Το γονίδιο CoV S που δηλώνει τα λειτουργικά συστατικά της πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη CoV S αποτελείται από τις δύο υπομονάδες: S1 και S2, που περιλαμβάνουν τα κύρια λειτουργικά συστατικά: SP (πεπτίδιο σήματος, ροζ). NTD (N-τελική περιοχή, πράσινο), CTD (C-τελική περιοχή, ανοιχτό μπλε), FP (πεπτίδιο σύντηξης, κόκκινο), HR1 (περιοχή 1 επαναλήψεων επτάδων, μωβ), HR2 (περιοχή 2 επαναλήψεων επτάδων, πορτοκαλί), TM (διαμεμβρανική περιοχή, κίτρινο) και CP (κυττοπλασματική περιοχή, σκούρο μπλε). Η πρωτεΐνη S έχει δύο θέσεις διάσπασης (cleavage sites) που υποδηλώνονται με σκούρα μωβ (S1 / S2) και ροζ (S2') βέλη. Δ) Ευθυγράμμιση αλληλουχίας της θέσης διάσπασης S1 / S2 (σκούρο μωβ βέλος) και της θέσης διάσπασης S2 (ροζ) μεταξύ MERS-CoV, SARS-CoV και SARS-CoV-2. E) Μέσα στο γονιδίωμα, το πεπτίδιο σύντηξης επισημαίνεται, υποδηλώνοντας τις αλληλουχίες από MERS-CoV FP και SARS-CoV FP. Το κόκκινο δηλώνει τα συντηρημένα κατάλοιπα μεταξύ των αλληλουχιών MERS-CoV, SARS-CoV και SARS-CoV-2 FP. Το μπλε υποδηλώνει τα συντηρημένα κατάλοιπα SARS-CoV και SARS-CoV-2 FP. Το πράσινο δηλώνει τα συντηρημένα κατάλοιπα SARS-CoV και MERS-CoV FP και το μωβ δηλώνει τα συντηρημένα κατάλοιπα MERS-CoV και SARS-CoV-2. Η αλληλουχία πεπτιδίων σύντηξης του SARS-CoV-2 προσδιορίστηκε εκτελώντας μια ζεύγη ευθυγράμμισης με το MUSCLE μέσω του Geneious (έκδοση 2020.0.5). Η αλληλουχία αμινοξέων των ακίδων πρωτεϊνών ελήφθη από την NCBI Genbank με βάση τα ακόλουθα: SARS-CoV-2 (MN908947.3), MERS-CoV (AFS88936.1), SARS-CoV (AAP13441.1) (Tang, et al., 2020).





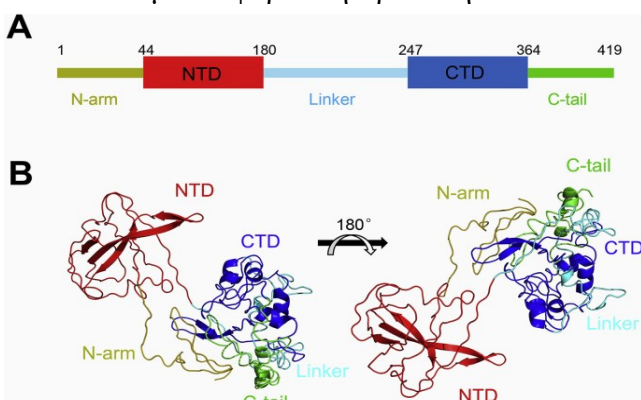
**Εικόνα 22 :** Η πρωτεΐνη S και οι μεταλλάξεις της σε διαφορετικές γενετικές παραλλαγές . (A) Το σχηματικό διάγραμμα διαφορετικών περιοχών στην πρωτεΐνη S. (B-F) Η δομική επίδειξη μεταλλάξεων σε S πρωτεΐνη (PBD: 6zgg) στη γενετική παραλλαγή D614G (B), (Cluster) Σύμπλοκο 5 (C), VOC202012 / 01 (D), 501Y.V2 (E) και P.1 ( ΦΑ). Η πορτοκαλί δομή δείχνει το μονομερές της ακίδας πρωτεΐνη, οι κίτρινες σφαίρες αντιπροσωπεύουν τις μεταλλάξεις στο RBD. Οι μπλε σφαίρες αντιπροσωπεύουν τις μεταλλάξεις εκτός της RBD (Guo, et al., 2021).

### 3.3.2 Πρωτεΐνη νουκλεοκαψίδιο (N) Nucleocapsid- SARS-CoV-2

Η πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου (N) του SARS-CoV-2 έχει μήκος 419 αμινοξέων με μοριακή μάζα 45,6 kDalton. Αυτή η πρωτεΐνη N έχει δύο μεγάλες ενδογενώς διαταραγμένες περιοχές (IDRs) στις τελικές περιοχές N και C και κυμαίνονται από 1 έως 41 και 366 έως 419 κατάλοιπα αντίστοιχα. Η πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου (N) του SARS-CoV-2 είναι το στενό ομόλογο της πρωτεΐνης N του BtCoV- RatG12 και SARS CoV (SARS CoV) με 99% και 90% ακολουθία ταυτότητας και 99% με 94% ακολουθία ομοιότητας, αντίστοιχα (Kumar, et al., 2020). Είναι μια εξαιρετικά ανοσογονική και άφθονα εκφρασμένη πρωτεΐνη κατά τη μόλυνση και χρησιμοποιείται συχνά στην ανάπτυξη εμβολίων και σε ορολογικές δοκιμασίες. Είναι άφθονη στους ιούς. Επιτελεί κυρίως 3 λειτουργίες, βοηθά στην είσοδο στο κύτταρο του ξενιστή, στη σύνδεση με το ιικό γονιδίωμα RNA και σχηματίζει τον πυρήνα ριβονουκλεοπρωτεΐνης (Zeng, et al., 2020).

Μετά τη μόλυνση του οργανισμού, η πρωτεΐνη N εισέρχεται στο κύτταρο ξενιστή μαζί με το ιικό RNA για να διευκολύνει τον αναδιπλασιασμό του και να επεξεργαστεί τη συγκρότηση σωματιδίων ιού και τέλος να το απελευθερώσει από το κύτταρο (Zeng, et al., 2020). Υπάρχουν τρεις διατηρημένες περιοχές στην πρωτεϊνική αρχιτεκτονική του κορωνοϊού της πρωτεΐνη N, δηλαδή μία N-τελική περιοχή δέσμησης (NTD), μία C-τελική περιοχή διμερισμού (CTD) και μια εγγενώς άτακτη (disordered) πλούσια σε σερίνη / αργινίνη { Ser-Arg (SR) } περιοχή σύνδεσης (linker region) (Kumar, et al., 2020). Λόγω των θετικών αμινοξέων, οι N-NTD και N-CTD έχουν αναφερθεί ότι δεσμεύονται με το ιικό RNA γονιδίωμα δηλαδή οι φορτισμένες αυτές περιοχές μπορεί να διευκολύνουν τη σύνδεση με τα νουκλεϊκά οξέα. Το LKR είναι η ικανότητα βελτίωσης του ολιγομερισμού. Επίσης αυτή η άτακτη περιοχή μπορεί να διευκολύνει την πρωτεΐνη να συνδέεται παροδικά με διαφορετικούς συνεργάτες (partners) και να διατηρεί τη σωστή διαμόρφωση της πρωτεΐνης N (Zeng, et al., 2020). Το μοντέλο της δομής της πλήρους μήκους N πρωτεΐνης από SARS-CoV-2, αποτελείται από οκτώ έλικες, (a-helices) δηλαδή από helica 1 ως helica 8, δέκα h-έλικες σχεδιασμένες ως έλικες h1 έως έλικες h10 και εννέα b-φύλλα (από φύλλο b1 ως φύλλο b9) (Kumar, et al., 2020). Και οι δύο NTD και CTD της SARS-CoV-2 πρωτεΐνης N είναι πλούσιες σε β-κλώνους, ενώ η CTD έχει μερικές μικρές έλικες (Zeng, et al., 2020).

Η μέθοδος Western Blotting και Dot Blotting έδειξε την παρουσία αντισωμάτων IgG, IgA και IgM έναντι της πρωτεΐνης N που ανιχνεύθηκαν στην ομάδα ορού των επιβεβαιωμένων COVID-19 ασθενών με διαφορετική αραιώση. Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαίωσε περαιτέρω ότι η πρωτεΐνη N



είναι ένα ισχυρό αντιγόνο για την ανοσία του ξενιστή και για τη διάγνωση της νόσου (Zeng, et al., 2020).

**Εικόνα 23:** Δομική οργάνωση πρωτεΐνης SARS-CoV-2 N και ευθυγράμμιση αλληλουχίας.

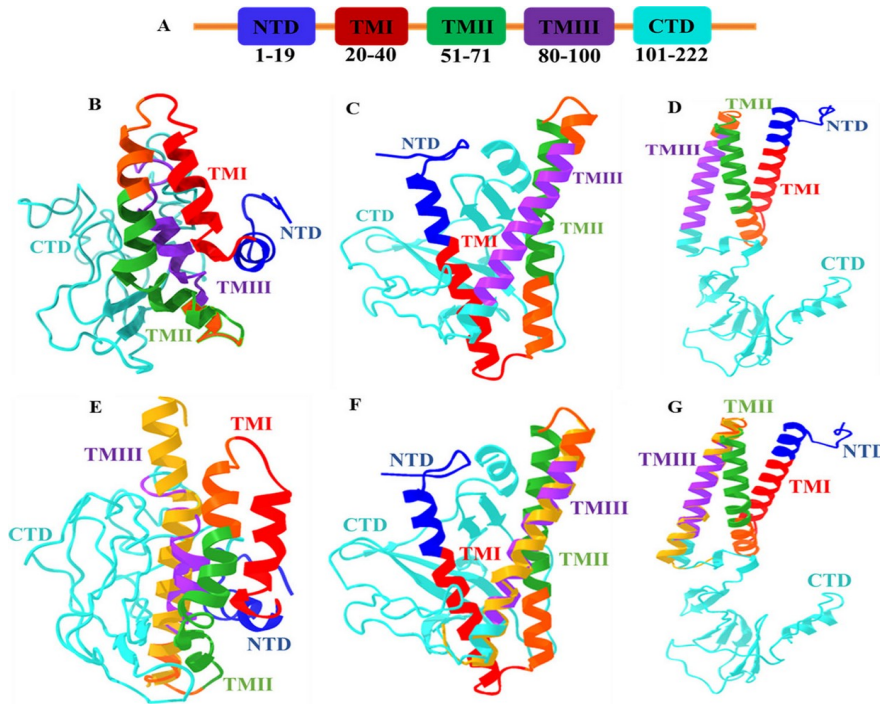
(A) Δομή τομέα της πρωτεΐνης SARS-CoV-2 N. Τα όρια του τομέα εμφανίστηκαν στην κορυφή και οι διαφορετικές επικράτειες επισημάνθηκαν σε διαφορετικά χρώματα.

(B) Παρουσιάστηκε η προβλεπόμενη δομή της πρωτεΐνης SARS-CoV-2N. Τα NTD και CTD επισημάνθηκαν με κόκκινο και μπλε χρώμα αντίστοιχα (Zeng, et al., 2020).

### 3.3.3 Πρωτεΐνη Μεμβράνη (M) Membrane -SARS-CoV-2

Η πρωτεΐνη M (μεμβράνη) γνωστή ως γλυκοπρωτεΐνη μεμβράνης E1 ή πρωτεΐνη Matrix, είναι η πιο άφθονη στο ιικό σωματίδιο, αποτελώντας ένα από τα βασικά συστατικά της ιογενούς συναρμολόγησης και μορφογένεσης. Εμπλέκεται στη ρύθμιση της αντιγραφής και της συσκευασίας του γονιδιωματικού RNA σε ιικά σωματίδια (Hu, et al., 2016). Έχει υποστηριχθεί ότι η πρωτεΐνη M σχετίζεται με ιική μολυσματικότητα μέσω της σύνδεσης της με την πρωτεΐνη S και τους υποδοχείς της επιφάνειας του ξενιστή, προάγοντας έτσι τη σύντηξη των μεμβρανών. Αλλά και η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών M-S βοηθά στην ενσωμάτωση της πρωτεΐνης S στο κύτταρο και φαίνεται ότι αυτές οι κρίσιμες αλληλεπιδράσεις μπορούν να διευκολύνουν τη μετάδοση ιών. Επιπλέον η πρωτεΐνη M, όπως και άλλες ιικές πρωτεΐνες, εμφανίζει αυτοσύνδεση καθώς και αλληλεπίδραση με άλλες βοηθητικές και μη δομικές πρωτεΐνες. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία και τροποποίηση των ιογενών δομικών πρωτεϊνών για τη συναρμολόγηση και την έξοδο των σωματιδίων του ιού (Li et al., 2020). Επίσης έχει υψηλή περιεκτικότητά σε G-C (44,5%) που οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο υψηλό κλάσμα των υδρόφοβων αμινοξέων (Hu, et al., 2016).

Οι πρωτεΐνες M των CoV διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την περιεκτικότητά τους σε αμινοξέα, αλλά έχουν τα ίδια βασικά δομικά χαρακτηριστικά. Σύμφωνα με την έρευνα της Mahtarin και των συνεργατών της, η αλληλουχία της M πρωτεΐνης του SARS-CoV-2 σε σύγκριση με την αλληλουχία πρωτεΐνης SARS-CoV έδειξε ομοιότητες ακολουθίας περίπου 96.40%. Παρατηρήθηκε ότι υπήρχαν 20 αναντιστοιχίες και 1 (gap) κενό στην πρωτεΐνη SARS-CoV-2M σε σύγκριση με τον ιό SARS-CoV και πολύ πιθανόν να παίζουν κρίσιμο ρόλο στην μολυσματικότητα. Περαιτέρω, οι περιοχές πεδίου (domain regions) της πρωτεΐνης SARS-CoV-2 M παρουσιάζονται στη παρακάτω εικόνα, όπου η N-τελική περιοχή περιέχει (1–19) αμινοξέα, τρεις διακριτές διαμεμβρανικές περιοχές (TMI, TMII, TMIII) που καταλαμβάνουν περιοχές μεταξύ (20–100) αμινοξέων και η C-τελική περιοχή βρίσκεται εντός (101–222) αμινοξέων (Mahtarin, et al., 2020).



*Εικόνα 24: (α) Οργάνωση τομέα της πρωτεΐνης SARS-CoV-2 M. Κάθε περιοχή επισημαίνεται με αντίστοιχα αμινοξέα, η N-τελική περιοχή βρίσκεται στο εξωτερικό χώρο ενώ η C-τελική περιοχή στο εσωτερικό του σωματιδίου του ιού και η περιοχή TM είναι ενσωματωμένη στη μεμβράνη. Μοντέλο δομών πρωτεϊνών M (πλήρους μήκους) από (b) I-TASSER, (c) Robetta και (d) διακομιστές μοντελοποίησης trRosetta. Δομική σύγκριση των πρωτεϊνών του μοντέλου M μεταξύ (e) I-TASSER, (f) Robetta και (g) trRosetta με το μοντέλο του μοντέλου TM (χρυσό) που λαμβάνεται από το SWISS-MODEL (Mahtarin, et al., 2020).*

Ανέλυσαν επίσης τις φυσικοχημικές παραμέτρους όπου βρήκαν πως η πρωτεΐνη M του SARS-CoV-2 έχει το ισηλεκτρικό σημείο 9,51, τον δείκτη αστάθειας (instability index) 39,14, τον αλειφατικό δείκτη (aliphatic index) 120,86, υψηλή υδροφοβία 0,446 και επίσης ότι έχει πιο πολλά θετικά φορτισμένα κατάλοιπα (21) από αρνητικά φορτισμένα (13) αμινοξέα (Πίνακας 2).

Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι η πρωτεΐνη M και άλλες δομικές πρωτεΐνες αλληλοεπιδρούν με βοηθητικές πρωτεΐνες (ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF9b και ORF10) καθώς και με μη δομικές πρωτεΐνες (nsp2, nsp4, nsp5, nsp8 και nsp16) (Li, et al., 2020).

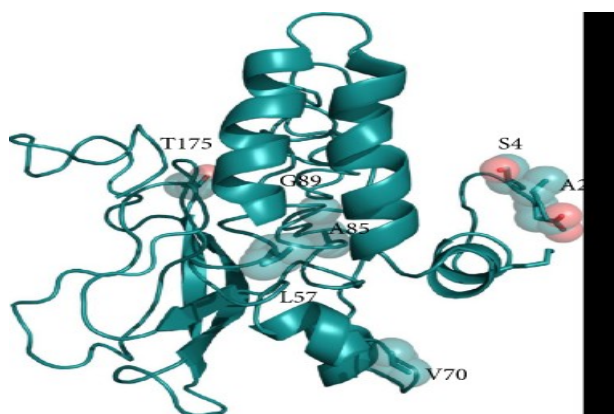
Σύμφωνα με την έρευνα της M.Bianchi και των συνεργατών της, επτά παραλλαγές πρωτεΐνης Sars-CoV-2 M ταυτοποιήθηκαν συγκρίνοντας την από άλλα στελέχη. Επίσης βρέθηκε πως στη θέση N-τελική περιοχή μπορεί να παρατηρηθεί η εισαγωγή ενός υπολειμματος σερίνης (Ser) στη θέση 4 του ανθρώπινου Sars-CoV-2, και φαίνεται να είναι ένα μοναδικό χαρακτηριστικό αυτής της πρωτεΐνης. Οι επτά παραλλαγές της M πρωτεΐνης διαφέρουν στις θέσεις 2, 3, 57, 70, 85, 89 και 175. Η πρωτεΐνη από το προϊόν απομόνωσης Sars-CoV-2 NIHE διαθέτει Arg αντί για συντηρημένη Gly στη θέση 89. Η μετάλλαξη συμβαίνει μέσα σε μια προβλεπόμενη διαμεμβρανική έλικα και εάν επιβεβαιωθεί, μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στις ιδιότητες της πρωτεΐνης (Bianchi, et al., 2020).

Επιπλέον, στους Alphacoronavirus, έχει αποδειχθεί ότι αυτή η πρωτεΐνη συνεργάζεται με την S πρωτεΐνη κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης και της εισόδου των κυττάρων. Επομένως οι

μεταλλάξεις που συμβαίνουν στην περιοχή N, η οποία εκτίθεται στην επιφάνεια του ιού, θα μπορούσαν να διαδραματίσουν βασικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των κυττάρων ξενιστών (Bianchi, et al., 2020).

Amino acid	Number	Composition
Ala (A)	19	8.6%
Arg (R)	14	6.3%
Asn (N)	11	5.0%
Asp (D)	6	2.7%
Cys (C)	4	1.8%
Gln (Q)	4	1.8%
Glu (E)	7	3.2%
Gly (G)	14	6.3%
His (H)	5	2.3%
Ile (I)	20	9.0%
Leu (L)	35	15.8%
Lys (K)	7	3.2%
Met (M)	4	1.8%
Phe (F)	11	5.0%
Pro (P)	5	2.3%
Ser (S)	15	6.8%
Thr (T)	13	5.9%
Trp (W)	7	3.2%
Tyr (Y)	9	4.1%
Val (V)	12	5.4%

**Πίνακας 3:** Ο αριθμός των αμινοξέων και η σύνθεση της πρωτεΐνης SARS-CoV-2 M από το εργαλείο ProtParam του ExPASy (Mahtarin, et al., 2020).



**Εικόνα 25:**

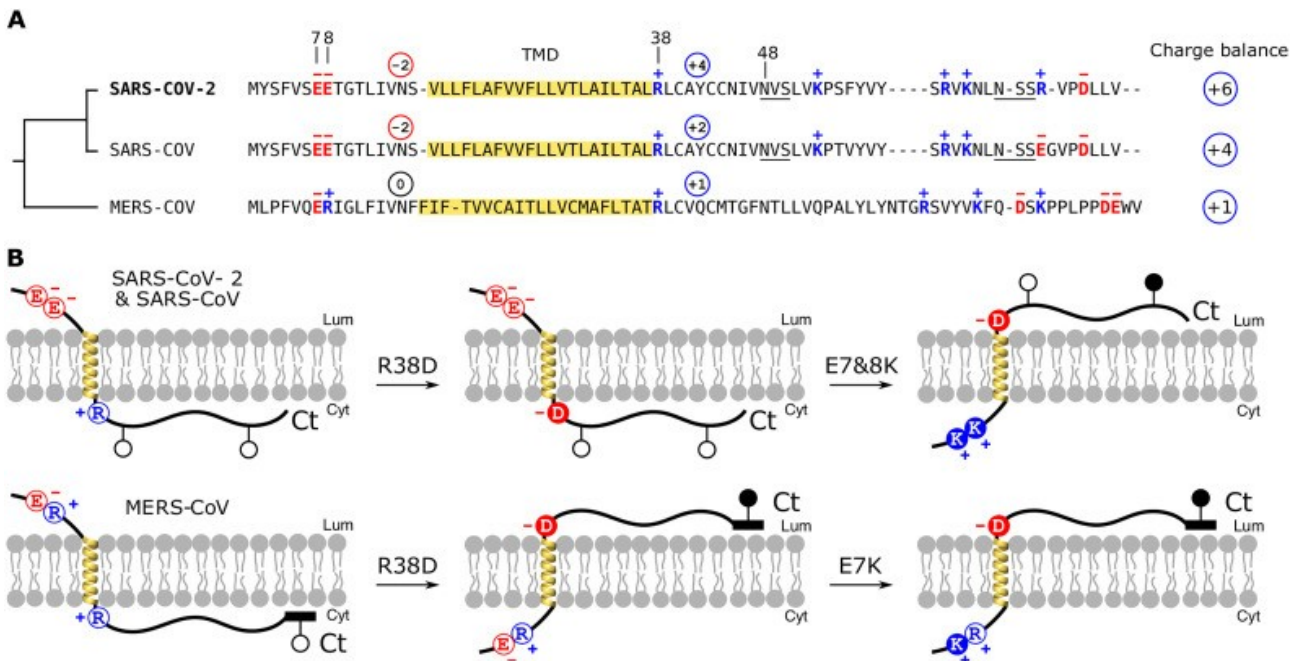
Το μοντέλο I-Tasser της πρωτεΐνης (M) μεμβράνης αντιπροσωπεύεται ως μοντέλο καρτούν. Οι παραλλαγές θέσεων εμφανίζονται ως διαφανείς σφαίρες γεμίματος χώρου και επισημαίνονται με τον κωδικό ενός γράμματος αμινοξέος. (Bianchi, et al., 2020)

### 3.3.4 Πρωτεΐνη φακέλος (E) Envelope- SARS-CoV-2

Η πρωτεΐνη φακέλου (E) είναι μια μικρή πρωτεΐνη μεμβράνης που εμπλέκεται σε διάφορες πτυχές του κύκλου ζωής του ιού, όπως η συναρμολόγηση, η εκκόλαψη, ο σχηματισμός φακέλου και η παθογένεση. Είναι μονής έκτασης με λοξή κατανομή φορτισμένων καταλοίπων και στις δύο πλευρές της μεμβράνης. Υπάρχουν μόνο οκτώ φορτισμένα κατάλοιπα στην αλληλουχία πρωτεΐνης,

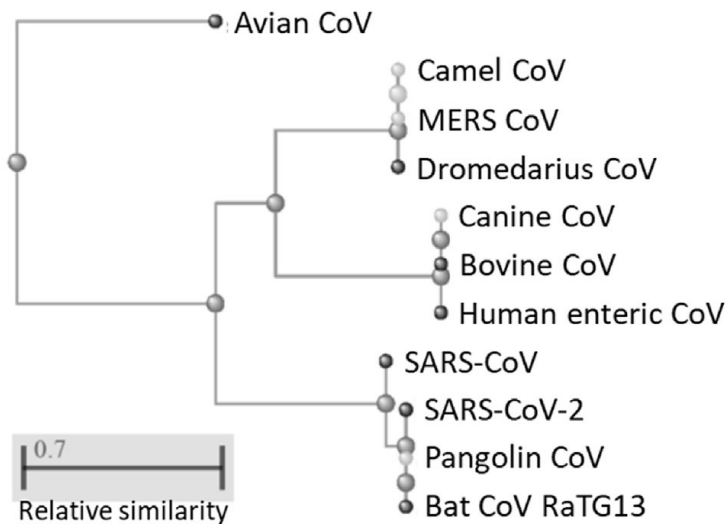
δύο αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα στην περιοχή διαμεμβράνης (TM) και πέντε θετικά συν ένα αρνητικό φορτισμένο κατάλοιπο στην C- περιοχή (Duart, et al., 2021). Υπάρχει μόνο σε μικρές ποσότητες και δεν χρειάζεται απαραίτητα για την αντιγραφή ιού αλλά είναι απαραίτητη για τη μολυσματικότητα και την παθογένεση όντας μια εξαιρετικά παθογόνος πρωτεΐνη.

Έχει μήκος 75 αμινοξέα και υπάρχει τόσο σε μονομερή όσο και σε ομο-πενταμερική μορφή. Περίπου 20 αντίγραφα της πρωτεΐνης έχουν βρεθεί στο ιικό σωματίδιο και προηγούμενες μελέτες που βασίζονται πάνω στη μεταλλαξογένεση κατέδειξαν τον κεντρικό ρόλο της στην έναρξη και ανάπτυξη της ιογενούς λοίμωξης (Tilocca, et al., 2021). Η πρωτεΐνη E που δεν διαθέτει ικά σωματίδια σχετίζεται με την ανικανότητα μόλυνσης των κυττάρων ξενιστών ή πολύ χαμηλών ιογενών τίτλων (Schoeman & Fielding, 2019). Εντοπίζεται εντός των εκκριτικών οδών (secretory pathways) στο ενδιάμεσο διάστημα μεταξύ του ενδοπλασματικού δικτύου και της συσκευής Golgi μέσα στο οποίο θεωρείται πως η διάταξη της υδρόφοβης διαμεμβρανικής της περιοχής σε ομο-πενταμερές, σχηματίζει ένα κανάλι ιόντων (δηλ. Ιοϊορίνη) στα διάφορα στελέχη του κορωνοϊού (Torres, et al., 2005; Stodola, et al., 2018). Μέσα στο ERGIC ενδοπλασματικό ενδιάμεσο διαμέρισμα Golgi του κυττάρου του ξενιστή, συμμετέχει στην εκκόλαψη νέων ιών, την συναρμολόγηση και την μετακίνησή τους (Nieto-Torres, et al., 2011). Διαθέτει ένα μοτίβο σύνδεσης (PDZ) που προκαλεί ανοσοπαθολογία με υπερέκφραση φλεγμονωδών κυτοκινών (Jimenez-Guardeño, et al., 2014). Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιδείνωση της ανοσοαπόκρισης που προκαλεί το οξύ αναπνευστικό σύνδρομο (Alam, et al., 2020). Ένα κοινό χαρακτηριστικό που έχουν οι MERS-CoV, SARS-CoV και SARS-CoV-2 είναι ένα θετικά φορτισμένο υπόλειμμα αργινίνης (Arg 38) που διατηρείται έντονα και βρίσκεται κοντά στην υδρόφοβη C-τελική περιοχή, ενώ στους υπόλοιπους ανθρώπινους κορωνοϊούς είναι μία λυσίνη (Duart, et al., 2020). Η εξελικτική τάση συσσώρευσης θετικά φορτισμένων υπολειμμάτων στην TM περιοχή αυτών των E πρωτεϊνών (**Εικόνα 26 Α**) συμβάλλουν στην πολυπαραγοντική επίδραση της τοπολογίας της μεμβράνης, η οποία επιτρέπει το σχηματισμό τεταρτοταγούς πρωτεϊνικής δομής παίζοντας ουσιαστικό ρόλο στην ιογενή λοίμωξη και την παθογένεση (Duart, et al., 2021) .



**Εικόνα 26:** Α) Πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχιών αμινοξέων της πρωτεΐνης E από MERS-CoV (UniProt K9N5R3), SARS-CoV (UniProt P59637) και SARS-CoV-2 (UniProt P0DTC4). Τα προβλεπόμενα τμήματα TM επισημαίνονται σε κίτρινο πλαίσιο. Τα αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα εμφανίζονται με κόκκινο σύμβολο - στην κορυφή, ενώ τα θετικά εμφανίζονται με μπλε χρώμα με σύμβολο + στην κορυφή. Οι εγγενείς προβλεπόμενες θέσεις αποδεκτών γλυκοσυλίσωσης υπογραμμίζονται. Τα διατηρημένα και σχετικά υπολείμματα σημειώνονται με τον αριθμό στην κορυφή (7, 8, 38 και 48). Το άθροισμα καθαρής φόρτισης πριν και μετά το τμήμα TM εμφανίζεται κυκλωμένο. Η ισορροπία φόρτισης charge balance (ισορροπία φόρτισης στην περιοχή που ακολουθεί το τμήμα TM μείον την ισορροπία φόρτισης στην περιοχή που προηγείται του τμήματος TM) εμφανίζεται στη δεξιά πλευρά. Β) Σχηματικές αναπαραστάσεις της τοπολογίας της πρωτεΐνης E παρουσία των διαφορετικών μεταλλάξεων. Τα κατάλοιπα άργιου τύπου 7, 8 και 38 εμφανίζονται σε έναν άδειο χρωματιστό κύκλο (κόκκινο για γλουταμινικά οξέα και μπλε για αργινίνες) συνοδευόμενα με - ή + σύμβολο ανάλογα με το φορτίο του υπολείμματος. Οι σημειακές μεταλλάξεις εμφανίζονται με κόκκινο (αρνητικό) ή μπλε (θετικό) συμπληρωματικό κύκλο με έμφαση στην αλλαγή φόρτισης. Οι θέσεις δέκτη γλυκοσυλίσωσης υποδεικνύονται με λευκές (μη γλυκοσυλιωμένες) ή μαύρες (γλυκοσυλιωμένες) κουκίδες. Στο MERS-CoV, η Ct-tail που περιέχει τη θέση γλυκοσυλίσωσης αντιπροσωπεύεται με ένα μαύρο ορθογώνιο (Duart, et al., 2021).

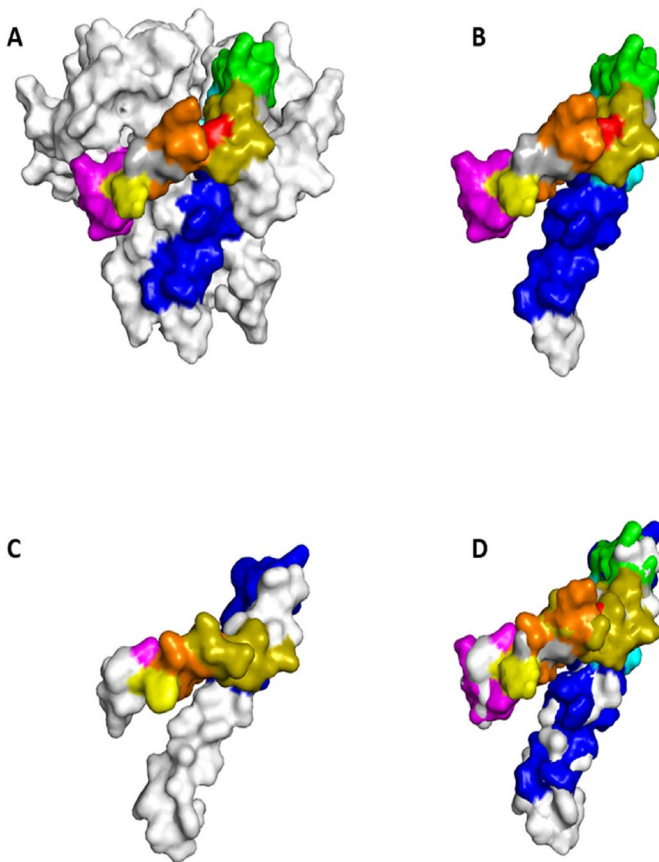
Σύμφωνα με την έρευνα του B.Tilocca και των συνεργατών του {Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες αναλύθηκαν μέσω του Basic Local Alignment Search Tool για πρωτεϊνικές αλληλουχίες (pBLAST)}, η ευθυγράμμιση πολλαπλών αλληλουχιών ολόκληρης της αλληλουχίας πρωτεΐνης E αποκαλύπτει ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι 100% ταυτόσημη με την αντίστοιχη κορωνοϊκή πρωτεΐνη Bat και την κορωνοϊκή παγκολίνη. Λιγότερο από 95% ταυτόσημες μεταξύ πρωτεϊνών SARS-CoV-2 E και SARS-CoV E. Με τον κορωνοϊό του κοτόπουλου η πρωτεΐνη E μοιράζεται ομοιότητες γύρω στο 20%. Και στην έρευνα της M. Bianchi και των συνεργατών της βλέπουμε ότι η πρωτεΐνη Sars-CoV-2E είναι πανομοιότυπη με τις αλληλουχίες των απομονωμένων προϊόντων Pangolin CoV MP798 και Bat CoV CoVZXC21, CoVZC45 και RaTG13. Ένα διακριτικό χαρακτηριστικό των παραλλαγών του Sars-2-CoV E είναι η παρουσία Arg στη θέση 69 που αντικαθιστά τις Glu, Gln, Asp σε άλλες ομόλογες πρωτεΐνες Sars-CoV E. Αυτή η τοποθεσία ακολουθείται από μια διαγραφή στη θέση 70 που αντιστοιχεί στη Gly ή τη Cys σε άλλες πρωτεΐνες. (Bianchi, et al., 2020).



**Εικόνα 27:**

Φυλογενετική ταξινόμηση των επιλεγμένων κορωνοϊών με βάση την αλληλουχία πρωτεΐνης φακέλου (Tilocca, et al., 2021).

Η δομική χαρτογράφηση επιλεγμένων επιτόπων (epitopes) υπογραμμίζει ένα πλήθος επιτόπων που γειτνιάζουν μεταξύ τους, σχηματίζοντας μια διαμορφωτική ανοσογόνο περιοχή της πρωτεΐνης που μπορεί να υπάρχει είτε στη μονομερική μορφή της είτε να συνδυάζεται ως ομο-πενταμερές. Στην παρακάτω εικόνα βλέπουμε σε τρισδιάστατη μορφή την δομική χαρτογράφηση των επιτόπων σε διάφορα είδη.



**Εικόνα 28:** Τρισδιάστατη δομή πρωτεϊνών E από εκπροσώπους κορωνοϊών και χαρτογράφηση επιτόπων. Οι ακολουθίες επιτόπου χρωματίζονται ως εξής:

μπε: LIVNSVLLFLAFVVFLVTLAILTALRLCAY;  
 κυανό: LLVTLAILTALRLCA;  
 πράσινο: LTALRLCAY;  
 πράσινο ελιά: CNIVNVS LVKPSFYV;  
 κόκκινο: SLVKPSFYV;  
 πορτοκαλί: LVKPSFYVYSRVKNL;  
 κίτρινο: LVKPSFYVY;  
 ματζέντα: KPSFYVYSRVKNLNS.

A) Ομοπενταμερική μορφή της πρωτεΐνης φακέλου από SARS-CoV (αναγνωριστικό βάσης δεδομένων PDB 5 × 29). Επιλεγμένες ακολουθίες επιτόπων χαρτογραφούνται σε κάθε μονομερές.

B) Μονομερές για την πρωτεΐνη SARS-CoV-2 E χρωματισμένη σύμφωνα με τους επιλεγμένους επιτόπους.

Γ) Προβλεπόμενη τρισδιάστατη δομή (μονομερής μορφή) του βοοειδούς CoV, CoV σκύλου και ανθρώπινου εντερικού CoV. Επιλεγμένες ακολουθίες επιτόπων χαρτογραφούνται στο μονομερές.

Δ) Δομική χαρτογράφηση των επιλεγμένων επιτόπων με επικάλυψη της μονομερούς μορφής των E πρωτεϊνών χρωματισμένες όπως στα πάνελ B και Γ (Tilocca, et al., 2021).

#### 4 ΜΟΛΥΝΣΗ ΑΠΟ SARS-CoV-2

Η εμφάνιση και η ταχεία εξάπλωση του νέου κορωνοϊού βάζοντας σε καραντίνα ολόκληρο το κόσμο, έχει αντίκτυπο στην παγκόσμια υγεία και οικονομία. Η διαφορά του νέου SARS-CoV-2 με



τον παλαιότερο SARS-CoV είναι πως ο νέος είναι πιο μεταδοτικός και λιγότερο θανατηφόρος ενώ ο πρώτος που ήταν πιο θανατηφόρος εξαφανίστηκε.

Πολλοί ασθενείς με SARS-CoV-2 αναπτύσσουν χαμηλά επίπεδα εξουδετερωτικών αντισωμάτων και υποφέρουν από παρατεταμένη ασθένεια γεγονός που υποδεικνύει πως ο ιός αποφεύγει την επιτήρηση του ανοσοποιητικού του ανθρώπου πιο αποτελεσματικά από τον SARS-CoV. Όταν οι ιοί εξελίσσονται για να ξεφύγουν από την παρακολούθηση του ανοσοποιητικού συστήματος συχνά γίνονται λιγότερο μολυσματικοί παρόλα αυτά ο SARS-CoV-2 παραμένει εξαιρετικά μολυσματικός. Ο συνδυασμός υψηλής μολυσματικότητας και αποφυγής του ανοσοποιητικού έχουν συμβάλει στην ευρεία διάδοσή του. Η είσοδος του ιού στα κύτταρα είναι ένας σημαντικός και καθοριστικός παράγοντας όσον αφορά την μολυσματικότητα και την παθογένεση του ιού και για αυτό θα δούμε εκτενώς στις επόμενες ενότητες την διαδικασία της πρόσδεσης και της σύντηξης ιού και κυττάρου-ξενιστή (Shang, et al., 2020). Η εξάπλωση του ιού συμβαίνει λόγω της στενής επαφής με μολυσμένο άτομο, εκτεθειμένο σε βήχα, φτάρνισμα, αναπνευστικά σταγονίδια ή αερολύματα. Αυτά τα αερολύματα μπορούν να διεισδύσουν στο ανθρώπινο σώμα (πνεύμονες) μέσω εισπνοής μέσω της μύτης ή του στόματος (Shereen, et al., 2020).

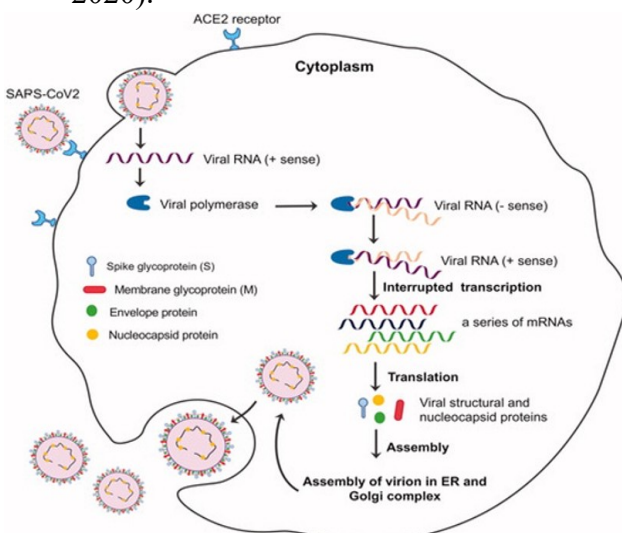
#### **4.1 Κύκλος ζωής κορωνοϊού SARS-CoV-2**

Ο κύκλος ζωής του SARS-CoV ξεκινά με την αλληλεπίδραση μεταξύ ξενιστή και ιού με σύνδεση της πρωτεΐνης S με το ένζυμο-2 της αγγειοτενσίνης (ACE2) ο οποίος είναι ο υποδοχέας που υπάρχει στα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα, κυψελιδικά πνευμονοκύτταρα (Khade, et al., 2020). Το ACE2 είναι μια πρωτεΐνη μεμβράνης τύπου I που βρίσκεται στους πνεύμονες, την καρδιά, τα νεφρά και το έντερο. Είναι μια καρβοξυπεπτιδάση που δεσμεύει ψευδάργυρο και παίζει καθοριστικό ρόλο στην ωρίμανση της αγγειοτενσίνης, μιας πεπτιδικής ορμόνης που ρυθμίζει την αγγειοσυστολή και την αρτηριακή πίεση. Επιπλέον, το ACE2 λειτουργεί και ως συνοδός για τη διακίνηση μεμβρανών του αμινοξέος μεταφορέα B<sup>0</sup> AT1 το οποίο διευκολύνει την πρόσληψη ουδέτερων αμινοξέων μέσα στα εντερικά κύτταρα (Artika, et al., 2020; Masters, 2006). Η πρωτεΐνη ACE2 έχει την N-τελική περιοχή πεπτιδάσης (PD) και την C-τελική περιοχή που μοιάζει με κολεκτρίνη (CLD) που τελειώνει με μία μονή διαμεμβρανική έλικα και ένα ενδοκυτταρικό τμήμα με περισσότερο ή λιγότερο από 40 κατάλοιπα αμινοξέων. Τα δομικά δεδομένα υψηλής ανάλυσης του SARS-CoV-2 δείχνουν ότι δύο τριμερείς πρωτεΐνες S μπορούν ταυτόχρονα να συνδεθούν με ένα ομοδιμερές ACE2. Σε αυτήν την αλληλεπίδραση, κάθε ACE2 PD φιλοξενεί μία περιοχή δέσμευσης υποδοχέα της S πρωτεΐνης. Ο διμερισμός του ACE2 προκαλείται κυρίως από την περιοχή του αυχένα της πρωτεΐνης που περιλαμβάνει ένα εκτεταμένο δίκτυο πολικών αλληλεπιδράσεων που σταθεροποιούν τον σχηματισμό διμερών. Επιπλέον, οι δομικές πληροφορίες υποδηλώνουν ότι οι επαφές των SARS-CoV-2 και SARS-CoV με το ACE2 είναι παρόμοιες, παρά το γεγονός ότι παρατηρούνται

διάφορες παραλλαγές ακολουθίας και διαμορφωτικές αποκλίσεις στις αντίστοιχες επαφές τους με το ACE2 (Yan R. , et al., 2020). Η συνολική δομική ομοιότητα της σύνδεσης SARS-CoV-2 και SARS-CoV με τον υποδοχέα ACE2 υποστηρίζει μια στενή εξελικτική σχέση μεταξύ των δύο ιών (Shang, et al., 2020)

Οι αιχμές της γλυκοπρωτεΐνης S στην εξωτερική επιφάνεια των κορωνοϊών είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση και την είσοδο του ιού στα κύτταρα ξενιστές. Το κατάλοιπο 394 γλουταμίνης στην περιοχή RBD του SARS-CoV-2 αναγνωρίζεται από το κρίσιμο κατάλοιπο λυσίνης 31 στον ανθρώπινο υποδοχέα ACE2 (Shereen, et al., 2020).

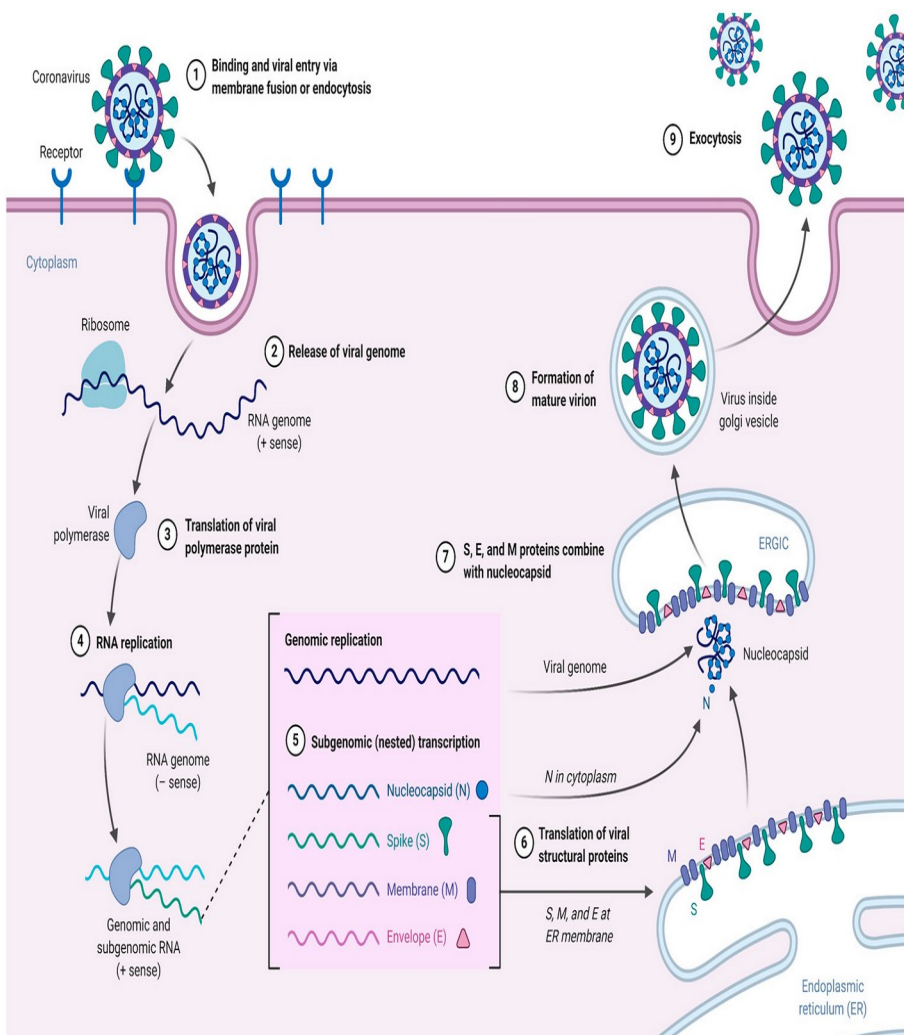
Η αναγνώριση των υποδοχέων μεμβράνης στα κύτταρα που πρόκειται να μολυνθούν είναι ο μηχανισμός με τον οποίο εμφανίζεται ο τροπισμός (Raskin, 2020). Έπειτα από την σύνδεση, η έκφραση (ACE2) αυτή υποδιαμορφώνεται και τελικά οδηγεί στην σοβαρή οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια. Όμως και η επιθηλιακή επιφάνεια του λεπτού εντέρου έχει την πρωτεΐνη ACE2, η οποία μπορεί να παρέχει μια επιπρόσθετη οδό παθογένεσης SARS-CoV. Μετά την σύνδεση ιού και υποδοχέων του κυττάρου γίνεται η σύντηξη των μεμβρανών τους (fusion) και τα ιικά σωματίδια εισέρχονται στο κύτταρο απελευθερώνοντας το γενετικό του υλικό (Khade, et al., 2020). Το γονιδίωμα RNA μεταφράζεται σε ικές ρεπλικάσες πολυπρωτεΐνες pp1a και 1ab, οι οποίες στη συνέχεια διασπώνται σε μικρά προϊόντα από ικές πρωτεΐνάσες (Shereen, et al., 2020). Λαμβάνοντας την εντολή στον ριβοσωμικό μηχανισμό του ξενιστή, η μετάφραση του ιικού RNA λαμβάνει χώρα στη λειτουργική πρωτεΐνη-RNA πολυμεράση η οποία στην συνέχεια αντιγράφει το θετικό (plus) ssRNA σε dsRNA. Μετά έχουμε την υπογονιδιωματική μεταγραφή των πρωτεϊνών (N), (S), (M) και των RNA πρωτεϊνών της (E). Η μετάφραση των S, M και E εμφανίζεται στο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο (RER) λόγω τροποποιήσεων μετά τη μετάφραση ενώ για την N στο κυτταρόπλασμα. Μετά οι δομικές πρωτεΐνες συγκεντρώνονται. Τα συναρμολογημένα ιικά σωματίδια υφίστανται περαιτέρω ωρίμανση στο κυστίδιο Golgi για να σχηματίσουν το ώριμο ιικό σωματίδιο με το περίβλημα λιπιδίων. Με εξωκυττάρωση, τα ώριμα ιικά σωματίδια απελευθερώνονται έξω από το κύτταρο, τα οποία είναι έτοιμα να δεσμεύσουν άλλα κύτταρα ξενιστών και έτσι πολλαπλασιάζεται ο ιός (Shereen, et al., 2020; Khade, et al., 2020; Iqbal, et al., 2020).



Προκειμένου να πραγματοποιηθεί όλη η διαδικασία της παραγωγής νέων ιικών σωματιδίων πρέπει να υπάρχει η προ-ενεργοποίηση μιας θέσης διάσπασης ακίδων από τη φουρίνη, μια ανθρώπινη πρωτεάση που υπάρχει στη συσκευή Golgi. Αυτή η προ-ενεργοποίηση από τη φουρίνη φαίνεται να παρέχει

καλύτερη επιλεκτικότητα και τροπισμό στην ακίδα σε σχέση με το ACE2, επιτρέποντάς της να εισέλθει σε κύτταρα που έχουν χαμηλή έκφραση άλλων πρωτεϊνών όπως TMPRSS2 και λυσοσωμικές καθεψίνες (Raskin, 2020).

**Εικόνα 29:** Φάσεις του κύκλου ζωής του SARS-CoV στα κύτταρα των ξενιστών που περιέχουν υποδοχέα ACE2. Ο κύκλος ζωής του SARS-CoV ξεκινά όταν η ιική πρωτεΐνη S συνδέεται με τον υποδοχέα ACE2 και αυτή η δέσμευση οδηγεί σε μια διαμορφωτική αλλαγή στην πρωτεΐνη S, η οποία μεσολαβεί στη σύντηξη του ιικού περιβλήματος με την κυτταρική μεμβράνη μέσω ενδοσωμικών οδών. Μετά την είσοδο σε ένα κύτταρο, ο ιός απελευθερώνει το RNA του στο μολυσμένο κύτταρο και το απελευθερωμένο RNA μεταφράζεται σε βασικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των πολυπρωτεϊνών της RNA ρεπλικάσης (replicase) και οι οποίες στη συνέχεια διασπώνται σε μικρά προϊόντα από ιικές πρωτεϊνάσες. Η πολυμεράση βοηθά στην παραγωγή μιας σειράς mRNA με διακοπτόμενη μεταγραφή, και τελικά αυτά τα mRNA μεταφράζονται σε κατάλληλες ιικές πρωτεΐνες. Επιπλέον, στο συγκρότημα ER και Golgi (Khade, et al., 2020).



**Εικόνα 30:** Αντιπροσώπευση της εισόδου και εξόδου κορωνοϊού με βάση την ενδοκυττάρωση και την εξωκυττάρωση αντίστοιχα.

Τα κύρια βήματα που εμπλέκονται στον κύκλο αναπαραγωγής είναι: (1) σύνδεση και είσοδος CoV στον ξενιστή μέσω μηχανισμού άμεσης σύντηξης ή ενδοκυττάρωσης,

(2) είσοδος στον ξενιστή και απελευθέρωση ιικού γονιδιώματος,

(3) μετάφραση ιικής -πρωτεΐνης- πολυμεράση

(4) αντιγραφή RNA,

(5) μεταγραφή υπο-γονιδιώματος,

(6) μετάφραση ιικών δομικών πρωτεϊνών,

(7) ιικές δομικές πρωτεΐνες συνδυάζονται με νουκλεοκαψίδιο, (8) σχηματισμός ώριμου ισοωματίου και

(9) απελευθέρωση ώριμου ισοωματίου μέσω μηχανισμού εξωκυττάρωσης (Iqbal, et al., 2020).

## 4.2 Ο μηχανισμός της

### σύντηξης των μεμβρανών

Σε προηγούμενη ενότητα αναφέραμε εκτενώς την δομή της πρωτεΐνης S και πως αυτή παίζει ρόλο στην δέσμευση του ιού με τους υποδοχείς του κυττάρου του ξενιστή αλλά και στην πρόκληση της σύντηξης μεταξύ ιού και κυτταρικών μεμβρανών.

Η πρωτεΐνη CoV S είπαμε πως ανήκει την κατηγορίας I. Σε αυτήν την κατηγορία, η υπομονάδα σύντηξης αποτελείται σε μεγάλο βαθμό από α-ελικοειδείς δευτερεύουσες δομές και η λειτουργία της ρυθμίζεται μέσω μια πρωτεολυτικής εκκίνησης ή διάσπασης σε συγκεκριμένες περιοχές για να

επάγει την ικανότητά της πρωτεΐνης S για σύντηξη. Η υπομονάδα S2 ή υπομονάδα σύντηξης περιέχει μια ποικιλία μοτίβων ξεκινώντας από το πεπτίδιο σύντηξης (FP) το οποίο είναι το λειτουργικό συντηρητικό στοιχείο της πρωτεΐνης S. Το FP είναι ένα μικρό τμήμα (15-25 αμινοξέα), που αποτελείται κυρίως από υδρόφοβα υπολείμματα, όπως γλυκίνη (G) ή αλανίνη (A), και που εισάγει στη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή για να προκαλέσει τη σύντηξη. Τα πεπτίδια σύντηξης τείνουν να είναι ευαίσθητα σε σημειακές μεταλλάξεις, για παράδειγμα μια μεμονωμένη μετάλλαξη μπορεί να αναιρέσει τη σύντηξη (Tang, et al., 2020).

Μετά την σύνδεση του υποδοχέα για να γίνει η κατάλυση της σύντηξης των μεμβρανών πρέπει η πρωτεΐνη S να τροποποιηθεί από κατάλληλη πρωτεάση στα σημεία επαφής των S1 και S2 και να ενεργοποιηθεί πριν το FP (S2') (Hoffmann, et al., 2020). Πιο συγκεκριμένα, όταν η RBD της ακίδας συνδέεται με τον υποδοχέα ACE2 του ξενιστή, οι πρωτεάσες των κυττάρων των ξενιστών (ιδιαίτερα TMPRSS2 και λυσοσωμικές καθεψίνες, μαζί με φουρίνη) κόβουν και ενεργοποιούν την «προ-ενεργοποιημένη» ακίδα πρωτεΐνη στη διασταύρωση S1 / S2, όπου αναγνωρίζεται μια θέση διάσπασης από τις πρωτεάσες. Η ενεργοποίηση αυτού του σημείου εκθέτει μια δεύτερη θέση διάσπασης πρωτεάσης (S2). Η ακίδα πρωτεΐνη πρέπει να διασπαστεί διαδοχικά και στις δύο θέσεις, S1 / S2 και S2, για να ενεργοποιηθεί αποτελεσματικά (Raskin, 2020).

Ο SARS-CoV-2 χρησιμοποιεί δύο μονοπάτια για την μεμβρανική σύντηξη, το μονοπάτι άμεσης σύντηξης ή αλλιώς πρώιμο μονοπάτι και το ενδοσωμικό μονοπάτι ή αλλιώς καθυστερημένο μονοπάτι ανάλογα με τη διαθεσιμότητα της πρωτεάσης και τον τύπο του κυττάρου. Είναι σκόπιμο να αναφέρουμε πως η ενεργοποίηση της σύντηξης ποικίλει ανάλογα με την πρωτεάση στο τοπικό περιβάλλον πράγμα που δείχνει την ευελιξία αυτών των ιών να προσαρμόζονται κάθε φορά. Οι διαμεμβρανικές πρωτεάσες εντοπίζονται στην επιφάνεια της μεμβράνης του πλάσματος όπου ο ιός συναντά τον υποδοχέα. Οι απαιτήσεις των πρωτεασών είναι τελικά αυτές που οδηγούν στον ιικό τροπισμό (Tang, et al., 2020; Hoffmann, et al., 2020).

Τέλος, μία άλλη έρευνα έδειξε πως ο SARS-COV-2, μπορεί να εισβάλλει στα κύτταρα των ξενιστών μέσω μιας άλλης οδού. Το SP της πρωτεΐνης S συνδέεται με τον υποδοχέα CD147 των κυττάρων των ξενιστών και εισέρχεται μέσα στα κύτταρα. Η ανακάλυψη αυτή μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη νέων αντικών φαρμάκων με στόχο την CD147 αφού τα φάρμακα που έχουν στόχο το ACE2 μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση στον προστατευτικό της ρόλο στον οργανισμό. Η CD147 είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στην υπερ-οικογένεια της ανοσοσφαιρίνης και που εμπλέκεται στην ανάπτυξη όγκου, στην εισβολή στο πλάσμα και τη μόλυνση από ιούς (Wang, et al., 2020).

## ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΑΜΕΣΗΣ ΣΥΝΤΗΞΗΣ:

Σε αυτή τη διαδρομή, μετά τη σύνδεση της περιοχής RBD της υπομονάδας S1 στον υποδοχέα ACE2, η διαμεμβρανική πρωτεάση σερίνη 2 (TMPRSS2) διασπά και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη S, στη εκτομή από S1 και S2, πράγμα που επιτρέπει τη σύντηξη της ιικής μεμβράνης με την μεμβράνη κυττάρου ξενιστή. Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι κάποιες πρωτεάσες βοηθούν στην συγχώνευση ιού και κυττάρου ξενιστή για παράδειγμα η παρουσία θρυψίνης, έδειξε πως η μόλυνση ήταν αποτελεσματικότερη στην επιφάνεια της μεμβράνης του πλάσματος. Οι πρωτεάσες δρουν στην πρωτεΐνη S σε διαφορετικές θέσεις, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ελαφρώς διαφορετικές δραστηριότητες. Σε αυτές τις πρωτεάσες ήταν και η θερμολυσίνη και η ελαστάση οι οποίες μεσολαβούν αποτελεσματικά στην κυτταρική είσοδο στην μεμβράνη του πλάσματος μετά την δέσμευση του υποδοχέα, εύρημα αξιοσημείωτο αφού η ελαστάση η οποία παράγεται από φλεγμονώδη κύτταρα στους πνεύμονες κατά την διάρκεια της μόλυνσης προάγει την εξέλιξη της λοίμωξης. Ενώ οι πρωτεάσες ενεργοποιούν τη σύντηξη δεν υπάρχουν ακόμα πληροφορίες σχετικά με τον μηχανισμό της σύντηξης στην αναπνευστική οδό του ανθρώπου γιατί οι κορωνοϊοί πρέπει να διασπώνται μόνο μετά την δέσμευσή τους με τους υποδοχείς του κυττάρου και όχι πριν, πράγμα δύσκολο να γίνει στο εργαστήριο αυτός ο συγχρονισμός όταν προσθέτουμε εξωγενείς πρωτεάσες για να τις μελετήσουμε. Ενώ η πρωτεΐνη S του SARS-CoV δεν έχει θέση διάσπασης στην περιοχή S1 / S2, δεν διασπάται κατά τη διάρκεια βιοσύνθεσης και δεν απαιτεί την προ-διάσπαση S1 / S2 για τη σύντηξη μεμβράνης πλάσματος, ο SARS-CoV-2 (S) διαθέτει μια πιθανή θέση διάσπασης φουρίνης στην περιοχή S1 / S2, η οποία είναι μοναδική για τα SARS που μοιάζουν με CoV. Ο ρόλος της θέσης διάσπασης φουρίνης στη θέση S1 / S2 καθώς σχετίζεται με τον ιικό τροπισμό και την παθογένεια ενδιαφέρει την επιστημονική κοινότητα. Οι κηλίδες Western έχουν δείξει ότι οι πρωτεΐνες S στο SARS2pp μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία στο σημείο S1 / S2 κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης όπως και ο MERS. *Ωστόσο, απομένει να προσδιοριστεί η επίδραση της πιθανής θέσης διάσπασης της φουρίνης και του συνοδευόμενου εκτεταμένου δομικού βρόχου στο S1 / S2* (Tang, et al., 2020; Walls, et al., 2020).

Οι πρωτεάσες διαμεμβρανικής σερίνης τύπου II ( TTSPs ) είναι αγκυρωμένες στην κυτταρική μεμβράνη και συγκεκριμένα το μέλος διαμεμβρανικής πρωτεάσης / υποοικογένειας σερίνης 2 (TMPRSS2) και TMPRSS4 βρέθηκε να ενεργοποιεί και να επιτρέπει την εξάπλωση του ιού της γρίπης, ακόμη και απουσία εξωκυτταρικής θρυψίνης (Betram, et al., 2011). Σε μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι ο SARS-CoV-2 χρησιμοποιεί TMPRSS2 (μια μορφή πρωτεάσης η οποία συνδέεται με μεμβράνη) για την είσοδο μεμβράνης στο πλάσμα (Matsuyama, et al., 2020). Ένας γενικός κανόνας είναι ότι οι κορωνοϊοί θα χρησιμοποιήσουν το μονοπάτι της άμεσης στα

πνευμονικά κύτταρα καθώς το TMPRSS εκφράζεται εκεί ενώ για τους άλλους τύπους κυττάρων θα χρησιμοποιήσουν το ενδοσωμικό μονοπάτι (Tang, et al., 2020).

#### ΕΝΔΟΣΩΜΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ/ ΟΔΟΣ:

Όταν δεν υπάρχουν πρωτεάσες τότε οι κορωνοϊοί επιλέγουν την ενδοκυττάρωση προκειμένου να ενσωματωθούν. Καθώς ο ιός κλείνει κατά μήκος της ενδοκυτταρικής οδού (ενκαψουλώνεται) προς το εσωτερικό των κυττάρων από το ενδόσωμα μετά την σύνδεση με τον υποδοχέα του ACE2, το pH στο ενδόσωμα μειώνεται και προάγει την διάσπαση της πρωτεΐνης S με την εξαρτώμενη από το pH πρωτεάση L κυστεΐνης (CPL), που για μερικούς ιούς αυτό βοηθά την σύντηξη. Όταν λοιπόν έχουμε χαμηλό pH ενεργοποιούνται οι ενδοσωμικές πρωτεάσες όπως είναι οι καθεψίνες (οικογένεια πρωτεασών κυστεΐνης). Τέτοιες είναι η καθεψίνη B και η καθεψίνη L οι οποίες ενεργοποιούνται αρχικά και στο τέλος του ενδοσώματος (early and late endosome) αντίστοιχα, και οι οποίες είναι ενεργοποιητές σε Con ιούς. Το SARS2pp είναι ευαίσθητο στους αναστολείς της καθεψίνης B / L. Οι μελέτες έδειξαν πως η εξάρτηση των SARS-CoV και SARS-CoV-2 από χαμηλό pH στην ενδοσωμική οδό είναι έμμεση. Απαιτούνται όξινες συνθήκες για την ενεργοποίηση της πρωτεάσης της καθεψίνης L η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την ακίδα S ώστε να γίνουν τα επόμενα στάδια της σύντηξης. *Για να επιβεβαιωθεί η ανεξαρτησία των ιών από το pH, θα πρέπει να επαναληφθεί το πείραμα σε ουδέτερο pH* (Qiu, et al., 2006; Xiuyuan Ou, et al., 2020; Tang, et al., 2020).

#### 4.3 Σύντηξη μεμβράνης της S πρωτεΐνης ακίδας

Ο μηχανισμός της σύντηξης είναι αναγκαίος ώστε ο ιός να μεταφέρει το γονιδιώμα του μέσα στο κύτταρο ξενιστή και να φτιαχτούν νέα ιικά σωματίδια. Για τον μηχανισμό αυτό όμως απαιτούνται υψηλά ποσά ενέργειας και είναι η ιική πρωτεΐνη σύντηξης που προωθεί την αντίδραση αυτή (στην περίπτωση του CoV-2 είναι η S πρωτεΐνη, που ανήκει στην I κατηγορία). Οι πρωτεΐνες αυτής της κατηγορίας καταλύουν την σύντηξη μέσω μιας ακολουθίας καταστάσεων: (1) φυσική κατάσταση προ σύντηξης, (2) μεταστατική κατάσταση προ σύντηξης, (3) ενδιάμεση κατάσταση προ-φουρκέτας, (4) σταθερή κατάσταση μετά τη σύντηξη (**εικόνα 31**). Καθώς η πρωτεΐνη S συντίθεται, υιοθετεί τη φυσική κατάσταση προ-σύντηξης. Η πρωτεολυτική επεξεργασία στη θέση διάσπασης S1 / S2 θα προκαλέσει την πρωτεΐνη S να υιοθετήσει μια προ-σύντηξη μεταστατική κατάσταση. Αυτό το γεγονός της εκκίνησης δημιουργεί ξεχωριστούς τομείς S1 και S2, οι οποίοι στη συνέχεια συνδέονται μη-ομοιοπολικά (Tripet, et al., 2004).

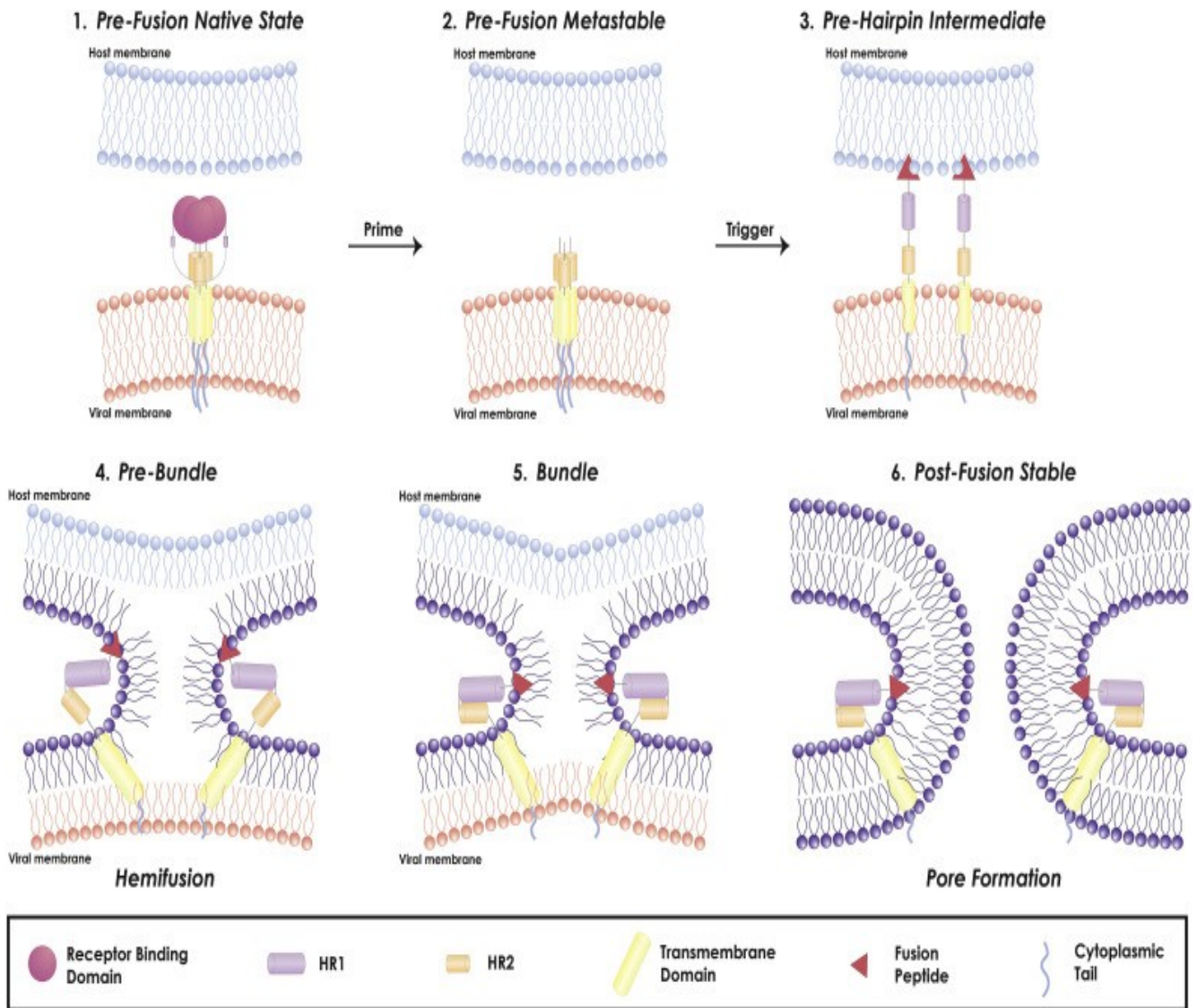
Στη μεταστατική κατάσταση, η πρωτεΐνη σύντηξης πρέπει να ξεπεράσει ένα κινητικό φράγμα για μετάβαση στην επόμενη κατάσταση. Η ενέργεια που χρειάζεται για να ξεπεραστεί αυτό μπορεί να

προέρχεται από έναν πυροδοτητή (trigger) που θα αλληλεπιδρά με την S πρωτεΐνη με αποτέλεσμα κάποιες αλλαγές διαμόρφωσής της ώστε να εισάγει το FP της στη μεμβράνη του ξενιστή σχηματίζοντας μια ενδιάμεση κατάσταση pre-hairpin. Τα γεγονότα συνήθως είναι περιβαλλοντικά όπου ο ιός ενημερώνεται από το μικροπεριβάλλον του (Carr & Kim, 1993).

Οι πρωτεΐνες σύντηξης κατηγορίας I δεν είναι αναστρέψιμες οπότε δεν θα πρέπει να ενεργοποιούνται σε σύντηξη όταν βρίσκονται σε κατάσταση μη βέλτιστη (non-optimal). Τα FP των SARS-CoV εκτίθενται μερικώς στην επιφάνειά τους (Yuan, et al., 2017; Tang et al., 2020). Μετά την εισαγωγή του FP, οι τρεις περιοχές HR1 συναρμολογούνται σε τριμερές πηνίου (coiled-coil trimer) και οι τρεις περιοχές HR2 συνδέονται με τις υδρόφοβες εγκοπές του τριμερούς HR1 με αντιπαράλληλο τρόπο (Guillén, et al., 2005).

Η συναρμολόγηση των περιοχών HR1 και HR2 είναι γνωστή ως πυρήνα σύντηξης ή δέσμη με έξι έλικες και αυτή η διαμορφωτική αναδιάταξη τραβάει τη μεμβράνη ιού και τη μεμβράνη του κυττάρου σε εγγύτητα ώστε να μπορούν να συντηχθούν, φέρνοντας την πρωτεΐνη σύντηξης σε σταθερή θέση - κατάσταση σύντηξης (post-fusion state.). Η σύντηξη αποτελείται από 2 στάδια, της ημιμόλυσης και το σχηματισμό πόρων (hemifusion and pore formation). Το στάδιο ημι-σύντηξης ορίζεται ως η συγχώνευση μόνο των εξωτερικών φύλλων των απέναντι μεμβρανών, με ακόμα ξεχωριστά εσωτερικά φύλλα και χωρίς ανάμιξη περιεχομένου. Το στάδιο της ημι-σύντηξης θεωρείται παροδικό ενδιάμεσο (transient intermediate) που είτε διαχωρίζεται και σχηματίζει δύο ξεχωριστά κυστίδια, είτε θα προχωρήσει στον σχηματισμό πόρων (Lentz, et al., 2000).

Στον σχηματισμό πόρων, συγχωνεύονται τόσο τα εξωτερικά όσο και τα εσωτερικά φύλλα, σχηματίζοντας μια σύνδεση μεταξύ του εσωτερικού του ιού και του κυτταροπλάσματος του κυττάρου, έτσι ώστε ο ιός να μπορεί να μεταφέρει το γενετικό του υλικό μέσω του νεοσυσταθέντος πόρου (Tang et al., 2020).



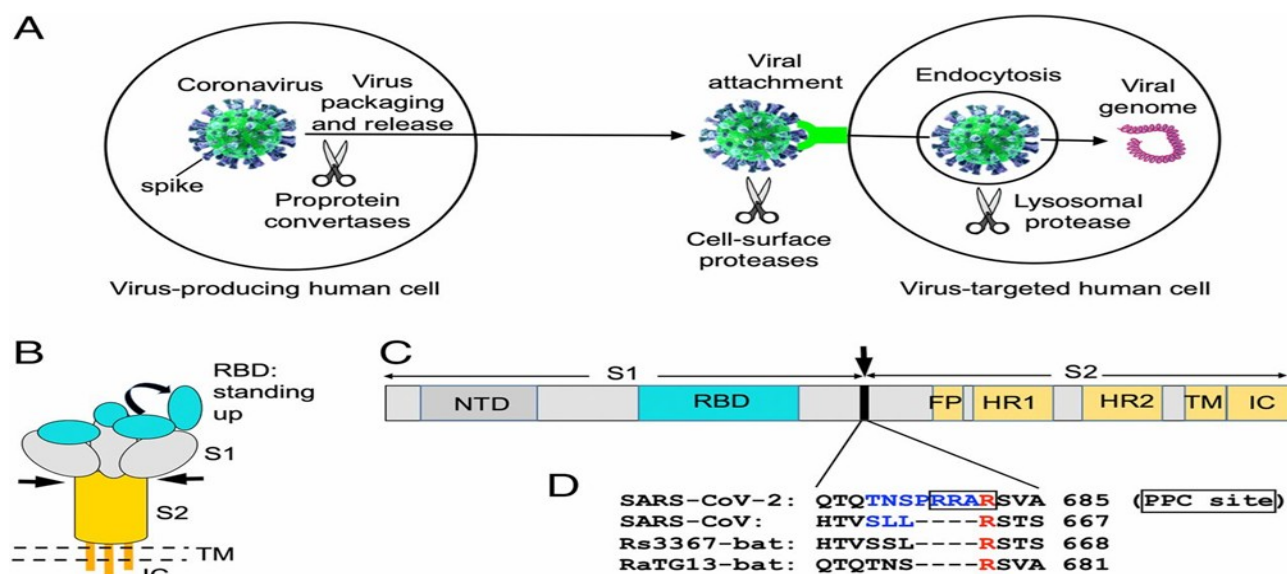
**Εικόνα 31:** Μοντέλο μονοπάτι ιογενούς σύντηξης ιού CoV που βασίζεται στην κατανόηση πρωτεϊνών σύντηξης κατηγορίας I. Οι υπότιτλοι πάνω από το σχήμα περιγράφουν την κατάσταση της πρωτεΐνης σύντηξης, οι παρακάτω τίτλοι περιγράφουν την κατάσταση των μεμβρανών. Η πρωτεΐνη S ξεκινά στη φυσική κατάσταση προ-σύντηξης (1) και υφίσταται εκκίνηση της υπομονάδας S1 από σχετικές πρωτεάσες για την επίτευξη της μεταστατικής προ-σύντηξης κατάσταση (2). Η επακόλουθη ενεργοποίηση από σχετικές πρωτεάσες θα επιτρέψει στο FP να εισαχθεί στη μεμβράνη ξενιστή και θα επιτρέψει στην πρωτεΐνη S να σχηματιστεί σε μια ενδιάμεση κατάσταση προ-φουρκέτας (=pre-hairpin) (3). Η προ-φουρκέτα αρχίζει να αναδιπλώνεται από μόνη της λόγω των αλληλεπιδράσεων HR1 και HR2 και σχηματίζονται οι προ-δέσμες (4), δέσμη (5) πιθανές καταστάσεις σταθερές μετά τη σύντηξη (6). Κατά τη διάρκεια της αναδίπλωσης πρωτεΐνης S, οι δύο μεμβράνες θα πλησιάσουν η μία την άλλη έως ότου τα εξωτερικά φύλλα συγχωνευτούν (ημιμόνωση) και στο τέλος συγχωνευτούν και τα εσωτερικά φύλλα (σχηματισμός πόρων) ΠΗΓΗ: (White & Whittaker, 2016).

#### 4.4 Προ-ενεργοποίηση από τις πρωτεάσες των ξενιστών

Η προ-ενεργοποίηση της ακίδας στον CoV-19 από τη πρωτεάση επεκτείνει την ικανότητά του ιού να εισέλθει σε τύπους κυττάρων όπου εκφράζουν το ACE2. Το TMPRSS2 και η λυσοσωμική καθεψίνη ενεργοποιούν την είσοδο του ιού. Και οι 2 έχουν αθροιστικά αποτελέσματα μαζί με την φουρίνη όταν εισέρχεται μέσα στο κύτταρο ο ιός. Η διαφορά του SARS-CoV-1 από τον SARS-CoV-2 είναι ότι η είσοδος του πρώτου ενεργοποιείται από το TMPRSS2 και τις καθεψίνες, αλλά όχι από την φουρίνη (Raskin, 2020).



Η εισαγωγή προλίνης στη διασταύρωση μεταξύ S1 και S2 πριν από την τοποθεσία εισαγωγής 12-ζεύγη βάσεων έχει ως αποτέλεσμα την προσθήκη Ο-γλυκοσιδικών δεσμών σε σερίνες και θρεονίνες (S673, T678 και S686) που συνοδεύουν τη θέση διάσπασης, οι οποίες είναι μοναδικές στο SARS-CoV-2. Οι Ο-γλυκοσιδικοί δεσμοί μπορούν να δημιουργήσουν μια «περιοχή που μοιάζει με βλεννίνη» που προστατεύει τους επίτοπους ή τα βασικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2. Διάφοροι ιοί χρησιμοποιούν αυτήν την επικράτεια ως ασπίδες γλυκάνης για ανοσοαποφυγή (Raskin, 2020).



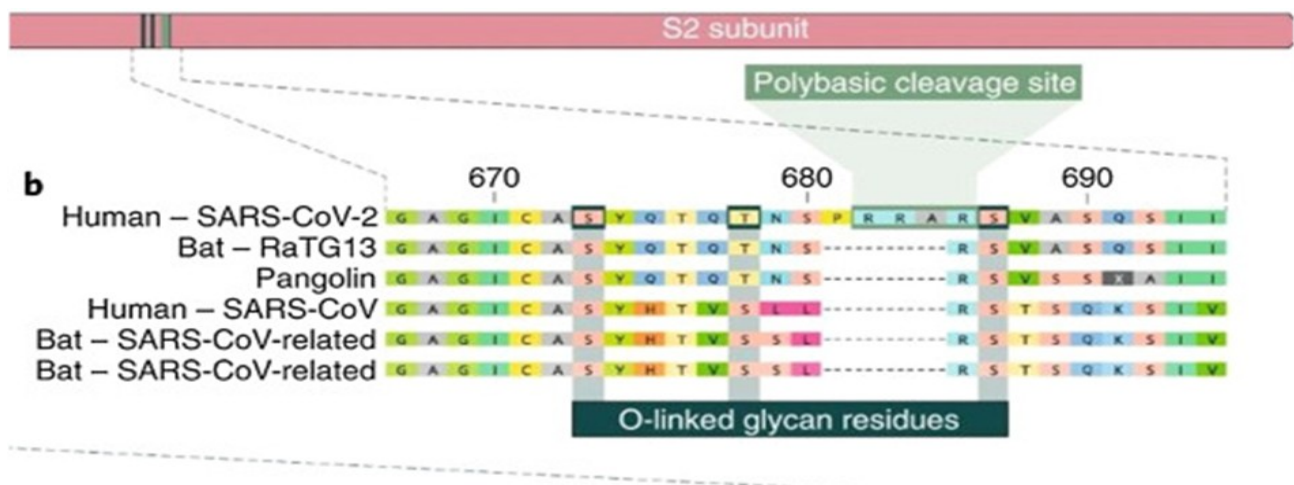
**Εικόνα 32:** Μοτίβο PPC σε πρωτεΐνη ακίδα SARS-CoV-2. (A) Διαφορετικά στάδια εισόδου κορωνοϊού όπου οι κυτταρικές πρωτεάσες των ξενιστών μπορεί να ενεργοποιήσουν τις ακίδες (S) του κορωνοϊού. (B) Σχηματικό σχέδιο της τρισδιάστατης (3D) δομής της ακίδας κορωνοϊού. S1, υπομονάδα δέσμευσης υποδοχέα; S2, υπομονάδα σύντηξης μεμβράνης; TM, διαμεμβρανική επικράτεια; IC, ενδοκυτταρική ουρά. (Γ) Σχήμα της 1D δομής της ακίδας κορωνοϊού. NTD, N-τελική περιοχή. Το FP (πεπτίδιο σύντηξης), το HR1 (1 επανάληψη επτάδων) και το HR2 (επανάληψη 2 επτάδων) είναι δομικές μονάδες στον κορωνοϊό S2 που λειτουργούν στη σύντηξη μεμβράνης. (Δ) Σύγκριση αλληλουχιών των ακίδων πρωτεϊνών από SARS-CoV-2, SARS-CoV, και δύο τύποι ιού SARS σε μια περιοχή στο όριο S1 / S2. Μόνο η ακίδα SARS-CoV-2 περιέχει ένα μοτίβο PPC - RRAR (κατάλοιπα στο κουτί). Η θέση διάσπασης της PPC βρίσκεται μπροστά από το κατάλοιπο αργινίνης επισημασμένο με κόκκινο χρώμα. Η περιοχή των ακίδων που μεταλλάχθηκε από την αλληλουχία SARS-CoV-2 (TNSPRRA) σε αλληλουχία SARS-CoV (SLL) επισημαίνεται με μπλε χρώμα. Οι αριθμοί προσχώρησης GenBank είναι QHD43416.1 για SARS-CoV-2 spike, AFR58740.1 για SARS-CoV spike, MG916901.1 για bat Rs33367 spike και QHR63300.2 για bat RaTG13 spike (Shang, et al., 2020).

Γενικά οι πρωτεάσες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην παρουσίαση μιας ανοσολογικής απόκρισης από τον οργανισμό κατά της λοίμωξης. Τα ανοσοκύτταρα εκφράζουν μια ποικιλία πρωτεασών σερίνης όπως είναι η ουδετερόφιλη ελαστάση, η τρυπτάση μαστοκυττάρων και η θρομβίνη οπότε η φαρμακευτική στόχευση των πρωτεασών, μπορεί να βοηθήσει στην ελεγχόμενη ανοσία και την μείωση της σοβαρότητας της νόσου. Για παράδειγμα, οι επιστήμονες έχουν ξεκινήσει τη διερεύνηση της πρωτεάσης NSP5 ( $M^{PRO}$ .3C) προκειμένου να φτιαχτεί φάρμακο στόχου προς αυτήν, καθώς αυτή έχει συμμετοχή στην επεξεργασία των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από ιικό RNA (Seth, et al., 2020).

#### 4.5 Πως το sars-cov-2 προσπαθεί να αποφύγει την ανοσολογική άμυνα

Η περιοχή RBD της ακίδας στο SARS-CoV-2 έχει υψηλή συγγένεια με το ACE2 αλλά είναι λιγότερο προσβάσιμο στον υποδοχέα λόγω της διαμόρφωσης των τριμερών που αποτελούν τη δομή της ακίδας. Η δυναμική κατάσταση της RBD στις προεξοχές του κορωνοϊού εξηγεί αυτό το παράδοξο. Η θέση της RBD στους κορωνοϊούς μπορεί να είναι είτε «πάνω», κάτι που του επιτρέπει να συνδεθεί με τον υποδοχέα, είτε «κάτω», όταν δεν μπορεί να συνδεθεί με τους υποδοχείς. Στην ακίδα SARS-CoV-1 η RBD είναι συνήθως «πάνω», αλλά στην πρωτεΐνη ακίδας στο SARS-CoV-2 η RBD είναι γενικά «κάτω». Για το λόγο αυτό, παρόλο που η RBD του SARS-CoV-2 έχει εξίσου συγγένεια με το ACE2 όπως η RBD στο SARS-CoV-1, είναι τελικά λιγότερο προσβάσιμη από ότι στο SARS-CoV-1, και ως εκ τούτου, το SARS CoV-2 είναι λιγότερο εκτεθειμένο στην ανθρώπινη ανοσοαπόκριση. Το SARS-CoV-2 αντισταθμίζει αυτήν την αδυναμία με τουλάχιστον τρία εξελικτικά πλεονεκτήματα (Raskin, 2020; Wan, et al., 2020).

Από όλους τους κορωνοϊούς μόνο ο SARS-CoV-2 έχει μια γενετική αλληλουχία που περιλαμβάνει εισαγωγή 12 ζευγών βάσεων (4 αμινοξέα) στην ακίδα, που ονομάζεται πολυβασική θέση. Τα τέσσερα αμινοξέα που εισάγονται στην αλληλουχία σχηματίζουν έναν εκτεθειμένο βρόχο, αυξάνοντας την ευαισθησία της πρωτεΐνης S σε διάσπαση που προκαλείται από πρωτεάση η οποία διευκολύνει τη μόλυνση από το SARS-CoV-2. Η αλληλουχία εισαγωγής δημιουργεί επίσης μια θέση διάσπασης για τη φουρίνη. Η ακολουθία εισαγωγής είναι μοναδική και δεν έχει βρεθεί σε κανένα άλλο γνωστό κορωνοϊό, ούτε καν στον κορωνοϊό RaTG12 (σε νυχτερίδες), ο οποίος είναι εξαιρετικά ομόλογος με το SARS-CoV-2. Αυτή η εισαγωγή πιθανώς αντισταθμίζει την κακή προσβασιμότητα του SARS-CoV-2 RBD με το ACE2 (Raskin, 2020; Andersen, et al., 2020).



**Εικόνα 33:** Μεταξύ όλων των κορωνοϊών, μόνο το SARS-CoV-2 έχει την εισαγωγή 4 αμινοξέων στην ακίδα που βρίσκεται μεταξύ των s1 και s2, πριν από την πρώτη θέση διάσπασης s1 / s2 (Raskin, 2020; Wan, et al., 2020).

## 5. ΕΜΦΑΝΙΣΗ SARS-CoV-2

Η εμφάνιση νέων ασθενειών είναι μια μεγάλη πρόκληση που αντιμετωπίζει ο σύγχρονος κόσμος. Η μετατόπιση του πληθυσμού σε αστικές περιοχές με την ανάμιξη διαφορετικών ειδών ζώων σε πυκνοκατοικημένες περιοχές πιστεύεται ότι διευκολύνουν την εμφάνιση και την επανεμφάνιση ορισμένων κορωνοϊών (Lau & Chan, 2015). Πολλές ασθένειες έχουν εμφανιστεί επειδή οι ιοί των ζώων μετατρέπουν τους ανθρώπους σε ξενιστές και αυτοί με την σειρά τους, τους μεταδίδουν σε άλλους ανθρώπους (Parrish, et al., 2008). Η αυξημένη επαφή με την άγρια ζωή σε αναπτυσσόμενες περιοχές, τα διεθνή ταξίδια και εμπόριο καθώς και η χρήση γης θεωρούνται ως παράγοντες για την εμφάνιση και μετάδοση παθογόνων ιών (Rosenberg, et al, 2013). Ένας ακόμη παράγοντας θεωρείται η φύση του γενετικού υλικού. Το 85% των αναδυόμενων ιών έχουν μονόκλιωνα RNA (ssRNA) γονιδιώματα, τα οποία είναι επιρρεπή σε μη διορθωμένα σφάλματα κατά την αντιγραφή (Rosenberg, et al, 2013). Πράγμα που σημαίνει ότι η πιθανότητα μετάλλαξης ανά κύκλο αναπαραγωγής ενός γονιδιώματος RNA είναι υψηλή (Rosenberg, 2014). Οι κορωνοϊοί, που διαθέτουν ένα τέτοιο γενετικό υλικό, έχει βρεθεί ότι έχουν υψηλούς ρυθμούς μετάλλαξης και ανασυνδυασμού, κάτι που θα τους επέτρεπε να διασχίσουν εμπόδια ειδών και να προσαρμοστούν σε νέους ξενιστές αποτελώντας έναν από τους ταχύτερους εξελισσόμενους ιούς (Lau & Chan, 2015). Η εξέλιξη των κορωνοϊών είναι επίσης αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης τους με τους ξενιστές του (Yu, et al., 2019). Οι ιοί SARS έχουν την ικανότητα να μεταδίδονται απευθείας από ζώα σε ανθρώπους (Rosenberg, 2014).

Ως περιοχή υψηλού δυναμικού για την εμφάνιση των CoV θεωρείται η Κίνα καθώς είναι το πιο πυκνοκατοικημένο έθνος σε όλο το κόσμο και το τρίτο μεγαλύτερο έδαφος με μεγάλη βιοποικιλότητα που περιλαμβάνει τις νυχτερίδες και τους ιούς που μεταφέρουν. Οι περισσότεροι CoV εντοπίζονται σε αυτά τα μέρη και οι περισσότεροι από τους ξενιστές των ιών αυτών ζουν πολύ κοντά στον άνθρωπο. Οι ιοί CoV που σχετίζονται με τους SARS και μπορούν να χρησιμοποιήσουν το ανθρώπινο ACE2, βρίσκονται στην Κίνα για αυτό και θεωρείται πως οι μελλοντικοί CoV θα την έχουν σαν αφετηρία (Fan, et al., 2019).

Σύμφωνα με μια έρευνα, υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερα κύρια κριτήρια που καθορίζουν την επιτυχή μετάδοση σε διάφορα είδη ξενιστών από ένα συγκεκριμένο ιό: Η διαθεσιμότητα ευαίσθητων κυττάρων ξενιστών που έχουν ειδικό υποδοχέα που απαιτείται για την είσοδο ιού. Η επιτρεπτότητα αυτών των κυττάρων ξενιστών να επιτρέπουν στον ιό να αναπαράγεται και να ολοκληρώνει τον κύκλο αναπαραγωγής τους. Η προσβασιμότητα ευπαθών και ανεκτικών κυττάρων στον ξενιστή. Τέλος η αδυναμία της έμφυτης ανοσοαπόκρισης των κυττάρων-ξενιστών να περιορίσει τον ιικό πολλαπλασιασμό (Hulswit, et al., 2016).

Η πλειονότητα, αν όχι όλων των κορωνοϊών που μολύνουν τον άνθρωπο, πιστεύεται ότι προέρχονται από CoV νυχτερίδων που μεταδίδονται στον άνθρωπο άμεσα ή έμμεσα μέσω ενός ενδιάμεσου ξενιστή (Hulswit, et al., 2016). *Μελλοντικές μελέτες που αποσκοπούν στην αποσαφήνιση του τρόπου με τον οποίο οι ιοί των ζώων διασχίζουν τα εμπόδια ειδών και μολύνουν αποτελεσματικά τον άνθρωπο θα βοηθήσουν στην πρόληψη μελλοντικών ζωονοσογόνων περιστατικών* (Artika, et al., 2020).

### **5.1 Τρόποι μετάδοσης Sars-CoV-2**

Η μετάδοση του νέου SARS μπορεί να γίνει με άμεσο τρόπο ή έμμεσα. Σαν πύλες εισόδου όλων των μικροοργανισμών θεωρούνται οι βλεννογόνοι ( π.χ επιπεφυκότα αναπνευστικό, γαστρεντερικό και ουροποιητικό), το δέρμα (από λύση του δέρματος) και η παρεντερική μετάδοση (μέσω του αίματος) (PROLIPSIS, ALPHA, 2017). Οι μικροοργανισμοί, βακτήρια ή ιοί, εισέρχονται μέσα στον οργανισμό μέσω της αναπνοής ή μέσω χεριών αφού υπάρξει επαφή με μάτια, μύτη, στόμα. Άρα, είναι δυνατόν ο SARS-COV-2 να μεταδοθεί με άμεση επαφή μέσω μολυσματικών ατόμων και με έμμεση επαφή από μολυσμένες επιφάνειες. Ας δούμε όμως τους πιο κοινούς τρόπους μετάδοσης.

#### **ΜΕΣΩ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ:**

Η μετάδοση ιών μέσω της αναπνευστικής οδού είναι συχνό φαινόμενο. Συνήθως οι ιοί μεταφέρονται μέσω των σταγονιδίων μικρών ή μεγάλων, αιωρούμενα από τον ασθενή κυρίως κατά τον βήχα. Τα μεγάλα σταγονίδια μεγέθους 5 μm και άνω, πέφτουν κάτω μολύνοντας επιφάνειες, ενώ μικρότερα του 5 μm αιωρούνται στον αέρα αποτελώντας την αερογενή μετάδοση. Η πιο συχνή μετάδοση του SARS-COV-2 είναι η αναπνευστική οδός και η πιθανότητα προσβολής από χώρους κλειστούς που δεν αερίζονται χωρίς την χρήση μάσκας αυξάνεται πάρα πολύ. Το ικό φορτίο στην ανώτερη αναπνευστική οδό, ρινοφάρυγγα και στοματοφάρυγγα είναι υψηλό και αυξάνεται στην κατώτερη αναπνευστική οδό (πτύελα), υποδηλώνοντας ότι η ανώτερη αναπνευστική οδός είναι η συνήθης αρχική θέση αντιγραφής του με επακόλουθη φθίνουσα λοίμωξη (Wölfel, et al., 2020; Meyerowitz, et al., 2020).

#### **ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΑ ΖΩΑ:**

Πολλές μελέτες έχουν τεκμηριώσει ότι ο ιός μπορεί να μολύνει γάτες, σκύλους κουνάβια και άλλα ζώα. Υπάρχουν στοιχεία ότι ο ιός μεταδίδεται μεταξύ των ζώων αλλά δεν υπάρχουν επιβεβαιωμένες περιπτώσεις από κατοικίδια σε ανθρώπους. Τα ζώα μίνκ ή βιζόν (Minks) που εκτρέφονται, υπήρξαν υποψίες μετάδοσης του ιού σε εργάτες (Meyerowitz, et al., 2020; Wen, et al., 2020).

### ΚΑΘΕΤΗ ΜΕΤΑΔΟΣΗ:

Η μετάδοση αυτού του είδους είναι σπάνια αλλά έχουν υπάρξει αναφορές που έδειξαν λοίμωξη νεογνού μέσω του πλακούντα (Patanè, et al., 2020). Όσον αφορά το μητρικό γάλα μπορεί να περιέχει ιικό RNA εν τούτοις δεν έχουν αναφερθεί επιβεβαιωμένες μεταδόσεις (Meyerowitz, et al., 2020). Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι οι έγκυες γυναίκες διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο σοβαρής νόσου που σχετίζεται με το COVID-19 σε σύγκριση με τις μη έγκυες. Το ποσοστό μόλυνσης SARS-CoV-2 σε έγκυες γυναίκες φαίνεται να είναι υψηλότερο από ό,τι στους ηλικιωμένους. Υπάρχουν επιπλοκές όπως πρόωρη γέννηση. Ανεξάρτητα αν η λοίμωξη έχει αποκτηθεί προγεννητικά ή μετά τον τοκετό, τα νεογνά πρέπει να παρακολουθούνται στενά μακροπρόθεσμα για τυχόν αναπτυσσόμενα συμπτώματα (FIGO, 2021).

### ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΜΕΣΩ ΚΟΠΡΑΝΩΝ:

Δεδομένου ότι σπάνια έχει απομονωθεί ο ζωντανός ιός από τα κόπρανα, καθώς και τα χαμηλά επίπεδα ιών που είναι ικανά για αναπαραγωγή στα κόπρανα που μπορεί να γίνουν αερόλυμα από το ξέπλυμα τουαλέτας, φαίνεται ότι είναι απίθανο να προκαλέσουν μόλυνση εκτός από ασυνήθιστες ή εξαιρετικές περιστάσεις (Meyerowitz, et al., 2020). Μία επίσης μελέτη, διαπίστωσε χαμηλά ανιχνεύσιμα επίπεδα RNA σε δείγματα αέρα κοντά σε τουαλέτες ασθενών σε νοσοκομείο στην Wuhan την Κίνας αν και δεν αξιολογήθηκε η απομόνωση ζώντος ιού (Liu, et al., 2020).

### ΣΕΞΟΥΑΛΙΚΗ ΜΕΤΑΔΟΣΗ:

Το ιικό RNA έχει βρεθεί στο σπέρμα, αν και δεν έχει απομονωθεί μολυσματικός ιός (Li, et al., 2020). Βέβαια, κάποιες σεξουαλικές πρακτικές (μέσω στοματικών-πρωκτικών επαφών) όπου ο ιός βρίσκεται στο σάλιο ή στα κόπρανα ή ακόμα και με έμμεσο τρόπο (π.χ. με έκθεση του ορθού βλεννογόνου στο σάλιο για λίπανση κατά τη διάρκεια του πρωκτικού σεξ) είναι δυνατόν να μεταδοθεί (Patri, et al., 2020).

### ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΜΕΣΩ ΑΙΜΑΤΟΣ:

Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας, το SARS-CoV-2 RNA έχει βρεθεί στο αίμα. Επίσης το ACE2 βρίσκεται στις επενδύσεις των αιμοφόρων αγγείων (vessel linings) που χρησιμοποιεί ο ιός για την είσοδο του στα κύτταρα και τους ιστούς (Salamanna, et al, 2020). Στο κυκλοφορικό σύστημα, ο ιός πηγαίνει σε πολλά όργανα και τα μολύνει προκαλώντας ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων (Wadman, et al., 2020). Το ιικό RNA βρέθηκε στο αίμα από τέσσερις αιμοδότες χωρίς συμπτώματα. Τα δείγματα απορρίφθηκαν και δεν χορηγήθηκαν σε άλλους ασθενείς (Chang, et al., 2020). Μέχρι σήμερα, δεν έχει απομονωθεί ιός ικανός για αναπαραγωγή από δείγματα

αίματος και δεν υπάρχουν τεκμηριωμένες περιπτώσεις μετάδοσης αίματος, θα πρέπει να γίνουν παραπάνω μελέτες (Meyerowitz, et al., 2020).

#### ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΜΕΤΑΔΟΣΗ:

Σύμφωνα με μια έρευνα που έγιναν πάνω στις σπιτικές μύγες, φιλοξένησαν τον ιό έως και 24 ώρες μετά την έκθεση του σε αυτόν. Επιπλέον μπόρεσαν να μεταδώσουν μηχανικά το γονιδιωματικό RNA του SARS-CoV-2 στο γύρω περιβάλλον έως και 24 ώρες μετά την έκθεση. Απαιτούνται όμως περαιτέρω μελέτες για να προσδιοριστεί εάν η μετάδοση μύγας από το σπίτι συμβαίνει φυσικά και τις πιθανές επιπτώσεις στη δημόσια υγεία αυτών των γεγονότων (Balaraman, et al., 2021).

#### **5.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην μετάδοση του ιού Sars-CoV-2.**

Τα χαρακτηριστικά της περιβαλλοντικής ποιότητας του αέρα αλλά και των επιφανειών που έχουν μολυνθεί από τον ιό καθώς και η διατήρηση του στις επιφάνειες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στην έμμεση μετάδοση του ιού και στην διατήρηση της μολυσματικότητας και κατ' επέκταση στην ταχύτητα με την οποία εξαπλώνεται ο ιός (Aboubakr, et al., 2020; Azuma, et al., 2020).

#### ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ :

Ο ιός είναι ευαίσθητος σε θερμική επεξεργασία αλλά μπορεί να παραμείνει για τουλάχιστον 14 ημέρες σε ψυκτικές θερμοκρασίες 4 °C, με μείωση μόνο 0,7% την 14<sup>η</sup> μέρα. Με αύξηση της θερμοκρασίας επώασης, ο χρόνος απενεργοποίησης του ιού μειώθηκε δραματικά σε 2 ημέρες για τους 37°C και στα 5 λεπτά για τους 70°C. Ο ιός είναι πολύ σταθερός σε ένα ευρύ φάσμα pH σε θερμοκρασία δωματίου (Chin, et al., 2020).

#### ΥΓΡΑΣΙΑ ΚΑΙ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ:

Σε πείραμα που έγινε σε 5 περιβαλλοντικές συνθήκες (αεροζόλ, πλαστικό, ανοξείδωτο χάλυβα, χαλκό και χαρτόνι) βρέθηκε ότι ο SARS-CoV-2 παρέμεινε βιώσιμος σε αερολύματα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (3 ώρες) με μείωση του μολυσματικού τίτλου (titer) από 10<sup>3,5</sup> σε 10<sup>2,7</sup> TCID<sub>50</sub> ανά λίτρο αέρα. Αυτή η μείωση ήταν παρόμοια με αυτήν που παρατηρήθηκε με το SARS-CoV-1, από 10<sup>4,3</sup> έως 10<sup>3,5</sup> TCID<sub>50</sub> ανά χιλιοστόλιτρο. Ο SARS-CoV-2 ήταν πιο σταθερό σε πλαστικό και ανοξείδωτο χάλυβα από ότι σε χαλκό και χαρτόνι, και ανιχνεύτηκε βιώσιμος ως και 72 ώρες μετά την εφαρμογή σε αυτές τις επιφάνειες αν και η ποσότητα του ιού μειώθηκε σημαντικά (από 10<sup>3,7</sup> έως 10<sup>0,6</sup> TCID<sub>50</sub> ανά χιλιοστόλιτρο μέσου μετά από 72 h σε πλαστικό και από 10<sup>3,7</sup> έως 10<sup>0,6</sup> TCID<sub>50</sub> ανά χιλιοστόλιτρο μετά από 48 h σε ανοξείδωτο χάλυβα). Σε

σύγκριση με τον SARS-CoV-1, η κινητική του σταθερότητα δεν διέφερε πολύ με τον SARS-CoV-2. Στον χαλκό δεν μετρήθηκε βιώσιμος ο SARS-CoV-2 μετά από 4 ώρες ενώ στο χαρτόνι μετά από 24 ώρες. Ο μέσος χρόνος ημιζωής του SARS-CoV-2 ήταν περίπου 5,6 h σε ανοξειδωτο ασάλι και 6,8 h σε πλαστικό. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μετάδοση του ιού μέσω του αερολύματος και επιφανειών είναι εφικτή αφού παραμένει ενεργός για ώρες στα αερολύματα και για επιφάνειες ως και μέρες ανάλογα την επιφάνεια (Van Doremalen, et al., 2020).

Σε άλλη πειραματική διαδικασία όπου εξετάστηκε η ικανότητα του SARS-CoV-2 να επιβιώνει στο σκοτάδι, σε δύο διαφορετικές τιμές σχετικής υγρασίας, μέσα σε τεχνητό σάλιο βρέθηκαν τα εξής: Ο ιός είναι σταθερός στο σκοτάδι σε ένα δυναμικό αεροζόλ μικρών σωματιδίων από 4 διαφορετικές συνθήκες και μπορούσε να ανιχνευτεί ύστερα από 90 λεπτά. Ο ρυθμός αποσύνθεσης ήταν 0,4 έως 2,27% ανά λεπτό και οι ημιζωές κυμαίνονταν από 30 έως 177 λεπτά για τις διάφορες συνθήκες που υποβλήθηκαν (Smither, et al, 2020).

Μια άλλη μελέτη έδειξε πως μετά από 1 λεπτό δυνατής ομιλίας μπορεί τα σταγονίδια να παραμείνουν στον αέρα για περισσότερο από 8 λεπτά ανάλογα με το μέγεθος των σταγονιδίων που εκτοξεύονται δείχνοντάς μας την δυναμική που υπάρχει στην αναπνευστική μετάδοση του ιού σε κλειστό περιβάλλον (Stadnytskyi, et al., 2020).

#### ΦΩΣ:

Σε μελέτη που έγινε με προσομοιωμένο ηλιακό φως για τον SARS-CoV-2 έδειξε πως το φως (συγκεκριμένης φωτεινότητας) απενεργοποίησε γρήγορα τον ιό που εναιωρήθηκε σε προσομοιωμένο σάλιο περίπου 90% κάθε 6,8 λεπτά και σε μέσο καλλιέργειας κάθε 14.3 λεπτά. Σημαντική απενεργοποίηση επήλθε και με χαμηλότερου επιπέδου φωτός αλλά με πιο αργό ρυθμό υποδηλώνοντας πως το φυσικό φως του ηλίου μπορεί να δρα αποτελεσματικά σαν απολυμαντικό για μολυσμένα μη πορώδη υλικά και ότι ο κίνδυνος μετάδοσης διαφέρει σε εξωτερικούς και εσωτερικούς χώρους. Επίσης σημαντικά επίπεδα ιικής απενεργοποίησης παρατηρήθηκαν μέσα σε λίγα λεπτά σε όλα τα προσομοιωμένα επίπεδα του ηλιακού φωτός που διερευνήθηκαν (Ratnesar-Shumate, et al., 2020). Ωστόσο, η απενεργοποίηση του ιού στον εξωτερικό χώρο μπορεί να επηρεαστεί και από τις επιφάνειες στις οποίες βρίσκεται και από τις καιρικές συνθήκες.

Επίσης σε μελέτη που έγινε με προσομοιωμένο σάλιο σε αερολύματα έδειξε την απενεργοποίηση του ιού από τεχνητό φως. Σε σκοτεινές συνθήκες ο χρόνος ημιζωής του αερολύματος είναι περίπου 86 λεπτά. Η προσομοίωση του φωτός σε υψηλής έντασης όπως αυτού του καλοκαιριού βρέθηκε μείωση κατά 90% μετά από 6 λεπτά. Σε έντασης φωτός όπως του φθινοπώρου η μείωση ήταν 90%

αλλά σε 19 λεπτά. Ενώ η υγρασία δεν είχε σημαντική επίδραση στην επιβίωση του αερολύματος (Schuit, et al., 2020).

### **5.3 Άλλοι παράγοντες που παίζουν ρόλο στην μετάδοση και την μεταδοτικότητα**

Τα άτομα που έχουν μολυνθεί από τον νέο ιό, μπορούν να τον μεταδώσουν είτε έχουν συμπτώματα είτε όχι. Αυτοί που δεν έχουν ακόμα εμφανίσει συμπτώματα μπορεί να είναι προ-συμπτωματικοί δηλαδή δεν έχουν ακόμα εμφανίσει, ή μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί δηλαδή δεν εμφανίζουν καθόλου συμπτώματα ( Qian, et al., 2020). Το μέσο ιικό φορτίο είναι υψηλότερο σε συμπτωματικά άτομα από ότι σε ασυμπτωματικά. Οπως επίσης είναι περισσότερο σε ενήλικες από ότι σε παιδιά (Kawasuji, et al., 2020).

Το ιικό φορτίο του ιού κορυφώνεται κατά τη έναρξη των συμπτωμάτων με βαθμιαία μείωση του φερτίου μετά από 10 μέρες (Pan, et al., 2020). Επιπλέον, μπορεί να σχετίζεται με την μολυσματικότητα, ειδικά κατά την οξεία φάση της νόσου (Kawasuji, et al., 2020). Όσον αφορά την περίοδο υψηλής μολυσματικότητας μια μελέτη έδειξε ότι η έκθεση εντός 5 ημερών από την έναρξη των συμπτωμάτων δημιουργεί υψηλό κίνδυνο δευτερογενούς μετάδοσης όπου σύμφωνα με το δυναμικό της ιογενούς αποβολής η μεταδοτικότητα μειώνεται (Cheng, et al., 2020; Xi He, 2020). Γενικά ο κίνδυνος της μετάδοσης από άνθρωπο σε άνθρωπο εξαρτάται από την διάρκεια της εξαιρετικά μολυσματικής φάσης και από τον αριθμό των ισωμάτων που περιέχονται στα σταγονίδια που αιωρούνται και εκτοξεύονται (Kawasuji, et al., 2020).

Η υγιεινή των χεριών, μαζί με τον κατάλληλο εξοπλισμό ατομικής προστασίας και ο εμβολιασμός, είναι υψίστης σημασίας για να σπάσει ο κύκλος της επαφής μολυσμένων περιβαλλοντικών επιφανειών με την επαφή των βλεννογόνων, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο μετάδοσης του COVID-19 (Lai, et al., 2020). Ακολουθώντας και οι προσωπικές πρακτικές και συμπεριφορές π.χ σωστή χρήση μάσκας, αποφυγή συγκεντρώσεων πολλών ατόμων, τακτικό πλύσιμο χεριών, παίζουν ρόλο στην μετάδοση του ιού.

Σε μελέτη που έγινε πάνω στα παιδιά, έδειξε πως αυτά περνούν την νόσο με λιγότερα συμπτώματα ή είναι ασυμπτωματικά. Ένας λόγος μπορεί να είναι ότι τα παιδιά μπορεί να έχουν περάσει άλλους τύπους CoV ή η έκφραση του ACE 2 να είναι μικρότερη σε αυτά. Επιπλέον υπάρχουν ενδείξεις ότι υπάρχουν διαφορές στην έμφυτη ανοσοαπόκριση στη μόλυνση ενηλίκων και παιδιών. Πολλά στοιχεία δείχνουν ότι τα παιδιά μπορεί να είναι λιγότερο πιθανόν να προσβληθούν από την ασθένεια. Τελικά, ακόμα δεν έχει προσδιοριστεί κατά πόσο αυτά μεταδίδουν την νόσο γιατί είναι δύσκολο να εξακριβωθεί ιδιαίτερα λόγω του αριθμού των ασυμπτωματικών περιπτώσεων. Υπάρχουν όμως ενδείξεις μετάδοσης από ασυμπτωματικά παιδιά σε άλλα. Οι επιστήμονες πιστεύουν πως ο ρόλος τους στη μετάδοση είναι περιορισμένος (RCPC, 2021).



Άλλος παράγοντας που παίζει ρόλο στην μεταδοτικότητα του ιού είναι οι μεταλλάξεις του, όπου οι νέες παραλλαγές του ιού τον κάνουν πιο μεταδοτικό / μολυσματικό. Ο ρυθμός μετάλλαξης για τον SARS-COV-2 είναι χαμηλότερος από της γρίπης αλλά παρόμοιος με άλλους κορωνοϊούς (Troy Day, 2020). Αρκετές μεταλλάξεις έχουν εμφανιστεί αλλά λίγες είναι αυτές που ανησυχούν την ιατρική κοινότητα και αφορά κυρίως την μεταδοτικότητά τους, δηλαδή να εξαπλώνεται πιο γρήγορα ο ιός. Αφορά επίσης την αποφυγή από την ανοσία που έχουν αναπτύξει τα άτομα από τα διαθέσιμα εμβόλια ή από φυσική ανοσία ή επίσης να προκαλούν πιο σοβαρή ασθένεια, ή να μην μπορούν να ανιχνευτούν από τις διαθέσιμες ιατρικές πρακτικές ή ακόμα και να είναι λιγότερο ανταποκρίσιμοι στην θεραπεία που υπάρχει σήμερα (Center for Disease Control and Prevention, 2021).

Η συσσώρευση μεγάλου αριθμού μεταλλάξεων εντοπίζονται στην ακίδα (S) πρωτεΐνη και πιο ειδικά εντός της αμινοτελικής περιοχής (NTD) και της περιοχής σύνδεσης του υποδοχέα (RBD). Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν άμεσες επιπτώσεις στα ποσοστά μόλυνσης από τον ιό μέσω της υψηλής συγγένειας του (S) RBD με τον κυτταρικό υποδοχέα ενζύμου-2 (ACE-2). Υπάρχουν ενδείξεις όσον αφορά τη συχνότητα της εμφάνισής τους, της ενισχυμένης μολυσματικότητας και της αυξημένης αντίστασης στη δράση μονόκλωνων και πολύκλωνικών αντισωμάτων από ορούς ανάρρωσης και σε εμβολιασμένα άτομα σε περιοχές όπου οι παραλλαγές κυριαρχούν (Gómez, et al., 2021).

#### **5.4 Μεταλλάξεις και μεταδοτικότητα Sars-CoV-2**

Οι αναδυόμενες παραλλαγές του SARS-COV-2 προκαλούν ανησυχία στο ιατρικό κόσμο καθώς όπως προανέφερα μπορεί να εξαπλωθούν και να διαφύγουν από την ανοσία και πιθανό να προκαλούν πιο σοβαρά συμπτώματα. Πιθανοί μηχανισμοί για μια μετάλλαξη μπορεί να είναι τα τυχαία συμβάντα, μπορεί να είναι οι μετατοπίσεις των ξενιστών, η επίμονη μόλυνση σε ανοσοκατεσταλμένο ξενιστή και οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη λειτουργία διόρθωσης (proofreading function) παρέχοντας τους ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα σε σχέση με την αντιγραφή, τη μετάδοση και τη διαφυγή του ιού από την ανοσία, καθώς αυξάνεται σε συχνότητα και τελικά γίνεται η κυρίαρχη παραλλαγή στις ευρύτερες περιοχές (Gómez, et al., 2021). Παρακάτω θα αναφέρουμε τις πιο γνωστές και σημαντικές από τις παραλλαγές που ακούγονται μέχρι στιγμής.

#### **ΠΑΡΑΛΛΑΓΗ B.1.1.7 (VOC 202012/01 ή 20B / 501Y.V1)**

Η συγκεκριμένη παραλλαγή ονομάζεται και βρετανική παραλλαγή γιατί εντοπίστηκε πρώτη φορά στη Βρετανία στις 14 Δεκεμβρίου 2020 καθιστώντας την, τη κυρίαρχη παραλλαγή στο Ηνωμένο

βασίλειο. Έχει μεγαλύτερη μεταδοτικότητα και συγκεκριμένες μελέτες την εκτιμούν ότι έχει 35% πιο αυξημένο κίνδυνο σοβαρής νόσου (Davies, et al., 2021).

Έχει έναν μεγάλο αριθμό γενετικών αλλαγών κυρίως στην ακίδα πρωτεΐνη που την καθιστά πιο εύκολα προσκολλημένη στα κύτταρα ξενιστές. Τρεις από αυτές τις μεταλλάξεις έχουν πιθανές βιολογικές επιδράσεις.

- ✓ Η μετάλλαξη N501Y είναι ένα από τα έξι βασικά υπολείμματα επαφής εντός της περιοχής δέσμησης υποδοχέα (RBD) και έχει αναγνωριστεί ως αυξανόμενη συγγένεια δέσμησης με το ACE2 του ανθρώπου και του ποντικού.
- ✓ Η διαγραφή ακίδων 69-70del έχει συσχετιστεί με την αποφυγή στην ανθρώπινη ανοσοαπόκριση αλλά έχει συσχετιστεί πολλές φορές σε συνδυασμό με άλλες αλλαγές της RBD.
- ✓ Η μετάλλαξη P681H είναι ακριβώς δίπλα στη θέση διάσπασης της φουρίνης, μια γνωστή θέση βιολογικής σημασίας (Rambaut, et al., 2020).

Η μετάλλαξη N501Y μπορεί να αυξήσει τη συγγένεια υποδοχέα ACE2 P681H, ένα από τα 4 κατάλοιπα που περιλαμβάνει την εισαγωγή μιας θέσης διάσπασης φουρίνης (furin) μεταξύ S1 και S2 σε ακίδα. Το N501Y έχει συσχετιστεί με αυξημένη μολυσματικότητα και σε πείραμα με ποντίκι (Rambaut, et al., 2020).

Η διαγραφή 2 αμινοξέων στις θέσεις 69-70 στην ακίδα - αυτή η μετάλλαξη είναι μία από τις πολλές επαναλαμβανόμενες διαγραφές που παρατηρούνται στην N τελική περιοχή της S ακίδας. Και έχει παρατηρηθεί σε πολλές μεταλλάξεις που συνδέονται με μεταλλάξεις στο RBD.

Άλλη μελέτη που έγινε σε αυτή τη μετάλλαξη οι ερευνητές συμπέραναν πως οι ασθενείς των οποίων τα δείγματα εμφανίζουν το προφίλ SGTF (S gene target failure) είναι πιο πιθανό να έχουν υψηλά ιικά φορτία, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει υψηλότερη μολυσματικότητα και ταχύτητα εξάπλωσης.

Έξω από την ακίδα, η μετάλλαξη ORF8 Q27 καθιστά την ORF8 ανενεργή ή την περικόπτει επιτρέποντας έτσι περαιτέρω συσσώρευση μεταγενέστερων μεταλλάξεων. Καθώς το ORF8 έχει συνήθως 121 αμινοξέα, είναι πιθανόν το κωδικόνιο διακοπής στη θέση 27 που παρατηρείται στη γενεαλογία B.1.1.7 να έχει ως αποτέλεσμα να την καθιστά ανενεργή (Rambaut, et al., 2020).

Τέλος, υπάρχουν 6 συνώνυμες μεταλλάξεις με 5 στο ORF1ab (C913T, C5986T, C14676T, C15279T, T16176C) και μία στο γονίδιο M (T26801C) (Rambaut, et al., 2020).

Σε ασθενείς με ανοσοανεπάρκεια όταν νοσούν τους χορηγείται θεραπεία με αναρρωτικό πλάσμα. Η αλληλουχία του γονιδιώματος αποκαλύπτει έναν μεγάλο αριθμό αλλαγών νουκλεοτιδίων και μεταλλάξεων διαγραφής με υψηλές αναλογίες μη συνώνυμων προς συνώνυμων αλλαγών (Rambaut, et al., 2020).

Στον ακόλουθο πίνακα, περιέχονται λεπτομέρειες με τις μη-συνώνυμες μεταλλάξεις και διαγραφές του SARS-COV-2 τα περισσότερα εκ των οποίων εμφανίζονται στην ακίδα πρωτεΐνη.

γονίδιο	νουκλεοτιδίο	αμινοξέων	
ORF1ab	C3267T	T1001I	
	C5388A	A1708D	
	T6954C	I2230T	
	11288-11296 διαγραφή	Διαγραφή SGF 3675-3677	
ακίδα	21765-21770 διαγραφή	Διαγραφή HV 69-70	
	21991-21993 διαγραφή	Διαγραφή Y144	
	A23063T	N501Y	
	C23271A	A570D	
	C23604A	P681H	
	C23709T	T716I	
	T24506G	S982A	
	G24914C	D1118H	
	Orf8	C27972T	Q27 στάση
		G28048T	R52I
		A28111G	Y73C
	N	28280 GAT-> CTA	D3L
		C28977T	S235F

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4:** Μη συνώνυμες μεταλλάξεις και διαγραφές της γενεαλογίας B.1.1.7 (Rambaut, et al., 2020).

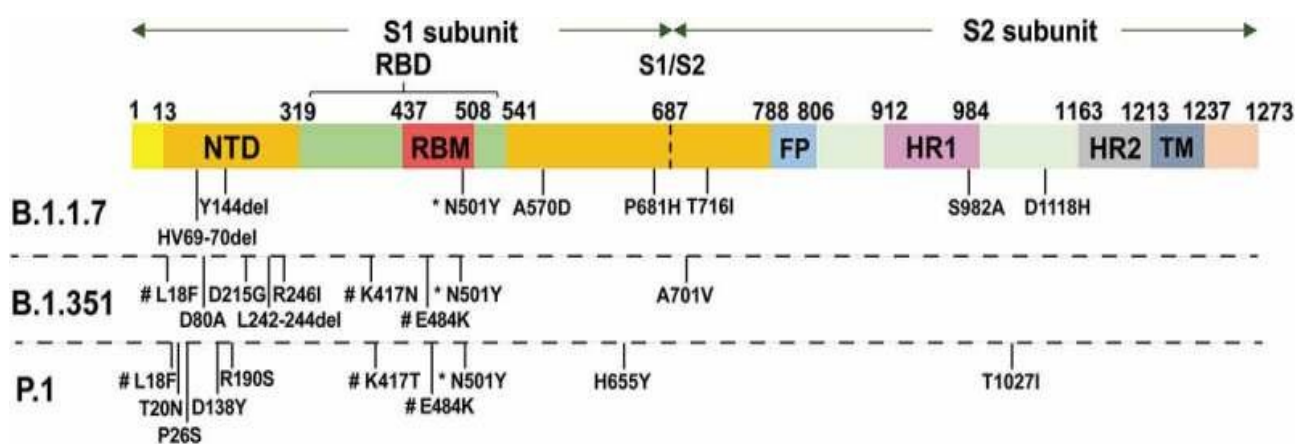
Υπάρχουν επίσης αναδυόμενες ενδείξεις πως τα άτομα με την μετάλλαξη N501Y μπορεί να φέρουν υψηλότερο ιικό φορτίο και να είναι μολυσματικά για μεγαλύτερο διάστημα (Kissler, et al., 2021). Σε άλλη μελέτη που έγινε, παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη διάρκεια της επιμονής του SARS-CoV-2 RNA σε ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα σε άτομα με λοίμωξη γενεαλογίας B.1.1.7 (16 ημέρες) σε σύγκριση με αυτά που μολύνθηκαν από άλλες γενεαλογίες (14 ημέρες) (Calistri, et al., 2021)

Όσον αφορά τους εμβολιασμούς, έγιναν αρκετές μελέτες κατά πόσο ο συγκεκριμένος τύπος μετάλλαξης μπορεί να διαφύγει από την ανοσία που προσφέρουν τα εξεταζόμενα εμβόλια. Στην μελέτη των Collier et al, έδειξαν ότι 10 από τους 23 ορούς από συμμετέχοντες που έλαβαν μία δόση εμβολίου Pfizer / BioNTech εμφάνισαν μειωμένη εξουδετέρωση έναντι της παραλλαγής B.1.1.7 (αλλαγή φορές > 3) και η υψηλότερη αλλαγή πτυχής ήταν περίπου 6 με διάμεση πτυχή αλλαγής τα 3,85 (Collier, et al., 2021). Για το εμβόλιο της Moderna SARS-Co-2 Moderna mRNA (mRNA-1273) τα αποτελέσματα δεν αποκάλυψαν σημαντικές διαφορές με αυτό της Pfizer / BioNTech (Wang, et al., 2021). Για το εμβόλιο της AstraZeneca-Oxford οι τίτλοι εξουδετέρωσης των ορών στις 14 και 28 ημέρες μετά τη δεύτερη δόση έδειξαν 2,5 φορές (γεωμετρικός μέσος όρος,  $n = 15$ ,  $p \leq 0,0001$ ) και 2,1 φορές ( γεωμετρική μέση,  $n = 10$ ,  $p < 0,002$ ) μείωση έναντι του στελέχους B.1.1.7, αντίστοιχα (Supasa, et al., 2021).

Συμπερασματικά, παρόλο που αυτές οι *in vitro* μελέτες έχουν τους περιορισμούς τους είτε μεθοδολογία κατά μέγεθος δείγματος, είτε λαμβάνοντας υπόψη μόνο το χυμικό σκέλος της ανοσολογικής απόκρισης, αυτό που δείχνουν είναι ότι η αποτελεσματικότητα των εμβολίων που έχουν χορηγηθεί είναι παρόμοια ή μέτρια χαμηλότερη έναντι η παραλλαγή B.1.1.7 (Gómez, et al., 2021).

### ΠΑΡΑΛΛΑΓΗ B.1.351 (20H / 501Y.V2) :

Η παραλλαγή αυτή γνωστή και ως 20H / 501Y.V2 ή Αφρικανική, εμφανίστηκε στη Νότια Αφρική το Δεκέμβριο του 2020 και το πρώτο κλινικό δείγμα προσδιορίστηκε τον Οκτώβριο του ίδιου χρόνου και μετά από ένα μήνα αντικατέστησε τους άλλους ιούς κάνοντάς της την κυρίαρχη στην ευρύτερη περιοχή (Galan, et al., 2005). Αυτή η συμπεριφορά υποδηλώνει υψηλότερα ποσοστά μετάδοσης, αν και μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί ένδειξη μεγαλύτερης μολυσματικότητας ή σοβαρότητας της νόσου. Από τις 16 Φεβρουαρίου 2021, 1383 ακολουθίες της γενεαλογίας B.1.351 έχουν εντοπιστεί σε 35 χώρες, ενώ οι 40 έχουν αναφέρει περιπτώσεις που σχετίζονται με αυτήν την παραλλαγή (O'Toole, et al., 2021). Περιέχει 9 μεταλλάξεις ακίδων (L18F, D80A, D215G, LAL 242–244 del, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G και A701V) και D614G συμπεριλαμβανομένου ενός συμπλόκου μεταλλάξεων στην NTD (π.χ. 242–244del και R246I), τρεις μεταλλάξεις στην RBD (K417N, E484K και N501Y) και μία μετάλλαξη (A701V) κοντά στο σημείο διάσπασης της φουρίνης (Wang, et al., 2021; Bian, et al., 2021)



**Εικόνα 34:** Σχηματικό διάγραμμα θέσεων μεταλλάξης για τις παραλλαγές B.1.1.7, B.1.351 και P.1

\* Η μετάλλαξη υπάρχει και στις τρεις παραλλαγές. Η μετάλλαξη που υπάρχει στις παραλλαγές B.1.351 και P.1. ιδιαίτερα, η μετάλλαξη στη θέση 417 είναι ασπαραγίνη (N) στην παραλλαγή B.1.351 και θρεονίνη (T) στην παραλλαγή P.1. NTD, N-τελική περιοχή; RBD, περιοχή δέσμευσης υποδοχέα; RBM, μοτίβο δέσμευσης υποδοχέα; FP, πεπτίδιο σύντηξης; HR, επανάληψη επτάδων. TM, διαμεμβρανική περιοχή (Bian, et al., 2021).

Ωστόσο, ο υψηλός αριθμός μεταλλάξεων που συσσωρεύονται σε 2 από τις πιο ανοσοεξαρτώμενες περιοχές της πρωτεΐνης S, όπως οι περιοχές NTD και RBD, υποδηλώνει ότι θα μπορούσε επίσης να προέρχεται ως παραλλαγή διαφυγής στην εξουδετέρωση. Έτσι, υπάρχει ανησυχία ως προς την αποτελεσματικότητα των εμβολίων σε αυτήν την παραλλαγή (Gómez et al., 2021). Ο συνδυασμός

των μεταλλάξεων E484K, K417N και N501Y έχει ως αποτέλεσμα τον υψηλότερο βαθμό διαμορφωτικών αλλαγών του S RBD όταν δεσμεύεται στο hACE2, σε σύγκριση με το E484K ή το N501Y μόνο. Και το E484K και το N501Y, αυξάνουν τη συγγένεια της S RBD για το hACE2 και το E484K, αλλάζει ιδιαίτερα το φορτίο στην περιοχή εύκαμπτου βρόχου της RBD που οδηγεί στο σχηματισμό νέων ευνοϊκών επαφών (Nelson, et al., 2021).

Σύμφωνα με μελέτες στις μεταλλάξεις αυτής της παραλλαγής έχει αναφερθεί σημαντική μείωση της ικανότητας εξουδετέρωσης των πολυκλωνικών αντισωμάτων που χορηγούνται σε νοσοκομειακούς ασθενείς που αναρρώνουν από B.1.351 με σοβαρά συμπτώματα, δεδομένα που δείχνουν μια πιθανή μείωση της αποτελεσματικότητας των μονοκλωνικών και πολυκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται σε θεραπείες. Επίσης υπάρχουν επαναμολύνσεις σε περιοχές όπου επικρατεί η παραλλαγή αυτή (Gómez, et al., 2021).

Όσον αφορά τα εμβόλια, μελέτες που έγιναν με τα εμβόλια της AstraZeneca Johnson-Johnson και Novartis έδειξαν μειωμένη αποτελεσματικότητα έναντι αυτής της παραλλαγής (Bian, et al., 2021). Για το εμβόλιο της Pfizer έγινε μελέτη έναντι των μεταλλάξεων E484K ή N501Y ή ο συνδυασμός K417N: E484K: N501Y, αναφέροντας μειωμένη δραστηριότητα στις αποκρίσεις αντισωμάτων (Wibmer, et al., 2021). Για το εμβόλιο της Moderna, το Φεβρουάριο ανακοινώθηκε ότι παρήγαγε μόνο το 1/6 των αντισωμάτων ως απάντηση στην παραλλαγή αυτή σε σύγκριση με τον αρχικό ιό (Wikipedia, 2021).

### **ΠΑΡΑΛΛΑΓΗ D614G :**

Σε αυτή την παραλλαγή έχουμε αντικατάσταση ασπαρτικού οξέως (D614) στη θέση 614 της S πρωτεΐνης με γλυκίνη (G614). Έχει υψηλή μολυσματικότητα και μεταδοτικότητα από το αρχικό στέλεχος. Παρατηρήθηκε επίσης πιο μεγάλο ιικό φορτίο στον ρινοφάρυγγα των ασθενών γεγονός που υποδηλώνει πως η υποκατάσταση D614G μπορεί να αυξήσει την προσαρμοστικότητα του ιού στους ανθρώπους χωρίς να προκαλέσει πιο σοβαρή ασθένεια. Τέλος, δεν φαίνεται να επηρεάζει την αποτελεσματικότητα των εμβολίων (Bian, et al., 2021).

### **ΠΑΡΑΛΛΑΓΗ P.1:**

Ανακαλύφθηκε πρώτα στην Ιαπωνία σε ταξιδιώτες από Βραζιλία όπου εκεί βρίσκεται ως κυρίαρχη. Ανήκει στην γενεαλογία B.1.1.28 και περιέχει έναν μοναδικό αστερισμό μεταλλάξεων που καθορίζουν τη γενεαλογία περιλαμβάνοντας σημαντικές μεταλλάξεις στην RBD, όπως E484K, K417T και N501Y (Bian, et al., 2021). Περιέχει 17 μη συνώνυμες μεταλλάξεις: [L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I και V1176F] στη πρωτεΐνη S, [S1188L, K1795Q και E5665D] σε ORF1ab, [E92K] σε ORF8 και [P80K] στην N

πρωτεΐνη, 1 διαγραφή: [SGF 3675-3677del] στο ORF1ab και 4 συνώνυμες μεταλλάξεις. Λόγω των πολλών μεταλλάξεων στην ακίδα S, έχουμε σημαντικές συνέπειες στην μετάδοση, στους ρυθμούς επαναμόλυνσης και αποφυγής της ανοσίας (Gómez, et al., 2021). Μελέτη στη Βραζιλία ανέφεραν ότι το εμβόλιο της εταιρείας Sinovac (CoronaVac), ήταν 50,38% αποτελεσματικό (nature, 2021) (Gómez, et al., 2021).

### **ΠΑΡΑΛΛΑΓΗ N439K:**

Ανακαλύφθηκε πρώτη φορά στην Σκωτία τον Μάρτιο του 2020 και είναι η 2<sup>η</sup> πιο συχνή μετάλλαξη στην περιοχή RBD. Έχει αντίσταση σε αρκετά μονόκλωνα αντισώματα εξουδετέρωσης και μειώνει την δραστηριότητα των πολυκλωνικών ορών από άτομα που έχουν αναρρώσει από την νόσο. Η επίδραση στην ανοσολογική προστασία των εμβολίων έναντι της N439K δεν έχει ακόμη διερευνηθεί (Bian, et al., 2021).

### **ΠΑΡΑΛΛΑΓΗ Delta Variant of Concern (VOC) :**

Η γενεαλογία SARS-CoV-2 B.1.617 περιλαμβάνει τρεις κύριους υποτύπους (B1.617.1, B.1.617.2 και B.1.617.3), που φιλοξενούν διαφορετικές μεταλλάξεις της πρωτεΐνης Spike στην αμινοτελική περιοχή (NTD) και στον τομέα δέσμευσης υποδοχέα (RBD) που μπορεί να αυξήσουν το ανοσοποιητικό τους δυναμικό διαφυγής (Planas, et al., 2021). Η παραλλαγή Delta είναι γνωστή ως Ινδικό VOC γιατί εντοπίστηκε στην Ινδία στα τέλη του 2020 ή αλλιώς B 1.617.2. Είναι μία από τις παραλλαγές που παρουσιάζουν σημαντική αύξηση κρουσμάτων με ταχεία αντικατάσταση των προηγούμενων παραλλαγών σε πολλές χώρες (Campbell, et al., 2021). Έχει ανιχνευτεί σε τουλάχιστον 94 χώρες και σε 52 πολιτείες των ΗΠΑ. Πολλές μεταλλάξεις βρίσκονται πάνω στα ανοιχτά πλαίσια ORF1a και ORF1b του γονιδιώματος, καθώς επίσης στην S ακίδα του ιού και την N πρωτεΐνη του (Outbreak.info, 2021). Η νέα αυτή παραλλαγή χαρακτηρίζεται από υψηλή μεταδοτικότητα σε κλειστούς χώρους και οι έρευνες τώρα στοχεύουν στο πόσο τα υπάρχοντα εμβόλια μας προστατεύουν έναντι της συγκεκριμένης παραλλαγής (Dougherty, et al., 2021). Η μετάλλαξη L452R στην ακίδα του ιού, είναι μια υποκατάσταση στην θέση 452 λευκίνης - αργινίνης που παρέχει ισχυρότερη συγγένεια μεταξύ της ακίδας πρωτεΐνης και του υποδοχέα των κυττάρων ACE2 πράγμα που βοηθά στην αύξηση της μεταδοτικότητάς του. Παρουσιάζει επιπλέον μειωμένη αποτελεσματικότητα η θεραπεία με μονόκλωνα αντισώματα (Starr, et al., 2021). Η χορήγηση 2 δόσεων Pfizer ή AstraZeneca δημιούργησε μια εξουδετερωτική απόκριση στο 95% των ατόμων. Οι οροί από αναρρωτικούς ασθενείς που συλλέχθηκαν έως και 12 μήνες μετά τα συμπτώματα ήταν 4 φορές λιγότερο ισχυροί έναντι της παραλλαγής Delta, σε σχέση με την παραλλαγή Alpha (B.1.1.7) (Planas, et al., 2021).

ΕΤΙΚΕ ΤΑ ΑΠΟ WHO	ΓΕΝΕΟ ΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΘ ΕΤΕΣ ΜΕΤΑΛ ΛΑΞΕΙΣ	ΧΩΡΑ ΠΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΤΗ ΚΕ ΓΙΑ ΠΡΩΤΗ ΦΟΡΑ	ΜΕΤΑΛΛΑΞΕ ΙΣ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ ΤΟΣ ΠΑΝΩ ΣΤΗΝ ΑΚΙΔΑ	ΕΤΟΣ ΚΑΙ ΜΗΝΑΣ ΠΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΤ ΗΚΕ	ΑΠΟΔΕΙΚΤΙΚ Α ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΤΙΚΤΥΠΟ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΛΟΤΙΚΟ ΤΗΤΑ	ΑΠΟΔΕΙΚ ΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΤΟΝ ΑΝΤΙΚΤΥ ΠΟ ΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ	ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΤΙΚΤΥ ΠΟ ΤΗΣ ΣΟΒΑΡΟΤ ΗΤΑΣ	ΔΙΑΒΙΒΑΣΗ ΣΕ ΕΕ/ΕΟΧ
<b>Alpha</b>	B.1.1.7	ΒΡΕΤΑΝΙΑ	N501Y, D614G, P681H	ΣΕΠΤΕΜΒ. 2020	ΝΑΙ (N)	ΟΧΙ	ΝΑΙ (N)	ΚΥΡΙΑΡΧΟ
	B.1.1.7+ E484K	ΒΡΕΤΑΝΙΑ	E484K, N501Y, D614G, P681H	ΔΕΚΕΜΒΡ. 2020	ΝΑΙ (N)	ΕΞΟΥΔΕΤΕ ΡΩΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΤΩΝ (N)	ΝΑΙ (N)	ΚΡΟΥΣΜΑΤΑ
<b>Beta</b>	B.1.351	Ν.ΑΦΡΙΚΗ	K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V	ΣΕΠΤΕΜΒ. 2020	ΝΑΙ (N)	ΔΙΑΦΥΓΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΟΣΙΑ ΤΟΥ ΕΜΒΟΛΙΟ Υ (N)	ΝΑΙ (N)	ΚΟΙΝΟΤΗΤΑ
<b>Gamma</b>	P.1	ΒΡΑΖΙΛΙΑ	K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y	ΔΕΚΕΜΒΡ. 2020	ΝΑΙ (N)	ΕΞΟΥΔΕΤΕ ΡΩΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΤΩΝ (N)	ΝΑΙ (N)	ΚΟΙΝΟΤΗΤΑ
<b>Delta</b>	B.1.617.2	ΙΝΔΙΑ	L452R, T478K, D614G, P681R	ΔΕΚΕΜΒΡ. 2020	ΝΑΙ (N)	ΔΙΑΦΥΓΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΟΣΙΑ (N)	ΝΑΙ (N)	ΚΟΙΝΟΤΗΤΑ
<b>Eta</b>	B.1.525	ΝΙΓΗΡΙΑ	E484K, D614G, Q677H	ΔΕΚΕΜΒΡ. 2020	ΔΕΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΘΕΙ ΑΚΟΜΑ	ΕΞΟΥΔΕΤΕ ΡΩΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΤΩΝ (M)	ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗ ΘΕΙ ΑΚΟΜΑ	ΚΟΙΝΟΤΗΤΑ

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5:** Συγκεντρωτικός πίνακας με τις παραλλαγές που ενδιαφέρουν (N) τα στοιχεία συλλέγονται από την ίδια την παραλλαγή και (M) τα στοιχεία συλλέγονται από μεταλλάξεις των παραλλαγών: ΠΗΓΗ (Control, European Centre for Disease Prevention and, 2021)

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

Το γονιδίωμα του SARS-COV-2 είναι ένα RNA θετικής πολικότητας. Η πιθανότητα μετάλλαξης ενός τέτοιου γονιδιώματος είναι υψηλή ανά κύκλο αναπαραγωγής καθώς είναι επιρρεπή σε μη διορθωμένα σφάλματα κατά την αντιγραφή. Αποτελείται από 13-15 (12 λειτουργικά) ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης τα ORFs, τα δύο πρώτα, τα ORF1a και ORF1b αποτελούν τα δύο τρίτα του ιικού γονιδιώματος. Αυτά μεταφράζονται σε 2 πολυπρωτεΐνες όπου κωδικοποιούν τις 16 μη δομικές πρωτεΐνες (NSPs), ενώ τα υπόλοιπα ORFs κωδικοποιούν δομικές ( M, N, E, S) και βοηθητικές πρωτεΐνες.

Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στις μη δομικές πρωτεΐνες και στον ρόλο τους που παίζουν στην αντιγραφή/αναπαραγωγή/μετάφραση, διόρθωση σφαλμάτων, την παθογένεια, την ανοσοαποφυγή και την μολυσματικότητα του ιού. Μερικές από τις μη δομικές πρωτεΐνες NSPs μαζί με μερικούς παράγοντες των ξενιστών σχηματίζουν ένα σύμπλοκο αντιγραφής-μεταγραφής (RTC) μέσα σε κυστίδια διπλής μεμβράνης (DMV). Το σύμπλοκο RTCs είναι ο κεντρικός κόμβος για την αντιγραφή και μεταγραφή του ιού γονιδιώματος. Η μη δομική πρωτεΐνη NSP1 παίζει κρίσιμο ρόλο στον κύκλο ζωής του κορωνοϊού και η κατανόηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας της NSP1 είναι για να αξιοποιηθεί πλήρως τόσο για την ανάπτυξη αντικών όσο και για το σχεδιασμό εμβολίων. Η NSP2, συνδέεται με πρωτεΐνες ξενιστές και διαταράσσει το περιβάλλον των κυττάρων των ξενιστών όμως ακόμα έχουμε πολλά να μάθουμε για τον ακριβή ρόλο του γιατί ακόμα δεν έχει αποσαφηνιστεί. Η NSP3 παίζει πολλαπλούς ρόλους όπως στην αντιγραφή του ιού και τη ρύθμιση της σηματοδότησης IRF3 και NF-kappaB αλλά ακόμα δεν ξέρουμε τον ακριβή ρόλο του και μένει μελλοντικά να διευκρινιστεί. Η NSP6, υπάρχει και στους α και β κορωνοϊούς, εντοπίζει το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και δημιουργεί αυτοφαγосώματα. Έχει παρουσιάσει μεταλλάξεις για παράδειγμα η παρουσία πολλών υπολειμμάτων φαινυλαλανίνης στην εξωτερική του μεμβράνη προκαλεί πιο σταθερή σύνδεση της με το ενδοπλασματικό δίκτυο και έχει αποδειχθεί ότι αυτή η δέσμευση μπορεί να ευνοεί τη μόλυνση από κορωνοϊό, διακυβεύοντας την ικανότητα των αυτοφαγосωμάτων να απελευθερώνουν ιικά συστατικά στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση. Ο ρόλος της αυτοφαγίας στη ιογενή λοίμωξη είναι ένα δίκκοπο μαχαίρι και δεν έχουμε άμεσες ενδείξεις ότι η μετάλλαξη της NSP6 ευνοεί στην πραγματικότητα την αντιγραφή του ιού και την αποφυγή από την κυτταρική ανοσία ή το αντίθετο. Η μετάλλαξη αυτή μπορεί να επιφέρει κάποια σημαντική αλλαγή στην έκφραση της σχέσης SARS-CoV-2 με τον ξενιστή του, ιδίως όσον αφορά μια κρίσιμη αντική άμυνα του ξενιστή, όπως ο μηχανισμός της λυσοσωμικής αυτοφαγίας.

Όσον αφορά το RTC η οποία αποτελείται από το RdRp και από διάφορες μη δομικές πρωτεΐνες, μένει να καθοριστεί ο τρόπος με τον οποίο συνδέονται αυτοί οι παράγοντες για τον σχηματισμό του



καθώς και τις λειτουργίες του. Επίσης, δεν είναι γνωστό με ποιους μηχανισμούς η συγκεκριμένη πολυμεράση ξεκινά την σύνθεση του RNA και πως αλλάζει μητρικά πρότυπα.

Όσον αφορά τις δομικές πρωτεΐνες, αυτή που μας ενδιαφέρει περισσότερο είναι η ακίδα S καθώς αυτή εμπλέκεται στην σύνδεση με τους υποδοχείς των κυττάρων για την επικείμενη σύντηξη και τελικά την παραγωγή νέων ιικών σωματιδίων. Αυτή συνδέεται με το ACE2 των κυττάρων προκειμένου να μπει στο κύτταρο. Όμως πολλές μεταλλάξεις πάνω στην ακίδα έχουν κάνει τον ιό πιο μεταδοτικό και ίσως πιο επιθετικό και υπάρχει παρακολούθηση αυτών των νέων παραλλαγών και των μεταλλάξεων που έχουν εμφανιστεί, κυρίως αυτών με τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Η παρατηρούμενη αύξηση της αποτελεσματικότητας δέσμευσης της S-γλυκοπρωτεΐνη στον υποδοχέα ξενιστή μπορεί να σχετίζεται με τις μεταλλάξεις κωδικονίων που παρατηρούνται στην πρωτεϊνική αλληλουχία, με αποτέλεσμα μια εύλογη αύξηση της ειδικής θέσης εναρκτήριας δράσης πρωτεασών και καθεψινών, οδηγώντας στην εξαιρετικά μεταδοτική φύση του SARS-CoV-2 σε σύγκριση με τους SARS και MERS. Επίσης η ακίδα έχει αποτελέσει στόχο για την ανάπτυξη εμβολίων και θεραπευτικών ουσιών λόγω αυτής της προσκόλλησης των κυττάρων και της εισόδου στο κύτταρο.

Η μεταδοτικότητα του SARS-COV-2 εξαρτάται πρώτον από τη δομή του ιού και την ικανότητα του να ενωθεί με το κύτταρο ώστε να γίνει η σύντηξη ιού και κυττάρου ξενιστή, κυρίως αφορά την ακίδα αφού αυτή εμπλέκεται στην πρόσδεση με τους υποδοχείς των κυττάρων. Οι μεταλλάξεις πάνω στην ακίδα τις περισσότερες φορές ευνοούν τις συνθήκες πρόσδεσης. Επίσης η μετάδοση και μεταδοτικότητα του ιού εξαρτάται από το μέγεθος του, αλλά και από ένα πλήθος άλλων εξωτερικών παραγόντων ή περιβαλλοντικών. Δηλαδή εξαρτάται από τον τρόπο που προσέχουμε εμείς οι άνθρωποι τις επαφές μας, εάν χρησιμοποιούμε μάσκα ή εάν πλένουμε συχνά τα χέρια μας. Από ασυμπτωματικούς ασθενείς όπου δεν ξέρουμε εάν νοσούν, από τις πρώτες μέρες των συμπτωμάτων που γίνεται πιο μεταδοτικός ο ιός, το ικό φορτίο κλπ. Αλλά εξαρτάται και από την ικανότητα του ιού να επιζεί σε επιφάνειες όπου διάφορες μελέτες δείχνουν διαφορετικό χρόνο ημιζωής σε χαρτόνι, χαλκό, γυαλί κλπ. Από την θερμοκρασία όπου σε υψηλότερες τιμές έχει λιγότερο χρόνο ημιζωής αλλά και από το φως όπου η ακτινοβολία του ηλίου μπορεί να τον αδρανοποιήσει σε 90 λεπτά. Αυτές οι μολυσμένες επιφάνειες μπορεί να μεταδώσουν τον ιό στον άνθρωπο.

Τελικά, όσα περισσότερα ξέρουμε για τη λειτουργία των πρωτεϊνών του SARS-COV-2 αλλά και άλλων δομικών παραγόντων, στο πως δρουν, αναπαράγονται, μεταφράζονται, αποφεύγουν την ανοσοαπόκριση κλπ., Γνώση για τι ικανότητες έχει ο ιός, την μετάδοση του, τη μεταδοτικότητα, την ικανότητα επιβίωσης σε περιβαλλοντικούς χώρους, όλα αυτά τα στοιχεία θα μας δώσουν την γνώση προκειμένου να αμυνθούμε στην νέα απειλή covid-19, είτε με την χρήση εμβολίων είτε με θεραπευτικές ουσίες.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Arndt, A., Larson, B., & Hogue, B. (2010, Nov.). A Conserved Domain in the Coronavirus Membrane Protein Tail Is Important for Virus Assembly. *J Virol.*(84), pp. 11418–11428. doi:10.1128/JVI.01131-10
- Aboubakr, H., Sharafeldin, T., & Goyal, S. (2020, jul 14). Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions: A review. *Transbound Emerg Dis*(10), p. 13707. doi:10.1111/tbed.13707
- Alam, I., Kaumau, A., Kulmanov, M., Jaremko,, K., Arold, S., Pain, A., . . . Duarte, C. (2020, JUL. 27). Functional Pangenome Analysis Shows Key Features of E Protein Are Preserved in SARS and SARS-CoV-2. *Front Cell Infect Microbiol*(10), p. 405. doi:10.3389/fcimb.2020.00405
- Al-Qaaneh, A., Alshammari, T., Aldahhan, R., Aldossary, H., Alkhalifah, A., & Borgio, J. (2021, Jan 6). Genome composition and genetic characterization of SARS-CoV-2. *Saudi J Biol Sci.* (28), pp. 1978–1989. doi:10.1016/j.sjbs.2020.12.053
- Amato, L., Puglia, I., Cito, F., Giuseppe, A., Danzetta, M., Morelli, D., . . . Lorusso, A. (2021, MAR. 05). Infection sustained by lineage B.1.1.7 of SARS-CoV-2 is characterised by longer persistence and higher viral RNA loads in nasopharyngeal swabs. *Int J Infect Dis*(105), pp. 753–755. doi:10.1016/j.ijid.2021.03.005
- Anand, K., Zieburhr, J., Wadhwani, P., Mesters, J., & Hilgenfeld, R. (2003, MAY 13). Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science*, 300(5626), pp. 1763-1767. doi:10.1126/science.1085658
- Andersen, K., Rambaut, A., Lipkin, W., Holmes, E., & Garry, R. (2020, MARCH). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*(17), pp. 1-3. doi:10.1038/s41591-020-0820-9
- Angeletti, S., Benvenuto, D., Bianchi, M., Giovanetti, M., Pascarella, S., & Ciccozzi, M. (2020, febr. 28). COVID-2019: The role of the nsp2 and nsp3 in its pathogenesis. *J Med Virol.*, 1002(10), p. 25719. doi:10.1002/jmv.25719
- Angelini, M., Akhlaghpour, M., Neuman, B., & Buchmeier, J. (2013). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nonstructural Proteins 3, 4, and 6 Induce Double-Membrane Vesicles. *ASM Journals*, 4(4). doi:https://doi.org/10.1128/mBio.00524-13
- Artika, I., Dewantari, A., & Wiyatno, A. (2020, August). Molecular biology of coronaviruses: current knowledge. *Heliyon*, 6(8), p. e04743. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04743

- Arya, R., Kumari, S., Pandey, B., Mistry, H., Bihani, S., Das, A., . . . Kumar, M. (2021, jan. 22). Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of Molecular Biology*, 433(2). doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.024>
- Azuma, k., Yanagi, U., Kagi, N., Kim, H., Ogata, M., & Hayashi, M. (2020, NOV. 03). Environmental factors involved in SARS-CoV-2 transmission: effect and role of indoor environmental quality in the strategy for COVID-19 infection control. *Environ Health Prev Med*(25), p. 66. doi:10.1186/s12199-020-00904-2
- B.Laguipo, A. (2021, JAN 22). *SARS-CoV-2's nonstructural proteins dysregulate immune responses, study finds*. Retrieved from NEWS MEDICAL LIFE SCIENCES: <https://www.news-medical.net/news/20210122/SARS-CoV-2e28099s-nonstructural-proteins-dysregulate-immune-responses-study-finds.aspx>
- Balaraman, V., Drolet, B., Mitzel, D., Wilson, W., Owens, J., Gaudreault, N., . . . Nayduch, D. (2021, APRIL 20). Mechanical transmission of SARS-CoV-2 by house flies. *Parasit Vectors*, p. 214. doi:10.1186/s13071-021-04703-8
- Benvenuto, D., Angeletti, S., Giovanetti, M., Bianchi, M., Pascarella, S., Cauda, R., . . . Cassoneg, A. (2020, APRIL 10). Evolutionary analysis of SARS-CoV-2: how mutation of Non-Structural Protein 6 (NSP6) could affect viral autophagy. *J Infect*(81), pp. e24–e27. doi:10.1016/j.jinf.2020.03.058
- Betram, S., Glowacka, I., Müller, M., Lavender, H., Gnirss, K., Nehlmeier, I., . . . Pöhlmann, S. (2011, Nov. 23). Cleavage and Activation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein by Human Airway Trypsin-Like Protease. *Journal of Virology*, 85(24). doi:<https://doi.org/10.1128/JVI.05300-11>
- Bian, L., Gao, F., Zhang, J., He, Q., Mao, Q., Xu, M., & Liang, Z. (2021, febr. 19). Effects of SARS-CoV-2 variants on vaccine efficacy and response strategies. *Expert Review of Vaccines*, 20(4), pp. 365-373. doi:10.1080/14760584.2021.1903879
- Bianchi, M., Benvenuto, D., Giovanetti, M., Angeletti, S., Ciccozzi, M., & Pascarella, S. (2020, MAY 30). Sars-CoV-2 Envelope and Membrane Proteins: Structural Differences Linked to Virus Characteristics. *BioMed Research International*, 2020, p. 6. doi:<https://doi.org/10.1155/2020/4389089>
- Brasier, A. (2006, June 6). The NF- $\kappa$ B regulatory network. *Cardiovascular Toxicology*(6), pp. 111–130. doi:10.1385/CT:6:2:111

- Brockway, S., & Denison, M. (2005, SEPT. 30). Mutagenesis of the murine hepatitis virus nsp1-coding region identifies residues important for protein processing, viral RNA synthesis, and viral replication. *Virology*(340), pp. 209–223. doi:10.1016/j.virol.2005.06.035
- Campbell, F., Archer, B., Laurenson-Schafer, H., Jinnai, Y., Konings, F., Batra, N., . . . le Polain de Waroux, O. (2021, JUNE 17). Increased transmissibility and global spread of SARS-CoV-2 variants of concern as at June 2021. *Euro Surveill.*, 26(24), p. 2100509. doi:10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100509
- Capital.gr. (2020, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 29). Ιντερφερόνη: Ένας ακόμη πιθανός δείκτης για τη σοβαρή νόσηση από κορονοϊό. Retrieved from <https://www.capital.gr/health/3484007/interferoni-enas-akomi-pithanos-deiktis-gia-ti-sobari-nosisi-apo-koronoio>
- capital.gr. (2021, 5 Γεναρη). *capital.gr.* Retrieved from <https://www.capital.gr/health/3506764/koronoios-ti-xeroume-gia-tis-duo-metallaxeis-pou-prokaloun-anisuxia>
- Carr, C., & Kim, P. (1993, MAY 22). A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin. *Cell*, 73(4), pp. 823-832. doi:10.1016/0092-8674(93)90260-W
- Center for Disease Control and Prevention. (2021, MAY 12). *SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions*. Retrieved from CDC: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/variant-surveillance/variant-info.html>
- Chan, J., Kok, K., Zhu, Z., Chu, H., To, K., Yuan, S., & Yuen, K. (2020, Jan. 28). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect.*(9), pp. 221–236. doi:10.1080/22221751.2020.1719902
- Chang, C., Hou, M., Chang, C., Hsiao, C., & Huang, T. (2014). The SARS coronavirus nucleocapsid protein – Forms and functions. *Antiviral Res.*(103), pp. 39–50. doi:10.1016/j.antiviral.2013.12.009
- Chang, L., Zhao, L., Gong, H., Wang, L., & Wang, L. (2020, june 21). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 RNA Detected in Blood Donations. *Emerg Infect Dis*, pp. 1631–1633. doi:10.3201/eid2607.200839
- Chen, Y., Su, C., Ke, M., Jin, X., Xu, L., Zhang, Z., . . . Guo, D. (2011, OCTOB. 13). Biochemical and Structural Insights into the Mechanisms of SARS Coronavirus RNA Ribose 2'-O-Methylation by nsp16/nsp10 Protein Complex. *PLoS Pathog.*(7), p. e1002294. doi:10.1371/journal.ppat.1002294

- Cheng, A., Zhang, W., Xie, Y., Jiang, W., Arnold, E., Sarafianos, S., & Ding, J. (2005, MAY 10). Expression, purification, and characterization of SARS coronavirus RNA polymerase. *Virology*.(335), pp. 165-176. doi:10.1016/j.virol.2005.02.017
- Cheng, H., Jian, S., & Liu, D. (2020, MAY 1). Contact Tracing Assessment of COVID-19 Transmission Dynamics in Taiwan and Risk at Different Exposure Periods Before and After Symptom Onset. *JAMA Intern Med*, 180(9), pp. 1156-1163. doi:10.1001/jamainternmed.2020.2020
- Chin, A., Chu, J., Perera, M., Hui, K., Yen, H., Chan, M., . . . Poon, L. (2020, APRIL 2). Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *Lancet Microbe*, 1(1), p. e10. doi:10.1016/S2666-5247(20)30003-3
- Clark, L., Green, T., & Petita, C. (2021). Structure of Nonstructural Protein 1 from SARS-CoV-2. *Journal of Virology*, 95(4). doi:https://doi.org/10.1128/JVI.02019-20
- Collier, D., De Marco, A., Ferreira, I., Meng, B., Datir, R., Walls, A., . . . Gupta, R. (2021). Impact of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Spike variant on neutralisation potency of sera from individuals vaccinated with Pfizer vaccine BNT162b2. *nature*(593), pp. 136–141. doi:10.1038/s41586-021-03412-7
- Cong, Y., Kriegenburg, F., de Haan, C., & Reggiori, F. (2017). Coronavirus nucleocapsid proteins assemble constitutively in high molecular oligomers. *Scientific Reports*(7), p. 5740. doi:https://doi.org/10.1038/s41598-017-06062-w
- Control, E. C. (2021, July 8). *SARS-CoV-2 variants of concern as of 8 July 2021*. Retrieved from ECDC: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>
- Das, A., Ahmed, R., Akhtar, S., Begum, K., & Banu, S. (2021). An overview of basic molecular biology of SARS-CoV-2 and current COVID-19 prevention strategies. *Gene Reports*, 23(101122). doi:https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101122
- Davies, N., Barnard, R., Jarvis, C., Kucharski, A., Munday, J., Pearsons, C., . . . Edmunds, W. (2021, April 21). Estimated transmissibility and severity of novel SARS-CoV-2 Variant of Concern 202012/01 in England. *Science*, 372(6538). doi:10.1126/science.abg3055
- Davies, N., Jarvis, C., Edmunds, W., Jewell, N., Diaz-Ordaz, K., & Keogh, R. (2021, FEBR. 03). Increased hazard of death in community-tested cases of SARS-CoV-2 Variant of Concern 202012/01. *nature*(593), pp. 270–274. doi:10.1038/s41586-021-03426-1
- Decroly, E., Debarnot, C., Ferron, F., Bouvet, M., Coutard, B., Imbert, I., . . . Canard, B. (2011, MAY 26). Crystal Structure and Functional Analysis of the SARS-Coronavirus RNA Cap

2'-O-Methyltransferase nsp10/nsp16 Complex. *PLoS Pathog*(7), p. e1002059.  
doi:10.1371/journal.ppat.1002059

Dhama, K., Khan, s., Tiwari, R., Sircar, S., Bhat, S., Malik, Y., . . . Rodriguez Morales, A. (2020, October). Coronavirus Disease 2019–COVID-19. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(4).  
doi:DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00028-20>

Dougherty, K., Mannell, M., Naqvi, O., Matson, D., & Stone, J. (2021, July 9). SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta) Variant COVID-19 Outbreak Associated with a Gymnastics Facility — Oklahoma, April–May 2021. *Weekly*, 70(28), pp. 1004–1007.  
doi:10.15585/mmwr.mm7028e2

Duart, G., Garsia-Murria, M., & Mingarro, I. (2021, JUN 1). The SARS-CoV-2 envelope (E) protein has evolved towards membrane topology robustness. *Biochim Biophys Acta Biomembr*(1863), p. 183608. doi:10.1016/j.bbamem.2021.183608

Duart, G., Murria, J., Grau, B., Acosta-Cáceres, J., Martínez-Gil, L., & Mingarro, I. (2020, SEPT. 10). SARS-CoV-2 envelope protein topology in eukaryotic membranes. *Open Biol.*, 10(9), p. 200209. doi:10.1098/rsob.200209

Emmie de Wit, N. v. (2016, june 27). *SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses*. Retrieved from nature reviews microbiology:  
<https://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.81>

Fan, Y., Zhao, K., Shi, Z., & Zhou, P. (2019, MARCH 11). Bat Coronaviruses in China. *Viruses*, 11(3), p. 210. doi:10.3390/v11030210

FIGO. (2021, MARCH 19). *Safe Motherhood and COVID-19 – March 2021 update*. Retrieved from <https://www.figo.org/safe-motherhood-and-covid-19-march-2021-update>

Forni, D., Cagliani, R., Clerici, M., & Sironi, M. (2016, Oct. 19). Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends Microbiol*(25), pp. 35-48. doi:10.1016/j.tim.2016.09.001

Frieman, M., Ratia, K., Johnston, R., Mesecar, A., & Baric, R. (2009, APRIL 15). Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like protease ubiquitin-like domain and catalytic domain regulate antagonism of IRF3 and NF-kappaB signaling. *J Virol*.(83), pp. 6689–6705. doi:10.1128/JVI.02220-08

Fung, S., Siu, K., Lin, H., Yeung, M., & Jin, D. (2021, April 10). SARS-CoV-2 main protease suppresses type I interferon production by preventing nuclear translocation of phosphorylated IRF3. *International Journal of Biological Sciences*(17), pp. 1547–1554. doi:10.7150/ijbs.59943

- Galan, C., Enjuanes, L., & Almazan, F. (2005, DECEMBER). A Point Mutation within the Replicase Gene Differentially Affects Coronavirus Genome versus Minigenome Replication. *J Virol.*(79), pp. 15016–15026. doi:10.1128/JVI.79.24.15016-15026.2005
- Gómez, C., Perdiguero, B., & Esteban, M. (2021, MAR 11). Emerging SARS-CoV-2 Variants and Impact in Global Vaccination Programs against SARS-CoV-2/COVID-19. *Vaccines (Basel)*, 9(3), p. 243. doi:10.3390/vaccines9030243
- Gui, M., Liu, X., Guo, D., Zhang, Z., Yin, C., Chen, Y., & Xiang, Y. (2017, JANUARY 2). Electron microscopy studies of the coronavirus ribonucleoprotein complex. *Protein & Cell*(8), pp. 219–224. doi:https://doi.org/10.1007/s13238-016-0352-8
- Guillén, J., Pérez-Berná, A., Moreno, M., & Villalaín, J. (2005, Febr.). Identification of the Membrane-Active Regions of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Membrane Glycoprotein Using a 16/18-Mer Peptide Scan: Implications for the Viral Fusion Mechanism. *J Virol*, pp. 1743–1752. doi:10.1128/JVI.79.3.1743-1752.2005
- Guo, S., Liu, K., & Zheng, J. (2021). The Genetic Variant of SARS-CoV-2: would It Matter for Controlling the Devastating Pandemic? *Int J Biol Sci.*(17), pp. 1476–1485. doi:10.7150/ijbs.59137
- Hancourt, B., Jukneliene, D., Kanjanahaluethai, A., Bechill, J., Severson, K., Smith, C., . . . Baker, S. (2004, Dec.). Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replicase Products and Characterization of Papain-Like Protease Activity. *J Virol.*(78), pp. 13600–13612. doi:10.1128/JVI.78.24.13600-13612.2004
- Helmy, Y., Fawzy, M., Elasward, A., Sobieh, A., Kenney, S., & Shehata, A. (2020, APRIL 19). The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control. *J. Clin. Med.* 2020, 9(4), p. 1225. doi:https://doi.org/10.3390/jcm9041225
- Hillen, H. (2021, APRIL 6). Structure and function of SARS-CoV-2 polymerase. *Curr Opin Virol.* (48), pp. 82–90. doi:10.1016/j.coviro.2021.03.010
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., & Pöhlmann, S. (2020, MAY 21). A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol Cell.* (78), pp. 779–784.e5. doi:10.1016/j.molcel.2020.04.022
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., . . . Pöhlmann, S. (2020, APRIL 16). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and

- TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), pp. 271-280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052
- Hu, B., Ge, X., Wang, L., & Shi, Z. (2015). Bat origin of human coronaviruses. *Virology* 12(12), p. 221. doi:10.1186/s12985-015-0422-1
- Hu, Y., Wen, J., Tang, L., Zhang, H., Zhang, X., Li, Y., . . . Yang, H. (2016, NOV 28). The M Protein of SARS-CoV: Basic Structural and Immunological Properties. *Genomics Proteomics Bioinformatics*(1), pp. 118–130. doi:10.1016/S1672-0229(03)01016-7
- Huang, C., Lokugamage, K., Rozovics, J., Narayanan, K., Semler, B., & Makino, S. (2011, DECEMBER 8). SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs: viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage. doi:10.1371/journal.ppat.1002433
- Hulswit, R., de Haan, C., & Bosch, B. (2016). Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. *Adv Virus Res*(96), pp. 29–57. doi:10.1016/bs.aivir.2016.08.004
- Iqbal, H., Romero-Castillo, K., Bilal, M., & Parra-Saldivar, R. (2020, Mar 09). The Emergence of Novel-Coronavirus and its Replication Cycle - An Overview. *J. Pure Appl. Microbiol.*, 14(1), pp. 13-16. doi:org/10.22207/JPAM.14.1.03
- Jimenez-Guardeño, J., Nieto-Torres, J., DeDiego, M., Regla-Nava, J., Fernandez-Delgado, R., Castaño-Rodríguez, C., & Enjuanes, L. (2014, AUG.). The PDZ-Binding Motif of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Envelope Protein Is a Determinant of Viral Pathogenesis. *PLoS Pathog.*, 10(8), p. e1004320. doi:10.1371/journal.ppat.1004320
- Jones, B., Grace, D., Kock, R., Alonso, S., Rushton, J., Said, M., . . . Pfeiffer, D. (2013, May 21). Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proc Natl Acad Sci U S A.*(110), pp. 8399–8404. doi:10.1073/pnas.1208059110
- Kawasuji, H., Takegoshi, Y., Kaneda, M., Ueno, A., Miyajima, Y., Kawago, K., . . . Yamamoto, Y. (2020, DECEMBER 09). Transmissibility of COVID-19 depends on the viral load around onset in adult and symptomatic patients. doi:10.1371/journal.pone.0243597
- Kemp, S., Meng, B., Ferriera, I., Datir, R., Harvey, W., Papa, G., . . . Gupta, R. (2021, MARC 08). Recurrent emergence and transmission of a SARS-CoV-2 Spike deletion H69/V70. doi:https://doi.org/10.1101/2020.12.14.422555
- Khade, S., Yabajib Pulmonary Cente, S., & Srivastava, J. (2020, NOVEMBER 23). An update on COVID-19: SARS-CoV-2 life cycle, immunopathology, and BCG vaccination. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(9), pp. 650-658. doi:10.1080/10826068.2020.1848869



- Kissler, S., Fauver, J., Mack, C., Tai, C., Breban, M., Watkins, A., . . . Grad, Y. (2021, FEBR. 16). Densely sampled viral trajectories suggest longer duration of acute infection with B.1.1.7 variant relative to non-B.1.1.7 SARS-CoV-2. doi:10.1101/2021.02.16.21251535
- Korber, B., Fisher, W., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., . . . Montefiori, D. (2020, AUG. 20). Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*(182), pp. 812–827.e19. doi:10.1016/j.cell.2020.06.043
- Kumar, A., Kumar, N., Bairy, S., Kushir, V., Chandola, C., Sharma, J., . . . Neerathilingam. (2020, May). Characterization of Nucleocapsid (N) protein from Novel Coronavirus Sars-CoV 2. *ResearchGate*. Retrieved from [https://www.researchgate.net/profile/Alisha-Parveen/publication/341671040\\_Characterization\\_of\\_nucleocapsid\\_N\\_protein\\_from\\_novel\\_coronavirus\\_SARS-CoV-2/links/5ece3452299b1c67d20493c/Characterization-of-nucleocapsid-N-protein-from-novel-coronavirus-SARS-Co](https://www.researchgate.net/profile/Alisha-Parveen/publication/341671040_Characterization_of_nucleocapsid_N_protein_from_novel_coronavirus_SARS-CoV-2/links/5ece3452299b1c67d20493c/Characterization-of-nucleocapsid-N-protein-from-novel-coronavirus-SARS-Co)
- Lai, T., Tang, E., Fung, K., & Li, K. (2020, MARCH 28). Reply to “Does hand hygiene reduce SARS-CoV-2 transmission?”. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*(258), p. 1135. doi:10.1007/s00417-020-04653-4
- Lau, S., & Chan, J. (2015, DECEMBER 22). Coronaviruses: emerging and re-emerging pathogens in humans and animals. *Virol J*(12), p. 209. doi:10.1186/s12985-015-0432-z
- Lentz, B., Malinin, V., Hauque, M., & Evans, K. (2000, OCTOBER 1). Protein machines and lipid assemblies: current views of cell membrane fusion. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(5), pp. 607-615. doi:10.1016/S0959-440X(00)00138-X
- Leung, K., Shum, M., Leung, G., Lam, T., & Wu, L. (2021, Jan. 7). Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020. *Euro Surveill*, 26(1), p. 2002106. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.26.1.2002106
- Li, D., Jin, M., Bao, P., Zhao, W., & Zhang, S. (2020, MAY 01). Clinical Characteristics and Results of Semen Tests Among Men With Coronavirus Disease 2019. *JAMA Netw Open*, 3(5), p. e208292. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.8292
- Li, J., Guo, M., Tian, X., Wang, X., Yang, X., Wu, P., . . . Liang, Q. (2020, Jan. 15). Virus-host interactome and proteomic survey of PBMCs from COVID-19 patients reveal potential

- virulence factors influencing SARS-CoV-2 pathogenesis. *Med (N Y)*, 2(1), pp. 99–112.e7. doi:10.1016/j.medj.2020.07.002
- Lim, Y., Ling Ng, T., Tam, J., & Liu, D. (2016, Sept.). Human Coronaviruses: A Review of Virus–Host Interactions. *Diseases*(4), p. 26. doi:10.3390/diseases4030026
- Liu, D., Fung, T., Long Chong, K., Shukla, A., & Hilgenfeld, R. (2014). Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. *Antiviral Res.*(109), pp. 97–109. doi:10.1016/j.antiviral.2014.06.013
- Liu, Y., Ning, Z., Chen, Y., Guo, M., Liu, Y., Gali, N., . . . Lan, K. (2020, April 27). Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *nature*(582), pp. 557–560. doi:10.1038/s41586-020-2271-3
- M.de Haan, C., Smeets, M., Vernooij, F., Vennema, H., & Rottier, P. (1999, SEPTEMBER). Mapping of the Coronavirus Membrane Protein Domains Involved in Interaction with the Spike Protein. *J.Virol*(73), pp. 7441–7452. Retrieved from Mapping of the Coronavirus Membrane Protein Domains Involved in Interaction with the Spike Protein: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC104271/>
- Madu, I., Belouzard, S., & Whittaker, G. (2009, October 25). SARS-coronavirus spike S2 domain flanked by cysteine residues C822 and C833 is important for activation of membrane fusion. *Virology*, 393(2), pp. 265-271. doi:10.1016/j.virol.2009.07.038
- Mahtarin, R., Islam, S., Islam, M., Ullah, M., Ali, M., & Halim, M. (2020, December 22). Structure and dynamics of membrane protein in. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, pp. 1-14. doi:<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1861983>
- Masters, P. (2006, July 28). The Molecular Biology of Coronaviruses. *ELSEVIER*(66), pp. 193-292. Retrieved from sciencedirect: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065352706660053?via%3Dihub>
- Matsuyama, S., Nao, N., Shirato, K., Kawase, M., Saito, S., Takayama, I., . . . Takeda, M. (2020, 31 MARCH). Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *PNAS*, 117(13), pp. 7001-7003. doi:10.1073/pnas.2002589117
- McBride, R., van Zyl, M., & Fielding, B. (2014, 6 AUG). The Coronavirus Nucleocapsid Is a Multifunctional Protein. *Viruses*(6), pp. 2991–3018. doi:10.3390/v6082991
- Meyerowitz, E., Richterman, A., Gandhi, R., & Sax, P. (2020, SEPT. 17). Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. *Ann Intern Med*(M20), p. 5008. doi:10.7326/M20-5008

- Millet, J., & Whittaker, R. (2015, April 16). Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Research*(202), pp. 120-134. doi:<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.021>
- Mousavizadeh, L., & Ghasemi, S. (2020, 31 MARCH). Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect*(54), pp. 159–163. Retrieved from Genotype and phenotype of COVID-19: Their: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7138183/>
- Muramatsu, T., Takemoto, C., Kim, Y., Wang, H., Nishii, W., Terada, T., . . . Yokoyama, S. (2016, octob 31). SARS-CoV 3CL protease cleaves its C-terminal autoprocessing site by novel subsite cooperativity. *Proc Natl Acad Sci U S A*(13), pp. 12997–13002. doi:10.1073/pnas.1601327113
- Murphy, F., Fauquet, C., Bishop, D. H., Ghabrial, S., Jarvis, A., Martelli, P., . . . Summers, M. (1995). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Springer, Vienna. Retrieved from [https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=zNvzCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Virus+Taxonomy:+Classification+and+Nomenclature+of+Viruses+Summers&ots=FopulwBkbD&sig=8PubG li5hhjfnINGLgWqwjZ7AHM&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Virus%20Taxonomy%3A%20Classification%20and%2](https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=zNvzCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Virus+Taxonomy:+Classification+and+Nomenclature+of+Viruses+Summers&ots=FopulwBkbD&sig=8PubG li5hhjfnINGLgWqwjZ7AHM&redir_esc=y#v=onepage&q=Virus%20Taxonomy%3A%20Classification%20and%2)
- Naqvi, A., Mohammad, T., Fatima, K., Fatima, U., Singh, I., Singh, A., . . . Hassan, M. (2020, june 13). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*(1866), p. 165878. Retrieved from PMC: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7293463/>
- nature. (2021, January 15). *China COVID vaccine reports mixed results — what does that mean for the pandemic?* Retrieved from nature: <https://www.nature.com/articles/d41586-021-00094-z>
- Naujokat, C., & Sternberg, A. (2020, Sept. 15). Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: Targets for vaccination. *Life Scin*(257), p. 118056. doi:10.1016/j.lfs.2020.118056
- Nelson, G., Buko, O., Spilman, P., Niazi, K., Rabizadeh, S., & Soon-Shiong, P. (2021, jan. 13). *Molecular dynamic simulation reveals E484K mutation enhances spike RBD-ACE2 affinity and the combination of E484K, K417N and N501Y mutations (501Y.V2 variant) induces conformational change greater than N501Y mutant alone, potentially resulting in an escap.* doi:10.1101/2021.01.13.426558

- Neuman, B., & Buchmeier, M. (2016, SEPTEMBER 15). Supramolecular Architecture of the Coronavirus Particle. *Adv Virus Res.*(96), pp. 1-27. doi:10.1016/bs.aivir.2016.08.005
- Neuman, B., Kiss, G., Kunding, A., Bhella, D., Baksh, M., Connelly, s., . . . Buchmeier, M. (2011, APRIL). A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *Journal of Structural Biology*(174), pp. 11-22. Retrieved from A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047847710003588>
- Nieto-Torres, J., DeDiego, M., Alvarez, E., Jiménez-Guardeño, J., Regla-Nava, J., Llorente, M., . . . Enjuanes, L. (2011, Jun 5). Subcellular location and topology of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. *Virology*, 415(2), pp. 69–82. doi:10.1016/j.virol.2011.03.029
- O'Toole, A., Hill, V., Pybus, O., Watts, A., Bogoch, I., Khan, K., . . . Kraemer, M. (2021, FEBR 04). Tracking the international spread of SARS-CoV-2 lineages B.1.1.7 and B.1.351/501Y-V2. *Wellcome Open Res.*(6), p. 121. doi:10.12688/wellcomeopenres.16661.1
- Outbreak.info. (2021). Καταγωγή | Παρακολούθηση μετάλλαξης B.1.617.2 Αναφορά γενεαλογίας. Retrieved from Outbreak.info: <https://outbreak.info/situation-reports?pango=B.1.617.2>
- Pan, Y., Zhang, D., Yang, P., Poon, L., & Wang, Q. (2020, FEBR. 24). Viral load of SARS-COV-2 in clinical samples. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(4), pp. 411-412,. doi:10.1016/S1473-3099(20)30113-4
- Parrish, C., Holmes, E., Morens, D., Park, E., Burke, D., Calisher, C., . . . Daszak, P. (2008, Sept.). Cross-Species Virus Transmission and the Emergence of New Epidemic Diseases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72(3), pp. 457–470. doi:10.1128/MMBR.00004-08
- Patanè, L., Morotti, D., Giunta, M., Sigismondi, C., Piccoli, M., Frigerio, L., . . . Cornolti, G. (2020, MAY 18). Vertical transmission of coronavirus disease 2019: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 RNA on the fetal side of the placenta in pregnancies with coronavirus disease 2019-positive mothers and neonates at birth. *Am J Obstet Gynecol MFM*, 2(3), p. 100145. doi:10.1016/j.ajogmf.2020.100145
- Patrì, A., Gallo, L., Guarino, M., & Fabbrocini, G. (2020, june). Sexual transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): A new possible route of infection? *J Am Acad Dermatol*, 82(6), p. e227. doi:10.1016/j.jaad.2020.03.098

- Peng, G., Sun, D., Rajashankar, K., Qian, Z., Holmes, K., & Li, F. (2011, June 28). Crystal structure of mouse coronavirus receptor-binding domain complexed with its murine receptor. *PNAS*(28), pp. 10696-10701. doi:10696-10701
- Planas, D., Veyer, D., & Schwartz, O. (2021, JULY 8). Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*, pp. 276–280. doi:10.1038/s41586-021-03777-9
- PROLIPSIS, ALPHA. (2017, NOEMBPIO 25). Πύλες εισόδου μικροβίων στον οργανισμό. Retrieved from <http://www.alphaprolipsis.gr/iatrika-themata/iatrika-arthra/pyles-eisodoy-mikrovion-ston-organismo>
- Qian, G., Yang, N., Yan Ma, A., Wang, L., Li, G., Chen, X., & Chen, X. (2020, MARCH 23). COVID-19 Transmission Within a Family Cluster by Presymptomatic Carriers in China. *Clin Infect Dis*, 71(15), pp. 861–862. doi:10.1093/cid/ciaa316
- Qiu, Z., Hingley, S., Simmons, G., Yu, C., Sarma, J., Bates, P., & Weiss, S. (2006, Jun). Endosomal Proteolysis by Cathepsins Is Necessary for Murine Coronavirus Mouse Hepatitis Virus Type 2 Spike-Mediated Entry. *J Virol.*, 80(12), pp. 5768–5776. doi:10.1128/JVI.00442-06
- Rambaut, A., Loman, N., Pybus, O., Wendy, B., Barrerr, J., Carabelli, A., . . . on behalf of COVID-19 Genomics Consortium UK (CoG-. (2020, DEC.). *Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations*. Retrieved from VIROLOGICAL: <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>
- Raskin, S. (2020, OCTOBER 7). GENETICS OF COVID-19. *Jornal de Pediatria*, 94(4), pp. 378-386. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2020.09.002>
- Ratnesar-Shumate, S., Williams, G., Green, B., Krause, M., Holland, B., Wood, S., . . . Dabisch, P. (2020, MAY 20). Simulated Sunlight Rapidly Inactivates SARS-CoV-2 on Surfaces. *J Infect Dis*, 222(2), pp. 214–222. doi:10.1093/infdis/jiaa274
- RCPCH. (2021, APRIL 09). *COVID-19 - research evidence summaries*. Retrieved from RCPCH: <https://www.rcpch.ac.uk/resources/covid-19-research-evidence-summaries>
- Redondo, R., Nam, H., Roberts, S., Simons, L., Jennings, L., Qi, C., . . . Ozer, E. (2020, Dec). A clade of SARS-CoV-2 viruses associated with lower viral loads in patient upper airways. *EBioMedicine*(62), p. 103112. doi:10.1016/j.ebiom.2020.103112

- Roe, M., Junod, N., Young, A., Beachboard, D., & Stobart, C. (2021, Jan. 28). Targeting novel structural and functional features of coronavirus protease nsp5 (3CL pro, M pro) in the age of COVID-19. *The Journal of General Virology*, 103(3). doi:10.1099/jgv.0.001558
- Rosenberg, R. (2014, Nov 22). Detecting the emergence of novel, zoonotic viruses pathogenic to humans. *Cell Mol Life Sci*, 72(6), pp. 1115–1125. doi:10.1007/s00018-014-1785-y
- Rosenberg, R., Johansson, M., Powers, A., & Miller, B. (2013, AUG. 20). Search strategy has influenced the discovery rate of human viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110(34), pp. 13961–13964. doi:10.1073/pnas.1307243110
- Ruch, T., & Machamer, C. (2012, MAR 8). The Coronavirus E Protein: Assembly and Beyond. *Viruses*(4), pp. 363–382. doi:10.3390/v4030363
- Sahu, U., Biswas, D., Singh, A., & Khare, P. (2021, MAY 4). Mechanism involved in the pathogenesis and immune response against SARS-CoV-2 infection. *Virus disease*(32), pp. 211-219. doi:10.1007/s13337-021-00687-2
- Salamanna, F., Maglio, M., Landini, M., & Fini, M. (2020, DECEMB. 03). Body Localization of ACE-2: On the Trail of the Keyhole of SARS-CoV-2. doi:10.3389/fmed.2020.594495
- Schoeman, D., & Fielding, B. (2019, MAY 27). Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology Journal volume*(16), p. 69. doi:https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0
- Schuit, M., Ratnesar-Shumate, S., Yolitz, J., Williams, G., Weaver, W., Green, B., . . . Dabisch, P. (2020, Aug. 1). Airborne SARS-CoV-2 Is Rapidly Inactivated by Simulated Sunlight. *J Infect Dis*, 222(4), pp. 564–571. doi:10.1093/infdis/jiaa334
- Seth, S., Batra, J., & Srinivasan, S. (2020, OCTOBER 09). COVID-19: Targeting Proteases in Viral Invasion and Host Immune Response. *Front Mol Biosci.*(7), p. 215. doi:10.3389/fmolb.2020.00215
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020, MAY 06). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *PNAS*, 117(21), pp. 11727-11734. doi:10.1073/pnas.2003138117
- Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H., . . . Li, F. (2020, March 30). Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*(581), pp. 221–224. doi:10.1038/s41586-020-2179-y
- Shen, X., Tang, H., McDanal, C., Wagh, K., Fischer, W., Theiler, J., . . . Montefiori, D. (2021, APRIL 14). SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 is susceptible to neutralizing antibodies elicited

by ancestral spike vaccines. *Cell Host Microbe*(29), pp. 529–539.e3. doi:10.1016/j.chom.2021.03.002

Shereen, M., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N., & Siddique, R. (2020, JUL). COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res*(24), pp. 91-98. doi:10.1016/j.jare.2020.03.005

Smither, S., Eastaugh, L., Findlay, J., & Lever, M. (2020, JUNE 22). Experimental aerosol survival of SARS-CoV-2 in artificial saliva and tissue culture media at medium and high humidity. *Emerg Microbes Infect.*, 1(9), pp. 1415–1417. doi:10.1080/22221751.2020.1777906

Snijder,, E., Decroly, E., & Ziebuhr, J. (2016, SEPT. 14). The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. *Adv Virus Res*(96), pp. 59–126. doi:10.1016/bs.aivir.2016.08.008

Stadnytskyi, v., Bax, c., Bax, A., & Anfinrud, P. (2020, MAY 13). The airborne lifetime of small speech droplets and their potential importance in SARS-CoV-2 transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(22), pp. 11875–11877. doi:10.1073/pnas.2006874117

Starr, T., Greaney, A., Dingens, A., & Bloom, J. (2021, April 5). Complete map of SARS-CoV-2 RBD mutations that escape the monoclonal antibody LY-CoV555 and its cocktail with LY-CoV016. *Cell Rep Med*, 2(4), p. 100255. doi:10.1016/j.xcrm.2021.100255

Stodola, J., Dubois, G., Le Coupanec, A., & Desforges, M. (2018, febr.). The OC43 human coronavirus envelope protein is critical for infectious virus production and propagation in neuronal cells and is a determinant of neurovirulence and CNS pathology. *Virology*(515), pp. 134-149. doi:10.1016/j.virol.2017.12.023

Subissi, L., Posthuma, C., Collet, A., Zevenhoven-Dobb, J., Gorbalenya, A., Decroly, E., . . . Imbert, I. (2014, SEPT. 16). One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*.(111), pp. E3900–E3909. doi:10.1073/pnas.1323705111

Supasa, P., Zhoy, D., Dejnirattisai, W., Liu, C., Mentzer, A., Ginn, H., . . . Screaton, G. (2021, APRIL 15). Reduced neutralization of SARS-CoV-2 B.1.1.7 variant by convalescent and vaccine sera. *Cell*, 184(8), pp. 2201–2211.e7. doi:10.1016/j.cell.2021.02.033

Tang , J., Cheung, J., Chu, I., Sung, J., Peiris, M., & Chan, P. (2006, SEPT. 15). The Large 386-nt Deletion in SARS-Associated Coronavirus: Evidence for Quasispecies? *J Infect Dis*(194), pp. 808–813. doi:10.1086/507044

- Tang, T., Bidon, M., Jaimes, J., Whittaker, G., & Daniel, S. (2020, JUNE). Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Research*, 178, p. 104792. doi:<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104792>
- Tilocca, B., Soggiu, A., Sanguinetti, M., Babini, G., De Maio, F., Britti, D., . . . Roncada, P. (2021, May 22). Immunoinformatic analysis of the SARS-CoV-2 envelope protein as a strategy to assess cross-protection against COVID-19. *Microbes and Infection*, 22(4-5), pp. 182-187. doi:10.1016/j.micinf.2020.05.013
- Torres, J., Wang, J., Parthasarathy, K., & Liu, D. (2005, Febr.). The Transmembrane Oligomers of Coronavirus Protein E. *Biophysical Journal*, 88(2), pp. 1283-1290. doi:10.1529/biophysj.104.051730
- Tripet, B., Howard, M., Jobling, M., Holmes, R., Holmes, K., & Hodges, R. (2004, MAY 14). Structural Characterization of the SARS-Coronavirus Spike S Fusion Protein Core. *J Biol Chem*, 279(20), pp. 20836–20849. doi:10.1074/jbc.M400759200
- Troy Day, S. G. (2020, AUG. 03). *On the evolutionary epidemiology of SARS-CoV-2*. Retrieved from CURRENT BIOLOGY: [https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822\(20\)30847-2?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0960982220308472%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822(20)30847-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0960982220308472%3Fshowall%3Dtrue)
- Van Doremalen, N., Bushmaker, T., Mooris, D., Holbrook, M., Gamble, A., Williamson, B., . . . Munster, V. (2020, MAR 17). Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 σε σύγκριση με SARS-CoV-1. *N Engl J Med*, p. NEJMc2004973. doi:10.1056/NEJMc2004973
- Venkatagopalan, P., Daskalova, S., Lopez, L., Dolezal, K., & Hogue, B. (2015, April). Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly. *Virology*(478), pp. 75–85. doi:10.1016/j.virol.2015.02.005
- Vithani, N., Ward, M., Zimmerman, M., Novak,, B., Borowsky, J., Singh, S., & Bowman, G. (2021, MARCH 29). SARS-CoV-2 Nsp16 activation mechanism and a cryptic pocket with pan-coronavirus antiviral potential. *Biophys J*(120), pp. 2880–2889. doi:10.1016/j.bpj.2021.03.024
- Wadman, M., Couzin-Frankel, J., Kaiser, J., & Maticic, C. (2020, APRIL 17). How does coronavirus kill? Clinicians trace a ferocious rampage through the body, from brain to toes. *Science*. doi:10.1126/science.abc3208
- Walls, A., Park, Y., Tortorici, M., Wall, A., McGuire, A., & Veerler, D. (2020, April 16). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), pp. 281–292.e6. doi:10.1016/j.cell.2020.02.058



- Wang, K., Chen, W., Zhou, Y., Lian, J., Zhang, Z., Du, P., . . . Chen, Z. (2020, March 14). *SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein*. doi:10.1101/2020.03.14.988345
- Wang, P., Nair, M., Liu, L., Iketani, S., Luo, Y., Guo, Y., . . . Ho, D. (2021, FEBR. 12). *Antibody Resistance of SARS-CoV-2 Variants B.1.351 and B.1.1.7*. doi:10.1101/2021.01.25.428137
- Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., Zhang, Z., . . . Qi, J. (2020, may 14). Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell*(181), pp. 894–904.e9. doi:10.1016/j.cell.2020.03.045
- Weisblum, Y., Schmidt, F., Zhang, F., DaSilva, J., Poston, D., Lorenzi, J., . . . Bieniasz, P. (2020). Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *eLife*(9), p. e61312. doi:10.7554/eLife.61312
- Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., Liu, R., . . . Bu, Z. (2020, APRIL 08). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science*, 368(6494), pp. 1016–1020. doi:10.1126/science.abb7015
- White, J., & Whittaker, G. (2016, APRIL 07). Fusion of Enveloped Viruses in Endosomes. *17*(6), pp. 593–614. doi:10.1111/tra.12389
- WHO, World HealthOrganization. (2020, ΑΥΓΟΥΣΤΟΥ 12). Retrieved from [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200812-covid-19-sitrep-205.pdf?sfvrsn627c9aa8\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200812-covid-19-sitrep-205.pdf?sfvrsn627c9aa8_2)
- Wibmer, C., Ayres, F., Hermanus, T., Madzivhandila, M., Kgagudi, P., Oosthuysen, B., . . . Moore, P. (2021, March 02). SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *nature medicine*(27), pp. 622–625. doi:10.1038/s41591-021-01285-x
- wikipedia. (2021, Sept. 22). Retrieved from <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9A%CE%BF%CF%81%CE%BF%CE%BD%CE%BF%CF%8A%CF%8C%CF%82>
- Wikipedia. (2021, June 8). *Γενεαλογία B.1.351*. Retrieved from Wikipedia: [https://en.wikipedia.org/wiki/Lineage\\_B.1.351](https://en.wikipedia.org/wiki/Lineage_B.1.351)
- Wölfel, R., Corman, V., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M., . . . Wendtner, C. (2020, APRIL 1). Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *nature*(581), pp. 465–469. doi:10.1038/s41586-020-2196-x

- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K., Goldsmith, J., Hsieh, C., Abiona, O., . . . McLellan, J. (2020, March 13). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 367(6483), pp. 1260-1263. doi:10.1126/science.abb2507
- Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., . . . Jiang, T. (2020, Febr. 7). Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe*(27), pp. 325–328. doi:10.1016/j.chom.2020.02.001
- Xi He, E. H. (2020, APRIL 15). *Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19*. Retrieved from naturemedicine: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0869-5>
- Xiuyuan Ou, Y. L., Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., . . . Qian, Z. (2020, MARCH 27). Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun.*(11), p. 1620. doi:10.1038/s41467-020-15562-9
- Yan, L., Zhang, Y., Ge, J., Zheng, L., Gao, Y., Wang, T., . . . Lou, Z. (2020, Nov. 18). Architecture of a SARS-CoV-2 mini replication and transcription complex. *Nat Commun*(11), p. 5874. doi:10.1038/s41467-020-19770-1
- Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y., & Zhou, Q. (2020, Mar 27). Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*(367), pp. 1444–1448. doi:10.1126/science.abb2762
- Yu, P., Hu, B., Shi, Z., & Cui, J. (2019, FEBR. 06). Geographical structure of bat SARS-related coronaviruses. *Infect Genet Evol.*(69), pp. 224–229. doi:10.1016/j.meegid.2019.02.001
- Yuan, Y., Cao, D., Zhang, Y., Ma, J., Qi, J., Wang, Q., . . . Gao, G. (2017, APRIL 10). Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains. *Nat Commun*(8), p. 15092. doi:10.1038/ncomms15092
- Zeng, W., Liu, G., Ma, H., Zhao, D., Yunru, Y., Liu, M., . . . Jin, T. (2020, jun 30). Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun*(527), pp. 618–623. doi:10.1016/j.bbrc.2020.04.136
- Zhou, A., Li, S., Khan, F., & Zhang, S. (2015, DEC. 15). Autophagy postpones apoptotic cell death in PRRSV infection through Bad-Beclin1 interaction. *Virulence*(7), pp. 98-109. doi:10.1080/21505594.2015.1131381
- Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. (2020, ΜΑΡΤΙΟΣ 04). *Θεμάτα υγείας*. Retrieved from [https://www.uoa.gr/anakoinoseis\\_kai\\_ekdiloseis/proboli\\_anakoinosis/koronoios\\_covid\\_19\\_erotimata\\_kai\\_apantiseis-1/](https://www.uoa.gr/anakoinoseis_kai_ekdiloseis/proboli_anakoinosis/koronoios_covid_19_erotimata_kai_apantiseis-1/)

