

SARS-CoV-2'nin Temel Virolojik Özellikleri ve Koronavirüs Reseptör Tanıma Mekanizması

Basic Virological of SARS-CoV-2 and Receptor Recognition Mechanism of Coronavirus

 Bülent ÇAKAL^a

^aİstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, İstanbul, TÜRKİYE

ÖZET Şiddetli akut solunum sendromu-koronavirüs-2 [severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2)]'nin etiyolojik etkeni olduğu koronavirüs hastalığı-2019 [coronavirus disease-2019 (COVID-19)] pandemisi, mevcut ve olası sonuçları açısından tüm dünyayı etkisi altına almıştır. SARS-CoV-2, insanlarda enfeksiyona neden olan 7.; 21. yüzyılda salgınlara neden olan 3. CoV'dur. CoV'ların konak hücreye girişi, CoV spike proteinlerinin reseptör tanıma ve membran füzyon fonksiyonları aracılığıyla gerçekleşir. SARS-CoV-2, insan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 [human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2)]'yi hücre girişi için fonksiyonel bir reseptör olarak kullanır. SARS-CoV'ların spike proteinleri, reseptör bağlayan (S1) ve membran füzyonu (S2) ile ilişkili 2 temel alt birim içerir. SARS-CoV-2 reseptör bağlama domaininin (RBD), ACE2'ye bağlanma afinitesinin SARS-CoV'dan daha yüksek olmasına ek olarak, viral spike proteinini kodlayan genomda polibazik (furin) bir kesim alanı insersiyonu içermesiyle de farklılık gösterir. Furin aracılı viral spike proteinin proteolitik aktivasyonu, SARS-CoV-2'nin hedef hücreye giriş etkinliğini artırır. SARS-CoV-2 spike protein RBD'nin yapısal olarak yatık konformasyonda olması, insan immün sisteminin denetiminden kaçmasına olanak tanımaktadır. Dolayısıyla SARS-CoV-2'nin yayılımının oldukça geniş olması, SARS-CoV-2 RBD'nin, hACE2'ye bağlanma afinitesinin yüksekliği, insan immün sisteminin denetiminden kaçabilme ve yüksek enfektivite gibi özgün virolojik karakteristik özelliklere sahip olması ile ilişkilidir. SARS-CoV-2 ve reseptörü ACE2 arasındaki etkileşimin moleküler dinamiklerinin aydınlatılması, salgının seyri ve sonuçları ile tedavi ve immünizasyon hedeflerinin belirlenmesinde kritik öneme sahiptir. Bu derlemede, viral enfektivite, patogenez ve konak aralığının belirlenmesi, aşılama, antiviral stratejiler, terapötik antikolar ve tanı için temel hedef olan CoV spike proteinleri ve reseptörü hACE2'yi tanımasına yönelik mekanizmaların irdelenmesi amaçlanmıştır.

ABSTRACT The coronavirus disease-2019 (COVID-19) pandemic which is the etiological agent of severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2) has influenced the whole world with the current and possible results. SARS-CoV-2 is the 7th CoV known to infect humans and also the 3rd CoV cause of outbreak in 21st century. Receptor recognition and membrane fusion functions of CoV spike protein mediates CoV entry into host cells. SARS-CoV-2 uses to human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2) as a functional receptor for cell entry. The spike proteins of SARS-CoVs contain two basic subunits associated with receptor binding (S1) and membrane fusion (S2). Unlike SARS-CoV, SARS-CoV-2 contains a polybasic (furin) cleavage site insertion in genome encoding viral spike protein and the receptor binding domain (RBD) of SARS-CoV-2 has higher ACE2 binding affinity to ACE2. Proteolytic activation of spike protein by furin increases efficiency of entry into target cell of SARS-CoV-2. And also a lying-down position of RBD of the SARS-CoV-2 spike protein allows to evade from surveillance of human immune system. The wide spread of SARS-CoV-2 is associated with the unique virological characteristics of SARS-CoV-2, such as the ability to high binding affinity to hACE2, escape from the human immune surveillance system and high infectivity. Identification of molecular dynamics of the interaction between SARS-CoV-2 and receptor ACE2 is critical in determining the course and outcomes of the outbreak and the targets of treatment and immunization. In this review, it is aimed to examination of mechanisms recognition for hACE2 receptor of its with spike proteins of CoV which is the main target for vaccination and antiviral strategies, therapeutic antibodies and diagnostics with determination viral infectivity, pathogenesis and host range.

Anahtar Kelimeler: Koronavirüs; SARS-CoV-2; COVID-19; virülans faktörleri; koronavirüs spike protein; reseptör tanıma; reseptör bağlama; anjiyotensin dönüştürücü enzim 2

Keywords: Coronavirus; SARS-CoV-2; COVID-19; virulence factors; coronavirus spike protein; receptor binding domain; receptor recognition; angiotensin-converting enzyme 2

Correspondence: Bülent ÇAKAL

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, İstanbul, TÜRKİYE/TURKEY

E-mail: bulentcakal@yahoo.com



Peer review under responsibility of Journal of Literature Pharmacy Sciences.

Received: 23 May 2020

Received in revised form: 19 Aug 2020

Accepted: 31 Aug 2020

Available online: 03 Feb 2021

2630-5569 / Copyright © 2021 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Şiddetli akut solunum sendromu-koronavirüs-2 [severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2)]'nin etiyolojik etken olduğu koronavirüs hastalığı-2019 [coronavirus disease-2019 (COVID-19)] pandemisi, mevcut ve olası sonuçları ile tüm dünyayı etkisi altına almıştır. SARS-CoV-2 enfeksiyonun klinik seyri ve sonuçlarının, hastaların çoğunda enfeksiyonunun kontrol altına alınmasına imkân verebilen immün yanıtlardan, özellikle kronik inflamasyon ve/veya immün yetersizlik gibi komorbiditelerin eşlik ettiği daha çok yaşlı kişilerde ise immün fonksiyon bozukluğu ve/veya yetersizliği sonucu ani ve hızla gelişen sitokin fırtınası ve yoğun inflamasyon ile karakterize, pulmoner trombozis ile sonuçlanabilen oldukça geniş bir yelpazeyi içerebilmektedir. COVID-19 ile mücadele ve SARS-CoV-2 enfeksiyonunun önlenmesi amacıyla aşı dizaynı ve potansiyel terapötiklerin ve/veya hedeflerin belirlenmesiyle enfeksiyonunun immünopatogenezinin moleküler düzeyde aydınlatılması, öncelikli önem arz etmektedir. CoV'ların spike proteinleri, reseptör tanıma ve membran füzyonu aracılığıyla konak hücreye girişine aracılık eden çok fonksiyonlu moleküler makinelerdir. Spike proteinin konak hücre reseptörünü tanıma, tutunma ve bağlanması ile konak hücre ve viral membranların füzyonu, enfeksiyonun oluşması ve viral biyogenezin sürdürülebilir olması için gerekli en temel virolojik süreçlerdir. Reseptör kullanımı ve çeşitliliği, CoV'lara özgü seçkin bir özelliktir. Dolayısıyla SARS-CoV-2 ve reseptörü insan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 [human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2)] arasındaki etkileşimin moleküler dinamiklerinin aydınlatılması, antiviral terapötik hedeflerin ve immünizasyon hedeflerinin belirlenmesi ile enfeksiyonun immünopatogenezinin aydınlatılmasında kritik öneme sahiptir. SARS-CoV-2'nin spike proteini ve reseptörü hACE2 ile etkileşiminin, moleküler düzeyde aydınlatılmasına yönelik bilgi ve verilerin, COVID-19 pandemisinin moleküler düzeyde anlaşılması ile salgınla mücadeleye yönelik çabalara katkı sağlaması beklenir. Bu derleme, viral enfektivite, patogeneze ve konak aralığının belirlenmesi, aşılama, antiviral stratejiler, terapötik antikorlar ve tanı için temel hedef olan CoV spike proteinleri ve resep-

törü hACE2 arasındaki biyolojik etkileşimin, moleküler düzeyde aydınlatılmasına yönelik bilimsel literatürün irdelenmesine yönelik olarak hazırlanmıştır.

KORONAVİRÜSLER VE SARS-COV-2'NİN TEMEL VİROLOJİK ÖZELLİKLERİ

CoV'lar, insan ve hayvanların solunum, gastrointestinal ve santral sinir sisteminde neden olabildikleri enfeksiyon hastalıkları sonuçlarıyla toplum sağlığını tehdit edebilme ve ciddi ekonomik kayıplara yol açabilme potansiyeline sahiptir.¹ CoV'ların, mutasyon ve rekombinasyonlar aracılığıyla yeni çevrelere adaptasyon yetkinliklerinin, konak aralığının ve doku tropizmlerinin dinamik bir şekilde değişimine ve çeşitlenmesine olanak sağlar.^{2,3} CoV'lar, omurgalıların sitopatik, zarflı, segmentsiz, genomu 5' cap ve 3' poliadenilasyon içeren, pozitif polariteli, tek zincirli, RNA virüsleridir.⁴ SARS-CoV'lar, 29.0-30.2 kb arasında değişen genom büyüklüğüne sahiptirler. SARS-CoV genomlarının hem 5' hem de 3' uçları, translasyonu olmayan kısa bölgeler içerir.⁵

Kuşların enfeksiyöz bronşit virüsü [avian infectious bronchitis virus (IBV)], 1937 yılında tavuklardan izole edilerek tanımlanan ilk CoV'dur. İnsanlarda enfeksiyon etkeni olan ilk insan CoV [human CoV (HCoV)] ise 1965 yılında Tyrrell ve Bynoe tarafından soğuk algınlığı geçiren bir erişkinin solunum sistemi örneğinin, insan embriyonik trakeal organ kültürlerinde 814 pasaj sonrası izole edilmiş, Bynoe ve yapılan pasaj sayısına atfen "coronavirus B814" diye adlandırılmıştır.⁶ Eş zamanlı olarak Hamre ve Procknow da yine soğuk algınlığı tanılı tıp öğrencilerinde, benzer yöntemlerle ürettikleri virüsü 229E olarak adlandırmışlardır.⁷ CoV'lar, ilk dönem organ kültürlerinde ürettikleri için OC (organ cultures) virüsler olarak adlandırılmışlardır. Yapılan elektron mikroskopisi çalışmaları sonucunda, her 2 virüs de hayvanlardan izole edilen IBV, fare hepatit virüsü [mouse hepatitis virus (MHV)] ve domuzların bulaşıcı gastroenterit virüsüne [porcine transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV)] benzer olduğu ve ayrıca elektron mikroskopisi altında, virüs yüzey morfolojisinin taç benzeri görüntüye sahip olmasına atfen CoV olarak adlandırılarak, yeni bir virüs cinsi olarak kabul edilmişlerdir.^{8,9}

KORONAVİRÜSLERİN TAKSONOMİSİ VE PATOJENİTE ÖZELLİKLERİ

CoV'lar, taksonomik olarak "Nidovirales" takımının (Order), "Coronaviridae" ailesinde (Family) yer alan "Coronavirinae" alt ailesi (Subfamily) içerisinde sınıflandırılırlar. CoV'lar; alfa-CoV, beta-CoV, gama-CoV ve delta-CoV olarak adlandırılan 4 cins ve 200'den fazla tür içerir.¹⁰ Alfa ve beta-CoV'lar memeli, gama-CoV'lar kuş, delta-CoV'lar ise memeli ve kuş türlerini enfekte eder.¹¹ SARS-CoV-2'den önce insanlarda enfeksiyona neden olabilen 2'si alfa, 4'ü ise beta-CoV cinsinde yer alan 6 CoV türü tanımlanmıştır. HCoV-229E ve HCoV-NL63, alfa-CoV içerisinde yer alan 2 majör HCoV'dur. HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV, Orta Doğu solunum sendromu-koronavirüsü [Middle East respiratory syndrome-coronavirus (MERS-CoV)] ve mevcut pandeminin etiyolojik etkeni kabul edilen SARS-CoV-2'de beta-CoV'lar içinde yer alan HCoV'dur.

Beta-CoV cinsine ait SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2 yüksek patojenik zoonotik patojenler; alfa-CoV HCoV-229E ve HCoV-NL63 ile beta-CoV HCoV-OC43, HCoV-HKU1'yi içeren diğer 4 insan CoV'u ise düşük patojeniteli insanların endemik virüsleri olarak nitelendirilmektedir.^{1,4,5} SARS-CoV, 2002 yılında Çin'in Guangdong eyaletinde ortaya çıkmış, hava yolu seyahati aracılığıyla 5 kıtaya yayılmış, 8.098 kişinin enfeksiyonu ve 774 ölümlü sonuçlanmış, MERS-CoV ise 2012 yılında Arabistan'ın Peninsula kentinde ortaya çıkmış, 27 ülkeye yayılmış, yaklaşık 2.494 kişinin enfeksiyonu ve 858 ölüme neden olmuş ve hâlâ rapor edilen sporadik vakalar uyarınca varlığını sürdürmektedir.⁵ HCoV-OC43 ve HCoV-229E, genel soğuk algınlığı sebebi olarak tanımlanan CoV'lar olmasına karşın, HCoV-HKU1 ve HCoV-NL63 ise daha şiddetli ve nadiren ölümlü sonuçlanabilen üst ve alt solunum sisteminde enfeksiyonlara neden olabilmektedirler.^{1,4,12} 2004 yılında tanımlanan ve alfa-CoV cinsinde yer alan HCoV-229E'ye yakın benzerlik gösteren, bununla birlikte özellikle çocuklar ve yaşlılar ile immün yetersizliği bulunan kişilerde, şiddetli alt solunum yolu enfeksiyonuna neden olabilen HCoV-NL63 de SARS-CoV ve SARS-CoV-2'ye benzer olarak ACE2'yi hücre girişi reseptörü olarak kullanmasına

karşın, diğer 2 SARS-CoV gibi yüksek patojeniteye sahip değildir.^{13,14}

CoV'ların viral patojeniteleri arasında farklılığa neden olan faktörlerin virolojik ve moleküler esasları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. HCoV-NL63'ün spike proteinin N terminal bölgesinde, diğer hiçbir CoV'da olmayan 179 amino asitlik özgün bir insersiyona sahip olması, virüsler arasında reseptör ACE2'ye bağlanma paternleri ve afiniteleri arasında farklılıklar ile özellikle SARS-CoV genomlarının 9, HCoV-NL63 genomunun ise tek aksesuar gen içermesinden hareketle aksesuar genler tarafından kodlanan spesifik patojenite faktörlerinin (virülans) eksikliği ve yine viral replikasyonunun kontrolü ile ilişkili aksesuar genlerdeki farklılıkların, CoV'ların patojenitelerinin belirlenmesinde rolü olabileceği belirtilmektedir.^{13,14} CoV'ların reseptör bağlama domaininin (RBD), hedef reseptöre bağlanması için S1-CTD'nin (trimerik) konformasyonel olarak açık (up) pozisyonda olması gereklidir. Bilimsel veriler, yüksek patojenik CoV'ların (SARS-CoV-2, SARS-CoV ve MERS-CoV) spike protein trimerlerinin kısmen açık pozisyonda (spontan olarak kapalı ve açık) olduğunu, buna karşın insanlarda genel soğuk algınlığı ile ilişkili düşük patojenik CoV'lardaki (HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-229E) spike protein trimerlerinin ise genel olarak kapalı pozisyonda olduğuna işaret etmektedir.¹⁵⁻¹⁸ Dolayısıyla SARS-CoV-2 spike protein trimerlerinin de kısmen açık pozisyonda olması, SARS-CoV-2'nin, SARS-CoV ve MERS-CoV gibi yüksek patojeniteye sahip olduğunu destekleyen bir bulgu olarak ifade edilmektedir.¹⁹

TGEV, domuz salgını ishal virüsü [porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)] ve domuz solunum koronavirüsü (porcine respiratory coronavirus) alfa-CoV'ları; yarası koronavirüsü HKU4 (bat coronavirus HKU4), MHV, sığır koronavirüsü (bovine coronavirus), IBV ve domuz deltakoronavirüsü (porcine deltacoronavirus) ise sırasıyla gama ve delta-CoV'ları temsil eden CoV'lardır.⁵ Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi Koronavirüs Çalışma Grubu tarafından, SARS-CoV-2'nin Betacoronavirus cinsi ve Sarbecovirus alt cinsi içerisinde SARS-CoV türü olarak adlandırılması önerilmiştir.²⁰ SARS-CoV-2'nin, ayrıca bilimsel literatürde kullanımı amacıyla hCoV-19 şeklinde adlandırılarak kullanılması da önerilmektedir.²¹

VİRAL BİYOGENEZ VE VİRAL PROTEİNLER

CoV'lar, 27-32 Kb arasında değişen genom büyüklükleri ile bilinen en büyük genoma sahip RNA virüsleridir. CoV'ların biyogenezini içeren transkripsiyon ve replikasyon süreçleri ve bunlara dâhil moleküler mekanizmalar, bu derlemenin kapsamı dışında olmakla birlikte özetle; virüsün, hücre içine girişi ve nükleokapsidin ayrışması sonucu serbest kalan pozitif polariteli genomik RNA çift membranlı veziküller içinde bir replikaz-transkripsiyon kompleksi [replication-transcription complex (RTC)] oluşturmak için yapısal olmayan proteinleri [nonstructural protein (nsp)] kodlayan polipeptin 1a/1b'nin (pp1a/pp1b) direkt olarak translasyonunu gerçekleştirmek amacıyla bir kalıp olarak kullanılır. Oluşturulan RTC içinde kesintisiz bir transkripsiyonel süreç dâhilinde ikincil subgenomik mRNA'lar (sgRNAs) ve bunların da pozitif polariteye sahip olanlarının tekrar bir kalıp olarak kullanılması ile genomik mRNA'ların sentezi gerçekleştirilir.^{1,22}

SARS-CoV-2 genomu, yaklaşık 14 açık okuma çerçevesi [open reading frames (Orf)] içerir. Viral genomun yaklaşık 2/3'ünü kapsayan 5'Orf1a/Orf1b'nin kodladığı polipeptin, oto-proteolitik bir süreç dâhilinde RTC'yi oluşturan 16 nsp'ye (nsp1-16) (gama-CoV'larda nsp1 kodlanmaz) proteoliz edilir. RTC, papain benzeri proteaz (lar) (nsp3), temel proteaz (nsp5), nsp7-nsp8 primaz kompleksi, primer RNA bağımlı RNA polimeraz (nsp12; RdRp), bir helikaz/trifosfatase (nsp13), bir ekzoribonükleaz (nsp14), bir endonükleaz (nsp15), N7 ve 2'O-metiltransferaz (nsp10/nsp16) gibi viral replikasyon aşamasında spesifik role sahip majör enzimler ile bir kısmının fonksiyonu ise henüz tam olarak bilinmeyen çoklu enzimleri içerir.^{5,23,24} Viral genomun 3' ucundaki tahminen 9 subgenomik RNA'dan, 13 Orf eksprese edilir. Bunların 4'ü yapısal, kalan 9'u ise aksesuar proteinleri kodlar. Dört Orf'tan sırasıyla yüzey protein [spike (S)], membran [membrane (M)], zarf [envelope (E)], ve nükleokapsid [nucleocapsid (N)] proteinleri kodlanır. Yapısal proteinelere ek olarak farklı CoV'lar, zarfla ilişkili hemaglutinin esterase protein, 3a/b protein, 4a/b protein gibi özel aksesuar ve özel yapısal proteinler kodlarlar. Tüm yapısal ve aksesuar proteinler, CoV'ların sgRNA'ları tarafından kodlanır.²³

CoV'ların, nsp'leri kodlayan bölgeleri %58, yapısal proteinleri kodlayan bölgeleri %43, tüm genom düzeyinde ise %54 oranında benzerlik gösterir. CoV'ların, yaklaşık 30 Kb gibi büyük genoma sahip olmalarının, RTC içinde yer alan ve RNA virüsleri içerisinde sadece CoV'lara özgün olduğu bilinen, hata düzeltme fonksiyonu olabileceği öngörülen 3'-5' ekzoribonükleaz gibi bazı enzimlerin edinilmesine katkı sağladığı düşünülmektedir.²⁵ SARS-CoV'lar; ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b ve ORF8 (ya da ORF8a ve 29 nt'lik delesyon sonucu oluşan ORF8b) tarafından kodlanan altı yedi aksesuar protein içerirler ki bu özellik, Betacoronavirus cinsi ve Sarbecovirus alt cinsi içerisindeki tüm SARS benzeri CoV'lara özgü ortak bir özelliktir.⁵ Aksesuar proteinlerin biyokimyasal fonksiyonları ise henüz tam olarak belirlenememiştir. Buna göre 3a apoptozu tetiklenmesi, nükleer faktör-kappa B (NF-κB) aktivasyonu, normal T hücrelerin ekspresyonunu ve salınımı aktive ve regüle eden kemokinlerin [regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES)] indüksiyonu ve interlökin-8 sentezi; protein 3b, Tip I interferon (IFN) inhibisyonu ve apoptozun indüksiyonu; protein 6, IFN sinyal inhibisyonu ve DNA sentezinin stimülasyonu; protein 7b'nin fonksiyonu henüz net olarak tanımlanmamasına karşın protein 7a, CXCL8 ve RANTES sentezi için mitojen aktive protein kinaz (MAPK8) ve NF-κB aktivasyonunu içeren fonksiyonlara sahiptir.²⁶

Yarasa ve misk kedilerinin tüm SARS ilişkili CoV'larında ve epideminin erken fazında izole edilen insan SARS-CoV'larda ORF8 bulunur. Protein 8, katlanmamış protein yanıtları için hedef genleri aktive edici transkripsiyon faktör 6'nın aktivasyonunu sağlar. Epideminin geç fazında insanlardan izole edilen SARS-CoV'ların genomları ORF8'i, ORF8a ve ORF8b olarak 2'ye ayıran 29 nt'lik delesyonla karakterize olup; ORF8a kaspaz bağımlı apoptozis, ORF8b ise hücresel DNA sentezinin modülasyonunda rol alır.⁵

CoV nsp'lerinin önemli bir kısmı, viral replikasyon aşamasında spesifik role sahip olmalarına karşın bir kısmının fonksiyonu ise henüz bilinmemektedir. Dört yapısal protein ise viral kurgu ve enfeksiyonun oluşması için gereklidir. M proteini, sahip olduğu 3 transmembran proteini aracılığıyla nükleo-

kapside bağlanarak, virüsün morfogenezinin oluşumuna katkıda bulunur. E proteini viral kurgu, viral morfogenez ve virüs salınımı ve viral patogeneze rol alır. E protein yokluğunda TGEV'de tamamen, SARS-CoV ve MHV'de ise virüsün biyogenezi sonrası hücre dışına salınımı kısmen inhibe olur.²⁷⁻³⁰ N proteinin, içerdiği 2 domain ve farklı mekanizmalar aracılığıyla viral genoma ve ayrıca nsp3'e bağlanarak, genomun RTC'ye bağlanmasında ve viral RNA'nın enkapsidasyonunda rol alabildiği, bir IFN agonisti olarak davranabildiği, MHV-3 ile enfekte farelerde fatal seyirli hepatik hastalığa katkıda bulunan protrombinazın aktivasyonuna sebep olabildiği, SARS-CoV enfekte hücrelerde dönüştürücü büyüme faktörü betanın sinyalizasyonunu modifiye edebildiği, N proteinin ayrıca S protein gibi immünojen özelliğe sahip olduğu, enfeksiyon sürecinde S proteininden hemen sonra antikör sentezini indükleyebildiği, dolayısıyla serolojik tanıda kullanılan hedef bir protein olduğu bilinmektedir.^{1,31}

KORONAVİRÜSLERİN SPIKE PROTEİNLERİ VE RESEPTÖR TANIMA FONKSİYONU

CoV'ların spike proteinleri, CoV'ların konak hücreye girişine aracılık eden çok fonksiyonlu moleküler makinelerdir. CoV'ların spike proteinleri, reseptör tanıma ve membran füzyonunu içeren 2 kritik fonksiyona sahiptirler. Spike proteinin konak hücre reseptörünü tanıma, tutunma ve bağlanması ile konak hücre ve viral membranların füzyonu, enfeksiyonun başlamasında rol alan en temel virolojik süreçlerdir. Reseptör kullanımının çeşitliliği, CoV'lara özgü seçkin bir özelliktir. Spike proteini, ayrıca konak aralığı ve doku tropizmi belirlenmesi ile özellikle humoral tipte immün yanıtların aktivasyonunun sağlanmasında da kritik öneme sahiptir.³² Dolayısıyla viral biyogenezin bu basamakları, SARS-CoV enfeksiyonlarının tedavisi ve/veya immünizasyonu amacıyla geliştirilecek antiviral terapötikler ve aşı tasarımlarının da temel hedeflerini teşkil etmektedir. ACE2, ilk defa 2003 yılında Li ve ark. tarafından hücre hatlarında (in vitro) fonksiyonel bir SARS-CoV reseptörü olarak tanımlanmıştır.³³ 2005 yılında ise Kuba ve ark. tarafından in vivo düzeyde yapılan deneysel çalışmalar ile ACE2'nin önemli bir SARS-CoV reseptörü olduğu genetik veriler ile desteklenmiştir.³⁴ SARS-CoV ve

SARS-CoV-2 S proteinleri arasındaki sekans benzerliğinin varlığı ile gerçekleştirilen yapısal çalışmalar ve biyokimyasal deneylerde, SARS-CoV-2'nin yüzey spike proteini (viral ligand) aracılığıyla hACE2'yi SARS-CoV'lara benzer şekilde hücre giriş reseptörü olarak kullandığı gösterilmiştir.^{19,35-39}

CoV'ların spike proteini büyük dış domain, membranlar arası tek yönlü geçiş sağlayan bağlantı ve kısa hücre içi kuyruktan oluşan 3 segment içerir. Dış domain reseptör bağlayan alt birim (S1) ve membran füzyonu ile ilişkili 2 alt birimden (S2) oluşur. Elektron mikroskop çalışmalarından elde edilen veriler, spike proteininin S1 alt biriminin 3 monomerik proteinden oluştuğu (trimer) ve bunların her birinin ayrı ama bitişik olacak şekilde S2'ye monte edildiği konfigürasyona işaret etmektedir. S1, konak hücre reseptörüne bağlanmadan, S2 ise viral ve konak hücre membranlarının füzyonundan sorumludur. Virüsün hücreye girişi sırasında S1'in, viral tutunma için konak hücre yüzeyindeki reseptöre bağlanması, S2'nin ise konak ve viral membranları kaynaştırması (füzyon), viral genomun konak hücre içine girmesini sağlar. Reseptöre bağlanma ve membran füzyonu, CoV enfeksiyon döngüsünün başlangıç ve en kritik basamaklarını oluşturur.^{16,17,32,40,41} CoV S1'de, N-terminal domain (S1-NTD) ve C-terminal domain (S1-CTD) olmak üzere 2 önemli domain tanımlanmıştır. S1'i oluşturan domainlerden 1 ya da 2'si, potansiyel olarak reseptörleri bağlar ve RBD olarak işlev görür. Beta-CoV farelerin hepatit ilişkili CoV'ları hariç CoV'ların S1-NTD'leri, genel olarak şekerlere bağlanmadan sorumlu olmalarına karşın S1-CTD'ler ise ACE2, aminopeptidaz N ve insan dipeptidil peptidaz 4 gibi protein reseptörlerin tanınmasından sorumludur.⁴²⁻⁴⁷ S1-CTD, bir kor (çekirdek) yapı ile reseptör bağlama motifinden [receptor-binding motif (RBM)] oluşan 2 alt domain içerir. Kor yapı, 5 adet β tabakasının antiparalel diziliminden oluşan bir konformasyona sahiptir. RBM, ACE2'ye bağlanmak için hafif konkav bir dış yüzeye sahiptir. Konkav yüzeyin tabanı kısa olup, antiparalel konformasyona sahip 2 tabakalı bir β sarmalı ile halkaların oluşturduğu 2 düğüm (halka) içerir.³²

ACE2'nin dış yüzeyi, membran-distal peptidaz ve membran-proksimal kollektin domain içerir.⁴⁸ SARS-CoV'un ACE2'ye bağlanması, ACE2'nin en-

zimatik aktivitesini engellemez, ACE2'nin enzimatik aktivitesi de SARS-CoV'un hücreye girişinde rol oynamaz. ACE2, lizin [lysine (Lys)] 31 ve Lys353 pozisyonunda SARS-CoV'lar için 2 kritik bağlanma noktası içerir. Bu nedenle SARS-CoV S1-CTD içerisinde, bu bağlanma noktaları ile yakın etkileşimde olan rezidüleri (sırasıyla SARS-CoV için 479 ve 487; SARS-CoV-2 için 493 ve 501. amino asit rezidüleri) mutasyona yönelik seçimli baskı altındadır. Dolayısıyla bu rezidülerde meydana gelen mutasyonlar, SARS-CoV S1-CTD'nin, hACE2'ye bağlanma afinitesinde değişikliğe neden olabilmektedir.⁴⁹⁻⁵¹ Bu nedenle viral RBD'deki birkaç mutasyonun, ciddi salgınlara neden olabilme potansiyeli yanında farklı hayvan türlerindeki reseptör homologlarının bir veya birkaç rezidüsünde olası varyasyonlar ise virüsün türler arası bulaşını engelleyebilen kritik bariyerleri oluşturma potansiyeline sahiptir.³² Farklı CoV türlerinin S1-CTD'leri arasında yapısal benzerlikler ve farklılıklar mevcuttur. Örneğin MERS ve SARS-CoV'ların S1-CTD'lerinin kor yapıları benzer olmasına karşın RBM'leri ise önemli farklılıklar içerir. Nihayetinde bu veriler korunmuş kor yapı içeren viral RBD'lerin, RBM'lerdeki yapısal varyasyonlar aracılığıyla farklı reseptörleri tanıyabildiğini belirtmesine ek olarak konak seçimi/aralığının belirlenmesinde reseptör tanınmanın kritik belirleyici rolüne dair yaklaşımı da destekler niteliktedir.³² Benzer şekilde alfa ve beta-CoV'ların S1-CTD'lerinin kor yapıları farklı olmasına karşın topolojik yapılarının benzerliği, bu virüslerin evrimsel orijinlerinin benzerliğine işaret etmektedir. Keza alfa-CoV HCoV-NL63 ve SARS-CoV'un RBD'leri yapısal olarak farklı olmalarına karşın her 2 virüsün de reseptör olarak ACE2'yi kullanabilmelerine ve ACE'ye benzer viral bağlanma motifleri üzerinden bağlanabilmelerine, viral RBD'lerin yapısal farklılıklarına rağmen aynı protein reseptörü üzerindeki kritik bağlanma noktalarını kullanabildiklerine, nihayetinde CoV'ların S1-CTD'leri arasında kompleks bir evrimsel ilişkinin varlığı ve bu domain üzerinde tür düzeyinde yoğun bir evrimsel baskının varlığına işaret eder.^{51,52}

CoV'ların spike proteinleri aracılığı ile reseptöre bağlanabilmesi için RBD'lerinin konformasyonel olarak açık (up) pozisyonunda olması gereklidir. CoV'ların RBD'leri açık pozisyonunda iken atomik dü-

zeyde kararsız bir yapıyı, reseptöre ulaşılabilir olmadığı kapalı pozisyonunda ise daha kararlı bir yapıyı sergiler. Perfüzyon öncesi atomik düzeyde bu moleküler yapıların belirlenmesi, nötralizan antikor hedeflerinin tespiti ile aşı dizaynı ve geliştirilmesi için önem taşımaktadır.⁵³ Beta-CoV'ların S1-NTD'leri ise RBM'lerinin konformasyonuna bağlı olarak ya bir protein reseptörü ya da bir şeker reseptörünü tanıır.³² Alfa, beta ve gama-CoV'ların S1-NTD'lerinin yapıları henüz açık değildir. Buna karşın bilimsel düzeyde gerçekleştirilen gözlem ve veriler, hepsinin bir galektin katlanması içerdiği yönündedir. İlk olarak alfa ve beta-CoV'ların S1-CTD'leri arasındaki yapısal benzerlik, farklı türlerin S1 alt domainleri arasında benzer evrimsel orijine, 2. olarak ise alfa-CoV TGEV ve PEDV ile gama-CoV IBV'nin S1-NTD'lerinin şeker reseptörlerini tanıması, buna karşın TGEV S1-NTD'nin, N-glikolilnöraminik asit [N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc)] ve N-asetilnöraminik asidi [N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac)] tanıması, PEDV S1-NTD'nin Neu5Ac ve IBV S1-NTD'nin de Neu5Gc tanıması, farklı türlerin S1-NTD'lerinin olasılıkla evrimsel ve yapısal benzerliğine işaret etmektedir.^{42,54,55} Bu açıdan özetle ilksel CoV'ların, konak galektin genlerinin eldesi yoluyla S1-NTD'leri oluşturularak, şeker reseptörleri aracılığıyla hücreye girip, biyogenez ve doğal yaşam süreci içinde spike gen ve proteinlerinin evrilmesini gerçekleştirmiş olabileceği öngörülebilir.³²

KORONAVİRÜS SPIKE PROTEİN ARACILI MEMBRAN FÜZYONU

Membran füzyonu, zarflı virüslerin hücreye girmesi için gerekli olan en temel ve en kritik aşamadır.⁵⁶ CoV'ların spike proteinleri influenza virüs, HIV ve Ebola virüslere benzer sınıf I viral membran füzyon proteinleri sınıfına dâhildir. Membran füzyonu, ya hücre yüzeyinde ya da endozomlarda gerçekleşir ve bunun için hücre düzeyinde bir takım enerji bariyerlerinin aşılması gerekir.^{57,58} Spike proteinlerinin füzyon öncesi ve sonrası konformasyonel değişimi, membran füzyonuna imkân verecek şekilde tetiklemek zorundadır. CoV spike proteinlerinin trimerik yapısı, S2'nin konformasyonel değişimini engeller. S1-CTD, spikenin üst kısmında lokalize iken, S1-NTD ise S2 ile direkt bağlantı hâlinindedir. S2 içeri-

sinde yer alan heptad tekrar N [heptad repeat N (HR-N)] oluşturduğu heliks formu aracılığıyla S2 aksisi boyunca stabil ve oldukça düzgün bir sıralanma sergilemesine karşın, HR-C ise daha zayıf bir sıralanma ve/veya yerleşme özelliği sergiler. CoV spike füzyon peptidi, S2'nin alt bölgesinde yer alması nedeniyle bir internal füzyon proteindir.³² S1/S2 sınır bölgesi ile internal füzyon proteininin N terminalinde yer alan 2 proteoliz bölgesi, S2'nin konformasyonları arasında geçişte (dönüşüm) kritik öneme sahiptir.^{59,60} Füzyon öncesi CoV spike proteini, konak hücre membranı ile viral membran arasındaki füzyon için konformasyonel yeniden düzenlenmeye izin verecek şekilde yarı kararlı bir yapıya sahiptir. Atomik düzeyde yapılan çalışmalarda gösterilmemesine karşın negatif elektron mikroskop çalışmaları, virüsün hücreye girişi sırasında membran füzyonu ile ilişkili konformasyonel değişimi destekler niteliktedir.^{38,61} CoV'ların spike proteinlerinin konformasyonları arasında geçiş oldukça kompleks bir süreçtir. CoV spike proteininin proteolizi, sıklıkla hücreye giriş sürecinden sonra bazen reseptöre bağlanmadan sonra gerçekleştirilir. CoV spike proteininin proteolizi, doğrudan membran füzyonuna yol açabildiğinden, bu durum ayrıca membran füzyonu için temel bir tetikleyici görevi de görebilmektedir.^{59,60} CoV'ların spike proteinlerinin kesiminde görev alan proteazlar, viral biyogenezin 4 farklı aşamasında etkinlik gösterirler:

a. Virüs sentezinin gerçekleştiği hücrelerde, virüsün girişi ve/veya salınımı (viral kurgu, biyogenez) sırasında görev yapan öncü protein proteazlar (örneğin furin),

b. Virüsün, hücre dışına salınımı sonrasında görev alan hücre dışı proteazlar (örneğin elastazlar),

c. Virüsün hedef hücreye tutunması sonrası görev alan hücre yüzey proteazları [örneğin Tip II transmembran serin proteazlar (transmembrane serine protease 2 "TMPRSS2")],

d. Virüsün, hedef hücrede endositozu sonrası görev alan lizozomal proteazlar (örneğin katepsin L ve katepsin B). Proteolize ek olarak reseptör bağlanması sürecinde düşük pH'de membran füzyonunda önemli rol oynayabilmektedir.³²

CoV'ların spike proteinlerinin proteoliz süreci ve aşamaları, tür düzeyinde farklılık gösterir. SARS-

CoV spike proteini, hücre içinde virüsün paketlenme sürecinde öncü proteazlar tarafından kesilmez, dolayısıyla spike olgun virion üzerinde bütünlüğünü korur. SARS-CoV'ların spike protein kesimi, daha çok virüsün endositoz aracılı hücreye giriş aşamasında ve lizozomal proteazlar (katepsin L ve katepsin B) tarafından gerçekleştirilir. Endozomal asidifikasyon veya lizozomal sistein proteazlara karşı inhibitörlerin, SARS-CoV'ların hücre girişini bloke etmesine yönelik gözlemler bu yaklaşımı doğrular niteliktedir. Bununla birlikte düşük pH, tek başına SARS-CoV'ların hücreye girişi için tetikleyici bir faktör olmamasına karşın lizozomal proteazları aktive ederek, membran füzyonu için SARS-CoV spike proteininin aktivasyonuna katkı sağlar.^{62,63} Lizozomal proteazlara ek olarak solunum sistemindeki elastaz gibi hücre dışı proteazlar ile akciğer hücre yüzeyindeki TMPRSS2 gibi hücre yüzey proteazları, membran füzyonu için SARS-CoV spike proteinini aktive edebilir. Keza bu proteazların hücre ve doku spesifitesi, SARS-CoV'ların solunum sistemi ve akciğerlere tropizmine katkı sağlar.⁶⁴⁻⁶⁷ Virionun, konak hücre tarafından alınımı öncesi ve/veya sonrasında virüsün S proteini, konağın proteazları tarafından 1 ya da 2 kesim alanından proteolize tabii tutulur. Bu işlem, reseptör tanıma ile birlikte CoV'ların hücreye girişi için gerekli konformasyonel değişimi sağlar. S1/S2 arasındaki kesime ek olarak S2 içerisinde internal füzyon peptidinin N terminal bölgesinde yer alan 2. bir kesim alanı olarak S2' tanımlanmıştır. S1/S2 alanından kesim, MHV gibi virüsler için viral salınım aşamasında, SARS-CoV için ise hedef hücre ile karşılaştığında gerçekleşir. Ayrıca bu kesim, S2'nin proteolizini artırıcı yönde teşvik sağlar. S2'nin proteolizi, tüm CoV'ların füzyon aktivasyonu için esastır. S1/S2 alanından kesim, S2 üzerindeki S1'in yapısal baskısını kaldırmasına karşın S2' bölgesinden kesim ise internal füzyon peptidinin hedef membranlar içine eklenmesi için salınımına olanak sağlar.^{16,17,32,40,41,68,69} ACE2'ye bağlanmanın, SARS-CoV spike proteininin membran füzyonu için tetikleyici bir unsur olup olmadığı açık değildir. Elektron mikroskop çalışmalarından elde edilen veriler, ACE2'ye bağlanmanın, S proteininin kısmen konformasyonel değişimine katkıda bulunduğu yönünde iken, diğer çalışmalar ise ACE2'ye bağlanmanın, SARS-CoV

spike proteininin konformasyonel değişimi tetikleyerek, kesim için enfekte ettiği konağın bazı kriptik proteazları ile temasını sağlayabileceği yönündedir.^{70,71} SARS-CoV'ların hücreye girişi düşük pH'ye bağımlı olmamasına karşın SARS-CoV'ların hücreye girişi için viral spike proteininin lizozomal, hücre dışı veya hücre yüzey proteazları gibi en az 2 proteaz tarafından kesilmesi gereklidir.³²

MERS-CoV'ların hücre giriş mekanizmaları, SARS-CoV'lara benzerlik gösterir. SARS-CoV'lara benzer şekilde membran füzyonunun gerçekleşmesi için MERS-CoV'ların da hem S1/S2 alanından hem de S2' bölgesinden proteolize edilmesi gereklidir. MERS-CoV'lar, ayrıca endositoz yoluyla konakçı hücrelere girer ve membran füzyonu için lizozomal sistein proteazlar tarafından aktive edilir. Ek olarak hücre dışı ve yüzey proteazları da MERS-CoV'ların hücre giriş aktivasyonuna katkıda bulunur. SARS-CoV'ların aksine MERS-CoV spike proteini, hücre içinde viral biyogenezin kurgu aşamasında konak öncü protein konvertazları tarafından kesilir.⁶⁹⁻⁷¹

Özetle; proteoliz, CoV'ların spike proteinlerinin membran füzyonunu tetikleyen temel bir biyolojik süreç olup, sırasıyla S1/S2 alanından kesimde olduğu gibi S2' bölgesinden kesimde, S1 üzerindeki S2'nin yapısal baskısını kaldırarak, internal füzyon peptidinin serbest kalmasını sağlar. Birçok hücrede çok sık ve çok fazla bulunmaları sebebiyle lizozomal proteazların, spike proteininin bu sürecinde daha fazla rol alması beklenir. Buna karşın diğer proteazların, bu süreçteki önceliği ve işlevi ise CoV'ların doku tropizminin regülasyonu ile doku ve hücre tipine bağlıdır. Nihayetinde bu tetiklemelerin temel amacı, CoV'ların spike proteinlerinin yapısal konformasyonları arasında geçiş/değişim/dönüşüm için gerekli enerji bariyerinin aşılmasına yöneliktir.³²

KORONAVİRÜS SPIKE PROTEİNLERİNİN ORİJİNİ VE ADAPTASYONU

CoV spike proteinleri, diğer sınıf I viral membran füzyon proteinleri gibi son derece özgün moleküler özelliklere sahiptirler. CoV spike proteinleri, konak hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanma ile viral ve konak membranlarının füzyonunu sağlayarak, CoV'ların konak hücreye girmelerini olanaklı hâle

getirir. Spike proteininin füzyon öncesi ve sonrası konformasyonundaki dönüşüm, farklı tetikleyici faktörler tarafından düzenlenir. Gerek reseptör tanıma gerekse membran füzyonu, CoV'ların doku tropizmi ve konak aralığının kritik belirleyicileridir. Beta-CoV S1-NTD'nin galektin kıvrımlarına sahip olması, NTD'lerin virüs konak etkileşimi süreci içerisinde enfekte ettikleri konaktan edinilmiş olduğuna işaret eder. Buna karşın CoV S1-CTD'lerin orijini ise açık değildir. S1-NTD'nin konak galektinleri ile ilişkisi CTD'nin, NTD'nin gen duplikasyonları ile oluşmuş olabileceğini olası kılmaktadır. S1-CTD konak immün denetiminden kaçmak için yoğun bir seçimli baskıya maruz kalması da orijininin belirlenmesini güçleştirmektedir. CoV'ların S2'sinin yapı ve fonksiyonu ise sınıf I membran füzyon proteinleri ile benzerlik göstermesi, sınıf I viral füzyon proteinlerinin ortak evrimsel bir atadan türemiş olabileceğine dair verileri oluşturmaktadır.³² Viral replikasyonun devamlılığının sağlanması, virüslerin hücreye girişi için temel gerekçe olmasından hareketle membran füzyonu S proteininin temel fonksiyonunu teşkil eder. Reseptör tanıma ise CoV'ların, konak hücre yüzeyine spesifik olarak tutunmasında işlevseldir. Bu açıdan nörotropik fare hepatit virüs JHM suşlarının, reseptör bağımsız hücreye girebilmeleri bazı olağan dışı durumlarda reseptöre bağlanmanın ötelenebileceğini ifade etmektedir. Dolayısıyla CoV'ların S proteinlerinin ilksel formlarının sadece S2 içerdiği öngörülebilir. Bu açıdan atasal virüsün yakın hücre hedeflerine, spesifik olmayan bir şekilde difüze olmak zorunda kalması sonucu, membran füzyonu gelişmiş olabilir ve sonradan S1-NTD'nin galektin genleri aracılığıyla evrilmesi, virüsün hücreye giriş etkinliğinin artmasına, bir sonraki aşamada ise S1-CTD'nin S1-NTD'den gen duplikasyonları ve benzer mekanizmalar aracılığıyla evrilmesi de reseptör tanıma fonksiyonunun daha da etkinleşmesine katkı sağlamış olabilir.³²

SARS-CoV-2'nin hem insan immün sisteminin denetiminden kaçabilmesi hem de yüksek enfektiviteye sahip olması, hızlı yayılmasına olanak tanıyan özgün virolojik özellikleridir. SARS-CoV-2'nin RBD'nin hACE2'ye bağlanma afinitesi, SARS-CoV'un RBD'den daha yüksek olmasına karşın SARS-CoV-2 spike proteininin (tüm yüzey proteini)

hACE2'ye bağlanma afinitesi, SARS-CoV'un spike proteininin hACE2'ye bağlanma afinitesine benzer ya da kısmen daha düşüktür.⁷² SARS-CoV-2 RBD'nin, ACE-2'ye bağlanma afinitesinin, SARS-CoV'dan daha yüksek olmasına ek olarak, viral spike proteinini kodlayan genomda polibazik (furin) bir kesim alanı insersiyonu içermesiyle de farklılık gösterir.³⁹ Yüzey proteini üzerindeki proprotein konvertaz motifi (PKM), yüksek patojenite niteliği taşır. Replikasyon kusurlu lentivirüsler kullanılarak gerçekleştirilen hücre kültürü (in vitro) temelli deneysel çalışmalarda, SARS-CoV-2'nin viral biyogenezin kurgu ve virionun hücre dışına salınım aşamalarında proteazlar tarafından kesildiği, dolayısıyla SARS-CoV-2 spike proteininin hücre içerisinde viral biyogenez aşamalarında PKM'ler tarafından kesiminin SARS-CoV-2'lerin hedef hücre içine giriş etkinliğini artırdığı, furinin de bir PKM olarak SARS-CoV-2'nin spike proteinini preaktive edebildiği, buna karşın SARS-CoV-2'nin hücreye girişinin esasen PKM preaktivasyonuna bağlı olmadığı gösterilmiştir. Nihayetinde SARS-CoV-2'nin proprotein konvertaz furin tarafından preaktivasyonu, virüsün hücreye giriş için gerekli olan hedef hücre üzerindeki proteazlara olan bağımlılığını azaltır. COVID-19'lu hastalarda nötralizan nitelikli antikorlar düzeylerinin düşük olması ve nekahet döneminin uzun süreli olması, SARS-CoV-2'nin immün denetimden kaçınabildiğine işaret etmektedir. CoV'ların spike protein RBD'leri, reseptöre bağlanma için dik (açık) veya immün tanımadan kaçınmak için yatık (kapalı) konformasyonları arasında geçiş yapabilme özelliğine sahiptir. Yapılan elektron mikroskop çalışmalarında SARS-CoV-2 spike proteininin RBD'nin yapısal olarak genellikle yatık konformasyonda olduğu gösterilmiştir.^{38,41} SARS-CoV-2 spike proteininin RBD'sinin yapısal olarak yatık konformasyonda olması ise RBD'nin hACE2'ye ulaşmasını sınırlandırabilmesine karşın insan immün sisteminin denetiminden kaçmasına da olanak sağlayabilmektedir. Dolayısıyla SARS-CoV ile karşılaştırıldığında SARS-CoV-2 RBD'nin, hACE2'ye daha yüksek afinite ile bağlanmasına karşın SARS-CoV-2 S proteininin, hACE2'ye bağlanma afinitesinin daha düşük olması, spike proteininin RBD'nin yapısal konformasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Nihayetinde SARS-CoV-2 spike protein RBD'nin, hACE2'ye yüksek afinite ile

bağlanması, spike proteininin furin ile preaktivasyonu, RBD'nin yapısal olarak yarı kapalı pozisyonda olması, SARS-CoV-2'nin immün tanımadan kaçınabilmesine karşın hücre girişini etkin bir şekilde sürdürmesine ve hızlı yayılmasına olanak tanıyabilmektedir.⁷²

SARS-CoV-2 RBD'si, viral spike proteininin en immünojenik epitoplarını ihtiva etmesine karşın immün tanıma denetiminden kaçabilmesi ise aşı ve antikor bazlı terapötikler aracılı nötralizan antikorların bu bölgeye ulaşmasını sınırlandırma potansiyelini işaret ettiğinden, bu bölgeyi hedefleyen aşı ve antikorların nötralizan etkinliğini artıracak detaylı yapısal tasarımlara ihtiyaç duyulduğu açıktır.

POTANSİYEL TERAPÖTİKLER VE TERAPÖTİK HEDEFLER

İnsanlarda enfeksiyon etkeni olarak tanımlanmış CoV'lar için henüz onaylanmış ve/veya tedavi etkinliği gösterilmiş terapötikler ve aşılardan mevcut değildir. SARS-CoV-2'nin antiviral tedavisine yönelik terapötik hedeflerin tespiti amacıyla afinite-safılaştırıcı kütle spektrometresi kullanılarak yapılan bir çalışmada, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından terapötik veya terapötik hedef olarak onaylanmış ya da farklı aşamalarda onay aşamasında olan yaklaşık 70'i insan proteinleri veya konak faktörlerini içeren 332 adet SARS-CoV-2 ve insan protein-protein etkileşimin tanımlandığı ve tanımlanan terapötik hedeflerin potansiyel antiviral ilaç tasarımları için değerlendirilme aşamasında olduğu rapor edilmiştir.²⁴ COVID-19 tedavisine yönelik henüz bilimsel ve klinik olarak tedavi etkinliği onaylanmış spesifik bir antiviral terapötik bulunmamasıyla birlikte SARS-CoV-2'nin spike proteini aracılı hücre girişinin ACE-2 ilişkili reseptöre bağlanmasının engellenmesine yönelik Arbidol (umifenovir/Pharmstandard/Russia) ile viral ve hücre membranlarının füzyonunun ve/veya endositozunun engellenmesine yönelik proteaz (serin) TMPRSS2'nin inhibisyonunu hedef alan Camostat mesylate (FOIPAN®/Japan) ve ayrıca spesifik antiviral ve immün hedefleri tam olarak bilinmemekle birlikte virüsün reseptör ilişkili glikozilasyonunun önlenmesi ve endozomal pH'nin artışı üzerinden viral girişin engellenmesine ek olarak otofajinin azaltılması, toll benzeri reseptör sinyallerinin blokajı ve si-

tokin sentezinin azaltılmasına yönelik immün düzenleyici etkinliği olabileceği de öngörülen klorokin/hidroksiklorokin olası potansiyel antiviral ve/veya immünomodülatör etkinlikleri nedeniyle profilaktik ve/veya preemtif tedavi amacıyla kullanılabilir. ^{73,74}

SONUÇ

Viral enfeksiyonların seyri ve sonuçları, virüse ait viral faktörler ile enfekte bireye ait konak faktörleri ve ayrıca çevresel faktörlerin karşılıklı etkileşimi ile şekillenen dinamik bir süreçtir. SARS-CoV-2'nin spike proteinini kodlayan viral genomda doğal süreç içerisinde meydana gelen özgün mutasyon ve rekombinasyonların, virüsün tür bariyerini aşarak insanlarda bulaşma yapma yetkinliği ile insan immün sisteminin denetiminden kaçabilme ve yüksek enfektivite gibi özgün virolojik karakteristik özelliklere sahip olmasına imkân sağlayarak, küresel düzeyde salgın oluşturabilmesinde de belirleyici olduğu anlaşılmaktadır. SARS-CoV-2 enfeksiyonundan korunmaya yönelik etkin bir immünizasyon ile tedaviye yönelik antiviral terapötik seçeneklerin sınırlı kalması durumunda, gelecek dönemde COVID-19 pandemisinin tıbbi, ekonomik ve sosyal yükünün artması öngörülebilmektedir. COVID-19 pandemisi ile mücadelede, enfekte bireye ve çevreye ait faktörler farklı düzeylerde de olsa kontrol edilebilir olmasına karşın viral faktörlerin kontrolü ve öngörülmesi olanaklı değildir. SARS-CoV-2'nin spike protein RBD ile reseptörü hACE2 arasındaki etkileşimin dinamiği, salgının seyri ile viral patojenite ve virülansı belirleyen temel viral faktördür. SARS-CoV-2'nin yayılımı, tüm dünyada hızla devam etmekte ve zaman içerisinde virüsün virülansının hangi yönde

değişeceği henüz bilinmemektedir. Bununla birlikte salgın sürecince insan immün sistem baskısı sonucu SARS-CoV-2 spike proteini kodlayan viral genomda, reseptörü hACE2 ile etkileşimini zayıflatacak yönde mutasyonların olması beklenebilir. Bu yönde meydana gelecek mutasyonların, salgının seyri ve sonuçlarını olumlu yönde etkileyeceği aşıkardır. Sonuç olarak; SARS-CoV-2'nin spike proteini ve reseptörü hACE2 ile etkileşimi, salgının dinamiğini belirleyen temel faktörlerden biri olması nedeniyle bu etkileşimin biyolojik ve immünolojik yönlerinin moleküler düzeyde aydınlatılmasının, virüsün orijinine yönelik bilimsel çalışmalar ile salgınla mücadele, tedavi ve korunmaya (immünizasyon) yönelik hedef ve stratejilerin belirlenmesi ve uygulanmasına yönelik çabalara önemli katkılar sağlanması beklenir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Bu çalışma tamamen yazarın kendi eseri olup başka hiçbir yazar katkısı alınmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(6):439-50. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
2. Graham RL, Baric RS. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J Virol.* 2010;84(7):3134-46. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
3. Li F. Receptor recognition and cross-species infections of SARS coronavirus. *Antiviral Res.* 2013;100(1):246-54. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
4. Weiss SR, Navas-Martin S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005;69(4):635-64. [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
5. Luk HKH, Li X, Fung J, Lau SKP, Woo PCY. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of SARS coronavirus. *Infect Genet Evol.* 2019;71:21-30. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
6. Tyrrell DA, Bynoe ML. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lancet.* 1966;1(7428):76-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
7. Hamre D, Procknow JJ. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1966;121(1):190-3. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
8. Witte KH, Tajima M, Easterday BC. Morphologic characteristics and nucleic acid type of transmissible gastroenteritis virus of pigs. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1968;23(1):53-70. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
9. Tyrrell DA, Almeida JD, Cunningham CH, Dowdle WR, Hofstad MS, McIntosh K, et al. Coronaviridae. *Intervirology.* 1975;5(1-2):76-82. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
10. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Family coronaviridae. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* London: Elsevier/Academic Press; 2012. p.806-28. [[Crossref](#)]
11. de Wilde AH, Snijder EJ, Kikkert M, van Hemert MJ. Host factors in coronavirus replication. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2018;419:1-42. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
12. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016;24(6):490-502. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
13. Li W, Sui J, Huang IC, Kuhn JH, Radoshitzky SR, Marasco WA, et al. The S proteins of human coronavirus NL63 and severe acute respiratory syndrome coronavirus bind overlapping regions of ACE2. *Virology.* 2007;367(2):367-74. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
14. Hofmann H, Pyrc K, van der Hoek L, Geier M, Berkhout B, Pöhlmann S. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(22):7988-93. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
15. Kirchdoerfer RN, Cottrell CA, Wang N, Pallen J, Yassine HM, Turner HL, et al. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature.* 2016;531(7592):118-21. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
16. Tortorici MA, Veesler D. Structural insights into coronavirus entry. *Adv Virus Res.* 2019;105:93-116. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
17. Walls AC, Tortorici MA, Bosch BJ, Frenz B, Rottier PJM, DiMaio F, et al. Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. *Nature.* 2016;531(7592):114-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
18. Li Z, Tomlinson AC, Wong AH, Zhou D, DesForges M, Talbot PJ, et al. The human coronavirus HCoV-229E S-protein structure and receptor binding. *Elife.* 2019;8:e51230. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
19. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell.* 2020;181(2):281-92.e6. Erratum in: *Cell.* 2020;183(6):1735. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
20. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):536-44. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
21. Wu Y, Ho W, Huang Y, Jin DY, Li S, Liu SL, et al. SARS-CoV-2 is an appropriate name for the new coronavirus. *Lancet.* 2020;395(10228):949-50. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
22. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol.* 2020;92(4):418-23. Erratum in: *J Med Virol.* 2020;92(10):2249. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
23. Masters PS. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res.* 2006;66:193-292. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
24. Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, Xu J, Obernier K, White KM, et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature.* 2020;583(7816):459-68. [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
25. Smith EC, Blanc H, Surdel MC, Vignuzzi M, Denison MR. Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: evidence for proofreading and potential therapeutics. *PLoS Pathog.* 2013;9(8):e1003565. Erratum in: *PLoS Pathog.* 2014;10(7):e1004342. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
26. Liu DX, Fung TS, Chong KK, Shukla A, Hilgenfeld R. Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. *Antiviral Res.* 2014;109:97-109. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
27. Nal B, Chan C, Kien F, Siu L, Tse J, Chu K, et al. Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. *J Gen Virol.* 2005;86(Pt 5):1423-34. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
28. Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, Bhella D, Baksh MF, Connelly S, et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J Struct Biol.* 2011;174(1):11-22. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
29. DeDiego ML, Alvarez E, Almazán F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, et al. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol.* 2007;81(4):1701-13. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
30. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 2015;1282:1-23. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
31. Zhao X, Nicholls JM, Chen YG. Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus nucleocapsid protein interacts with Smad3 and modulates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem.* 2008;283(6):3272-80. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
32. Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annu Rev Virol.* 2016;3(1):237-61. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
33. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* 2003;426(6965):450-4. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
34. Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med.* 2005;11(8):875-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
35. Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature.* 2020;581(7807):221-4. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]

36. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-3. [Crossref] [PubMed] [PMC]
37. Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J Virol*. 2020;94(7):e00127-20. [Crossref] [PubMed] [PMC]
38. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020;367(6483):1260-3. [Crossref] [PubMed] [PMC]
39. Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol*. 2020;5(4):562-9. [Crossref] [PubMed] [PMC]
40. Tortorici MA, Walls AC, Lang Y, Wang C, Li Z, Koerhuis D, et al. Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. *Nat Struct Mol Biol*. 2019;26(6):481-9. [Crossref] [PubMed] [PMC]
41. Walls AC, Tortorici MA, Snijder J, Xiong X, Bosch BJ, Rey FA, et al. Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(42):11157-62. [Crossref] [PubMed] [PMC]
42. Promkuntod N, van Eijndhoven RE, de Vrieze G, Gröne A, Verheije MH. Mapping of the receptor-binding domain and amino acids critical for attachment in the spike protein of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology*. 2014;448:26-32. [Crossref] [PubMed] [PMC]
43. Kubo H, Yamada YK, Taguchi F. Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein. *J Virol*. 1994;68(9):5403-10. [Crossref] [PubMed] [PMC]
44. Wong SK, Li W, Moore MJ, Choe H, Farzan M. A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem*. 2004;279(5):3197-201. [Crossref] [PubMed] [PMC]
45. Lin HX, Feng Y, Wong G, Wang L, Li B, Zhao X, et al. Identification of residues in the receptor-binding domain (RBD) of the spike protein of human coronavirus NL63 that are critical for the RBD-ACE2 receptor interaction. *J Gen Virol*. 2008;89(Pt 4):1015-24. [Crossref] [PubMed]
46. Hofmann H, Simmons G, Rennekamp AJ, Chaipan C, Gramberg T, Heck E, et al. Highly conserved regions within the spike proteins of human coronaviruses 229E and NL63 determine recognition of their respective cellular receptors. *J Virol*. 2006;80(17):8639-52. [Crossref] [PubMed] [PMC]
47. Du L, Zhao G, Kou Z, Ma C, Sun S, Poon VK, et al. Identification of a receptor-binding domain in the S protein of the novel human coronavirus Middle East respiratory syndrome coronavirus as an essential target for vaccine development. *J Virol*. 2013;87(17):9939-42. Erratum in: *J Virol*. 2013;87(21):11963. [Crossref] [PubMed] [PMC]
48. Towler P, Staker B, Prasad SG, Menon S, Tang J, Parsons T, et al. ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis. *J Biol Chem*. 2004;279(17):17996-8007. [Crossref] [PubMed] [PMC]
49. Li F. Structural analysis of major species barriers between humans and palm civets for severe acute respiratory syndrome coronavirus infections. *J Virol*. 2008;82(14):6984-91. [Crossref] [PubMed] [PMC]
50. Wu K, Peng G, Wilken M, Geraghty RJ, Li F. Mechanisms of host receptor adaptation by severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Biol Chem*. 2012;287(12):8904-11. [Crossref] [PubMed] [PMC]
51. Wu K, Chen L, Peng G, Zhou W, Pennell CA, Mansky LM, et al. A virus-binding hot spot on human angiotensin-converting enzyme 2 is critical for binding of two different coronaviruses. *J Virol*. 2011;85(11):5331-7. [Crossref] [PubMed] [PMC]
52. Li F. Evidence for a common evolutionary origin of coronavirus spike protein receptor-binding subunits. *J Virol*. 2012;86(5):2856-8. [Crossref] [PubMed] [PMC]
53. Gui M, Song W, Zhou H, Xu J, Chen S, Xiang Y, et al. Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding. *Cell Res*. 2017;27(1):119-29. [Crossref] [PubMed] [PMC]
54. Krempf C, Schultze B, Laude H, Herrler G. Point mutations in the S protein connect the sialic acid binding activity with the enteropathogenicity of transmissible gastroenteritis coronavirus. *J Virol*. 1997;71(4):3285-7. [Crossref] [PubMed] [PMC]
55. Liu C, Tang J, Ma Y, Liang X, Yang Y, Peng G, et al. Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhoea coronavirus. *J Virol*. 2015;89(11):6121-5. [Crossref] [PubMed] [PMC]
56. Harrison SC. Viral membrane fusion. *Virology*. 2015;479-480:498-507. [Crossref] [PubMed] [PMC]
57. Eckert DM, Kim PS. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:777-810. [Crossref] [PubMed]
58. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:531-69. [Crossref] [PubMed]
59. Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*. 2012;4(6):1011-33. [Crossref] [PubMed] [PMC]
60. Heald-Sargent T, Gallagher T. Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses*. 2012;4(4):557-80. [Crossref] [PubMed] [PMC]
61. Li F, Berardi M, Li W, Farzan M, Dormitzer PR, Harrison SC. Conformational states of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein ectodomain. *J Virol*. 2006;80(14):6794-800. [Crossref] [PubMed] [PMC]
62. Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL, Bates P. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(33):11876-81. [Crossref] [PubMed] [PMC]
63. Simmons G, Reeves JD, Rennekamp AJ, Amberg SM, Piefer AJ, Bates P. Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(12):4240-5. [Crossref] [PubMed] [PMC]
64. Glowacka I, Bertram S, Müller MA, Allen P, Soilleux E, Pfefferle S, et al. Evidence that TM-PRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *J Virol*. 2011;85(9):4122-34. [Crossref] [PubMed] [PMC]
65. Bertram S, Glowacka I, Müller MA, Lavender H, Gnirss K, Nehlmeier I, et al. Cleavage and activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by human airway trypsin-like protease. *J Virol*. 2011;85(24):13363-72. [Crossref] [PubMed] [PMC]
66. Shulla A, Heald-Sargent T, Subramanya G, Zhao J, Perlman S, Gallagher T. A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry. *J Virol*. 2011;85(2):873-82. [Crossref] [PubMed] [PMC]
67. Matsuyama S, Ujiie M, Morikawa S, Tashiro M, Taguchi F. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(35):12543-7. [Crossref] [PubMed] [PMC]

68. Belouzard S, Chu VC, Whittaker GR. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(14):5871-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
69. Belouzard S, Madu I, Whittaker GR. Elastase-mediated activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein at discrete sites within the S2 domain. *J Biol Chem*. 2010;285(30):22758-63. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
70. Beniac DR, deVarenes SL, Andonov A, He R, Booth TF. Conformational reorganization of the SARS coronavirus spike following receptor binding: implications for membrane fusion. *PLoS One*. 2007;2(10):e1082. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
71. Simmons G, Zmora P, Gierer S, Heurich A, Pöhlmann S. Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research. *Antiviral Res*. 2013;100(3):605-14. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
72. Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(21):11727-34. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
73. Sanders JM, Monogue ML, Jodlowski TZ, Cutrell JB. Pharmacologic treatments for coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *JAMA*. 2020;323(18):1824-36. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
74. Kapoor KM, Kapoor A. Role of chloroquine and hydroxychloroquine in the treatment of COVID-19 infection-a systematic literature review. *medRxiv*. 2020. [[Crossref](#)]