МУТАГЕНЕЗ.

SARS-CoV-2 – особенности генома, вероятные варианты происхождения, инсерции в ген спайкового белка

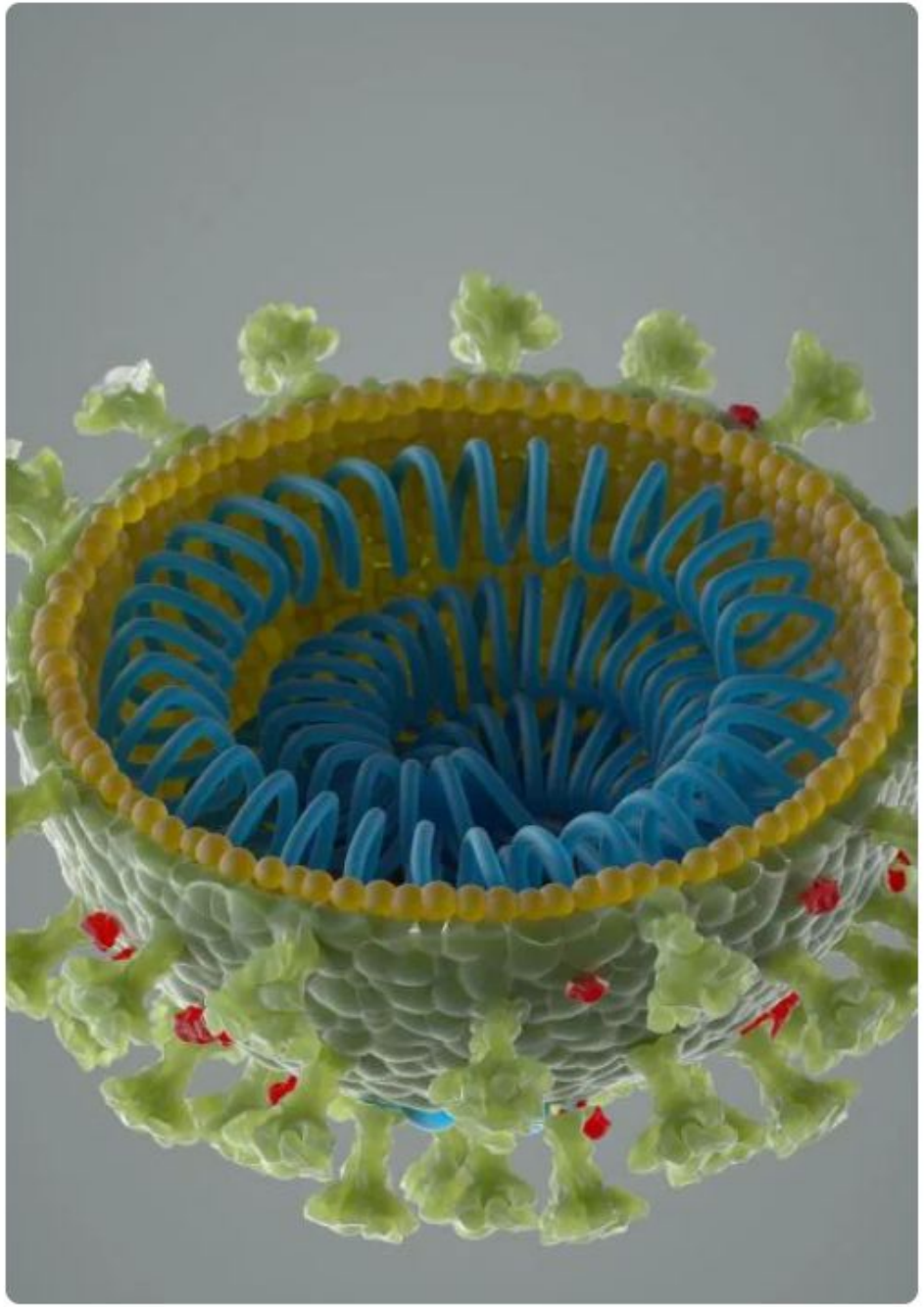
Для 3-го курса 7 факультета.

Цикл «Генетика»

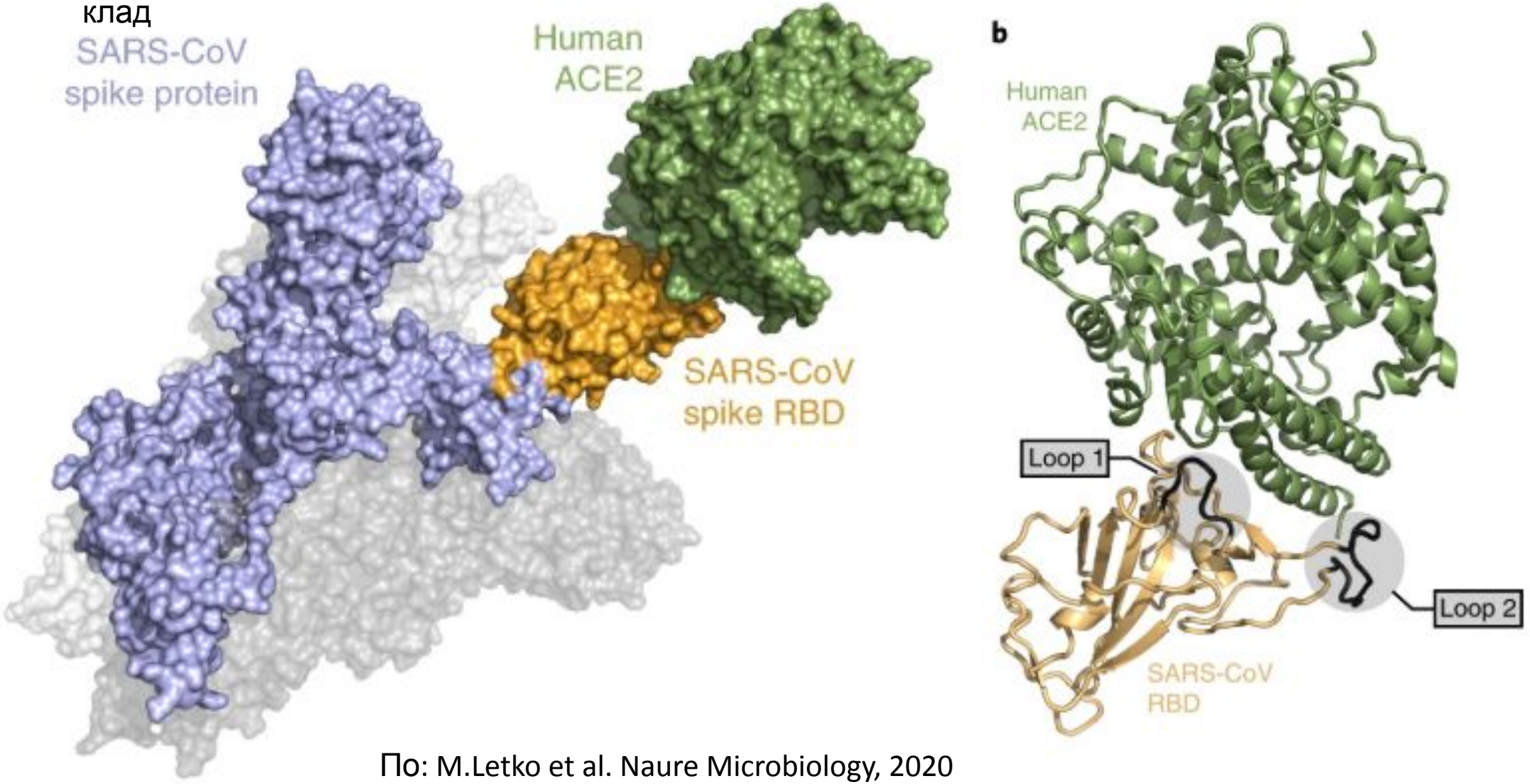
SARS-CoV-2 является седьмым по счету известным коронавирусом, обнаруживаемым у людей.

Среди описанных коронавирусов **SARS-CoV**, **MERSCoV** и **SARS-CoV-2** вызывают серьезные патологические изменения, в то время как **HKU1**, **NL63**, **OC43** и **229E** не ассоциируются с формированием тяжелой клинической картины

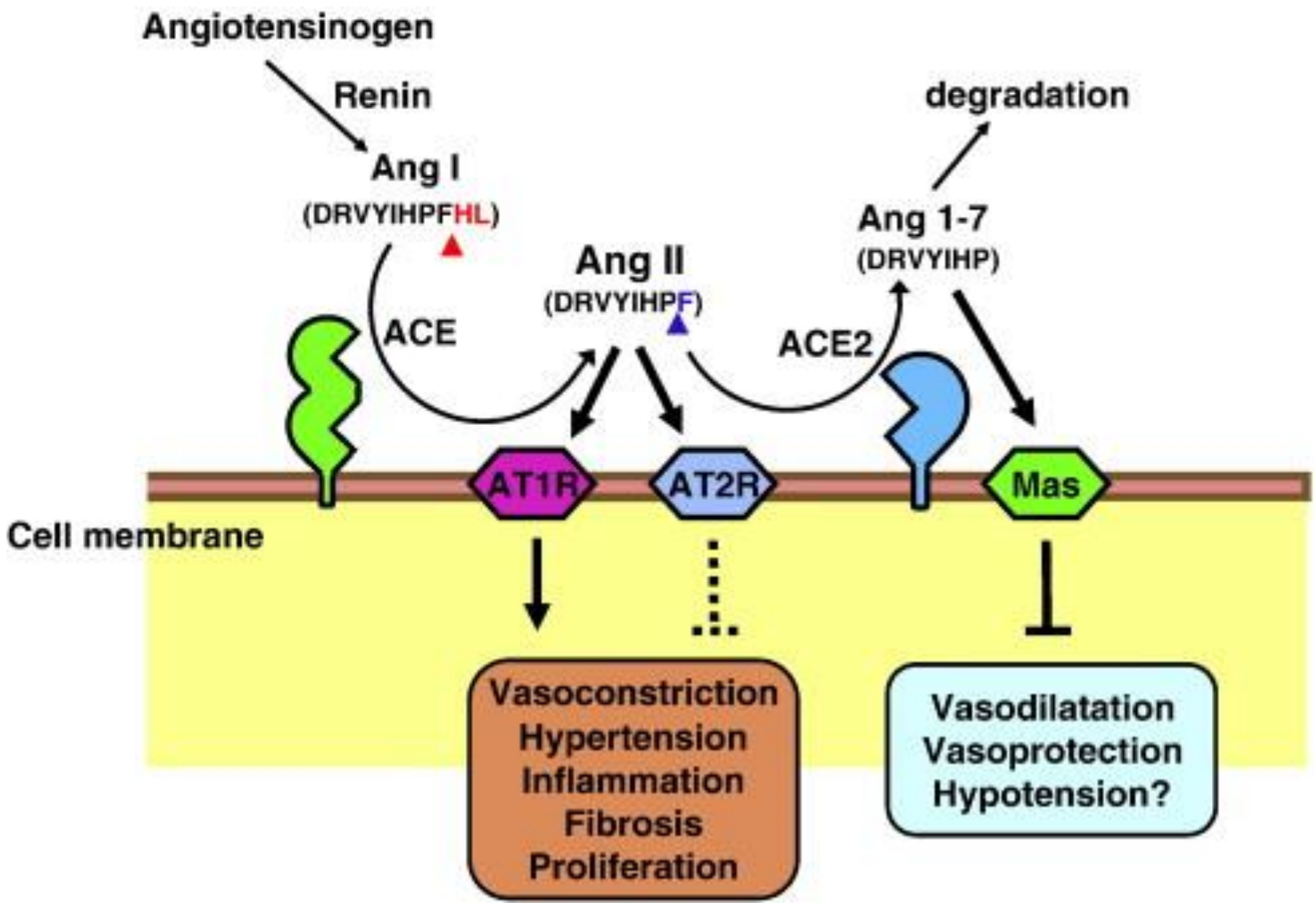
Все известные представители коронавирусов - РНК-содержащие. Основной механизм проникновения в клетку и воспроизведения связан с наличием S-белка, в составе которого различают RBD-домен



Ключевое событие для проникновение в клетки – взаимодействие S-белка вируса SARS-CoV2 с рецептором ACE2. Во взаимодействии участвует RBD-домен вирусов (Receptor-binding domain), обладающий высокой степенью вариабельности в рамках трех известных вирусных клад



По: M.Letko et al. Naure Microbiology, 2020



ACE2 - angiotensin 2 converting enzyme – экзопептидаза, конвертирующая ангиотензин 1 в ангиотензин 1-9, либо ангиотензин 2 – в ангиотензин 1-7

НЕСПЕЦИФИЧНА, может иметь и другие субстраты

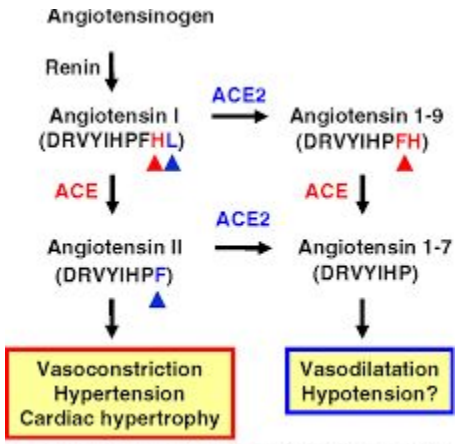
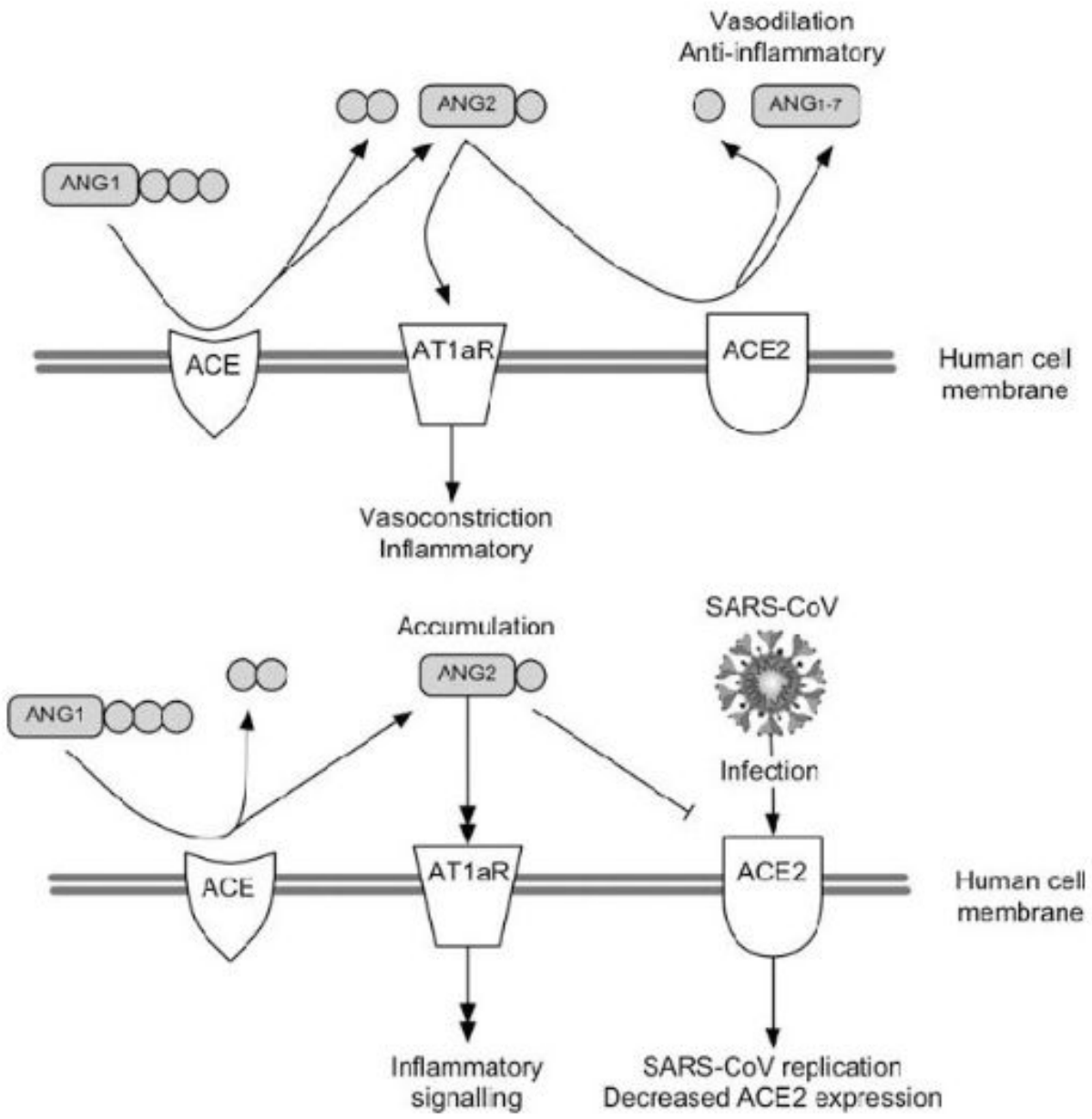


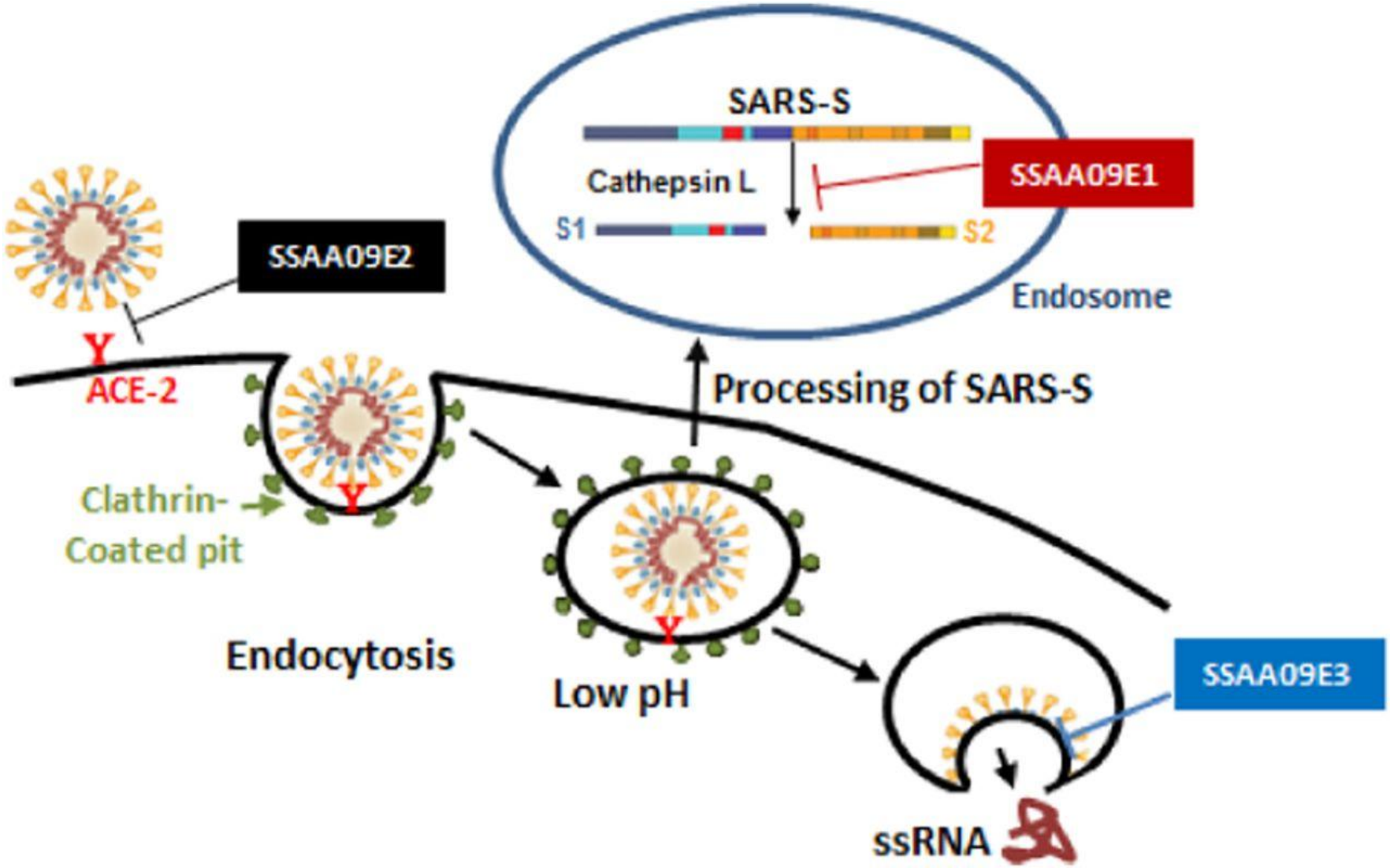
Fig. 1 Current view of ACE and ACE2 functions. ANG I

По: K.Kuba et al. Journal of Molecular Medicine 2006



(а) ACE2 и ACE являются ключевыми регуляторами ренин-ангиотензиновой системы, которая контролирует функции ССС, поддерживая кровяное давление и баланс электролитов. Современные данные in vitro позволяют предположить, что лигирование и передача сигнала от ANG II через рецептор ангиотензина 1a (AT1aR) может приводить к выработке провоспалительных цитокинов (TNFa, IL-1b, IL-6, MCP-1 и т. Д.), фиброзу и пролиферации клеток. (б) Инфекция легкого за счет SARS-CoV нарушает гомеостаз РАС. Текущие данные свидетельствуют о том, что S-белок SARS снижает уровень продукции ACE2 в клетках легочного эпителия, тем самым инактивируя ключевой механизм утилизации провоспалительного пептида ANG II, избыток которого связан с более тяжелой формой заболевания.

По: T.P. Sheahan SARS Coronavirus Pathogenesis and Therapeutic Treatment Design 2010



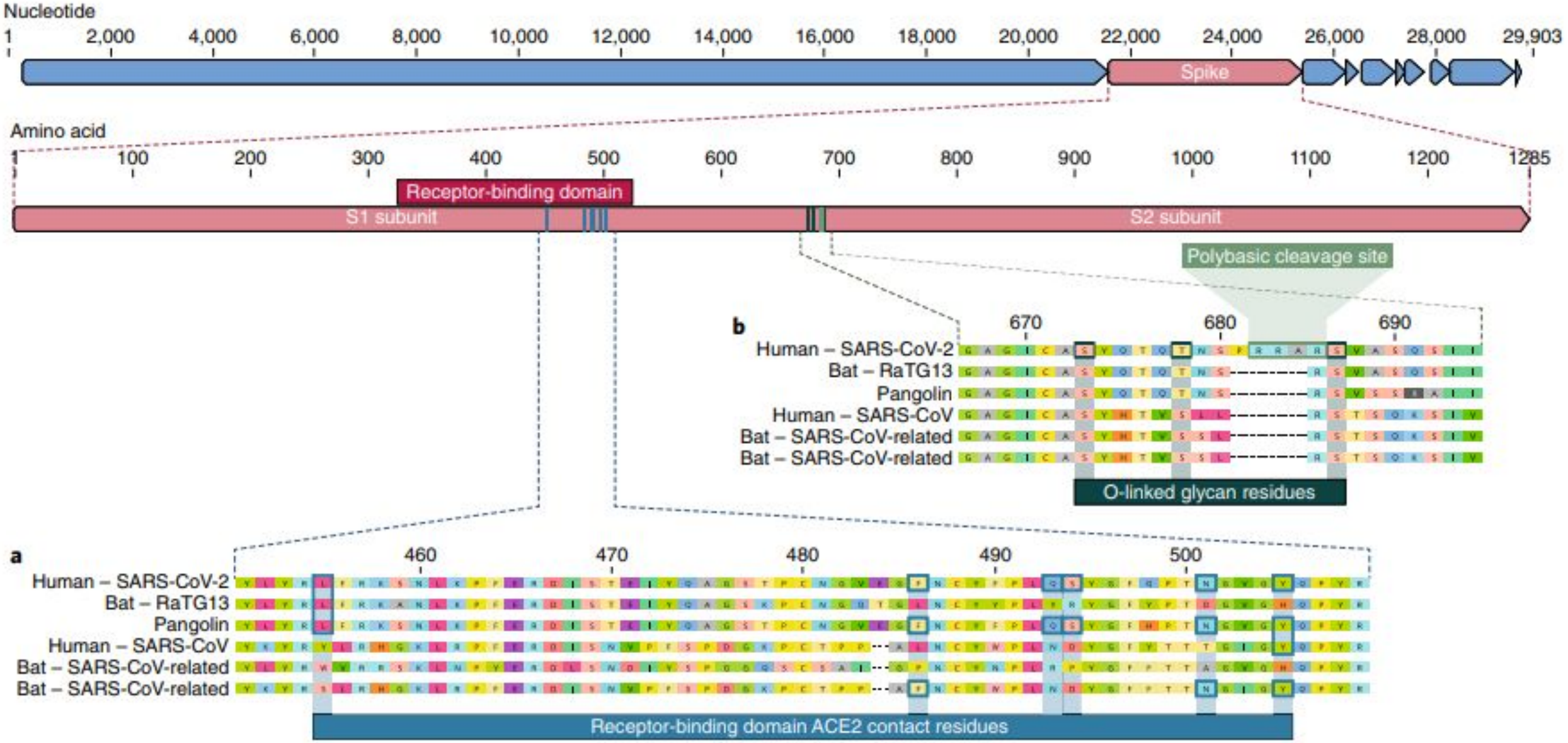
https://jvi.asm.org/content/87/14/8017/F9

домена вирусного S-белка и ACE-2 на поверхности клетки, запускается рецептор-опосредованный эндоцитоз с образованием клатринового пузырька. Последующее закисление среды вызывает активацию катепсина L, который протеолитически разрезает белок на S1 и S2 домены, после чего липидная оболочка вируса диссоциирует с последующим высвобождением вирусной РНК в цитозоль.

*В других источниках (K.Kuba et al. Journal of Molecular Medicine 2006): для разъединения комплекса внутри эндосомы необходима интернализация трипсина

Особенности генома вируса SARS-CoV-2

- На основании геномных исследований были выделены следующие особенности генома вируса SARS-CoV-2:
- 1) последовательность нуклеотидов рецептор-связывающего домена имеет ряд мутаций, оптимизирующих связывание SARS-CoV-2 с рецептором на поверхности клеток человека ACE2;
- 2) S- белок вируса имеет функциональный сайт разрезания (cleavage-site), для образования впоследствии доменов S1–S2. В геноме при этом - инсерция 12 нуклеотидов, приведшая также к формированию трех O-связанных гликанов вокруг сайта (O-linked glycans)



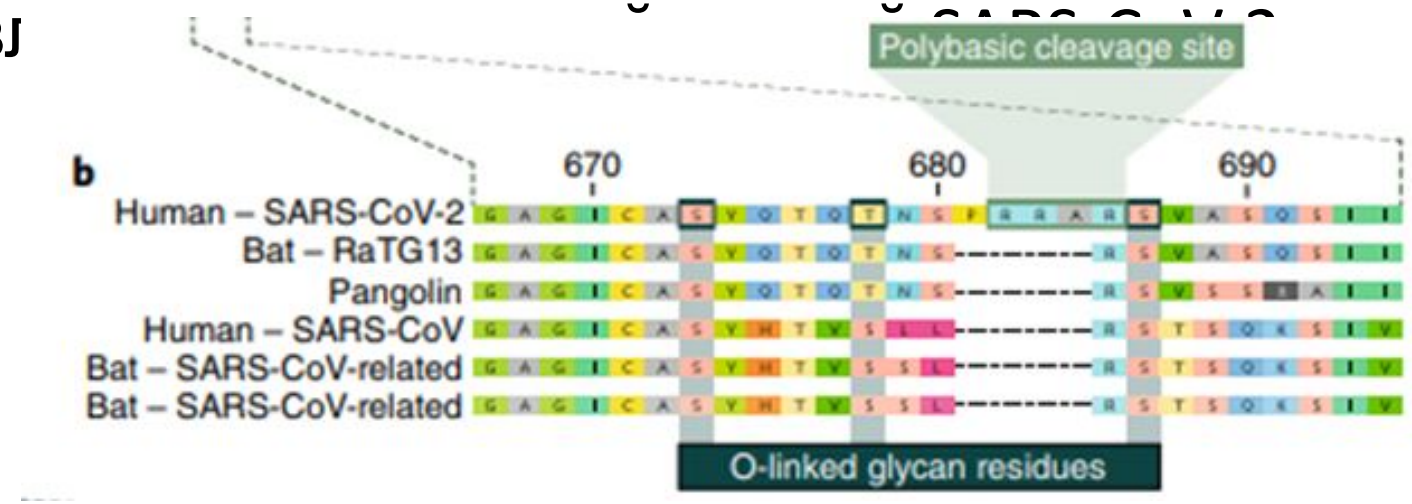
По: K.G.Andersen et al. Nature Medicine, 2020

RBD домен вируса SARS-CoV2

- 6 аминокислот RBD домена обуславливают взаимодействие с рецептором ACE2.
- У вируса- «предшественника» SARS-CoV: Y442, L472, N479, D480, T487 and Y491,
- У вируса SARS-CoV-2 2019 года: L455, F486, Q493, S494, N501 and Y505. Таким образом, 5 из 6 аминокислот у «предшественника» и вируса 2019-го года отличаются.
- Домен RBD вируса SARS-CoV-2 2019 года с высокой афинностью связывается с рецептором ACE2 человека, хорьков, диких кошек и других животных.
- Афинность связывания RBD и ACE2 не максимально высокая (т.к. расположение и комбинация ключевых аминокислот «не идеальные») □ вероятнее всего, геном вируса имеет естественное происхождение

Сайт разрезания S-белка

- Последовательность (RRAR) является сайтом распознавания для неспецифических протеаз (фурин, катепсин), благодаря чему S- белок разрезается на два домена по ходу интернализации вируса внутрь клетки хозяина. У SARS-CoV-2 сайт начинается с дополнительного пролина, таким образом, сайт разрезания имеют последовательность PRRA. Предполагается, что поворот, созданный пролином, приведет к добавлению O-связанных гликанов к S673, T678 and S686, которые находятся по краям сайта разрезания, что будет явл



Возможные варианты происхождения вируса SARS-CoV-2

- 1) Мутагенез и селекция внутри животных-хозяев с последующим зоонозным переносом
- 2) Мутагенез и селекция внутри организма человека, которому предшествовал зоонозный перенос
- 3) Мутагенез с последующей селекцией в ходе работы с клеточными культурами в рамках лабораторных исследований SARS CoV

Вариант 1. Мутагенез и селекция внутри животных-хозяев с последующим зоонозным переносом

Большинство первых выявленных случаев были связаны с рынком Huanan market в Юхани

Вариант 1. Мутагенез и селекция внутри животных-хозяев с последующим зоонозным переносом

- Вероятный резервуар – летучие мыши (в связи с ~96%-ым сходством геномов человеческого SARS CoV-2 и вируса SARS-CoV-like летучих мышей). НО! RBD домен вируса летучих мышей имеют последовательность аминокислот, при которой связывание с рецептором ACE2 человека невозможно
- Геномы некоторых панголинов имеют идентичные последовательности аминокислот в домене RBD, включая шесть ключевых аминокислот, участвующих в связывании с рецптором ACE2.
- Прямой предшественник так и не обнаружен

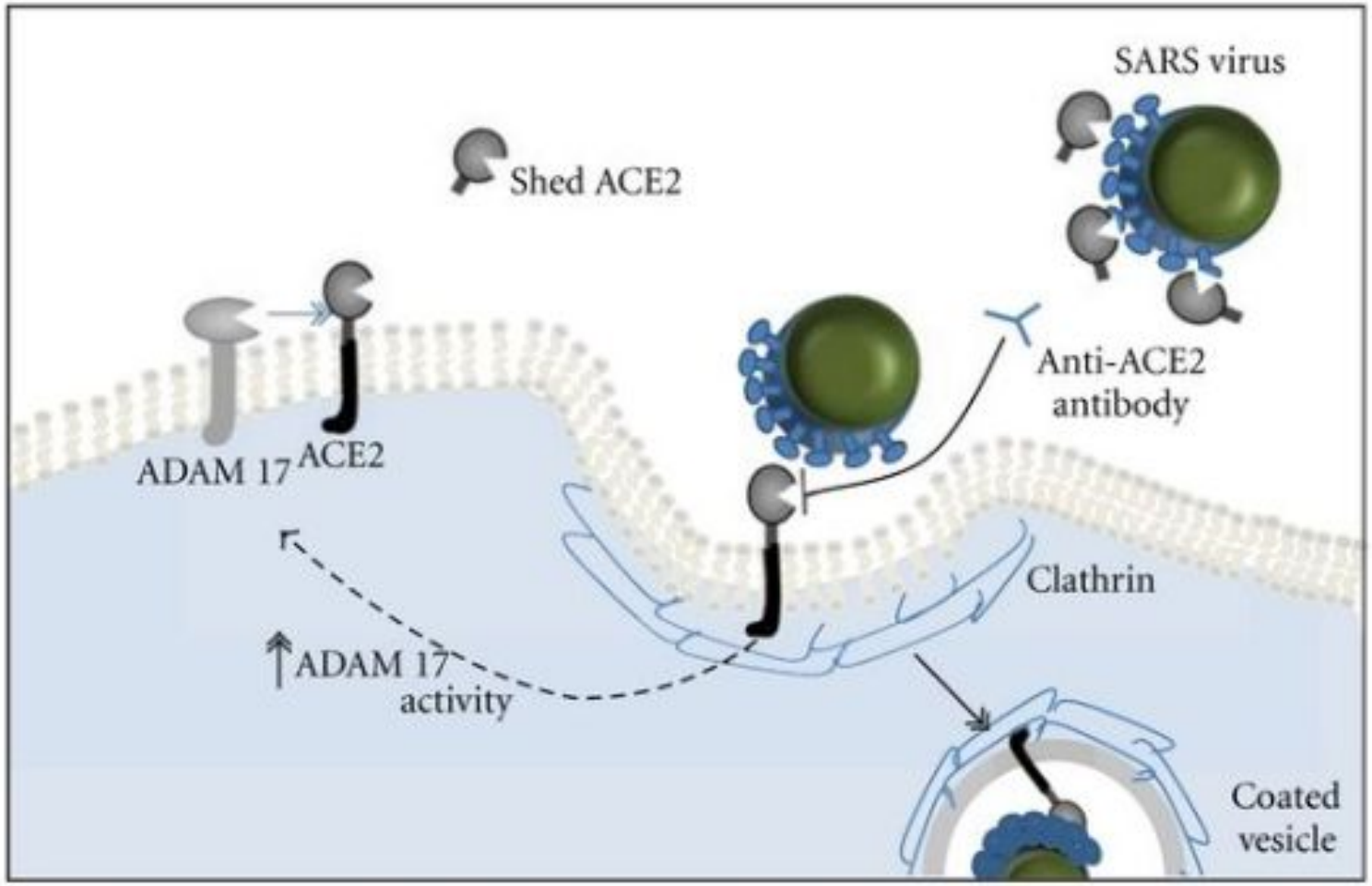
Вариант 2. Мутагенез и селекция внутри организма человека, которому предшествовал зоонозный перенос

- У панголинов домен RBD вируса идентичен такому же домену в вируче человека могла произойти передача вируса от панголина к человеку с последующим мутагенезом и селекцией, приведшими к формированию измененного сайта связывания и О-связанных гликанов уже в организме человека
- По оценкам последний мутагенез и формирование окончательного варианта генома SARS CoV2 произошел в ноябре – декабре 2019 года.
- Нужны ретроспективные исследования пациентов с SARS CoV2 и другими вирусами клады для выяснения механизма появления

Вариант 3. Мутагенез с последующей селекцией в ходе работы с клеточными культурами в рамках лабораторных исследований SARS CoV

- Фундаментальные исследования вирусов летучих мышей SARS-CoV-like coronaviruses при использовании культур клеток и/или животных моделей продолжались долгое время в лабораториях 2 уровня биобезопасности по всему миру.
- Появление вируса SARS CoV2 из лабораторного SARS CoV в ходе посевов предполагает мутацию в последовательности, кодирующей RBD домен, а также сайт разрезания одновременно, что маловероятно.

Потенциальные точки приложения терапии: введение растворимого ACE-2 либо анти-ACE-2 иммуноглобулинов заблокирует взаимодействие RBD домена и ACE2 Рецептора клетки.



По: N.E.Clarke et al. International Journal of Hypertension. 2012

Благодарю за внимание!
Будьте здоровы!