

SARS-CoV-2 virus: utjecaj mutacije D614G na strukturu površinskog glikoproteina S

Horn, Robert

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:958998>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Robert Horn

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

SARS-CoV-2 virus: utjecaj mutacije D614G na strukturu površinskog glikoproteina S

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović

Zagreb, 2021.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

15. srpnja 2021.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

24. rujna 2021.

Mentor rada: prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VI
§ 1. UVOD.....	1
1.1. COVID-19.....	1
1.1.1. SARS-CoV-2.....	1
1.1.2. Površinski glikoprotein S.....	2
1.1.3. Mutacija D614G.....	4
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	6
2.1. Kriogena elektronska mikroskopija.....	6
2.1.1. Odabir metode.....	6
2.1.2. Nobelova nagrada za kemiju 2017.....	7
2.1.3. Postupak korištenja kriogene elektronske mikroskopije.....	7
2.1.4. Prednosti kriogene elektronske mikroskopije.....	9
2.1.5. Primjena u vizualizaciji SARS-CoV-2.....	10
2.2. Glikoprotein S	12
2.2.1. Struktura površinskog glikoproteina S.....	12
2.2.2. Konformacije glikoproteina S.....	14
2.2.3. Genetske mutacije virusa.....	14
2.3. Mutacija D614G	15
2.3.1. Interakcije aminokiselina.....	17
2.3.2. D614.....	18
2.3.3. G614.....	19
2.4. Rasprava	20
2.5. Zaključak.....	21
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXII

§ Sažetak

U cilju borbe protiv pandemije uzrokovane virusom SARS-CoV-2 nužno je proučiti i detaljno opisati strukturu virusa i mehanizam infekcija stanica kako bi se što prije razvilo cjepivo zadovoljavajuće efikasnosti i zaustavilo širenje bolesti COVID-19. Virus je vrlo sklon mutacijama te je uočeno da je mutirani tip D614G gotovo u potpunosti u svega nekoliko mjeseci istisnuo prvotni divlji tip virusa. Razlog tomu je zamjena aminokiseline aspartata s glicinom u strukturi površinskog glikoproteina šiljka S koji omogućuje virusu ulazak u stanicu domaćina preko receptora ACE2 na površini stanice. Za proučavanje mutiranih tipova virusa koji dominantno kruže u populaciji znanstvenici koriste kriogenu elektronsku mikroskopiju kojom je moguće opisati interakcije aminokiselina u strukturi šiljka te na taj način saznati zašto su upravo ti tipovi dominantni.

§ 1. UVOD

1.1. COVID-19

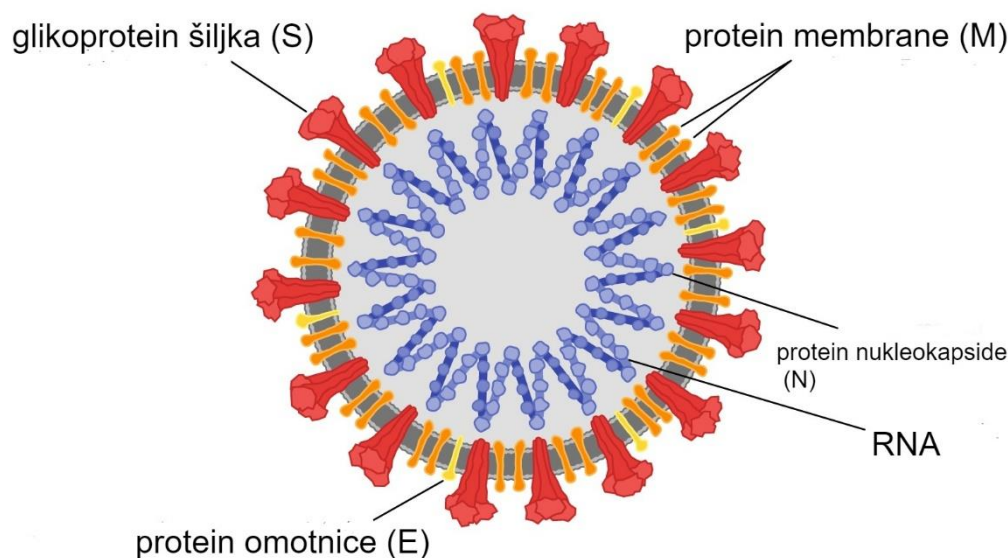
1.1.1. SARS-CoV-2

Pandemija koja je izbila 2019. i zahvatila cijeli svijet pod nazivom COVID-19 predstavlja brojne ekonomske, zdravstvene, znanstvene i druge probleme današnjem društvu. Brzo i nekontrolirano širenje bolesti u potpunosti je promijenilo izgled svakodnevice kakvu smo do sada poznavali, stoga kako bi se život vratio u normalu pred znanstvenike je stavljen veliki izazov u borbi protiv pandemije. U cilju spašavanja što više života, zaustavljanja širenja bolesti i konačno omogućavanja normalnog funkcioniranja svih djelatnosti, znanstvenici moraju pronaći način da zaustave pandemiju. Kako bi to uspješno napravili, moraju znati kako uzročnik bolesti COVID-19 izgleda, kako se širi, kako se replicira i tako dalje. Stoga se cijela svjetska znanstvena zajednica ujedinila u suradnji i razmjeni informacija u cilju što bržeg napretka.

Uzročnik bolesti COVID-19 jest virus pod nazivom SARS-CoV-2 (engl. „severe acute respiratory syndrome coronavirus-2“). Iz velike porodice je koronavirusa (lat. *Coronaviridae*) koji uobičajeno uzrokuju srednje do srednje teške bolesti gornjih dišnih puteva. Većina njih kruži među životinjama poput svinja, deva, šišmiša i mačaka. Ponekad ti virusi mogu sa životinja prijeći na ljude i uzrokovati bolesti sličnih simptoma, čak i pandemijskih razmjera. U posljednjih 20 godina zabilježeno je nekoliko slučajeva takvog prelaska koronavirusa sa životinje na čovjeka, od kojih su tri imali potencijal uzrokovati pandemiju. Prvi je bio SARS koronavirus (engl. „severe acute respiratory syndrome“) koji se pojavio 2002., prešavši s cibetke (lat. *Paguma larvata*), mesoždera iz porodice mačaka, na čovjeka i nestao 2004. Drugi je bio MERS (engl. „Middle East respiratory syndrome“) koji je prešao s deve na čovjeka 2012. i uzrokovao sporadična i lokalizirana žarišta. Treći i posljednji je upravo SARS-CoV-2 koji se pojavio u prosincu 2019. u gradu Wuhanu u Kini te se vjeruje da je prešao sa šišmiša, čijom populacijom normalno cirkulira, na čovjeka i od tada se u kratkom vremenu proširio na cijeli svijet.

SARS-CoV-2 spada u RNA viruse, što znači da je sva njegova genetska informacija sadržana u jednolančanoj ribonukleinskoj kiselini. Zanimljivo, genetskim sekvenciranjem je utvrđeno poklapanje 79 % genoma s njegovim prethodnikom SARS-CoV,¹ stoga posjeduju slične proteine (slika 1) Kako bi se širio, virus mora ući u živu stanicu, odnosno životinjsku ili ljudsku

stanicu. Ulazak virusa u stanicu temelji se na specifičnoj interakciji između proteina šiljka virusa i staničnog receptora, točnije membranskog enzima ACE2 (engl. „angiotensin-converting enzyme 2“) koji se nalazi na površini stanica u plućima, srcu, bubrezima i probavnom sustavu, stoga virus pogađa upravo te dijelove tijela.



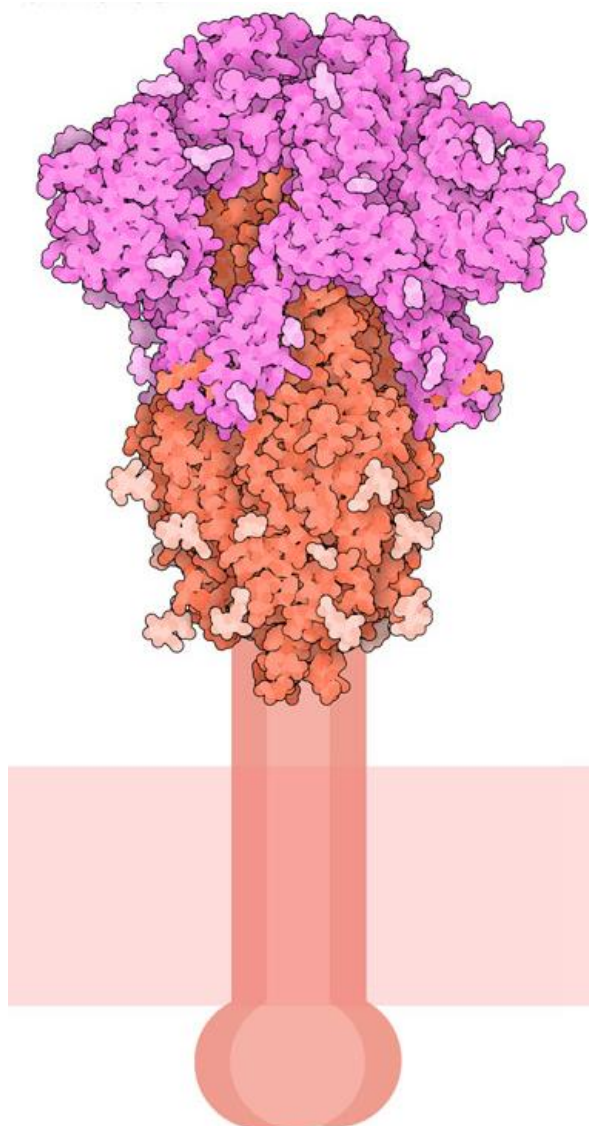
Slika 1. Shematski prikaz SARS-CoV-2 i SARS-CoV. Proteini nukleokapside (N) su RNA vezujući proteini koji asociraju s virusnim genomom, što je iznimno bitno za skladištenje i očuvanje genoma. Također proteini nukleokapside asociraju s preostale tri vrste strukturnih proteina. Proteini membrane (M) su visoko glikozilirani te njihova funkcija nije u potpunosti poznata, pretpostavlja se da služe glikozilaciji šiljka (S). Glikoproteini šiljka (S) i proteini omotnice (E) omogućavaju virusu ulazak u stanicu domaćina. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.^{2,3}

1.1.2. Površinski glikoprotein S

Površina virusa prekrivena je ovim proteinima, koji se u procesu ulaska u stanicu, specifično vežu za receptor te na taj način ostvaruju interakciju s membranom stanice te ubacuju virusni genom u stanicu. Da bismo mogli objasniti taj mehanizam moramo poznavati strukturu tog glikoproteina. Glikoprotein šiljka se sastoji od tri identična polipeptidna lanca, koji zajedno tvore malu domenu unutar virusa i veliku domenu izvan virusa, koja je bitna za ulazak virusa u

stanicu. Velika domena sadrži brojne monosaharide koji ju maskiraju od imunološkog sustava domaćina te zbog tih šećera taj protein spada u glikoproteine. Može se podijeliti na dva funkcionalna dijela, S1 dio koji se veže za receptor i S2 dio koji omogućava pričvršćivanje virusa na površinu stanice i fuziju s membranom virusa (slika 2).⁴

Da bi interakcija s receptorom bila uspješna, potrebna je velika fleksibilnost šiljka, stoga on može postojati u više konformacija u kojima može ostvariti povoljne interakcije s receptorom ACE2 na površini stanice. Pretpostavlja se da su virusi gripe manje opasni od novog SARS-CoV-2 virusa upravo zato što imaju puno manje fleksibilne glikoproteine S. Kako bi postigao tu konformacijsku fleksibilnost, šiljak je sklon mutacijama, odnosno nasumičnim genetskim promjenama koje su uzrokovane zamjenom aminokiselina u primarnom slijedu proteina. Pretpostavlja se da mutacije koje omogućuju lakše konformacijske promjene uzrokuju brže širenje pandemije. Jedna takva mutacija je aminokiselinska zamjena D614G.



Slika 2. Prikaz glikoproteina S virusa. Roza bojom je označen S1 dio vanjske domene, dok je narančasto-crvenom bojom označen S2 dio domene.⁴

1.1.3. Mutacija D614G

Ova mutacija je opažena kao najčešća i najznačajnija za dosadašnje širenje COVID-19 pandemije. Radi se o zamjeni aminokiseline aspartata (D) u primarnom aminokiselinskom slijedu s glicinom (G). Nekoliko studija ukazuju na to da je ova mutacija povezana s bržim širenjem i većom infektivnošću virusa, stoga kako bi se to objasnilo, mora se prikazati i proučiti asocijacija divljeg glikoproteina S s receptorom ACE2 i usporediti s asocijacijom mutiranog glikoproteina S s receptorom. Za to se koristi metoda kriogene-elektronske mikroskopije (kraće: krio-elektronska mikroskopija; engl. cryo-EM) pomoću koje su znanstvenici pokušali

izolirati što više konformacija samog šiljka, kao i konformacija vezanja šiljka na stanični receptor.

U ovom radu želi se proučiti i prikazati utjecaj mutacije D614G na konformacijske promjene glikoproteina S, odnosno na širenje globalne pandemije uzrokovane virusom SARS-CoV-2.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Kriogena elektronska mikroskopija

Kako bi se uspješno prikazala i usporedila konformacijska promjena tipova G614 i D614 glikoproteina S SARS-CoV-2, znanstvenici koji se bave proučavanjem tih glikoproteina moraju odabrati prikladnu metodu. Obzirom da im je u cilju što prije odgovoriti na sva pitanja vezana uz SARS-CoV-2, na raspolaganju su im sve poznate metode, neovisno o njihovoj složenosti i cijeni.

2.1.1. Odabir metode

Radi se o vrlo specifičnim aminokiselinskim zamjenama i interakcijama na atomskoj razini, stoga je potrebno koristiti metodu vrlo visoke rezolucije, koja također ne narušava nativnu strukturu glikoproteina. Za proučavanje staničnih i virusnih proteina u drugoj polovici prošloga stoljeća pretežno su korištene dvije metode. Rendgenska kristalografija (rezolucija (ili razlučivost) je tada bila do 3 Å) zahtijeva kristalizaciju proučavanog proteina pri čemu mu se ne narušava nativna struktura. Tim postupkom se ne može saznati puno o dinamici i promjenama konformacije proteina. Druga je metoda NMR (nuklearna magnetska rezonancija) spektroskopija koja omogućava proučavanje proteina u čvrstom stanju i otopini, omogućava prikaz strukture proteina i interakcije s drugim molekulama, ali je pogodna za korištenje prilikom proučavanja manjih molekula i proteina, a ne velikih proteina kao što su glikoproteini.⁵

Stoga je, za prikazivanje i proučavanje glikoproteina potrebno koristiti neku suvremeniju metodu, elektronsku mikroskopiju, koja je slična svjetlosnoj mikroskopiji; ali umjesto zrake svjetlosti koja se reflektira od uzorka i uočava svjetlosnim mikroskopom, elektronski mikroskop emitira snop elektrona koji imaju puno kraću valnu duljinu od svjetlosti te zbog toga povećava rezoluciju i omogućava uočavanje vrlo malih struktura, poput razmještaja pojedinih atoma. Nažalost, posljedično kraćoj valnoj duljini, snop elektrona ima veliku energiju i uništava gotovo svaki uzorak organskog podrijetla. Prvi elektronski mikroskop konstruirali su još 1931. fizičar Ernst Rusk, koji je za svoj rad u tom području 1986. dobio Nobelovu nagradu i inženjer elektrotehnike Max Knoll, a već 1933. elektronski mikroskop je rezolucijom premašio optički mikroskop.⁶ Iako je rezolucija elektronskog mikroskopa bila na zadovoljavajućoj razini, preparacija uzoraka je bila veoma dugotrajna i zahtjevna te tom

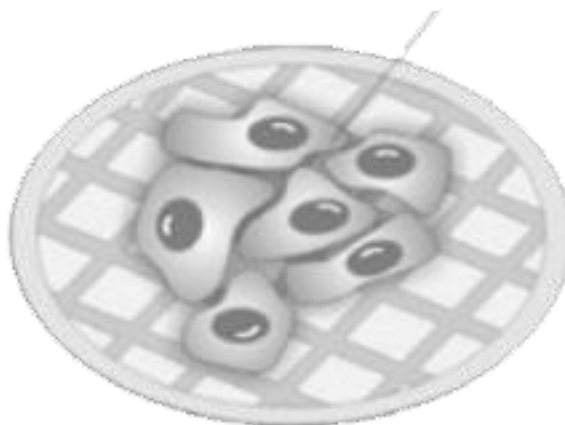
metodom nije omogućeno proučavanje staničnih struktura manjih od 20 Å. Daljnjim razvojem tehnologije, početkom 21. stoljeća usavršena je metoda kriogene elektronske mikroskopije (krio-EM), koja može na razini rezolucije NMR-a i rendgenske kristalografije proučavati velike proteine bez potrebe za njihovom kristalizacijom. Ta je metoda idealna za proučavanje glikoproteina S i njegovih konformacija.

2.1.2. Nobelova nagrada za kemiju 2017.

Za usavršavanje metode krio-elektronske mikroskopije kojom se danas proučava SARS-CoV-2, trojica znanstvenika, Jacques Dubochet iz sveučilišta Lausanne, Joachim Frank iz sveučilišta Columbia i Richard Henderson iz MRC Laboratorija za molekularnu biologiju na Cambridgeu, dobili su Nobelovu nagradu za „razvoj krio-elektronske mikroskopije za određivanje strukture biomolekula u otopini s visokim razlučenjem.“ Henderson i suradnici su pokazali da je moguće elektronskim mikroskopom dobiti strukture bioloških makromolekula, riješivši strukturu bakteriorodopsina u visokoj rezoluciji.⁶ Problem očuvanja native strukture proučavanih proteina riješio je Jacques Dubochet smrzavanjem uzorka na vrlo tankoj mrežici pri temperaturi tekućeg dušika, postupkom vitrifikacije. Za razvoj algoritama i računalnih programa kojima je moguće vizualizirati čestice u vitrificiranom otapalu zaslužan je Joachim Frank osmišljavanjem metode koja se naziva „single particle analysis“, odnosno jednočestična analiza.⁶

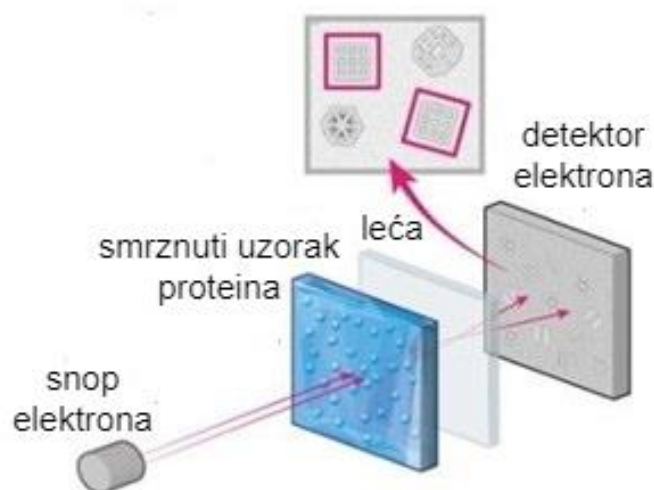
2.1.3. Postupak korištenja kriogene elektronske mikroskopije

Prvi korak u pripremi uzorka za krio-EM je pročišćavanje uzorka. Potom se uzorak obradi s krio-fiksatorom koji ga pričvršćuje za posebnu mrežicu punu sićušnih rupa (slika 3). Tada se mrežica uranja u tekući etan i smrzava na temperaturu od oko -180 °C. Tako smrznut, uzorak se unosi u krio-EM uređaj u kojemu se temperatura održava na -180 °C.⁷



Slika 3. Nanošenje uzorka na rupičastu mrežicu prilikom pripreme uzorka za krio-EM.⁷

U krio-EM se snop elektrona šalje kroz smrznuti uzorak te se prilikom sudara s uzorkom elektroni reflektiraju i putuju do detektora koji bilježe svaki pojedini reflektirani elektron od uzorka. Snopovi elektrona bi pri normalnim uvjetima razorili uzorak, no pri temperaturi od $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ zbog veoma čvrste strukture, reflektiraju se od njega (slika 4). Zbog smrzavanja uzorka se ova metoda zove „kriogena“. Izvor snopa elektrona kruži oko uzorka te na taj način omogućuje 3D prikaz strukture proteina.



Slika 4. Shematski prikaz snimanja uzorka u krio-EM pri temperaturi od $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$. Snop elektrona prolazi kroz smrznutu mrežicu s uzorkom, pri čemu se elektroni reflektiraju ili prolaze kroz uzorak do leće koja ih usmjerava na detektor elektrona koji bilježi njihov signal te na taj način nastaje 2D slika uzorka. Pomicanjem izvora elektrona oko uzorka tvori se više

2D slika koje se računalnim programima kombiniraju u jedan 3D prikaz. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.⁸

Posljednji korak jest prikupljanje 2D slika detektora pomoću suvremenih računala koja posebnim programima, koristeći važne fizikalno-kemijske i stereokemijske zakone, kombiniraju 2D slike u jedinstveni model visokog razlučenja.

2.1.4. Prednosti kriogene elektronske mikroskopije

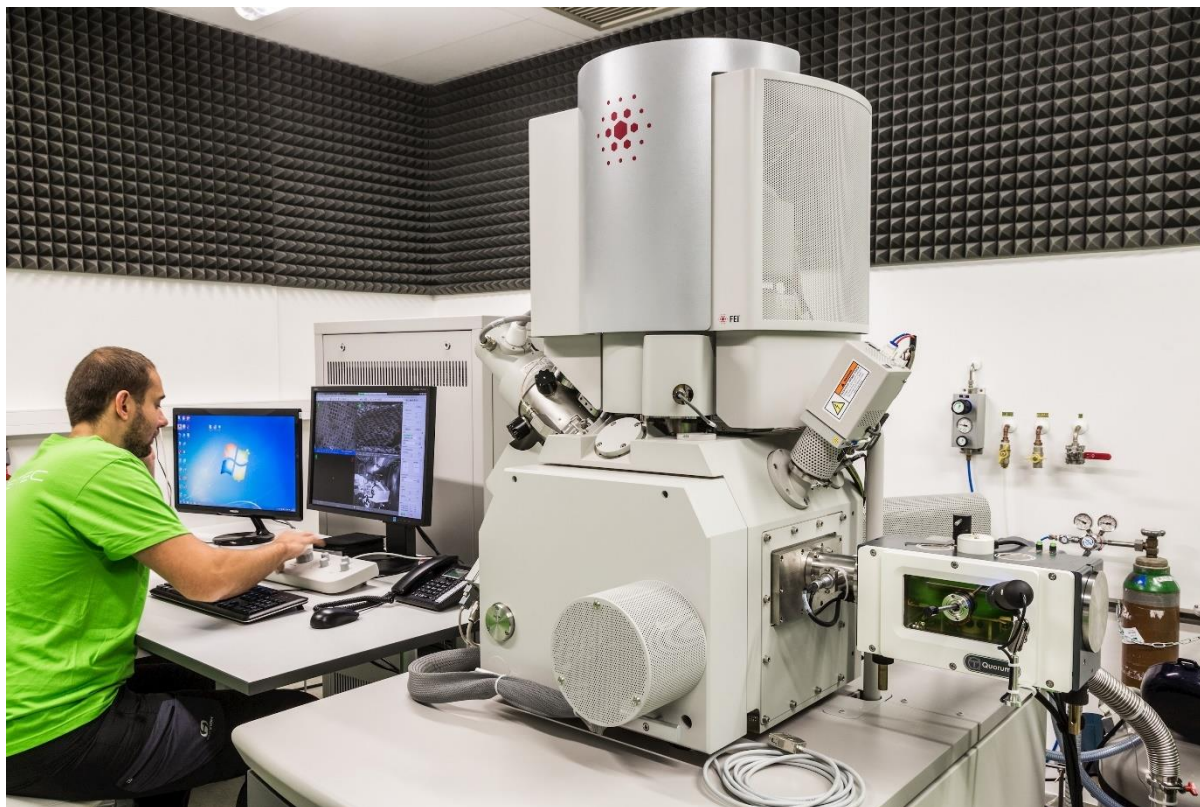
Suvremena krio-EM se koristi kada se želi dobiti:

3D-prikaz neke molekule, membranskog proteina, antigen-antitijelo kompleksa, protein-ligand kompleksa, virusa ili dijelova virusa, DNA molekule, ribosoma i tako dalje.

Prednosti ove metode su:

- mala količina potrebnog uzorka
- uzorak ne treba kristalizirati
- rezolucija 3D slike je na atomskoj razini, najnoviji podatci su čak do 1,2 Å
- mogu se proučavati velike biomolekule (veličine do 2000 Å)
- proučavanje proteina u njihovoj nativnoj strukturi

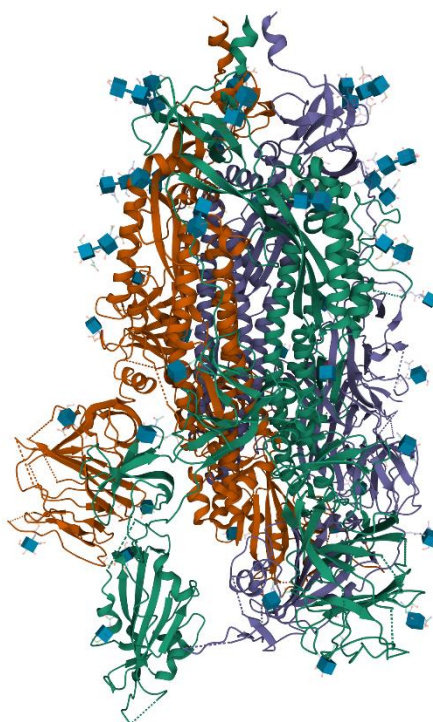
Jedini nedostatak ove metode je to što je iznimno skupa te su uređaji masivni i vrlo zahtjevni za održavanje te dostupni tek malom broju znanstvenika u nekoliko svjetskih laboratorija (slika 5).⁷



Slika 5. Kriogen-elektronski mikroskop iz Masaryk Sveučilišta u Brnu, Republika Češka.⁹

2.1.5. Primjena u vizualizaciji SARS-CoV-2

Prva vizualizacija novog SARS-CoV-2 virusa kriogenim-elektronskim mikroskopom provedena je na Odjelu za molekularne bioznanosti na Sveučilištu Austin u Texasu (engl. „Department of Molecular Biosciences, The University of Texas at Austin“). Rezultati tog istraživanja objavljeni su 26. veljače 2020. te je od tada svijetu poznata struktura virusa i glikoproteina S virusa (slika 6). Virus je snimljen pri rezoluciji od 3,46 Å što je dovoljno precizno za određivanje konformacijskih promjena i daljnjih mutacija glikoproteina S šiljka virusa, odnosno predmeta istraživanja ovoga rada.¹⁰



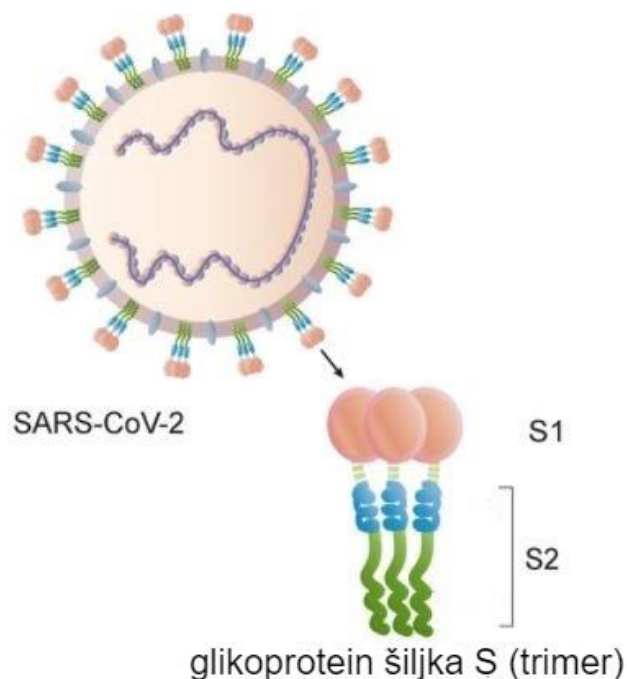
Slika 6. Vizualni prikaz glikoproteina S, objavljen u radu 26. veljače 2020., snimljen krio-EM pri rezoluciji od 3,46 Å pri Odjelu za molekularne bioznanosti u Austinu u Texasu.¹⁰

Prikazani glikoprotein S sadrži 22854 atoma, ukupne molekularne mase 440,39 kDa. (PDB ID: 6VSB)

2.2. Glikoprotein S

2.2.1. Struktura površinskog glikoproteina S

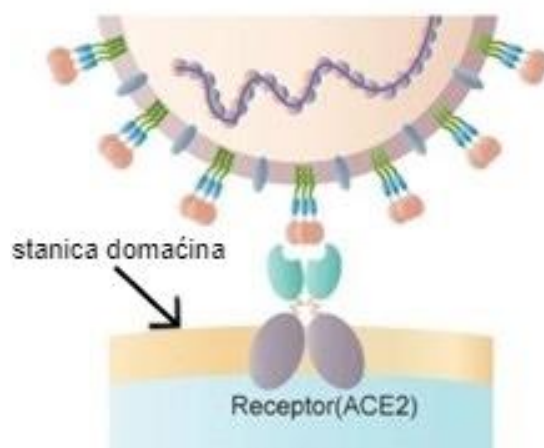
SARS-CoV-2 ulazi u stanicu domaćina pomoću transmembranskog glikoproteina šiljka S na površini virusa. Zbog mnogo takvih površinskih proteina, SARS-CoV-2 izgledom podsjeća na krunu (lat. „Corona“ znači kruna). Glikoprotein S se sastoji od tri identična polipeptidna lanca, stoga je homotrimer (slika 7).



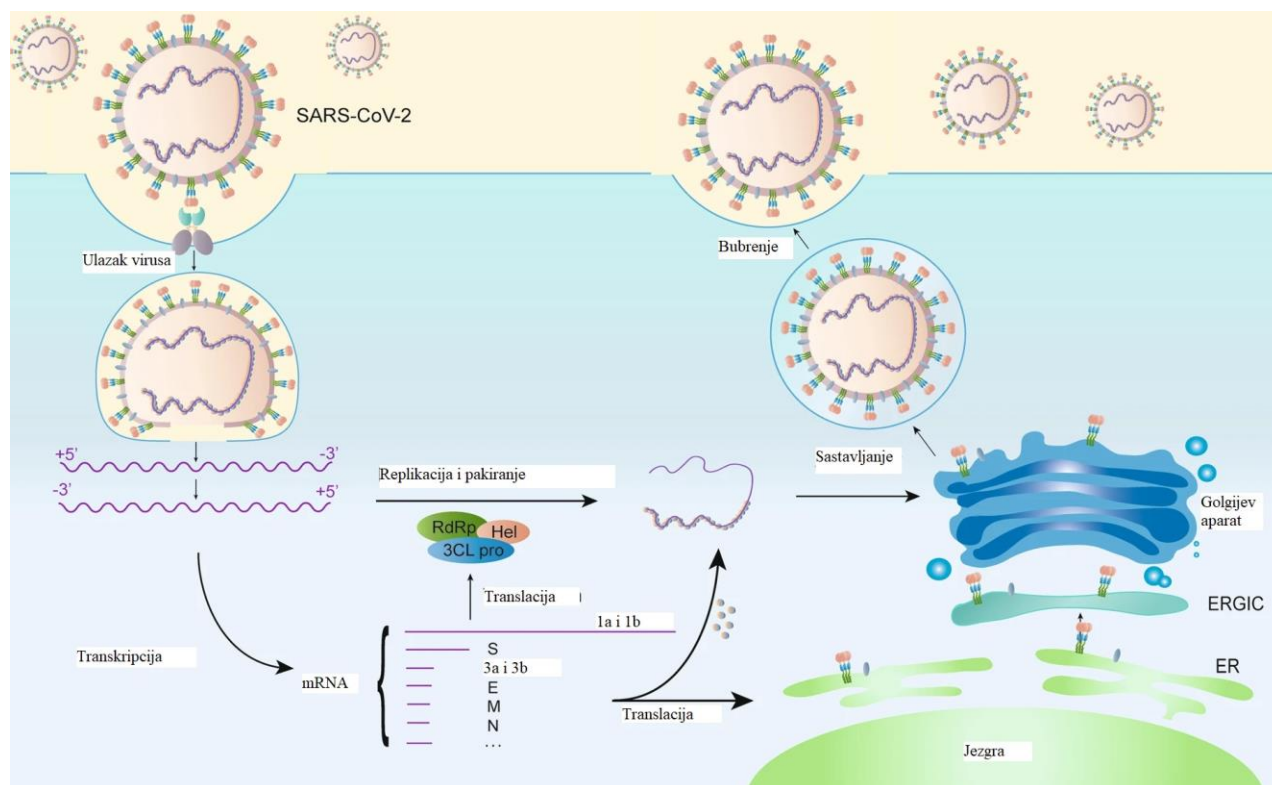
Slika 7. Shematski prikaz glikoproteina S kao homotrimer na površini SARS-CoV-2. Zeleno i plavo je prikazana S₂ podjedinica šiljka, dok je rozom bojom prikazana S₁ podjedinica.

Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹¹

Šiljak se sastoji od dvije podjedinice: S₁ koja je odgovorna za vezanje šiljka s receptorom stanice u koju virus ulazi. Kod ljudi je to transmembranski enzim ACE2 (engl. „angiotensin-converting enzyme 2“) (slika 8) i S₂ podjedinica koja je bitna za fuziju virusne i stanične membrane. Jednom kada virus uđe u stanicu domaćina koristi stanične enzime i mehanizme u svoju korist kako bi se replicirao. Pri tome stanica troši previše energije i ne uspijeva vršiti funkcije važne za vlastiti život i kada se virus umnoži stanica umire (slika 9). U ovome radu ćemo se fokusirati na S₁ podjedinicu, odnosno njezinom domenom za vezanje receptora, RBD (engl. „receptor binding domain“). Svaka od tri RBD ostvaruje interakciju s N-terminalnom domenom (NTD) susjedna dva monomerna lanca o čemu će biti riječ kasnije u radu.



Slika 8. Shematski prikaz vezanja ljudskog receptora ACE2 za RDB domenu S₁ podjedinice glikoproteina S SARS-CoV-2 virusa. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹²

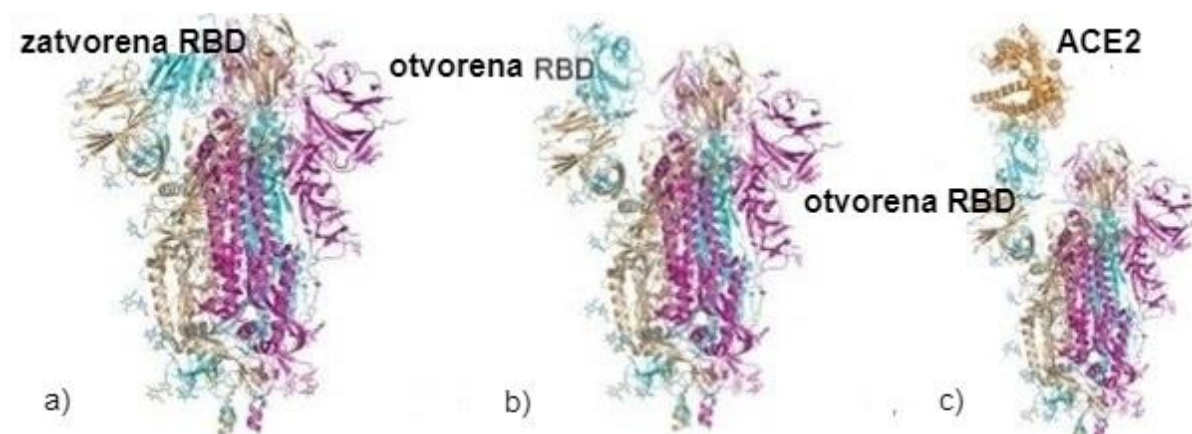


Slika 9. Shematski prikaz ulaska i replikacije virusa u stanici domaćina. Kada virus uđe u stanicu, njegova ovojnica se razgrađuje te se virusna RNA transkripcijom prevodi u mRNA koju stanica zamjenjuje za vlastitu mRNA i raznim staničnim procesima stvara dijelove virusa

koji se spajaju i tvore nove viruse. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹²

2.2.2. Konformacije glikoproteina S

Proučavanjem glikoproteina S uočene su dvije važne konformacije. Prva je zatvorena konformacija u kojoj se virus nalazi pri nepovoljnim uvjetima za fuziju sa stanicom. Karakterizira ju niski afinitet za vezanje s receptorom ACE2 zbog manje dodirne površine između RBD i ACE2. Kada se nađe u međustaničnom prostoru tijela čovjeka, na šiljak djeluje stanična endoproteaza furin, pomiče ga prema otvorenoj konformaciji u kojoj postoji veliki afinitet za vezanje s ACE2 zbog veće dodirne površine. Jednom kada prijeđe u otvorenu konformaciju, šiljak se više ne može vratiti u zatvorenu konformaciju (slika 10).



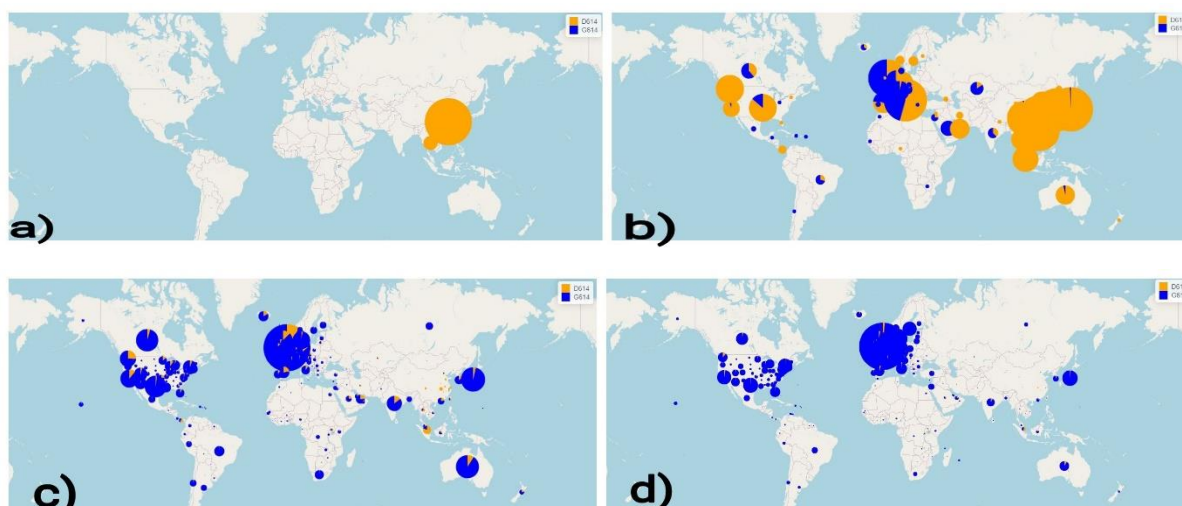
Slika 10. Prikaz a) zatvorene konformacije glikoproteina S, b) otvorene konformacije glikoproteina S i c) vezanja glikoproteina S za stanični transmembranski receptor ACE2.

Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹³

2.2.3. Genetske mutacije virusa

Posljedica umnažanja virusnog genoma u ljudskoj stanici su mutacije koje se događaju prilikom transkripcije virusne RNA. Učestalost mutacija se uvelike razlikuje ovisno o tipu virusa, stoga RNA virusi mutiraju brže nego li DNA virusi, jednolančani mutiraju brže nego li dvolančani te veličina genoma obrnuto proporcionalno utječe na učestalost mutacija. Mogućnost virusa da mutira određena je na nekoliko razina, počevši s točnošću polimeraze, sadržaja sekvence, sekundarne strukture, staničnog mikrokruženja, replikacijskog mehanizma do post-

replikacijskih popravaka.¹⁴ Neke od tih mutacija imaju za posljedicu promjenu u aminokiselinskom slijedu primarne strukture glikoproteina S. Genetskim sekvenciranjem nasumičnih uzoraka uzetih pacijentima koji su pozitivni na infekciju, moguće je relativno jednostavnim metodama ustvrditi postojanje mutacija. Već nekoliko mjeseci nakon pojave prvih slučajeva zaraze SARS-CoV-2, u prosincu 2019. u gradu Wuhanu, otkriveno je postojanje novih sojeva virusa. U kratkom vremenskom periodu uočene su brojne mutacije virusa diljem svijeta, zaključno s 1. 6. 2020. nađeno je oko 35 tisuća sojeva te se do kraja pandemije može očekivati i nekoliko stotina tisuća. Neke od tih mutacija nisu uočavane često, dok su neke gotovo u potpunosti istisnule divlji tip virusa, odnosno onaj tip koji je postojao kod prvog pacijenta (slika 11). Riječ je o mutaciji D614G, odnosno zamjeni aminokiseline aspartata (D) aminokiselinom glicinom (G) RBD domeni podjedinice S₁.



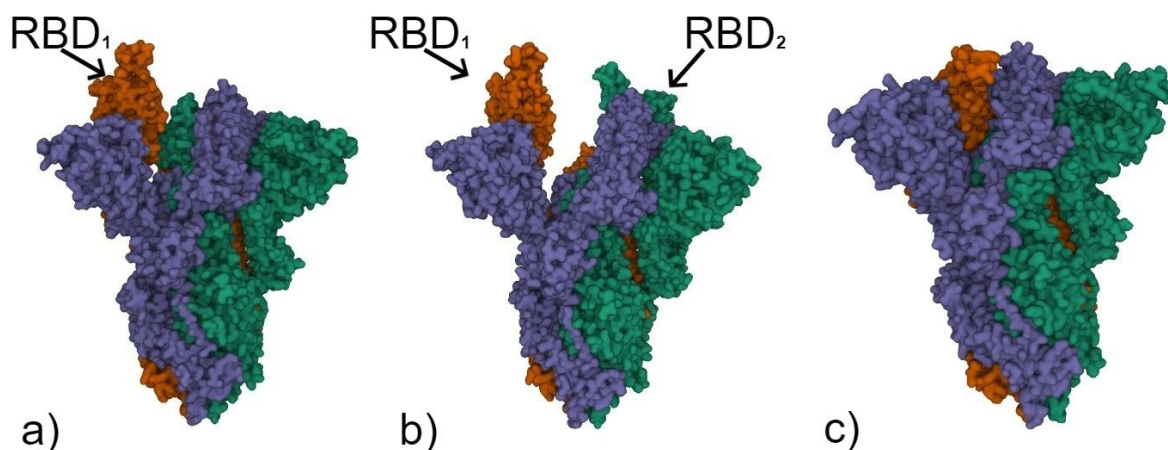
Slika 11. Prikaz rasprostranjenosti divljeg tipa SARS-CoV-2 označenog narančastom bojom na dijagramima na karti svijeta i mutacije D614G označene plavom bojom na dijagramima, uzevši u obzir da ostale mutacije nisu uključene u dijagrame. Podatci su prikupljenim nasumičnim genetskim sekvenciranjem testiranih pacijenata: a) 1. 12. 2019. b) 1. 3. 2020. c) 1. 10. 2020. i d) 1. 4. 2021.¹⁵

2.3. Mutacija D614G

Pretpostavlja se da aminokiselinska zamjena aspartata glicinom na 614. mjestu pospješuje vezanje glikoproteina S šiljka za stanični receptor ACE2, odnosno uspješniji ulazak u stanicu. Obzirom da je glikoprotein šiljka vrlo stabilan, moguće je divlji i mutirani tip proučavati

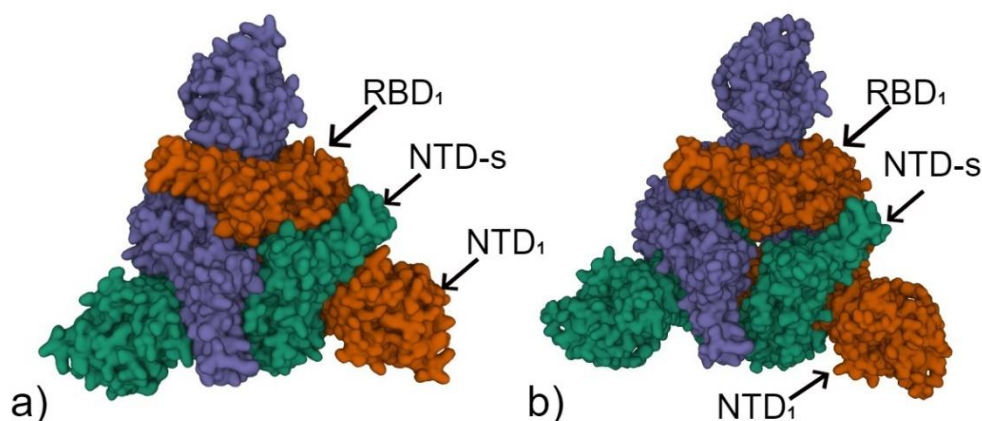
kriogenom elektronskom mikroskopijom te tom metodom uspješno odrediti mehanizam konformacijskih promjena oba tipa. U istraživanju objavljenom u članku „The effect of the D614G substitution on the structure of the spike glycoprotein of SARS-CoV-2“ uočeno je da se 87 % proučavanih šiljaka mutiranog tipa nalazi u otvorenoj konformaciji, s jednom ili dvije izbačene RBD. Suprotno tomu, kod divljeg tipa se 17 % proučavanih šiljaka nalazi u otvorenoj, dok se ostatak nalazi u zatvorenoj konformaciji (slika 12).¹⁶ Podsjećamo, kada se šiljak nalazi u zatvorenoj konformaciji, RBD je fizički spriječena da ostvari interakciju s receptorom ACE2. Tip G614 dominantno egzistira u obliku koji je sposoban za vezanje s receptorom, stoga nije potrebno da na njega djeluje furin, koji mora djelovati na šiljak divljega tipa kako bi prešao u otvorenu konformaciju. Dakle, iz cijeloga mehanizma ulaska virusa u stanicu, kod mutiranog tipa je uklonjen jedan korak, što uvelike olakšava infekciju stanica. Nadalje, u radu se navodi da dodirna površina monomera sa susjednim monomerom iznosi 4000 \AA^2 za zatvorenu konformaciju u proteinu G614, u usporedbi s 5900 \AA^2 za zatvorenu konformaciju proteina D614.

Te promjene u dodirnim površinama ukazuju da RBD-e nisu toliko gusto pakirane u šiljku tipa G614 kao u šiljku tipa D614, što se očituje u stisnutijim RBD divljega tipa koje se nalaze bliže osi simetrije te više ostvaruju interakciju s NTD (N-terminalna domena) za razliku od tipa G614 kod kojega su RBD udaljenije od osi simetrije i NTD (slika 13).



Slika 12. Prikaz struktura glikoproteina S šiljka, snimljeno kriogenom-elektronskom mikroskopijom pri rezoluciji od $2,60 \text{ \AA}$. Različitim bojama su prikazane različite monomerne podjedinice. Pod a) je prikazana otvorena konformacija mutiranog proteina tipa G614 s jednom izbačenom RBD (PDB ID: 7BNN), pod b) otvorena konformacija proteina tipa G614 s dvije izbačene RBD (PDB ID: 7BNO), dok je pod c) prikazana zatvorena konformacija

divljeg tipa (PDB ID: 7DF3), odnosno proteina tipa D614. Mutirani tip glikoproteina S nalazi se 87 % u otvorenoj konformaciji pod a) ili b), a 83 % šiljaka postoji u zatvorenoj konformaciji prikazanoj pod c). Prikazano pomoću programa „Javascript“.



Slika 13. Prikaz zatvorenih konformacija glikoproteina S šiljka, snimljeno kriogenom-elektronskom mikroskopijom pri rezoluciji od 2,60 Å. Različitim bojama su prikazane različite monomerne podjedinice. Pod a) je prikazana zatvorena konformacija proteina divljeg tipa (PDB ID: 7DF3), a pod b) zatvorena konformacija proteina tipa G614 (PDB ID: 7BNM). RBD₁ je domena za vezanje s receptorom ACE2 jedne monomerne podjedinice, NTD₁ je N-terminalna domena iste monomerne podjedinice, dok je NTD-s N-terminalna domena susjedne monomerne podjedinice s kojom je u doticaju RBD₁. Na slici se uočava veća površina dostupna za interakciju s receptorom ACE2 u slučaju mutiranog tipa nego li kod divljeg tipa. Prikazano pomoću programa „Javascript“.

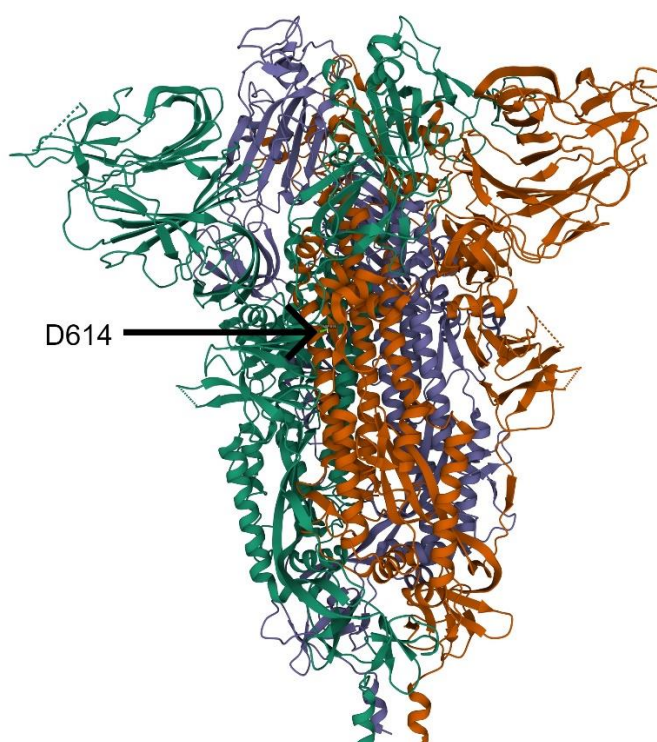
2.3.1. Interakcije aminokiselina

Prostornu strukturu proteina određuje primarna struktura, odnosno slijed aminokiselina koje tvore neki monomer. Proteini nisu statični u prostoru, već prolaze različite konformacijske promjene koje stabiliziraju ili destabiliziraju interakcije na razini aminokiselina. Te interakcije se dijele na nekovalentne koje stabiliziraju različite konformacije od kojih je najbitniji hidrofobni efekt i kovalentne koje mogu stabilizirati ili destabilizirati strukturu.

Koristeći računalne programe poput „Javascript“ moguće je pobliže proučavati međumolekulske interakcije. Pretraživanjem PDB baze podataka odabere se željena konformacija glikoproteina te se u primarnom aminokiselinskom slijedu pronade aminokiselina

čije nas interakcije zanimaju i odabere se vizualizacija iste. Na taj način je u ovom radu proučavana razlika između divljeg i mutiranog tipa na atomskoj razini.

Kako bi se ustvrdio razlog stabilnosti otvorene konformacije glikoproteina S kod tipa G614 potrebno je pronaći interakcije aminokiseline glicina na poziciji 614 s ostalim aminokiselinama koje ju okružuju te usporediti okruženje i interakcije aspartata na poziciji 614 kod divljega tipa virusa. Mjesto 614 se nalazi u N-terminalnoj domeni jedne monomerne podjedinice koja ostvaruje interakciju s jednom RDB druge monomerne podjedinice (slika 14).

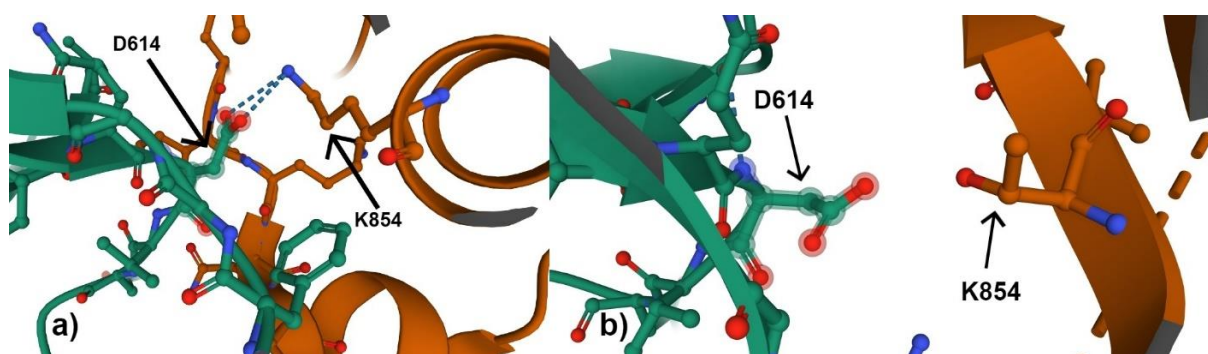


Slika 14. Prikaz zatvorene konformacije divljeg tipa glikoproteina S (PDB ID: 7DF3), snimljenog kriogenom-elektronskom mikroskopijom pri rezoluciji od 2,70 Å uz naznačeni aspartat na 614. poziciji N-terminalne domene jedne monomerne podjedinice označene zelenom bojom koja ostvaruje interakciju s RDB druge monomerne podjedinice označene narančastom bojom. Prikazano pomoću programa „Javascript“.

2.3.2. D614

Uočeno je da aspartat (D) A monomernog lanca (zeleno) dovoljno blizu (6,46 Å) lizinu (K) na poziciji 854 B monomernog lanca (narančasto) kako bi deprotonirana karboksilna skupina koja

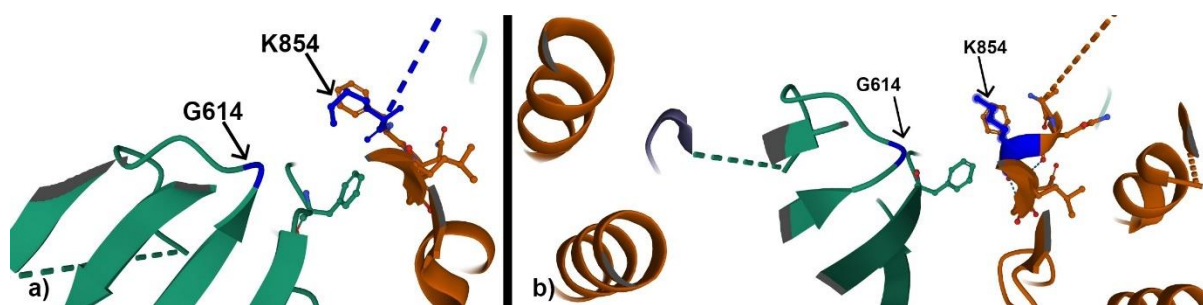
je negativno nabijena tvorila privlačnu ionsku interakciju s pozitivno nabijenom, protoniranom aminoskupinom lizina u zatvorenoj konformaciji divljeg tipa virusa. Kada glikoprotein prelazi u otvorenu konformaciju lanci A i B se moraju udaljiti jedan od drugoga, kako bi se RBD B lanca izbacila prema van. Taj proces zahtijeva kidanje nekoliko privlačnih interakcija među lancima. Usporedbom zatvorene i otvorene konformacije glikoproteina uočeno je da se prilikom prelaska mora prevladati privlačna interakcija između aspartata i lizina za što je potrebno utrošiti energiju kako bi se te dvije aminokiseline dovoljno udaljile, na udaljenost od 8,25 Å da više ne mogu tvoriti ionski most (slika 15). Nadalje se pretpostavlja da postojanje te interakcije favorizira zatvorenu konformaciju glikoproteina, stoga se on u 83 % slučajeva nalazi u takvom obliku.



Slika 15. Interakcija aspartata 614 A lanca s lizinom 854 B lanca divljega tipa virusa, snimljeno krio-EM pri rezoluciji od 2,60 Å, vizualizirano programom „Javascript“. Zeleno je prikazan A lanac, a narančasto B lanac. Glikoprotein se nalazi u zatvorenoj konformaciji pod a) (PDB ID: 7DF3) i otvorenoj konformaciji pod b) (PDB ID: 7DWZ).

2.3.3. G614

U slučaju mutiranog tipa, negativno nabijena aminokiselina aspartat je mutacijom zamijenjena s neutralnim glicinom. Glicin je mala aminokiselina, bez bočnog ogranka, stoga ne može u zatvorenoj konformaciji ostvarivati interakciju s negativno nabijenim lizinom 854 B lanca. Uočeno je da su glicin i lizin u zatvorenoj konformaciji udaljeni otprilike isto (oko 8,40 Å) kao u otvorenoj konformaciji (slika 16). Pretpostavlja se da u slučaju mutiranog tipa ne postoji stabilizirajući efekt na položaju 614. A lanca te je utrošak energije prilikom prelaska konformacije manji te za postizanje otvorene konformacije u povoljnim uvjetima gotovo da nije potreban enzim, što se očituje u dominantnom postojanju mutiranog tipa virusa od 87 % u tom obliku, povoljnom za ulazak virusa u stanicu.



Slika 16. Virtualizacija glicina 614 A lanca (zeleno) mutiranog tipa i lizina 854 B lanca (narančasto), snimljeno krio-EM pri rezoluciji od 2,70 Å, prikazano programom „Javascript“. Nepostojanje interakcija se uočava kod zatvorene konformacije pod a) (PDB ID: 7BNM) i otvorene konformacije pod b) (PDB ID: 7BNO).

2.4. Rasprava

Kako bi se potvrdila valjanost hipoteze da je mutirani tip istisnuo divlji zbog većeg afiniteta prema otvorenoj konformaciji i lakšeg prelaska iz nepovoljne u konformaciju povoljnu za vezanje s receptorom ACE2, moraju se pobiti ostali razlozi koji su mogući čimbenici bržem širenju mutiranog tipa.

Uočeno je da je mutirani tip čak 9 puta zarazniji od divljeg tipa.¹⁷ Veća zaraznost mutiranog tipa nije vezana isključivo za receptor ACE2 u epitelnim stanicama pluća, što potvrđuje istraživanje na stanicama kineskog šišmiša (lat. *Rhinolophus sinicus*), malajskog ljuskavca (lat. *Manis javanica*), kućne mačke (lat. *Felis catus*) i psa (lat. *Canis lupis*) koje su pokazale jednaku otpornost na divlji i mutirani tip. To dokazuje da je relativni porast zaraznosti uzrokovan D614G mutacijom približno jednak kod stanica koje posjeduju ortologe ACE2, što pokazuje da porast zaraznosti D614G mutanta nije specifično vezan za stanice čovjeka.¹⁷

Nadalje, proučavanjem interakcija glikoproteina s receptorom ACE2, pokazano je da povećana zaraznost mutiranog tipa nije uzrokovana jačim vezanjem RBD mutiranog tipa za receptor ACE2. Također je dokazano i da mutirani tip virusa nema veću sposobnost izbjeci imunološkom sustavu domaćina, što je veoma bitno za razvoj cjepiva.

Dakle, razlog većoj infektivnosti mutiranog virusa doista jest veća konformacijska sloboda uzrokovana izostankom privlačne ionske interakcije između aspartata i lizina, odnosno zamjenom aspartata s glicinom.

2.5. Zaključak

SARS-CoV-2 je uzrokovao pandemiju svjetskih razmjera, šireći se vrlo brzo s vrijednošću reproduksijskog broja, R_0 između 2,2 i 3,9. Procjene smrtnosti uzrokovane virusom iznose između 0,8 % i 14,5 % prema Sveučilištu John Hopkins. Tako brzo širenje virusa omogućuju mutacije koje su prirodan proces prilikom cirkulacije virusa u populaciji. One mogu biti beznačajne i bez utjecaja na sposobnost virusa da zarazi ljudsku stanicu, dok vrlo mali broj mutacija na glikoproteinu šiljka, svega 0,3 % mogu utjecati na globalno širenje virusa i prevladati populacijom.¹⁸ Analogno se mutacije događaju i kod ostalih virusa, puno češće kod virusa gripe te mu omogućuju da razvije otpornost na imunološki sustav i za razliku od SARS-CoV-2 virusa uspije izbjeći antitijelima zbog čega se svake sezone mora razvijati novo sezonsko cjepivo. Dakle, mutacije su prirodan evolucijski proces koji se događa nasumično i preživljavaju one jedinke koje su najспособnije i najizdržljivije. Male promjene u strukturi velikog glikoproteina poput zamjene aspartata glicinom mogu uvelike utjecati na strukturu šiljka, što može imati za posljedicu brže širenje i veću smrtnost virusa. Srećom, dokazano je da mutacija D614G ne uzrokuje veću smrtnost, ali to ne mora značiti da će ostali sojevi koji se pojave tijekom pandemije jednako utjecati na smrtnost oboljelih. Nadasve je važno pratiti mutacije na glikoproteinu S šiljka kako bi se uočile one koje su evolucijski naprednije, odnosno kojih ima najviše u populaciji. Te mutacije treba analizirati, ustvrditi razlog njihove veće sposobnosti i pratiti njihov odgovor na antitijela kako bi se znalo jesu li dostupna cjepiva i mogući antivirusni lijekovi pogodni za reakciju na njih i imaju li ljudi koji su preboljeli bolest adekvatan odgovor na nove tipove virusa. Pandemija se može zaustaviti jedino efikasnim cijepljenjem populacije, stoga je od iznimne važnosti pratiti tok mutacija do posljednjeg slučaja zaraze virusom SARS-CoV-2 u svijetu.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. B. Hu, H. Guo, P. Zhou, Z.L. Shi, *Nat Rev Microbiol.* **19** (2021) 141-154.
2. M. Y. Wang, R. Zhao, L. J. Gao, X. F. Gao, D. P. Wang, J. M. Cao, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* **10** (2020) 724.
3. <https://www.britannica.com/science/2019-nCov> (datum pristupa 4. svibnja 2021.)
4. <https://pdb101.rcsb.org/motm/246> (datum pristupa 20. travnja 2021.)
5. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2017/advanced-information> (datum pristupa 20. travnja 2021.)
6. M. Močibob, *Kem. Ind.* **66** (2017) 696–708
7. https://www.creative-biostructure.com/cryo-em-services_4.htm (datum pristupa 10. svibnja 2021.)
8. D. Cressey, E. Callaway, *Nature.* **550** (2017.) 167.
9. <https://www.ciisb.org/open-access/core-facilities/cryo-electron-microscopy-and-tomography> (datum pristupa 10. svibnja 2021.)
10. D. Wrapp, N. Wang, K.S. Corbett, *Science.* **367** (2020) 1260-1263.
11. Y. Huang, C. Yang, *Acta Pharmacol Sin.* **41** (2020) 1141–1149.
12. E. de Wit, N. van Doremalen, D. Falzarano, *Nat Rev Microbiol.* **14** (2016) 523–534.
13. https://media.springernature.com/lw685/springer-static/image/art%3A10.1038%2Fs41401-020-0485-4/MediaObjects/41401_2020_485_Fig2_HTML.png?as=webp (datum pristupa 5. svibnja 2021.)
14. R. Sanjuán, P. Domingo-Calap, *Cell Mol Life Sci.* **73** (2016) 4433–4448.
15. <https://cov.lanl.gov/apps/covid-19/map/> (datum pristupa 1. svibnja 2021.)
16. D. J. Benton, A. G. Wrobel, C. Roustan, A. Borg, P. Xu, S. R. Martin, P. B. Rosenthal, J. J. Skehel, S. J. Gamblin, *PNAS* **118** (2020) 9.
17. B. Korber, W. M. Fischer, S. Gnanakaran, H. Yoon, J. Theiler, W. Abfalterer, N. Hengartner, E. E. Giorgi, T. Bhattacharya, B. Foley, K. M. Hastie, M. D. Parker, D. G. Partridge, C. M. Evans, T. M. Freeman, T. I. de Silva, *Cell.* **182** (2020) 812–827.
18. L. Yurkovetskiy, X. Wang, K. E. Pascal, C. Tomkins-Tinch, T. P. Nyalile, Y. Wang, A. Baum, W. E. Diehl, A. Dauphin, C. Carbone, K. Veinotte, S. B. Egri, S. F. Schaffner, L.

E. Lemieux, J. B. Munro, A. Rafique, A. Barve, P.C. Sabeti, C. A. Kyratsous, N. V. Dudkina, K. Shen, J. Luban, *Cell*. **183** (2020) 739–751.