Mechanizmy unikania wrodzonej odpowiedzi immunologicznej przez ludzkie koronawirusy

Mechanisms of evasion of the innate immune system response by human coronaviruses

ROBERT SZEWCZYK[1], JOLANTA KALINOWSKA[1], MACIEJ CHAŁUBIŃSKI[1*]

[1] Klinika Immunologii i Alergii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź
* Autor do korespondencji

Streszczenie

Układ odporności wrodzonej stanowi pierwszą linię obrony gospodarza przed otaczającymi go patogenami. W przypadku infekcji wirusowych, jako iż są to patogeny wewnątrzkomórkowe, obrona ta rozpoczyna się rozpoznaniem zagrożenia przez cytozolowe i endosomalne receptory rozpoznające wzorce (PRR). Zaktywowana odpowiedź przeciwwirusowa indukuje produkcję interferonów (IFNs) i cytokin, których zadaniem jest eliminacja atakującego wirusa i przygotowanie innych, niezainfekowanych jeszcze komórek do skutecznej obrony. Koronawirusy są jednoniciowymi wirusami RNA o dodatniej polarności (+)ssRNA, które odpowiedzialne są za epidemie SARS w latach 2002 oraz MERS w 2012 roku, a także pandemię COVID-19 w 2019 roku. W związku z powyższym, rodzina *Coronaviridae* stała się głównym celem badań ze względu na duże ryzyko wystąpienia kolejnych pandemii w przyszłości. Koronawirusy na drodze ewolucji wykształciły wachlarz mechanizmów na podstawie których unikają nie tylko rozpoznania przez receptory wrodzonego układu odpornościowego gospodarza, ale również, efektywnych w stosunku do innych wirusów mechanizmów obrony przeciw-wirusowej. Celem tej pracy jest opis oraz charakterystyka najważniejszych mechanizmów na podstawie których członkowie rodziny *Coronaviridae* unikają ukształtowanych przez wrodzony układ odpornościowy, uniwersalnych mechanizmów obrony gospodarza przed infekcjami wirusowymi.

Słowa kluczowe: ludzkie koronawirusy, odpowiedź wrodzona, mechanizmy unikania

Summary

The innate immune system is the first line of host's defense against surrounding pathogens. In the case of viral infections, as they are intracellular pathogens, defense begins with the recognition of the threat by cytosolic and endosomal pattern recognition receptors (PRRs). Activated antiviral response induces production of interferons (IFNs) and other cytokines to eliminate invading virus and prepare other, not yet infected cells, for effective defense. Coronaviruses are positive single-stranded RNA viruses (+)ssRNA, which are responsible for outbreaks in 2002 and 2012 (SARS and MERS accordingly), as well as the COVID-19 pandemic in 2019. Therefore, the *Coronaviridae* family has become a major target for research due to the high risk of further pandemics in the future. *Coronaviruses*, through evolution, have developed a wide range of mechanisms on the basis of which they avoid not only recognition by receptors of the host's innate immune system, but also effective against other viruses, antiviral defense mechanisms. The purpose of this work is to describe and characterize the key mechanisms by which members of the *Coronaviridae* family evade innate immune system-formed, universal host defense mechanisms against viral infections.

Key words: human coronaviruses, innate immunity, evasion mechanisms

© Alergia Astma Immunologia 2023, 28 (3) 85 - 94

www.alergia-astma-immunologia.pl

Adres do korespondencji / Address for correspondence

dr hab. n. med. Maciej Chałubiński, prof. UM

Klinika Immunologii i Alergii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź
e-mail: maciej.chalubinski@umed.lodz.pl

IFN - interferon, interferon
RNA - ribonucleic acid, kwas rybonukleinowy
SARS - Severe Acute Respiratory Syndrome, zespół ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej
MERS- Middle-East Respiratory Syndrome, zespół oddechowy bliskiego wschodu
ARDS - Acute Respiratory Disease Syndrome, zespół ciężkiej wschodniej niewydolności oddechowej
ACE2 - angiotensin-converting enzyme-2, konwertaza angiotensyny 2
DPP4 - dipeptidyl peptidase 4, dipeptydylopeptydaza 4
AP-N - aminopeptidase N, aminopeptydaza N
ORF1a/ab - open reading frame 1a/ab, otwarta ramka odczytu 1a/ab
RTCs - replication-transcription centers, centra replikacyjno-transkrypcyjne
HCoVs - human coronaviruses, ludzkie koronawirusy
PAMP - pathogen assosiated molecular patterns, wzorce molekularne związane z patogenami
DAMP - damage assosiated molecular patterns, wzorce molekularne związane z uszkodzeniami
PRR - pattern recognition receptors, receptory rozpoznające wzorce
TLR - toll- like receptors, receptory toll-podobne,
RLR - rig-like receptors, receptory rig-podobne
NLR - nod-like receptors, receptory nod-podobne
IRF - interferon regulatory factors, czynniki regululatorowe interferonu

ISGs - interferon-stimulated genes, geny stymulowane interferonami
dsRNA - double-stranded ribonucleic acid, dwuniciowy kwas rybonukleinowy
ssRNA - single-stranded ribonucleic acid, jednoniciowy kwas rybonukleinowy
NF-κB - nuclear factor kappa B, jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B
MYD-88 - myeloid differentiation primary response 88, czynnik pierwotnej odpowiedzi różnicowania mieloidalnego 88
MDA-5 - melanoma differentiation-associated protein 5, białko różnicowania czerniaka 5
LGP2 - laboratory of genetics and physiology 2, czynnik laboratorium genetyki i fizjologii 2
CTD - carboxy-terminal domain, domena regulatorowo-represorowa
EndoU - endonuclease, poly(U) specific, endonukleaza specyficzna względem urydyny
DMV - double membrane vesicle, pęcherzyk dwubłonowy
Nsp - non-structural protein, białko niestrukturalne
RO's - replication organelles, organy replikacyjne
SGs - stress granules, granulki stresowe
PKR - protein kinase R, kinaza białkowa R
OAS-1 - 2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 2-5-oligoadenylowa syntetaza 1

1. Wstęp

Koronawirusy są dużą grupą wirusów należącą do podrodziny *Orthocoronavirinae* w obrębie rodziny *Coronaviridae*. Ich materiał genetyczny stanowi jednoniciowa cząsteczka RNA o dodatniej polarności, a genom składający się z 30 kpz (kilo par zasad) jest jednym z największych wśród wirusów RNA [1]. Koronawirusy podzielono na cztery główne rodzaje: alfa-, beta-, gamma- oraz delta- koronawirusy. Wszystkie są zdolne do infekcji ssaków, a pierwsze dwa rodzaje (alfa oraz beta) stanowią zagrożenie również dla ludzi. Ludzkie koronawirusy 229E, OC-43, HKU1 i NL63 są najczęściej występującymi w środowisku szczepami nisko patogennymi, które odpowiedzialne są za wywoływanie łagodnych, sezonowych infekcji górnych dróg oddechowych potocznie nazywanych przeziębieniami. Do wysoko patogennych szczepów atakujących dolne drogi oddechowe należą członkowie rodzaju beta: SARS-CoV, MERS-CoV oraz SARS-CoV-2, których infekcje mogą charakteryzować się nagłym i ciężkim przebiegiem zdefiniowanym jako zespół ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej ARDS (ang. acute respiratory distress syndrome) [2]. Przedstawiciele rodzaju beta odpowiedzialni są za wybuchy epidemii SARS-CoV w 2002 i MERS-CoV w 2012 roku oraz pandemii COVID-19 w 2019 (SARS-CoV-2), których śmiertelność wynosiła odpowiednio 11%, 36% oraz 5.2% [3]. Co ciekawe, SARS-CoV-2, pomimo mniejszej śmiertelności dzieli 79% materiału genetycznego z SARS-CoV oraz 30% z MERS-CoV [4].

Wszystkie z wysoko patogennych koronawirusów są wirusami odzwierzęcymi, które pokonały barierę rodzajową nabywając zdolności do infekowania ludzi. Receptorami wejścia dla wysoko patogennych koronawirusów są cząsteczki ACE-2 (SARS-CoV i SARS-CoV-2) oraz DPP4 (MERS-CoV), które regulują odpowiednio skurcz naczyń krwionośnych i ciśnienie krwi oraz indukują sygnał kostymulujący aktywację dziewiczych limfocytów T [5]. Nisko patogenny szczep HCoV-229E natomiast wykorzystuje cząsteczkę AP-N, której główną rolą w organizmie człowieka jest kontrola odczuwania bólu oraz pośrednia regulacja ciśnienia krwi poprzez rozluźnianie naczyń krwionośnych [6].

Typowa dla koronawirusów organizacja genomu zawiera trzy główne sekwencje kodujące białka strukturalne, białka niestrukturalne oraz białka dodatkowe. Genom zaś zakończony jest na końcu 5' specjalną czapeczką (7'metyloguanozyna) oraz łańcuchem poly A na końcu 3' [7]. Dwie-trzecie końca 5' genomu koronawirusów zajmują dwa regiony ORF1a oraz ORF1ab, które bezpośrednio po wniknięciu do komórek gospodarza ulegają translacji. Powstałe poliproteiny pp1a i pp1ab po wcześniejszej hydrolizie stają się szesnastoma białkami niestrukturalnymi odpowiedzialnymi za utworzenie centr replikacyjno-transkrypcyjnych RTC (ang. Replication-Transcription Complexes) [8]. Ze względu na fakt, iż materiał genetyczny ludzkich koronawirusów stanowi dodatnio-spolaryzowana jednoniciowa cząsteczka RNA, bezpośrednio po wniknięciu do komórki gospodarza może dochodzić do jej translacji, a co za tym idzie, natychmiastowej produkcji białek wirusowych i tworzenia mikrośrodowiska sprzyjającego replikacji patogenu [9]. Pozostała część materiału genetycznego wirusa na końcu 3' koduje białka strukturalne: kolca S (ang. spike), osłonki E (ang. envelop), błony M (ang. membrane) i nukleokapsydu N (ang. nucleocapsid). W tej części kodowane są również białka dodatkowe, które wchodzą w skład syntetyzowanych wirionów i regulują zachodzące podczas infekcji procesy biologiczne. Co ważne, białka strukturalne są kluczowymi elementami biorącymi udział w unikaniu wrodzonej odpowiedzi gospodarza, pomimo, iż nie są niezbędne do przeprowadzenia procesu replikacji. Białka dodatkowe natomiast stanowią bardzo ważny element mechanizmu wykorzystywania struktur gospodarza do sukcesywnej infekcji antagonizując wrodzone mechanizmy obronne [10]. Ekspresja poszczególnych białek dodatkowych wykazuje wysoką heterogenność względem poszczególnych szczepów.

2. Infekcje ludzkimi koronawirusami

Ludzkie koronawirusy (HCoVs) infekują komórki gospodarza używając jako receptorów wejścia białek z rodziny peptydaz: ACE-2 (SARS-CoV i SARS-CoV-2), DPP4 (MERS-CoV), AP-N (HCoV-229E) [11]. Szerokie rozpowszechnienie tkankowe białek powierzchniowych, które HCoVs wykorzystują do infekcji komórek docelowych spowodowane jest rozległym spektrum funkcji fizjologicznych, jakie cząstki te pełnią w organizmie człowieka. Ich obecność wykazano nie tylko w obrębie układu oddechowego, ale również układzie sercowo-naczyniowym, pokarmowym, moczowo-płciowym, nerwowym oraz nerkach i wątrobie, co w znacznym stopniu przekłada się na patogenezę i konsekwencje, jakie niesie za sobą ciężki przebieg infekcji koronawirusami o wysokiej patogenności. Szerokie rozpowszechnienie cząstek receptorowych ułatwia rodzinie *Coronaviridae* sukcesywną ekspansję i może stanowić o wielonarządowym charakterze systemowego zapalenia, jakie obserwuje się podczas najcięższego przebiegu infekcji wysoko patogennymi koronawirusami. Charakterystyczne dla ciężkich infekcji koronawirusami o wysokiej patogenności jest

występowanie nadmiernej reakcji odporności wrodzonej nazywanej ,,burzą cytokinową" [12]. Gwałtowne wydzielanie przez makrofagi, monocyty, komórki dendrytyczne oraz nabłonek cytokin prozapalnych (IL-1β, IL-2, IL-6 TNF-α), chemokin (MCP-1, MIP-1 IP-10, RANTES) oraz białek ostrej fazy i interferonów (IFN-α/β) [13] prowadzi do nagłej, nadmiernej i niekontrolowanej reakcji organizmu, która towarzyszy ponad 80% przypadków zgonów chorych na COVID-19 [14]. Jedną z głównych hipotez wyjaśniających przyczynę występowania ,,burzy cytokinowej" jest wykształcenie przez ludzkie koronawirusy mechanizmów, które pozwalają wirusom na ukrywanie swojej obecności w komórkach gospodarza [15]. Mechanizmy te uniemożliwiają detekcję wirusów w zrearanżowanych przez niestrukturalne białka wirusa organellach gospodarza, zapewniając tym samym ochronę przed głównymi sposobami detekcji przez receptory odpowiedzi wrodzonej. Intensywna replikacja wirusa w specjalnie utworzonych przedziałach komórki gospodarza pozwala na akumulację dużej liczby cząstek wirusowych, których nagłe uwolnienie prowadzi do niekontrolowanej i nadmiernej reakcji organizmu.

3. Wrodzona odpowiedź układu odpornościowego

Układ wrodzonej odpowiedzi odpornościowej stanowi pierwszą linię obrony organizmu przed zagrażającymi czynnikami, w tym wirusami. Obrona ta jest wieloetapowym procesem, w skład którego wchodzą: rozpoznanie atakującego patogenu, indukcja szlaków sygnałowych prowadząca do ekspresji genów odpowiedzi zarówno zapalnej, jak i przeciwwirusowej oraz wydzielanie czynników, które ograniczają replikację i nasilają reakcję zapalną. Pierwszy etap odpowiedzi wrodzonej stanowi rozpoznanie konserwatywnych wzorców molekularnych związanych z patogenami (PAMP, ang. Patogen-Assosiated Molecular Patterns) oraz cząstek pochodzących z uszkodzonych w wyniku infekcji komórek własnych (DAMPs, ang. Damage-assosiated Molecular Patterns) przez receptory rozpoznające wzorce (PRR, ang. Pattern Recognition Receptors). U człowieka wyróżnia się na trzy główne rodzaje PRR: TLR (ang. Toll-like receptors), RLR (ang. RIG I-like receptors) i NLR (ang. NOD-like receptors) [16]. Receptory te zdolne są do rozróżniania cząsteczek obcych od własnych. W przypadku infekcji wirusowych najważniejszą rolę odgrywają receptory TLR i RLR odpowiedzialne za detekcję wirusowego RNA oraz białek powierzchniowych na wszystkich etapach jego oddziaływania: zewnątrzkomórkowym, endosomalnym oraz cytozolowym. Stanowi to o ich roli w zachowaniu homeostazy i zdolności do szybkiej reakcji, która w odróżnieniu od odpowiedzi nabytej nie wymaga wydłużonej fazy przygotowawczej [17]. Szybka i celowana odpowiedź może przesądzić o losie infekcji, umożliwiając natychmiastową eliminację wirusa oraz przygotowanie innych komórek do skutecznej obrony jeszcze przed zetknięciem się komórki z infekcyjną cząstką wirusa. Receptory wrodzonej odporności indukują sygnały i czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za wydzielanie i produkcję prozapalnych cytokin oraz białek odpowiedzi przeciwwirusowej, w której główne role odgrywają IFN typu I i III [18]. Zdolność do omijania tej fazy indukcyjnej może stanowić o przewadze patogenów nad mechanizmami obronnymi gospodarza. Stąd koronawirusy wykształciły na drodze ewolucji wachlarz mechanizmów, które bezpośrednio lub pośrednio pozwalają im na skuteczną ucieczkę spod spektrum działania obrony wrodzonej.

4. Receptory odpowiedzi wrodzonej – wykrywanie wirusów

4.1. Receptory TLR

Receptory Toll-podobne są głównym elementem odpowiedzi wrodzonej odpowiedzialnym za wykrywanie sygnałów zagrożenia pochodzących z PAMPs. U ludzi zidentyfikowano dotychczas 10 typów receptorów TLR: od TLR1-10, podczas gdy u myszy jest ich 12 [19]. W infekcjach wirusowych największą rolę, ze względu na wewnątrzkomórkowy charakter patogenu, odgrywają receptory rozmieszczone wewnątrz różnego rodzaju struktur o charakterze pęcherzyków. Do tej grupy należą TLR-3 oraz TLR-7/8 występujące wewnątrz endosomów i lizosomów, rozpoznając kolejno: dsRNA i ssRNA – odpowiednio przejściowy (wynikający z mechanizmów replikacji) i główny – materiał genetyczny koronawirusów [20]. Rozpoznanie patogenu indukuje kaskadę transdukcji sygnałów na skutek kontaktu z cząstkami adaptorowymi, której końcowym etapem po pobudzeniu odpowiedniego czynnika transkrypcyjnego (AP-1, NF-κB lub IRF) jest indukcja ekspresji genów odpowiedzialnych za odpowiedź zapalną i przeciwwirusową [21]. Wyróżnia się receptory posługujące się szlakiem zależnym i niezależnym od cząstki adaptorowej MyD88. W odróżnieniu od TLR-7/8, charakterystyczną cechą TLR-3 jest transdukcja sygnału niezależnie od cząstki MyD88, a z wykorzystaniem cząstki TRIF (ang. TIR-domain-containing adaptor protein including IFN-beta) [22].

4.2. Receptory RLR

Receptory RLR są rodziną cytozolowych białek zdolnych do wewnątrzkomórkowej detekcji wirusowego RNA. Główną rolą transdukcji sygnału przez RLR jest aktywacja takich czynników transkrypcyjnych jak NF-κB oraz IRF3 i IRF7 – kluczowych elementów pośredniczących w odpowiedzi przeciwwirusowej realizowanej na podstawie interferonów typu I oraz III [23]. Wyróżnia się trzy receptory będące członkami rodziny RLR: RIG-I (ang. retinoic acid-inducible gene-1) określany również jako DDX58, MDA5 (ang. melanoma differentiation-associated protein 5) oraz trzeci, najsłabiej poznany receptor LGP2 (ang. laboratory of genetics and physiology 2) [24]. Pod względem strukturalnym wszystkie receptory RLR charakteryzują się obecnością dwóch domen odpowiedzialnych za wiązanie RNA: regulatorowo-represorowej CTD (ang. carboxy-terminal domain) oraz helikazy RNA (ang. central helicase) [25]. Elementem odróżniającym LGP2 od reszty jest nieobecność domen aktywacji i rekrutacji kaspaz CARD (ang. caspaze activation and recrutation domain), których główna rola opiera się na transdukcji sygnału. Stąd powszechnie uważa się, że kluczowym mechanizmem działania LGP2 jest zarówno pozytywna, jak i negatywna regulacja aktywności pozostałych dwóch receptorów MDA5 i RIG-I, które w odróżnieniu od LGP2 i za sprawą obecności wszystkich trzech rodzajów domen (CARD, CTD i helikazy RNA) są w stanie rozpoznawać zagrożenie oraz zdolne są do następczej transdukcji sygnału.

Głównymi elementami odróżniającymi receptory RIG-I i MDA5 są cechy, jakimi muszą charakteryzować się cząsteczki RNA, by zostać sukcesywnie rozpoznane przez te receptory. RIG-I preferencyjnie wiąże krótkie odcinki końca 5'dsRNA (13 par zasad), które spełniają jedną z trzech poniższych cech: obecność dwóch lub trzech grup fosforanowych na końcu 5' RNA oraz brak metylacji w pozycji 2'O terminalnego nukleotydu końca

5’ [26]. Co ciekawe, wszystkie z podanych struktur, poza obecnością dsRNA, ze względu na brak u człowieka polimerazy RNA zależnej od RNA, mogą występować jako materiał genetyczny gospodarza. Niemniej jednak, ludzkie RNA charakteryzuje się obecnością specjalnych struktur określanych mianem ,,czapek” (ang. caps) na końcach 5’ RNA, co pozwala na odróżnienie cząsteczek gospodarza, od egzogennego materiału wirusa [27]. Co więcej, post transkrypcyjna obróbka mRNA pozwala na metylację cząsteczki kwasu rybonukleinowego w pozycji 2’O jeszcze na poziomie jądra komórkowego, czyli bezpośrednio przed pojawieniem się w cytoplazmie, gdzie cząsteczki mogłyby indukować transdukcję sygnału za pośrednictwem RLR [28]. Dodatkowo tak zsyntetyzowana cząsteczka RNA powiązana jest ze strukturami białkowymi, które zapobiegają wiązaniu się do RIG-I. Receptory MDA5 natomiast wykazują się możliwością wiązania dsRNA o stosunkowo długich strukturach [29]. Stąd, popularnym syntetycznym agonistą MDA5 wykorzystywanym na szeroką skalę w badaniach naukowych jest cząsteczka Poly I:C (polyinosinic: polycytidylic acid).

5. Ludzkie koronawirusy

Infekcje ludzkimi koronawirusami rozpoczynają się przyłączeniem białka S do odpowiedniego dla danego szczepu koronawirusa receptora wejścia na powierzchni komórek gospodarza. Reakcja ta może zachodzić na podstawie dwóch mechanizmów: bezpośredniej fuzji wirusa z błoną cytoplazmatyczną komórki docelowej lub pochłonięcia z wykorzystaniem zjawiska endocytozy [30]. W obu przypadkach po wniknięciu do cytoplazmy materiał genetyczny wirusa odłącza się od białka N nukleokapsydu i tym samym, ze względu na swoją budowę (dodatnio polarny ssRNA), może podlegać bezpośredniej translacji z wykorzystaniem rybosomalnej maszynerii komórkowej gospodarza [31]. Jako obligatoryjne patogeny wewnątrzkomórkowe, koronawirusy zmuszone są do wykorzystywania struktur gospodarza do sukcesywnej translacji i replikacji [32]. Niemniej jednak ich genom koduje czynniki, ułatwiając te procesy, na co również składają się mechanizmy unikania odpowiedzi wrodzonej. Stąd translacja dwóch otwartych ramek odczytu ORF1a i ORF1b prowadzi do powstania poliprotein pp1a i pp1ab, które po rozszczepieniu przez wirusowe proteazy kodują 16 białek niestrukturalnych niezbędnych do replikacji wirusa [33]. Białka te są kluczowymi elementami regulującymi oddziaływanie wirusa z komórką gospodarza od momentu wniknięcia do cytoplazmy, aż po uwalnianie nowo zsyntetyzowanych infekcyjnych cząstek wirusa do środowiska pozakomórkowego.

6. Unikanie rozpoznania przez receptory odpowiedzi wrodzonej

6.1. Mechanizmy

Jednym z mechanizmów zapewniającym koronawirusom niezahamowaną możliwość rozwoju pełnowymiarowej infekcji jest wysoce konserwatywne białko Nsp15 i kodowane przez nie endonukleazy (Tabela 1).

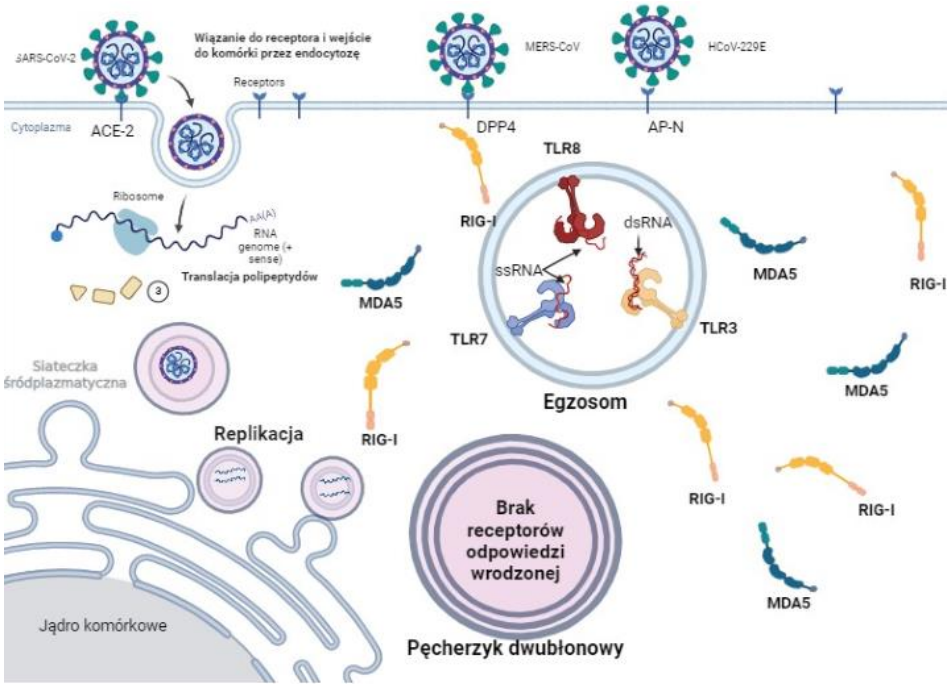
Tabela 1. Mechanizmy unikania odpowiedzi wrodzonej wykorzystywane przez ludzkie koronawirusy.

Cząstka	Opis mechanizmu
Nsp15	Kodowanie endonukleazy EndoU, zapobieganie odkładania struktur rozpoznawanych przez PRR, hamowanie aktywacji MDA-5
Pęcherzyki dwubłonowe	Ukrywanie materiału genetycznego wirusa, odizolowanie wirusa od receptorów odpowiedzi wrodzonej, udział w składaniu nowych wirionów
Nsp3	Indukcja tworzenia DMV
Nsp4	Indukcja tworzenia DMV
Nsp6	Dostarczanie lipidów niezbędnych do utworzenia DMV z błon siateczki śródplazmatycznej
Białko 4a	Hamowanie powstawania granulek stresowych, inhibicja fosforylacji eIF2α, hamowanie aktywacji PKR
Nsp1	Funkcjonalne wyłączenie translacji białek komórki gospodarza, blokowanie wejścia mRNA do rybosomów
Białko 4b	Hamowanie ekspresji genów IFN typu I i II, rozszczepianie RNazy L

Materiał genetyczny rodziny *Coronaviridae* stanowi dodatnio polarna cząsteczka ssRNA, która nie jest rozpoznawana jako obcy materiał genetyczny ze względu na fakt, iż wykazuje tożsame z ludzkim RNA charakterystyczne elementy budowy. Koronawirusy podczas replikacji nadają swoim nowo zsyntetyzowanym cząsteczkom cech ludzkiego RNA pod postacią cząsteczki 7’metyloguanozyny na końcu 5’ oraz metylacji w pozycji 2’O terminalnego nukleotydu tego samego końca [34]. Mechanizmy te wyłączają cząstki materiału genetycznego wirusa spod restrykcji aparatu receptorowego odpowiedzi wrodzonej, sprawiając, że zarówno RIG-I, jak i MDA-5 nie są w stanie rozróżnić RNA wirusa od materiału gospodarza. W trakcie procesu replikacji jako produkty pośrednie powstają jednak cząsteczki ssRNA o ujemnej polarności, a także dwuniciowy dsRNA, który ze względu na brak polimerazy RNA zależnej od RNA nie występuje naturalnie w organizmie człowieka [35]. Obecność tych struktur potwierdza obecność aktywnej infekcji w komórce gospodarza w bezpośredni sposób narażając wirusa na detekcję przez wrodzone mechanizmy układu

odpornościowego. Indukcja odpowiedzi przeciwwirusowej i zapalnej na wczesnym etapie infekcji wirusowej znacząco zwiększa ryzyko skutecznego ograniczenia replikacji i zasadniczo uniemożliwia transmisję infekcji na komórki niezainfekowane. Stąd mechanizmem poprzedzającym każdy proces replikacji wirusa jest wykorzystanie białek z rodziny endonukleaz (EndoU) kodowanych przez Nsp15 [36]. Endonukleazy odpowiadają za zapobieganie akumulacji dsRNA i ssRNA o przeciwstawnej do genomowej polarności w komórce gospodarza poprzez rozrywanie wiązań fosfodiestrowych kwasu nukleinowego [37]. Prowadzi to do uwolnienia oligonukleotydów, które nie indukują powyższych mechanizmów receptorowych gospodarza oraz nie są akumulowane w cytoplazmie, gdzie mogłyby zindukować reakcję zapalną. Udowodniono, że białko Nsp15 w bezpośredni sposób antagonizuje wytwarzanie interferonów przyczyniając się do opóźnienia odpowiedzi realizowanej na podstawie interferonów typu I [38]. Badania na liniach komórkowych udowodniły, że mutacje w domenach EndoU przyczyniają się do zmniejszenia zjadliwości koronawirusów, a także obniżenia ich zdolności aktywacji receptorów odpowiedzi wrodzonej [39].

Badania dowodzą jednak, iż nie jest to mechanizm całkowicie skuteczny i nowo zsyntetyzowany materiał genetyczny wirusa może zostać wykryty przez aparat rozpoznawczy gospodarza [40]. Wirusy z rodziny *Coronaviridae* wykształciły jednak inny mechanizm, by odgraniczyć miejsca replikacji wirusa od środowiska występowania receptorów odporności wrodzonej. Mechanizm ten opiera się na wykorzystaniu lipidowych struktur gospodarza do formowania dwubłonowych pęcherzyków DMV's (ang. Double Membrane Vesicles), które izolują miejsca replikacji i syntezy białek wirusowych od środowiska występowania mechanizmów receptorowych [41] (Rycina 1). DMV są strukturami zbudowanymi z błon siateczki śródplazmatycznej, które za pomocą wirusowych białek niestrukturalnych (Nsp3, Nsp4 i Nsp6) [42] przekształcane są w niezbędne do przeżycia organelle replikacyjne wirusa RO (ang. Replication Organelles). W przypadku SARS-CoV-2 do formowania DMVs wystarczające są dwa białka niestrukturalne: Nsp3 i Nsp4 [43]. Nsp6 wspomaga jednak ten proces zapewniając lipidy do uformowania DMVs szczególnie w stanach nasilonej infekcji [44]. Znanych jest kilka rodzajów DMVs, a formą charakterystyczną indukowaną przez HCoVs są, „sealed vesicles" - czyli pęcherzyki całkowicie zamknięte, które powstają już na kilka godzin po infekcji, a ich liczba silnie skorelowana jest intensywnością replikacji [45]. Indukowane przez wirusa struktury zwane organellami replikacyjnymi są wytwarzane w celu koncentracji białek wirusowych i niektórych czynników komórki gospodarza niezbędnych do replikacji wirusa. Badania dowodzą, że profil lipidowy pęcherzyków dwubłonowych w znacznym stopniu różni się od siebie w zależności od patogenu, jaki indukuje ich powstawanie [46].



Rycina 1. Unikanie mechanizmów odpowiedzi wrodzonej z wykorzystaniem pęcherzyków dwubłonowych, w których za sprawą uwypuklenia błon siateczki śródplazmatycznej nie występują receptory odpowiedzi wrodzonej (TLR3/7/8) obecne w egzosomach.

Co więcej, udowodniono, iż po przeprowadzeniu procesu replikacji, DMVs mogą przekazywać nowo zsyntetyzowany materiał genetyczny wirusa do przedziałów ERGIC/Golgi, w których składane są wiriony w sposób nienaruszający środowiska cytoplazmatycznego, tym samym nie alarmując komórki gospodarza o powstaniu nowych infekcyjnych cząstek wirusa [47]. Rola DMVs nie ogranicza się więc jedynie do ukrywania materiału genetycznego wirusa oraz metabolitów wytwarzanych w procesie replikacji, ale realizowana jest również na podstawie udziału w procesie składania nowych infekcyjnych cząsteczek patogenu. Niemniej jednak, wciąż niewiele wiadomo o potencjalnym wykorzystaniu DMV w ograniczaniu replikacji podczas infekcji wirusami z rodziny *Coronaviridae*. Można więc stwierdzić, że badania nad ich powstawaniem oraz funkcją na przełomie najbliższych lat wymagają znaczącej intensyfikacji.

6.2. Wykorzystywanie mechanizmów translacyjnych gospodarza – granulki stresowe

Działanie odporności wrodzonej opiera się głównie na rozpoznaniu zagrażającego czynnika i indukcji odpowiedzi przeciwwirusowej realizowanej na podstawie białek z rodziny interferonów. Na drodze ewolucji organizm ludzki wykształcił jednak również mechanizmy, które w bezpośredni sposób mają na celu zahamować poszczególne etapy rozwoju infekcji. Jednym z tych mechanizmów jest pozbawienie infekującego wirusa możliwości syntezy własnych białek, do której jako obligatoryjny patogen, musi wykorzystać maszynerię translacyjną gospodarza [48]. Granulki stresowe (SGs, ang. stress granules) są bezbłonowymi strukturami, w których, w odpowiedzi na stres, taki jak wynikający z infekcji wirusowych, komórka koncentruje wyprodukowane mRNA [49]. Nagromadzone mRNA nie może jednak ulec translacji ze względu na fakt, iż – by powstrzymać produkcję białek wirusowych – komórki gospodarza hamują również produkcję białek własnych. Nagromadzenie mRNA, które nie uległo translacji, a także kompleksów inicjujących tę reakcję indukuje powstawanie granulek stresowych [50], których głównym markerem jest białko G3BP1 [51]. Początkowo uważano, iż główną rolą tych struktur ze względu na fakt dużej akumulacji wirusowych substratów dla receptorów odpowiedzi wrodzonej jest stanowienie swoistego fundamentu dla aparatu sensingowego gospodarza [52]. W rzeczy samej, w późniejszych badaniach udowodniono, iż w strukturach tych wykazano intensywną obecnością cytozolowych receptorów dla kwasu rybonukleinowego: RIG-I i MDA-5 [53].

W badaniach z wykorzystaniem białka 4a wirusa MERS-CoV udowodniono jednak, że białko to hamuje zależną od dsRNA aktywację PKR (ang. Protein Kinase R) [54]. PKR jest enzymem z rodziny kinaz, który hamuje translację, fosforylując podjednostkę α eukariotycznego czynnika inicjacji translacji (eIF2α), co wyzwala montaż granulek stresu [55]. Zahamowanie przez białko 4a wirusa MERS-CoV tego procesu skutkuje blokowaniem powstawania granulek stresowych, które tym samym nie ograniczają translacji cząsteczek mRNA niezbędnych do tworzenia centr replikacji i pęcherzyków dwubłonowych. Badania na liniach komórkowych potwierdziły, że pozbawienie wirusa MERS-CoV sekwencji kodujących białko 4a spowodowało powstanie granulek stresowych, w odróżnieniu od zastosowanego w tym samym badaniu, dzikiego szczepu wirusa zdolnego do ekspresji genów białka 4a, gdzie powstanie granulek stresowych zostało zahamowane [56].

6.3. Unikanie głównej odpowiedzi przeciwwirusowej

Rozpoznanie wirusa przez wrodzony układ odpornościowy gospodarza inicjuje odpowiedź przeciwwirusową opartą w szczególności na produkcji białek z rodziny interferonów typu I (IFN), głównie IFN-α i IFN-β, a także typu III (IFN-λ) [57]. Odpowiedź interferonowa składa się z dwóch głównych faz: w pierwszej komórka wytwarza IFN w odpowiedzi na detekcję cząsteczek wirusa, a w drugiej fazie wyprodukowany IFN oddziałuje na komórki go produkujące (działanie autokrynne), a także komórki sąsiednie (działanie parakrynne), co skutkuje produkcją genów stymulowanych IFN (ISG, ang. interferon-stimulated genes) [58]. Oddziaływanie to wywołuje ekspresję setek genów indukowanych interferonami, aby ułatwić i spotęgować dalszą odpowiedź przeciwwirusową. Wyprodukowane IFN i cytokiny mają za zadanie koordynować wczesną odpowiedź immunologiczną oraz rekrutować wiele typów komórek odpornościowych do miejsc infekcji wirusowej [59]. Oddziaływanie IFN na komórki polega na wiązaniu się IFN typu I i typu III z ich receptorami, IFNAR1/IFNAR2 i IFNLR1/ IL-10R2, co inicjuje przeciwwirusowe kaskady sygnalizacyjne poprzez aktywację kinaz tyrozynowych JAK1 i Tyk2 [60]. Późniejsza aktywacja czynników transkrypcyjnych transduktora sygnału i aktywatora transkrypcji STAT1 i STAT2 przez kinazy indukuje powstawanie czynników stymulowanych przez IFN (ISGF3) (IRF9/p-STAT1/p-STAT2), które następnie działają jako czynniki transkrypcyjne napędzające ekspresję genów stymulowanych interferonem (ISG) [61]. Białka kodowane przez ISG odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi przeciwwirusowej poprzez ścisłą kontrolę etapów cyklu wirusa na każdym z poziomów jego oddziaływania na komórki gospodarza.

Wiadomo jednak, że wiele koronawirusów, w tym SARS-CoV-2, hamuje odpowiedzi IFN typu I i III w różnych etapach, od produkcji cytokin po sygnalizację receptora. Ponadto, rozregulowane odpowiedzi IFN są ściśle związane z immunopatogenezą infekcji ludzkimi koronawirusami. Ludzkie niskopatognne koronawirusy, takie jak HCoV-229E, indukują wysoki poziom ekspresji IFN typu I, podczas gdy bardziej patogenne i potencjalnie śmiertelne koronawirusy SARS-CoV, SARS-CoV-2 i MERS-CoV osłabiają odpowiedź IFN typu I. Od czasu wybuchu pierwszej epidemii SARS w 2002 roku wiele badań wykazało, że SARS-CoV i MERS-CoV wykorzystują różne mechanizmy, aby uniknąć odpowiedzi immunologicznej za pośrednictwem IFN typu I [62]. Udowodniono, że jednym z głównych czynników jaki odgrywa kluczową role w ciężkich przebiegach COVID-19 może być receptor TLR3 i jego mutacje. Zaobserwowano, że więcej infekcji in vitro SARS-CoV-2 wystąpiło w komórkach od pacjentów z mutacją alleli dla TLR3, niż w komórkach od osób zdrowych [63]. Dodanie egzogennego IFN-β w znacznym stopniu usunęło tę różnicę w skuteczności infekcji SARS-CoV-2, co sugeruje, że IFN-β, który jest wytwarzany po wykryciu SARS-CoV-2 za pośrednictwem TLR3, hamuje rozprzestrzenianie się wirusa [64].

Nadekspresja białka Nsp1 SARS-CoV hamuje indukowaną wirusem dimeryzację IRF3 i aktywację promotora IFN-β [65]. Dodatkowo, białka Nsp1 wirusa SARS-CoV i SARS-CoV-2 oddziałują z podjednostką rybosomalną 40S i prawie całkowicie wyłączają translację białek gospodarza, w tym IFN-β, co sugeruje, że Nsp1 może hamować odpowiedź IFN na podstawie więcej niż jednego mechanizmu [66]. Krio-elektronowa analiza mikroskopowa wykazała, że C-końcowe helisy SARS-CoV-2 Nsp1 wiążą i blokują drogę wejścia dla mRNA do rybosomów tym samym hamując tę reakcję. Ponadto, białko Nsp1 skutecznie zapobiega indukowanej przez wirusa ekspresji IFN typu I i typu III, a także ekspresji ISG stymulowanej przez IFN-β [67].

Innym ważnym mechanizmem pozostaje hamowanie mechanizmów zależnych od indukcji interferonami, takich jak OAS-1 i PKR. Syntetaza oligoadenylanowa-1 (OAS-1, ang. 2'-5'-oligoadenylate syntetase 1) jest jedną z głównych ISG o działaniu silnie przeciwwirusowym. OAS-1 po związaniu wirusowego dsRNA prowadzi do homodimeryzacji i aktywacji RNazy L, która w stanie nieaktywnym ulega konstytutywnej ekspresji w komórkach gospodarza [68]. Aktywowana RNaza L rozszczepia ssRNA gospodarza i wirusa, prowadząc do zatrzymania translacji i późniejszej śmierci komórki oraz

zapobiega replikacji i rozprzestrzenianiu się wirusa. Udowodniono, że niestrukturalne białko 4b MERS-CoV nie tylko wykazuje się zdolnością do hamowania indukowanej wirusem ekspresji IFN typu I i III, ale także rozszczepia enzym poprzez swoją aktywność fosfodiesterazy, antagonizując w ten sposób przeciwwirusowe działanie tego mechanizmu [69].

7. Podsumowanie

Koronawirusy powodujące zarówno łagodne infekcje, jak i zespoły ostrej ciężkiej niewydolności oddechowej wywołujące chorobę koronawirusową 2019 (COVID-19), rozprzestrzeniają się na całym świecie w charakterze nagle wybuchających epidemii. Zakażenie koronawirusami skutkuje szerokim spektrum objawów klinicznych, od bezobjawowej lub łagodnej choroby aż do ciężkich zapaleń płuc powodujących śmierć. Pomimo, iż wskaźnik śmiertelności COVID-19 jest niższy niż w przypadku poprzednich epidemii (SARS i MERS), jest on znacznie wyższy niż w przypadku chorób sezonowych, takich jak grypa. Lepsze zrozumienie wrodzonej odpowiedzi immunologicznej przeciwko ludzkim koronawirusom oraz tego, na podstawie jakich mechanizmów unikają uniwersalnych sposobów na ich detekcję oraz zwalczanie jest niezbędne do opracowania skutecznych strategii terapeutycznych. Pomimo intensywnych badań w trakcie ostatnich lat pandemii COVID-19 wciąż wiele z tych mechanizmów pozostaje nieznanych. W związku z powyższym, monitorowanie oraz analiza sekwencji genomu koronawirusów jest niezbędna do zrozumienia ich ewolucji genetycznej oraz wpływu na odpowiedź odpornościową.

Bibliografia:

1. Grellet, E., L'Hôte, I., Goulet, A., & Imbert, I. (2022). Replication of the coronavirus genome: A paradox among positive-strand RNA viruses. Journal of Biological Chemistry, 298(5), 101923. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101923
2 Zheng, J., Miao, J., Guo, R., Guo, J., Fan, Z., Kong, X., Gao, R., & Yang, L. (2022). Mechanism of COVID-19 Causing ARDS: Exploring the Possibility of Preventing and Treating SARS-CoV-2. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 12. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.931061
3 Pustake, M., Tambolkar, I., Giri, P., & Gandhi, C. (2022). SARS, MERS and COVID-19: An overview and comparison of clinical, laboratory and radiological features. Journal of Family Medicine and Primary Care, 11(1), 10. https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_839_21
4 Rajat Goyal1, 2, Rupesh K. Gautam3*, Hitesh Chopra4, Ankit Kumar Dubey5, Rajeev K. Singla6, 7, Rehab A. Rayan8, & Mohammad Amjad Kamal6, 9, 10, 11. (2022). Comparative highlights on MERS-CoV, SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, and NEO-CoV. EXCLI Journal.
5 Sebastián-Martín, A., Sánchez, B. G., Mora-Rodríguez, J. M., Bort, A., & Díaz-Laviada, I. (2022). Role of Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP4) on COVID-19 Physiopathology. Biomedicines, 10(8), 2026. https://doi.org/10.3390/biomedicines10082026
6 Savitha, M. N., Suvilesh, K. N., Siddesha, J. M., Milan Gowda, M. D., Choudhury, M., Velmurugan, D., Umashankar, M., & Vishwanath, B. S. (2020). Combinatorial inhibition of Angiotensin converting enzyme, Neutral endopeptidase and Aminopeptidase N by N-methylated peptides alleviates blood pressure and fibrosis in rat model of dexamethasone-induced hypertension. Peptides, 123, 170180. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.170180
7 Brant, A. C., Tian, W., Majerciak, V., Yang, W., & Zheng, Z.-M. (2021a). SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. Cell & Bioscience, 11(1), 136. https://doi.org/10.1186/s13578-021-00643-z
8 Li, J.-Y., Zhou, Z.-J., Wang, Q., He, Q.-N., Zhao, M.-Y., Qiu, Y., & Ge, X.-Y. (2021). Innate Immunity Evasion Strategies of Highly Pathogenic Coronaviruses: SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2. Frontiers in Microbiology, 12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.770656
9 Brant, A. C., Tian, W., Majerciak, V., Yang, W., & Zheng, Z.-M. (2021b). SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. Cell & Bioscience, 11(1), 136. https://doi.org/10.1186/s13578-021-00643-z
10 Rashid, F., Xie, Z., Suleman, M., Shah, A., Khan, S., & Luo, S. (2022a). Roles and functions of SARS-CoV-2 proteins in host immune evasion. Frontiers in Immunology, 13. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.940756
11 Gulbas, I., Gajewski, A., Gawrysiak, M., Szewczyk, R., Likońska, A., Michlewska, S., Kowalski, M. L., & Chałubiński, M. (2022). IL - 33 prevents the enhancement of AP-N, DPP4, and ACE2 expression induced by rhinovirus HRV16 in the human lung endothelium—potential implications for coronaviral airway infections. Allergy, 77(5), 1610–1613. https://doi.org/10.1111/all.15251
12 Montazersaheb, S., Hosseiniyan Khatibi, S. M., Hejazi, M. S., Tarhriz, V., Farjami, A., Ghasemian Sorbeni, F., Farahzadi, R., & Ghasemnejad, T. (2022). COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. Virology Journal, 19(1), 92. https://doi.org/10.1186/s12985-022-01814-1
13 Chałubiński, M., Gajewski, A., & Kowalski, M. L. (2020). The relationship between human coronaviruses, asthma and allergy—An unresolved dilemma. Clinical & Experimental Allergy, 50(10), 1122–1126. https://doi.org/10.1111/cea.13718
14 Hojyo, S., Uchida, M., Tanaka, K., Hasebe, R., Tanaka, Y., Murakami, M., & Hirano, T. (2020). How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. Inflammation and Regeneration, 40(1), 37. https://doi.org/10.1186/s41232-020-00146-3
15 Coperchini, F., Chiovato, L., Croce, L., Magri, F., & Rotondi, M. (2020). The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. Cytokine & Growth Factor Reviews, 53, 25–32. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.05.003
16 Carty, M., Guy, C., & Bowie, A. G. (2021). Detection of Viral Infections by Innate Immunity. Biochemical Pharmacology, 183, 114316. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114316
17 Hosseini, A., Hashemi, V., Shomali, N., Asghari, F., Gharibi, T., Akbari, M., Gholizadeh, S., & Jafari, A. (2020). Innate and adaptive immune responses against coronavirus. Biomedicine & Pharmacotherapy, 132, 110859. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110859
18 Kim, Y.-M., & Shin, E.-C. (2021). Type I and III interferon responses in SARS-CoV-2 infection. Experimental & Molecular Medicine, 53(5), 750–760. https://doi.org/10.1038/s12276-021-00592-0
19 Aluri, J., Cooper, M. A., & Schuettpelz, L. G. (2021). Toll-Like Receptor Signaling in the Establishment and Function of the Immune System. Cells, 10(6), 1374. https://doi.org/10.3390/cells10061374
20 Bortolotti, D., Gentili, V., Rizzo, S., Schiuma, G., Beltrami, S., Strazzabosco, G., Fernandez, M., Caccuri, F., Caruso, A., & Rizzo, R. (2021). TLR3 and TLR7 RNA Sensor Activation during SARS-CoV-2 Infection. Microorganisms, 9(9), 1820. https://doi.org/10.3390/microorganisms9091820
21 Kehrer, T., García-Sastre, A., & Miorin, L. (2021). Control of Innate Immune Activation by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 and Other Coronaviruses. Journal of Interferon & Cytokine Research, 41(6), 205–219. https://doi.org/10.1089/jir.2021.0060
22 Park, A., & Iwasaki, A. (2020a). Type I and Type III Interferons – Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. Cell Host & Microbe, 27(6), 870–878
23 Rehwinkel, J., & Gack, M. U. (2020a). RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. Nature Reviews Immunology, 20(9), 537–551. https://doi.org/10.1038/s41577-020-0288-3
24 Rehwinkel, J., & Gack, M. U. (2020b). RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. Nature Reviews Immunology, 20(9), 537–551. https://doi.org/10.1038/s41577-020-0288-3
25 Jiang, F., Ramanathan, A., Miller, M. T., Tang, G.-Q., Gale, M., Patel, S. S., & Marcotrigiano, J. (2011). Structural basis of RNA recognition and activation by

innate immune receptor RIG-I. Nature, 479(7373), 423–427. https://doi.org/10.1038/nature10537
26 Brisse, M., & Ly, H. (2019). Comparative Structure and Function Analysis of the RIG-I-Like Receptors: RIG-I and MDA5. Frontiers in Immunology, 10. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01586
27 Doamekpor, S. K., Sharma, S., Kiledjian, M., & Tong, L. (2022). Recent insights into noncanonical 5′ capping and decapping of RNA. Journal of Biological Chemistry, 298(8), 102171. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102171
28 Khoshnevis, S., Dreggors-Walker, R. E., Marchand, V., Motorin, Y., & Ghalei, H. (2022). Ribosomal RNA 2′- O -methylations regulate translation by impacting ribosome dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences, 119(12). https://doi.org/10.1073/pnas.2117334119
29 Dias Junior, A. G., Sampaio, N. G., & Rehwinkel, J. (2019). A Balancing Act: MDA5 in Antiviral Immunity and Autoinflammation. Trends in Microbiology, 27(1), 75–85. https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.08.007
30 Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 23(1), 3–20. https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x
31 Condé, L., Allatif, O., Ohlmann, T., & de Breyne, S. (2022). Translation of SARS-CoV-2 gRNA Is Extremely Efficient and Competitive despite a High Degree of Secondary Structures and the Presence of an uORF. Viruses, 14(7), 1505. https://doi.org/10.3390/v14071505
32 Eriani, G., & Martin, F. (2022). Viral and cellular translation during SARS - CoV - 2 infection. FEBS Open Bio, 12(9), 1584 – 1601. https://doi.org/10.1002/2211-5463.13413
33 Yadav, R., Chaudhary, J. K., Jain, N., Chaudhary, P. K., Khanra, S., Dhamija, P., Sharma, A., Kumar, A., & Handu, S. (2021). Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. Cells, 10(4), 821. https://doi.org/10.3390/cells10040821
34 Walker, A. P., Fan, H., Keown, J. R., Knight, M. L., Grimes, J. M., & Fodor, E. (2021). The SARS-CoV-2 RNA polymerase is a viral RNA capping enzyme. Nucleic Acids Research, 49(22), 13019–13030. https://doi.org/10.1093/nar/gkab1160
35 Lai, M. M. C. (2005). RNA Replication without RNA-Dependent RNA Polymerase: Surprises from Hepatitis Delta Virus. Journal of Virology, 79(13), 7951–7958.
36 Deng, X., & Baker, S. C. (2018). An “Old” protein with a new story: Coronavirus endoribonuclease is important for evading host antiviral defenses. Virology, 517, 157–163. https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.024
37 Hackbart, M., Deng, X., & Baker, S. C. (2020b). Coronavirus endoribonuclease targets viral polyuridine sequences to evade activating host sensors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 117(14), 8094–8103. https://doi.org/10.1073/pnas.1921485117
38 Deng, X., Hackbart, M., Mettelman, R. C., O’Brien, A., Mielech, A. M., Yi, G., Kao, C. C., & Baker, S. C. (2017). Coronavirus nonstructural protein 15 mediates evasion of dsRNA sensors and limits apoptosis in macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114(21). https://doi.org/10.1073/pnas.1618310114
39 Kindler, E., Gil-Cruz, C., Spanier, J., Li, Y., Wilhelm, J., Rabouw, H. H., Züst, R., Hwang, M., V’kovski, P., Stalder, H., Marti, S., Habjan, M., Cervantes-Barragan, L., Elliot, R., Karl, N., Gaughan, C., van Kuppeveld, F. J. M., Silverman, R. H., Keller, M., Thiel, V. (2017). Early endonuclease-mediated evasion of RNA sensing ensures efficient coronavirus replication. PLOS Pathogens, 13(2), e1006195. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006195
40 Bhardwaj, K., Sun, J., Holzenburg, A., Guarino, L. A., & Kao, C. C. (2006). RNA Recognition and Cleavage by the SARS Coronavirus Endoribonuclease. Journal of Molecular Biology, 361(2), 243–256. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.021
41 Roingeard, P., Eymieux, S., Burlaud-Gaillard, J., Hourioux, C., Patient, R., & Blanchard, E. (2022). The double-membrane vesicle (DMV): a virus-induced organelle dedicated to the replication of SARS-CoV-2 and other positive-sense single-stranded RNA viruses. Cellular and Molecular Life Sciences, 79(8), 425. https://doi.org/10.1007/s00018-022-04469-x
42 Angelini, M. M., Akhlaghpour, M., Neuman, B. W., & Buchmeier, M. J. (2013). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nonstructural Proteins 3, 4, and 6 Induce Double-Membrane Vesicles. MBio, 4(4). https://doi.org/10.1128/mBio.00524-13
43 Kasuga, Y., Zhu, B., Jang, K.-J., & Yoo, J.-S. (2021). Innate immune sensing of coronavirus and viral evasion strategies. Experimental & Molecular Medicine, 53(5), 723–736. https://doi.org/10.1038/s12276-021-00602-1
44 Ricciardi, S., Guarino, A. M., Giaquinto, L., Polishchuk, E. V., Santoro, M., Di Tullio, G., Wilson, C., Panariello, F., Soares, V. C., Dias, S. S. G., Santos, J. C., Souza, T. M. L., Fusco, G., Viscardi, M., Brandi, S., Bozza, P. T., Polishchuk, R. S., Venditti, R., & De Matteis, M. A. (2022). The role of NSP6 in the biogenesis of the SARS-CoV-2 replication organelle. Nature, 606(7915), 761–768. https://doi.org/10.1038/s41586-022-04835-6
45 Eymieux, S., Rouillé, Y., Terrier, O., Seron, K., Blanchard, E., Rosa-Calatrava, M., Dubuisson, J., Belouzard, S., & Roingeard, P. (2021). Ultrastructural modifications induced by SARS-CoV-2 in Vero cells: a kinetic analysis of viral factory formation, viral particle morphogenesis and virion release. Cellular and Molecular Life Sciences, 78(7), 3565–3576. https://doi.org/10.1007/s00018-020-03745-y
46 Yan, B., Chu, H., Yang, D., Sze, K.-H., Lai, P.-M., Yuan, S., Shuai, H., Wang, Y., Kao, R. Y.-T., Chan, J. F.-W., & Yuen, K.-Y. (2019). Characterization of the Lipidomic Profile of Human Coronavirus-Infected Cells: Implications for Lipid Metabolism Remodeling upon Coronavirus Replication. Viruses, 11(1), 73. https://doi.org/10.3390/v11010073
47 Roingeard, P., Eymieux, S., Burlaud - Gaillard, J., Hourioux, C., Patient, R., & Blanchard, E. (2022). The double - membrane vesicle (DMV): a virus - induced organelle dedicated to the replication of SARS-CoV-2 and other positive - sense single - stranded RNA viruses. Cellular and Molecular Life Sciences, 79, 425.
48 Walsh, D., & Mohr, I. (2011). Viral subversion of the host protein synthesis machinery. Nature Reviews Microbiology, 9(12), 860–875. https://doi.org/10.1038/nrmicro2655

49 Glauninger, H., Wong Hickernell, C. J., Bard, J. A. M., & Drummond, D. A. (2022). Stressful steps: Progress and challenges in understanding stress-induced mRNA condensation and accumulation in stress granules. Molecular Cell, 82(14), 2544–2556. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.05.014

50 Kikkert, M. (2020). Innate Immune Evasion by Human Respiratory RNA Viruses. Journal of Innate Immunity, 12(1), 4–20. https://doi.org/10.1159/000503030

51 Kang, W., Wang, Y., Yang, W., Zhang, J., Zheng, H., & Li, D. (2021). Research Progress on the Structure and Function of G3BP. Frontiers in Immunology, 12.

52 Sánchez-Aparicio, M. T., Ayllón, J., Leo-Macias, A., Wolff, T., & García-Sastre, A. (2017). Subcellular Localizations of RIG-I, TRIM25, and MAVS Complexes. Journal of Virology, 91(2). https://doi.org/10.1128/JVI.01155-16

53 Zheng, Y., Deng, J., Han, L. et al. SARS-CoV-2 NSP5 and N protein counteract the RIG-I signaling pathway by suppressing the formation of stress granules. Sig Transduct Target Ther 7, 22 (2022). https://doi.org/10.1038/s41392-022-00878-3

54 Rabouw, H. H., Langereis, M. A., Knaap, R. C. M., Dalebout, T. J., Canton, J., Sola, I., Enjuanes, L., Bredenbeek, P. J., Kikkert, M., de Groot, R. J., & van Kuppeveld, F. J. M. (2016). Middle East Respiratory Coronavirus Accessory Protein 4a Inhibits PKR-Mediated Antiviral Stress Responses. PLOS Pathogens, 12(10), e1005982. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005982

55 Reineke, L. C., & Lloyd, R. E. (2015). The Stress Granule Protein G3BP1 Recruits Protein Kinase R To Promote Multiple Innate Immune Antiviral Responses. Journal of Virology, 89(5), 2575–2589. https://doi.org/10.1128/JVI.02791-14

56 Liu, H., Bai, Y., Zhang, X., Gao, T., Liu, Y., Li, E., Wang, X., Cao, Z., Zhu, L., Dong, Q., Hu, Y., Wang, G., Song, C., Niu, X., Zheng, T., Wang, D., Liu, Z., Jin, Y., Li, P., … Liu, X. (2022). SARS-CoV-2 N Protein Antagonizes Stress Granule Assembly and IFN Production by Interacting with G3BPs to Facilitate Viral Replication. American Society for Microbiology, 96(12).

57 Schoggins, J. W., & Rice, C. M. (2011). Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. Current Opinion in Virology, 1(6), 519–525. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.008

58 Kotenko, S. V., Rivera, A., Parker, D., & Durbin, J. E. (2019). Type III IFNs: Beyond antiviral protection. Seminars in Immunology, 43, 101303. https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101303

59 Schoggins, J. W. (2019). Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? Annual Review of Virology, 6(1), 567–584. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015756

60 Schindler, C., Levy, D. E., & Decker, T. (2007). JAK-STAT Signaling: From Interferons to Cytokines. Journal of Biological Chemistry, 282(28), 20059–20063. https://doi.org/10.1074/jbc.R700016200

61 Rashid, F., Xie, Z., Suleman, M., Shah, A., Khan, S., & Luo, S. (2022b). Roles and functions of SARS-CoV-2 proteins in host immune evasion. Frontiers in Immunology, 13. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.940756

62 Park, A., & Iwasaki, A. (2020b). Type I and Type III Interferons – Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. Cell Host & Microbe, 27(6), 870–878. https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.008

63 Zhang, Q., Bastard, P., Liu, Z., Le Pen, J., Moncada-Velez, M., Chen, J., Ogishi, M., Sabli, I. K. D., Hodeib, S., Korol, C., Rosain, J., Bilguvar, K., Ye, J., Bolze, A., Bigio, B., Yang, R., Arias, A. A., Zhou, Q., Zhang, Y., … Zhang, X. (2020). Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. Science, 370(6515). https://doi.org/10.1126/science.abd4570

64 Russell, B., Moss, C., George, G., Santaolalla, A., Cope, A., Papa, S., & Van Hemelrijck, M. (2020). Associations between immune-suppressive and stimulating drugs and novel COVID-19—a systematic review of current evidence. Ecancermedicalscience, 14. https://doi.org/10.3332/ecancer.2020.1022

65 Shemesh, M., Aktepe, T. E., Deerain, J. M., McAuley, J. L., Audsley, M. D., David, C. T., Purcell, D. F. J., Urin, V., Hartmann, R., Moseley, G. W., Mackenzie, J. M., Schreiber, G., & Harari, D. (2021). SARS-CoV-2 suppresses IFNβ production mediated by NSP1, 5, 6, 15, ORF6 and ORF7b but does not suppress the effects of added interferon. PLOS Pathogens, 17(8), e1009800. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009800

66 Yuan, S., Balaji, S., Lomakin, I. B., & Xiong, Y. (2021). Coronavirus Nsp1: Immune Response Suppression and Protein Expression Inhibition. Frontiers in Microbiology, 12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.752214

67 Thoms, M., Buschauer, R., Ameismeier, M., Koepke, L., Denk, T., Hirschenberger, M., Kratzat, H., Hayn, M., Mackens-Kiani, T., Cheng, J., Straub, J. H., Stürzel, C. M., Fröhlich, T., Berninghausen, O., Becker, T., Kirchhoff, F., Sparrer, K. M. J., & Beckmann, R. (2020). Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. Science, 369(6508), 1249–1255. https://doi.org/10.1126/science.abc8665

68 Lee, W.-B., Choi, W. Y., Lee, D.-H., Shim, H., Kim-Ha, J., & Kim, Y.-J. (2019). OAS1 and OAS3 negatively regulate the expression of chemokines and interferon-responsive genes in human macrophages. BMB Reports, 52(2), 133–138. https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.2.129

69 Canton, J., Fehr, A. R., Fernandez-Delgado, R., Gutierrez-Alvarez, F. J., Sanchez-Aparicio, M. T., García-Sastre, A., Perlman, S., Enjuanes, L., & Sola, I. (2018). MERS-CoV 4b protein interferes with the NF-κB-dependent innate immune response during infection. PLOS Pathogens, 14(1), e1006838. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006838