



Kandidaatintutkielma

S-proteiinin variaatioiden vaikutus SARS-CoV-2:n infektiivisyyteen

Konsta Saarijärvi

Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet	3
1. Johdanto	6
2. Koronavirukset	7
3. SARS-CoV-2:n rakenne	8
3.1. S-proteiini	10
3.1.1. ACE2.....	15
4. SARS-CoV-2 variaatiot ja mutaatiot S-proteiinissa.....	17
4.1. B.1.1.7.....	19
4.2. B.1.351.....	20
4.3. P.1 (B.1.1.28.1).....	21
4.4. B.1.617.2.....	21
5. Yhteenveto	23
6. Kirjallisuusviitteet	24

Käytetyt lyhenteet

+ssRNA	Positiivisjuosteinen ribonukleiinihappo, eng. positive-sense single-stranded ribonucleic acid
aa	Aminohappo, eng. amino acid
ACE2	Angiotensiinikonvertaasi 2, eng. angiotensin-converting enzyme 2
BatCoV RaTG13	Eng. bat coronavirus, Rhinolophus affinis, Tongguan, 2013
COVID-19	Koronavirustauti, eng. coronavirus disease 2019
CT	Syttoplasmisen hännän domeeni, eng. cytoplasmic tail domain
FP	Fuusiopeptidi, eng. fusion peptide
HR-1	Heptad toisto domeeni 1, eng. heptad repeat domain
HR-2	Heptad toisto domeeni 2, eng. heptad repeat domain
IFP	Sisäinen fuusiopepti, eng. internal fusion peptide
kpl	Kappale
Kryo-EM	Kryoelektronimikroskopia
mAb	Monoklonaalinen vasta-aine, eng. monoclonal antibodies
mACE2	Kalvo angiotensiinikonvertaasi 2, eng. membrane angiotensin converting enzyme 2
MERS-CoV	Lähi-idän hengitysoireyhtymä-koronavirus, eng. middle east respiratory syndrome coronavirus
Nsp1-16	Ei-rakenteellinen proteiini 1-16, eng. non-structural protein 1-16
NTD	N-terminaalin domeeni, eng. N-terminal domain
ORF 1-17	Avoin lukukehys 1-17, eng. open reading frame 1-17
RAAS	Reniini-angiotensiini-aldosteronijärjestelmä, eng. renin-angiotensin-aldosterone system
RBD	Reseptoriin sitoutuva domeeni, eng. Receptor binding domain

RBM	Reseptoriin sitoutuva motiivi, eng reseptor binding motif
RNA	Ribonukleiinihappo, eng. ribonucleic acid
sACE2	Liukeneva angiotensiinikonvertaasi 2, eng. soluble angiotensin converting enzyme 2
SARS-2-E	Vakava akuutti hengitystieoireyhtymä-koronavirus 2:sen vaippaproteiini, eng. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 envelope protein
SARS-2-M	Vakava akuutti hengitystieoireyhtymä-koronavirus 2:sen kalvoproteiini, eng. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 membrane protein
SARS-2-N	Vakava akuutti hengitystieoireyhtymä-koronavirus 2:sen nukleokapsidiproteiini, eng. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 nucleocapsid protein
SARS-2-S	Vakava akuutti hengitystieoireyhtymä-koronavirus 2:sen piikkiproteiini, eng. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 spike protein
SARS-CoV	Vakava akuutti hengitystieoireyhtymä-koronavirus, eng.severe acute respiratory syndrome coronavirus
SARS-CoV-2	Vakava akuutti hengitystieoireyhtymä-koronavirus 2, eng. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SARS-S	Vakava akuutti hengitystieoireyhtymä-koronavirusen piikkiproteiini, eng. severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein
SP	Signaalipeptidi
TM	Trans-membraani domeeni, eng. trans-membrain domain
TMPRSS2	Trans-membraaninen seriinin proteaasi 2, eng. transmembrane serine protease 2
UK	Yhdistyneet kuningaskunnat, eng. United Kingdoms
VOC	Huolestuttava variantti eng. variant of concern

VOI Kiinnostava variantti, eng. variant of interest

WHO Maailman terveysjärjestö, eng. World Health Organisation

1. Johdanto

Vuoden 2019 loppupuolella Kiinan Wuhanista leviämään lähtenyt SARS-CoV-2, joka aiheuttaa ihmisissä COVID-19-hengitystieinfektioita, on yleistynyt ja muuttunut pandemiasta endeemiseksi virukseksi suurelle osalle maailmaa. Pandemian aikana alkuperäinen SARS-CoV-2-viruslinja eriytyi useiksi eri variaatioiksi, joista B.1.1.529-variantista, joka tunnetaan myös omikronvarianttina, eriytyneet alatyypit olivat vuoden 2023 alussa viruksen valtavariantteja (Anttila, 2023).

SARS-CoV-2:sta muodostuu jatkuvasti uusia variantteja, mutta vanhempienkin varianttien tarkastelu on silti tärkeää selvittääksemme, miten SARS-CoV-2 kehittyi ja optimoitui ihmisissä leviämiseen pandemian alkuvaiheessa. Tämä on tärkeää niin nykyisten, kuin tulevienkin varianttien ymmärtämistä varten, sekä ennustaaksemme miten muut tulevat zoonoosiset virukset voisivat kehittyä levittyään laajoihin ihmispopulaatioihin. Tässä tutkielmassa keskitytään SARS-CoV-2:n S-proteiinin rakenteeseen ja toimintaan, sekä siihen tulleisiin mutaatioihin neljässä COVID-19 pandemian alussa yleistyneestä viruslinjasta B.1.1.7, B.1.351, P.1 ja B.1.617.2, jotka WHO määritteli huolestuttaviksi SARS-CoV-2 varienteiksi (WHO, 2023).

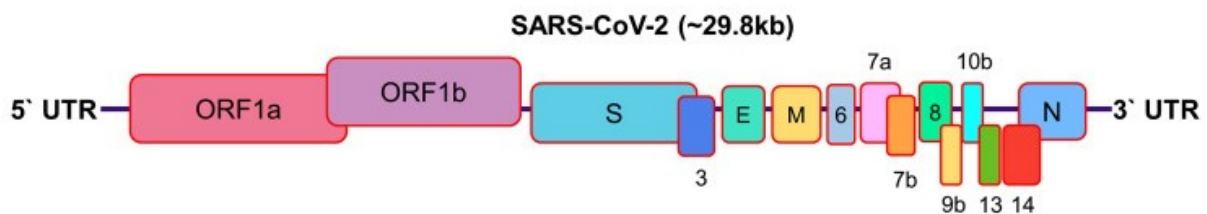
2. Koronavirukset

Koronavirukset ovat monipuolinen ryhmä vaipallisia, +ssRNA-genomisia viruksia, jotka tarttuvat monia eri lajeja ja aiheuttavat ihmisissä sekä lieviä, että vakavia hengitysteiden infektiota. Koronavirukset jaetaan neljään sukuun, joita ovat alfa-, beeta-, gamma- ja delta-koronavirukset. Näistä delta- ja gammakoronavirukset pääasiallisesti infektoivat lintuja, sekä joskus nisäkkäitä, kun taas alfa- ja beetakoronavirukset yleisesti infektoivat nisäkkäitä ja ovat ainoita koronaviruksia, joiden tiedetään tähän mennessä levinneen ihmisiin. Kaikki tähän mennessä ihmisiin levinneet koronavirukset omaavat zoonoottiset lähteet. SARS-CoV:n luonnollisena isäntänä toimivat hevosenkenkäyököt ja MERS-CoV:n isäntänä toimivat kamelit (Mishra & Tripathi, 2021).

Tähän mennessä on identifioitu seitsemän ihmisiä tartuttavaa koronaviruskantaa, joista neljä aiheuttaa lieviä hengityselimistön infektiota lapsille, vanhuksille ja immuunipuutteisille yksilöille. Näistä merkittävimpiä ovat erittäin virulentit viimeisen 20 vuoden aikana ihmisiin levinneet beta-koronavirus-kannat SARS-CoV (2002), MERS-CoV (2012) ja SARS-CoV-2 (2019), jotka voivat aiheuttaa myös voimakkaampia ja vakavampia infektiota. Tällä hetkellä näistä merkittävimpanä tarkemman seuraamisen kohteena on joulukuussa 2019 havaittu SARS-CoV-2, minkä aiheuttama COVID-19 infektio julistettiin pandemiaksi maaliskuussa 2020 sen ihmispopulaatioissa leviämisen tehokkuuden ja infektion oireiden vakavuuden vuoksi (Mishra & Tripathi, 2021).

3. SARS-CoV-2:n rakenne

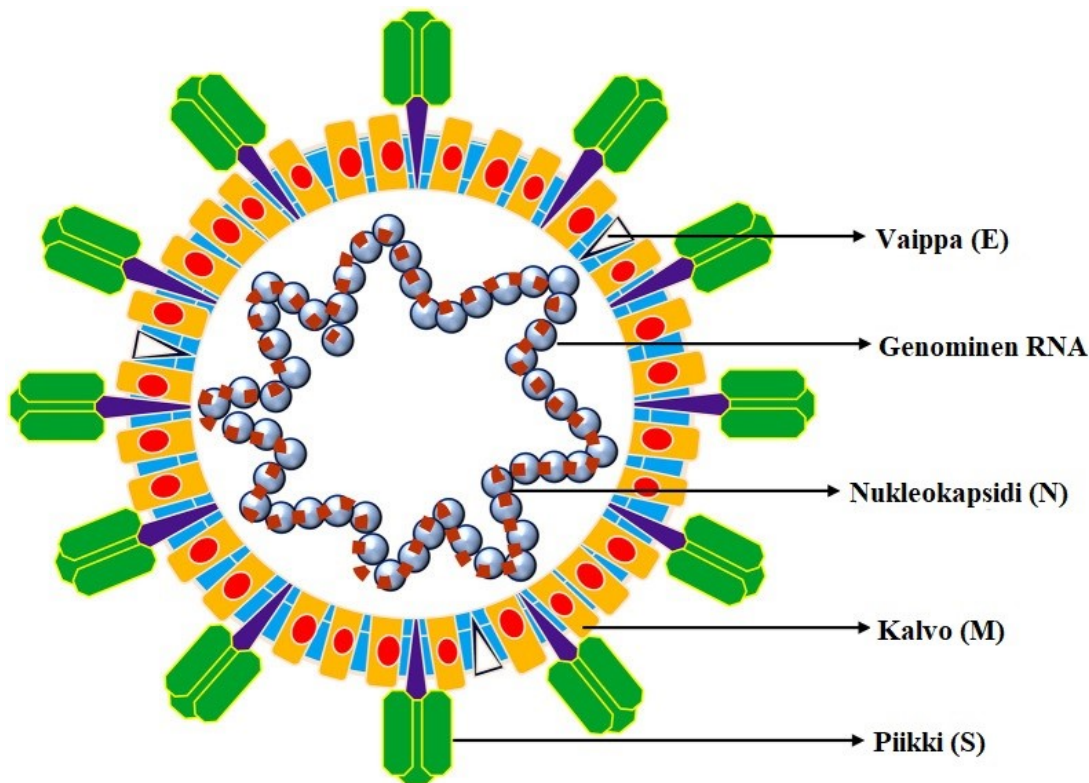
Rakenteeltaan SARS-CoV-2 on pallomainen vaipallinen virus, minkä genomi on segmentoimaton positiivinen yksijuosteinen RNA (+ssRNA), joka on ~29,9 kb pitkä ja omaa muihin koronaviruksiin verrattuna hyvin matalan GC pitoisuuden 38 % (Kadam et al., 2021). Genominen RNA sisältää 5'-cap ja 3'-poly-A häntä rakenteet, mitkä ovat tärkeitä RNA-RNA vuorovaikutuksille, viruksen s- ja isäntäsolun proteiinien sitoutumiselle RNA:han sekä niiden toiminnalle säätelyelementteinä (Mishra & Tripathi, 2021). Koronaviruksien genomien tiedetään muodostavan useita sekundaarirakenteita, mitkä toimivat säätelyelementteinä (Kadam et al., 2021).



Kuva 1. SARS-CoV-2 genomirakenteen kuvaus, mikä ei ole suhteessa. Kuvan lähde: Kirtipal et al. (2020). Kuvaa on leikattu.

Pisin SARS-CoV-2:n genomirakenteista on ORF1a, mikä yhdessä ORF1b:n kanssa muodostaa ORF1ab:n, minkä pituus vie noin kaksi kolmasosaa viruksen koko genomista 5'-päästä lähtien. ORF1a ja ORF1b ovat osittain lomittain, ORF1b:n omalla erillisellä lukukehyksellä. ORF1ab tuottaa kahta pitkää polypeptidiä: pp1a ja pp1ab, joista virus proteaasien aktiivisuus tuottaa ei-rakenteellisia proteiineja Nsp1-16, mitkä omaavat monia rooleja viruksen elinsykliissä (Kadam et al., 2021).

ORF1ab:ta seuraa ryhmä lyhyempiä lukukehyksiä 3'-päähen asti, mitkä tuottavat neljää rakenneproteiinia: piikki (SARS-2-S), vaippa (SARS-2-E), kalvo (SARS-2-M) ja nukleokapsidi (SARS-2-N), sekä useita lisäproteiineja kuten: ORF3a, ORF7a, ORF8 ja ORF9b (Arya et al., 2021).



Kuva 2. Koronaviruksien yleinen rakenne. Kuvan lähde: Kirtipal et al. (2020). Kuvaa on muokattu.

M-proteiini on 222 aminohappoa pitkä tyypin III trans-membraani (Arya et al., 2021). Se omaa kolme trans-membraani domeenia, jättäen C-terminaalin virionin sisälle ja N-terminaalin ulkopuolelle. M-proteiini on SARS-CoV-2:n runsaiten tuotettu rakenneproteiini ja niitä on ympäri virionin vaippaa. M-proteiinin roolina on ylläpitää virionin muotoa, ja sillä on useiden proteiini-proteiini vuorovaikutusten seurauksena merkittävä rooli viruksen kokoonpanossa ja sisäisessä homeostaasissa. On havaittu, että M-proteiinit SARS-CoV:ssa, mitkä ovat hyvin samankaltaisia SARS-CoV-2:n M-proteiinien kanssa, voivat löytyä virionista kahdessa eri konformaatiossa, kompaktissa tai pitkänomaisessa. Kompakti konformaatio on usein liitetty matalaan S-proteiini tiheyteen viruksen pinnalla (Kadam et al., 2021).

E-proteiini on koronaviruksissa hyvin säilynyt (Kadam et al., 2021) 75 aminohappoa pitkä trans-membraani proteiini, mikä omaa kolme domeenia: N-terminaalin hydrofiilisen ekto-domeenin, hydrofobisen trans-membraani domeenin, sekä pitkän C-terminaalin hydrofiilisen endo-domeenin (Arya et al., 2021). Koronaviruksien E-proteiinit pystyvät oligomerisoitumaan ja täten muodostamaan pentameerisiä nippuja (Arya et al., 2021). E-proteiini niput toimivat viroporiineina, mitkä kykenevät selektiivisesti kuljettamaan ioneja, ja osallistuvat virus partikkelien kasaamisen ja poistumiseen solusta (Kadam et al., 2021).

SARS-2-S:t ovat 1273 aminohappoa pitkiä (Arya et al., 2021) homotrimeerisiä luokan 1 trans-membraani glykoproteiineja, joita kiertää 15–30 kappaletta vapaasti viruksen pinnalla (Kadam et al., 2021). Ne muodostuvat kahdesta alayksiköstä S1 ja S2. S1 alayksikön roolina on tunnistaa ja sitoutua angiotensiinikonvertaasi 2:een (ACE2), minkä jälkeen S2 aloittaa virus- ja isäntäsolujen solukalvojen fuusion (Arya et al., 2021).

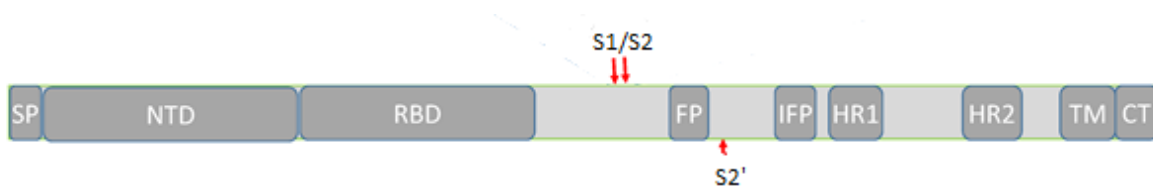
N-proteiini pakkaa virus RNA:n helikaaliseksi ribonukleokapsidiksi ja vuorovaikuttaa muiden rakenneproteiinien kanssa virionin kokoamisen aikana, johtaen genomien pakkautumiseen virioniin (Arya et al., 2021). N-proteiinin koko vaihtelee 43 ja 50 kDa välillä.

Ribonukleokapsidin muodostamisen ja ylläpidon lisäksi N-proteiini omaa rooleja viruksen RNA-genomin replikaatiossa ja transkriptiossa. Lisäksi ne säätelevät isäntäsolun solusykliä, mukaan lukien apoptoosia, mahdollistaen viruksen monistumisen ja leviämisen (Kadam et al., 2021).

3.1. S-proteiini

SARS-2-S on 1273 aa pitkä homotrimeeri (Kuva 4.). S-proteiini, ja varsinkin sen reseptoria-sitova domeeni (RBD), vaikuttaa merkittävästi SARS-CoV-2:en toimintaan, määrittäen mihin isäntäsoluihin se pääsee sisälle ja omaakin eniten variaatiota SARS-CoV-2 varianttien välillä verrattuna muihin virusproteiineihin. S-proteiini muodostuu kahdesta alayksiköstä S1 ja S2, mitkä eroavat toisistaan ennen kuin virus fuusioituu isäntäsolun solukalvoon (Walls et al., 2020). Alayksiköt eivät ole kovalenttisesti kiinni toisissaan, sillä SARS-2-S katkaistaan sen biosynteesin aikana, mutta ne pysyvät toisissaan kiinni ei-kovalenttisten vuorovaikutusten avulla kunnes kalvofuusio tapahtuu, jonka lopussa S1 irtoaa S2:sta (Jackson et al., 2022). Alayksikkö S1 toimii ACE2 reseptorin tunnistamisessa ja siihen sitoutumisessa ja sisältää seuraavat domeenit: signaalipeptidi, N-terminaalinen domeeni (NTD) ja reseptoria sitova domeenin (RBD). Alayksikkö S2 aiheuttaa viruksen ja isäntäsolun kalvojen fuusion ja sisältää seuraavat domeenit: fuusiopeptidit (FP), sisäiset fuusiopeptidit (IFP), heptad-toisto domeenit HR-1 ja HR-2, trans-membraani domeenin (TM) ja sytoplasmisen hännän domeenin (CT). S-proteiinin eri domeenien rajapinnoilla ei ole tunnistettu selviä rakenteellisia rajapintoja, minkä takia osalle domeeneista niiden alku- ja loppukohdat ovat vain karkeita arvioita (Denison et al., 2021). Domeenien arvioidut kohdat SARS-2-S proteiinissa ovat seuraavat N-terminaalista lähtien: SP (1-13), alayksikkö S1 (14-685) ja S2 (686-1273), NTD (14-305), RBD (319-541), FP (788-806), HR-1 (912-984), HR-2 (1163-1213), TM (1213-1237) ja SP (1237-1273)

(Huang et al., 2020).



Kuva 3. S-proteiinin domeenit. N-terminaali on kuvassa vasemmalla ja C-terminaali oikealla. Katkaisupaikat 1 ja 2 alayksikköjen S1 ja S2 välillä on kuvattu punaisilla nuolilla RBD- ja FP-domeenien välillä. Katkaisupaikka 3 on lähempänä RBD:tä ja 2 FP:tä. Punainen nuoli FP ja IFP domeenien välillä kuvaa katkaisupaikkaa 3. Kuvan lähde: Denison et al. (2021). Kuvaa on muokattu.

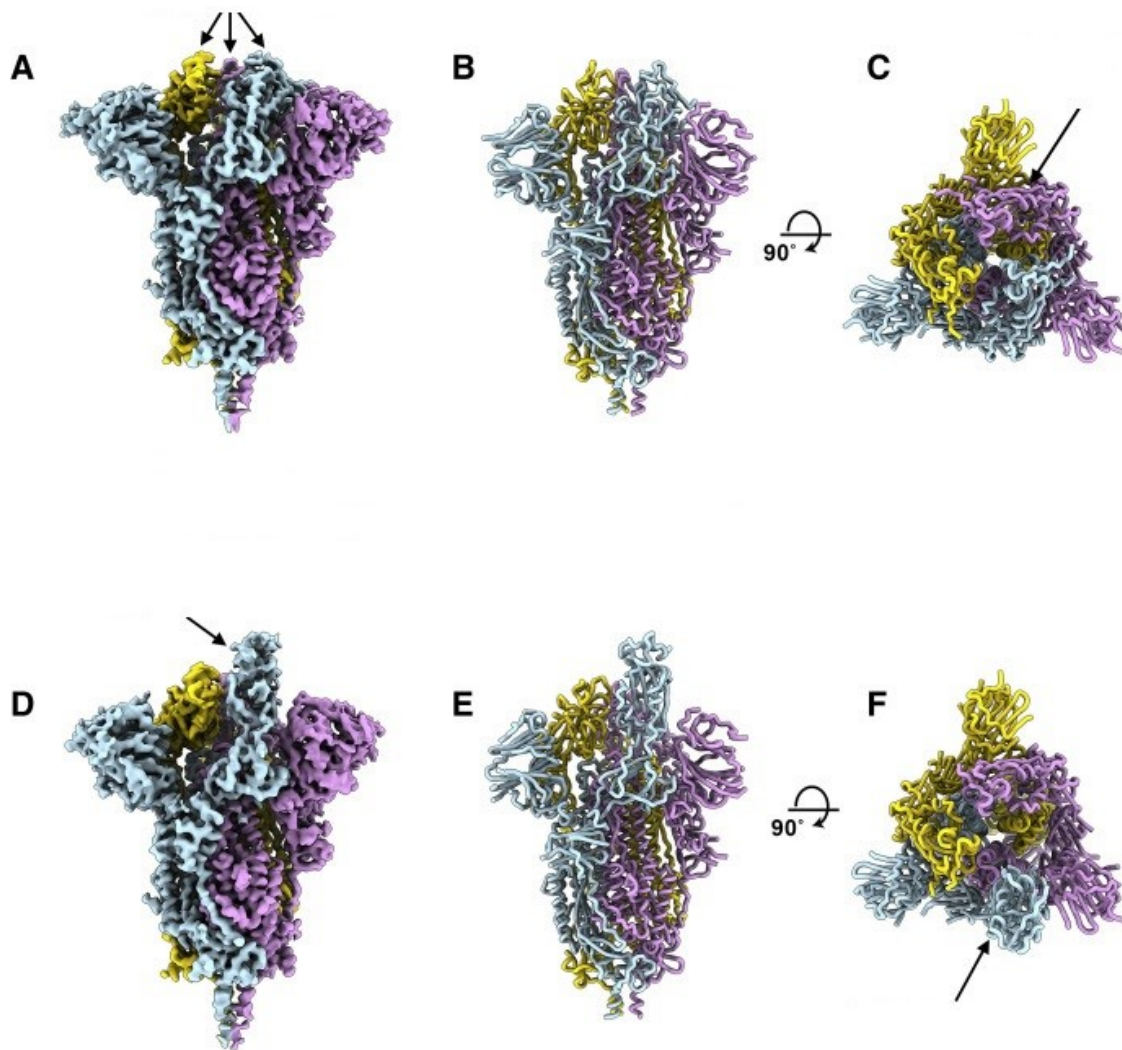
SARS-2-S omaa kolme katkaisupaikkaa. Kaksi katkaisupaikoista on hyvin lähellä toisiaan alayksikköjen S1 ja S2 välillä, kolmannen erottaessa alayksikkö S2:n FP- ja S2'-domeeneiksi. Ensimmäinen katkaisu SARS-2-S:ssa tapahtuu furiinin toimesta alayksikköjen S1 ja S2 välissä. Tätä leikkauskohtaa ei löydy SARS-S:stä tai sen läheisimmistä sukulaisista kuten lepakon RaTG13 ja muurahaiskäpyjen koronavirus-varianteista. Katkaisu tapahtuu todennäköisesti viruksen kasaamisen aikana. Tämä furiinin katalysoima proteolyttinen katkaisu omaa keskeisen roolin viruksen sisäänpääsyssä isäntäsoluihin, tehostaen varsinkin solusta-soluun leviämistä. Toisen alayksikköjen S1 ja S2 välissä olevan katkaisukohtan vaikutuksesta SARS-CoV-2:ssa ei ole tietoa, mutta se on hyvin säilynyt SARS-CoV-2-S:ssä, viitaten sen funktionaaliseen tärkeyteen. Katkaisu todennäköisesti tapahtuu endosomissa, missä sen katalysoi cathepsin L. Seuraava katkaisutapahtuma tapahtuu solujen ulkopuolella, missä TMPRSS2 katkaisee S2-alayksikön FP- ja S2'-domeeneiksi katkaisupaikalta 3, mikä aloittaa virus- ja isäntäsolujen kalvofuusion ja solusitkoksen muodostumisen. Katkaisukohtaa kutsutaan usein S2'-kohdaksi. TMPRSS2 on tarpeellinen SARS-CoV-2 infektiolle ja sitä on oltava kohdesolun solukalvolla infektion onnistumiseksi, mikä rajoittaa SARS-CoV-2:n potentiaalisia isäntäsoluja merkittävästi soluihin, jotka ekspressoivat TMPRSS2:sta. Eksogeenisesti lisätyn trypsiinin on havaittu voivan katkaista S2-proteiini S2'-kohdasta siten edistävän kalvofuusion todennäköisyyttä. Mikäli TMPRSS2:sta ei ole ympäristössä, niin SARS-CoV voi päästä isäntäsoluun myös endosytoosin kautta cathepsiini-järjestelmän avulla (Denison et al., 2021). Tällöin viruksen päästyä isäntäsolun endosomiin ACE2:n avulla, endosomin cathepsin L leikkaa S2'-kohdan aktivoiden kalvofuusion (Jackson et al., 2022).

Koronavirusten S-proteiinit ovat yleensä voimakkaasti glykosyloituja, omaten 22 N-glykosylointi paikkaa, joista 20 on säilyneitä SARS-S:stä. SARS-S ja SARS-2-S omaavat 76 % identiteetin aminohappo sekvenssistään ja molemmat tunnistavat ja sitoutuvat ihmisessä

ACE2:en (Walls et al., 2020). N-glykosylointi paikkojen modifiointi SARS-S:ssä muokkaa niin proteiinin laskostumista, kuin ilmentymistäkin, mutta glykosylaation ei ole havaittu olevan edellytys reseptoriin sitoutumiseen varten SARS-S:lle. SARS-2-S:stä on N-glykosylaation lisäksi löydetty O-glykosylaatiota (Denison et al., 2021).

ACE2 reseptorin tunnistamisesta ja siihen sitoutumisesta vastuussa oleva alayksikkö S1 omaa 13 aa pitkän signaalipeptidin (1–13) (SP), 292 aa pitkän NTD:n (14–305) ja 223 aa pitkän RBD:n (319–541). RBD on S-proteiinin ACE2 reseptoriin-sitoutuva motiivi ja omaa täten hyvin paljon variaatiota eri SARS-CoV-2 varianttien välillä (Denison et al., 2021).

RBD muodostuu kahdesta alayksiköstä, joista RBM tunnistaa ACE2:en. Toinen alayksikkö muodostuu α -helikseistä ja vastakkaisista viisisäikeisistä β -levyistä muodostaen domeenin rungon. SARS-2-S trimeerin päässä on kolme RBD:tä, jotka sijoittuvat trimeerin keskelle. Näillä on kaksi konformaatiota ”ylhäällä” ja ”alhaalla”. ”Ylhäällä”-konformaatioissa ollessa RBD:n mahdollista kiinnittyä reseptoriin, kun taas ”alhaalla” ollessaan se ei ole mahdollista. Trimeerille konformaatio, missä yksi RBD on ”ylhäällä” on konformationaalisesti vakaa muoto (Kuva 4.). ”Ylhäällä” oleva RBD kiinnittyy ACE2:een hydrofiilisten vuorovaikutuksien avulla 17 RBD:n ja 20 ACE2:n sivuketjun välillä (Jackson et al., 2022).



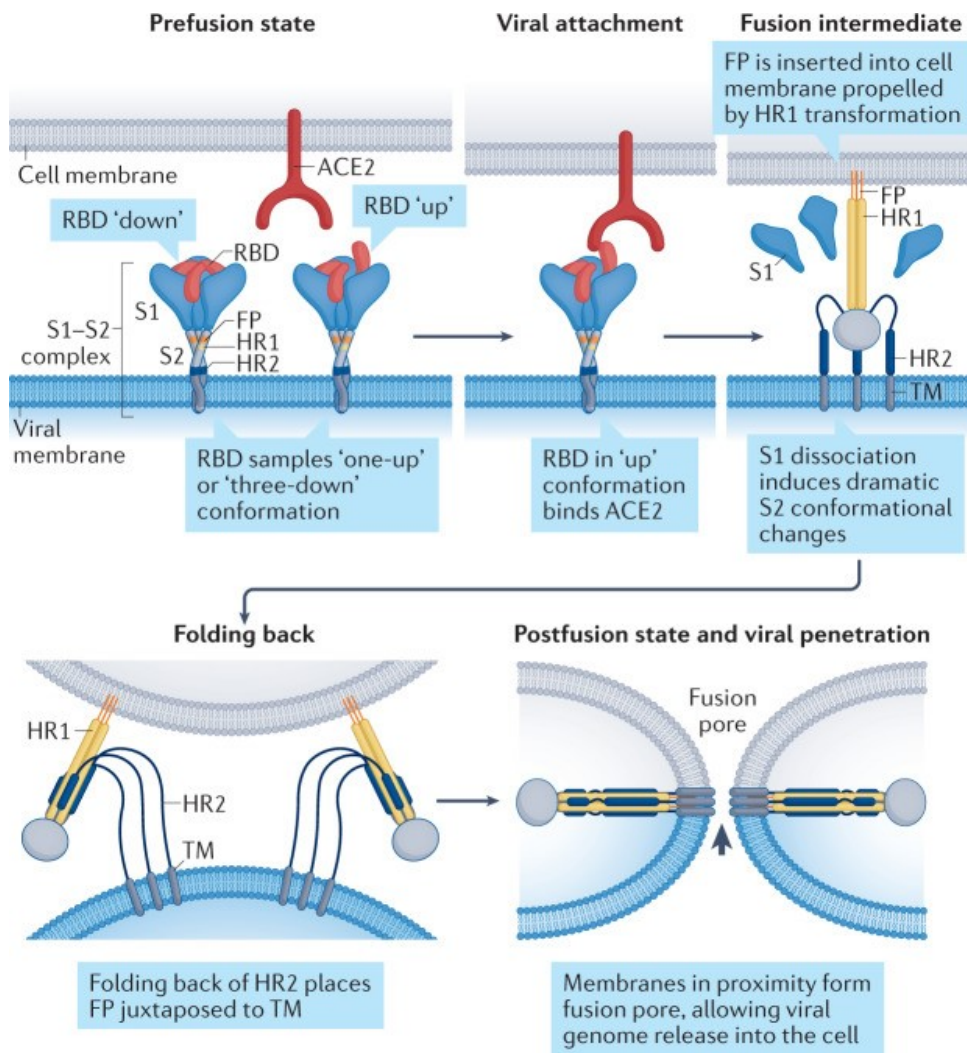
Kuva 4. Kryo-EM:llä kuvatut SARS-2-S trimeerin rakenteet. Kuvassa nuolilla osoitetaan RBD:stä ylösnousevaa domeenia. (A) on tarkentamaton Kryo-EM kuva ”alhaalla” SARS-2-S trimeeristä. (B, C) ovat tarkennettuja Kryo-EM kuvia ”alhaalla” SARS-2-S trimeeristä eri kulmista. (D) on tarkentamaton Kryo-EM kuva SARS-2-S trimeeristä, jossa yksi RBD on ”ylhäällä” tilassa. (E, F) ovat tarkennettuja Kryo-EM kuvia SARS-2-S trimeeristä, jossa yksi RBD on ”ylhäällä” tilassa eri kulmista. Kuvan lähde: Walls et al. (2020). Kuvaa on muokattu.

Kalvofuusion aloittava S2 alayksikkö sisältää fuusiopeptidin (FP) (788–806) tai IFP kun FP-domeeni on katkaistu pois, joka lävistää kohdesolun solukalvon ja ankkuroituu isäntäsolun sisäpuolelle. FP ja IFP domeenien väliset segmentit ovat säilyneempiä kuin ympäröivät domeenit ja ovat siten oletettavasti kriittisen tärkeitä kalvofuusiassa. TM (1213–1237) ja CT (1237–1273) domeenit ankkuroituvat S-proteiinin virukseen ja osallistuvat trimeerin rakenteen stabilisaatioon. Molempien ankkurien kiinnittyttyä, niiden välissä oleva S2`domeeni muuttaa konformaatiotaan, tuoden solukalvot lähemmäs toisiaan. Konformaatiomuutoksen

aloittavana signaalina toimii todennäköisesti TMPRSS2:n katalysoima S2'-kohdan katkaisu (Denison et al., 2021).

SARS-2-S TM-domeeni on hyvin säilynyt SARS-CoV-2:n ja sen lähisukulaisten kesken ja muodostuu kolmesta osasta: juxtamembraaninen aromaattinen osio, keskinäinen hydrofobinen osio ja kysteiini-rikas osio, mikä on CT:n vieressä. Keskinäinen hydrofobinen keskus muodostaa heliksin, joka vuorovaikuttaa muiden trimeerin TM heliksien kanssa. Kysteiinirikkaan osion kysteiinit, jotka ovat keskinäisen hydrofobisen osion puolella, ovat palmitoyloituja ja niiden korvaus muilla aminohapoilla aiheuttaa kalvofuusion inhibitiota, kun taas CT:n puolella olevien kysteiinien korvaus ei aiheuta kalvofuusion inhibitiota (Denison et al., 2021).

Heptad-toisto domeenit (HR-1 (912–984) ja HR-2 (1163–1213)) ovat hyvin säilyneitä heliksejä muodostavia domeeneja. Ne eivät sisällä heliksin-rikkovia proliineja, eivätkä ryhmittyneitä ja varautuneita aminohappoja (aa) ja ne omaavat suhteellisen vähän glysiiniä. Heliksit muodostuvat 7 aa toistoista (a, b, c, d, e, f, g)_n, jonka kohdissa a ja d olevat aa:t ovat hydrofobisia, sekä samalla puolella heliksiä. Tämä muodostaa hydrofobisen rajapinnan muiden heliksien kanssa ja ne voivat sitoutua toisiinsa. SARS-2-S:n ollessa homotrimeeri, se omaa kolme HR-1- ja HR-2-domeenia, mitkä muodostavat 6 heliksi-nippua. HR-domeenien helikset ovat kohtisuorassa viruskalvoon nähden. HR-domeenit ovat hyvin säilyneitä SARS-CoV:ssa, SARS-Cov-2:ssa ja heidän lähisukulaisissaan. Varsinkin HR-1 on säilynyt useissa koronaviruksissa (Denison et al., 2021).



Kuva 5. SARS-CoV-2 kalvofuusio ACE2:n avulla. Fuusio alkaa ”ylhäällä” olevan RBD:n sitoutumisella ACE2:een, mikä mahdollistaa S2’-paikan katkaisemisen. S2’-paikan katkaisu aiheuttaa HR-1:n ja FP:n konformaation muutokset ja FP lävistää kohdesolun solukalvon ja ankkuroituu. Tämä myös aloittaa S1 alayksikön irtoamisen S2:sta. Tämän jälkeen HR-2 vetää solukalvoja lähemmäs toisiaan, kunnes ne fuusioituvat ja mahdollistavat viruksen vapauttamisen isäntäsoluun. Kuvan lähde: Jackson et al. (2022).

3.1.1. ACE2

Ihmisen ACE2 on 805 aa pitkä trans-membraaniproteiini ja karboksipeptidaasi, joka toimii SARS-CoV-2:n ensisijaisena kohteena solukalvon sitoutumista ja sitä seuraten solun sisälle pääsemistä varten. ACE2 muodostuu trans-membraani-ankkurista ja solunulkoisesta domeenista, missä proteiinin entsymaattisesti aktiivisen N-terminaali sijaitsee. ACE2:sta ekspressoidaan pääasiallisesti ohut-, paksusuoleissa, sydänlihaksissa, munuaisissa ja kiveksissä. Keuhkokudoksissa ACE2 ekspressio on normaalisti erittäin vähäinen, esiintyen

pääosin vain pienessä osassa tyypin II alveolaarisia epiteelisoluja, mutta keuhkojen SARS-CoV-2 infektion seurauksena vapautuvien tulehdusta edistävien sytokiinien uskotaan aiheuttavat ACE2 ekspression kasvua keuhkoissa. ACE2:n liukenevaa versiota sACE2, joka muodostuu ACE2:n katkaistusta solunulkopuolisesta domeenista, voi normaalisti löytyä verenkierrosta erittäin pienissä konsentraatioissa. ADAM10, ADAM17 ja TMPRSS2 voivat katalysoida ACE2:n leikkauksen. sACE2:n konsentraatio verenkierrossa voi nousta COVID-19 infektion seurauksesta, sillä SARS-2-S:n RBD kiinnittyminen ACE2:een aiheuttaa, että reaktion, missä ADAM17/TACE pyrkivät aiheuttamaan solunulkopuolisen domeenin leikkauksen (Scialo et al., 2020).

ACE2 ja ACE toimivat osina RAAS ja KKS järjestelmiä. RAAS järjestelmän suhteen ACE toimii karboksidiptidaasina Ang-I:lle poistaen siitä kaksi c-terminaalista aminohappoa tuottaen Ang-II:sta. ACE2 puolestaan toimii karboksipeptidaasina poistaen Ang-II:sta yhden c-terminaalista aminohapon tuottaen Ang-(1-7). ACE2 voi myös poistaa aminohapon Ang-I:n c-terminaalista tuottaen Ang-(1-9), mutta omaa tälle pienemmän affiniteetin, kuin Ang-I:lle. Ang-(1-7) myös sekä inhiboi ACE:n entsymaattista aktiivisuutta, että toimii sen substraattina, tullen leikatuksi Ang-(1-5):ksi. Ang-II aktivoi AT1- ja AT2-reseptorit, mutta Ang-II:n ja sen edeltäjän Ang-I:n leikkaaminen Ang-(1-7) ja Ang-(1-9):ksi säätelee negatiivisesti RAAS järjestelmää. Angiotensiinien-I ja -II lisäksi ACE2 hajottaa [des-Arg9]-bradykiniin (DABK) inaktiivisiksi peptideiksi, kun taas ACE metabolisoi bradykiniä. Nämä vähentävät KSS järjestelmän B1- ja B2- reseptorien aktiivisuutta. Täten SARS-CoV-2 infektiot, jotka aiheuttavat ACE2:n aktiivisuuden laskua voivat nostaa DABK-tasoa, mikä puolestaan voi johtaa tulehdusta edistävien sytokiinien vapautukseen (Oz et al., 2021).

4. SARS-CoV-2 variaatiot ja mutaatiot S-proteiinissa

SARS-CoV-2 on levitessään maailmanlaajuisesti pandemiaksi mutatoitunut merkittävästi, ja siitä on erottunut useita variaatioita, jotka kaikki ovat useiden mutaatioiden kokoelmia. WHO jakoi nämä variaatiot huolestuttaviin variaatioihin (engl. Variant of concern VOC) ja kiinnostaviin variantteihin (engl. Variant of interest VOI) 13.5.2023 asti. VOI:ksi luokiteltiin uudet variantit, joilla on useita mutaatioita, mitkä aiheuttavat muutoksia fenotyyppiin tai niillä on mutaatioita, joiden epäillään johtavan vastaaviin muutoksiin ja niitä on havaittu useissa leviämistapauksissa tai useissa maissa. VOC:den on näiden lisäksi demonstroitu liittyvän variantin lisääntyneeseen leviämiseen, virulenssiin tai muutoksiin sairauden käyttäytymisessä tai niiden on havaittu laskeneen hoito- ja/tai diagnostiikkamenetelmien efektiivisyyttä (WHO, 2023) Tässä kappaleessa käsittelemme S-proteiinin mutaatioita neljästä pandemian alkuvaiheissa nousseesta VOC:sta: B.1.1.7, B.1.351, P.1 ja B.1.617.2.

Suuri osa variaatioiden mutaatioista löytyy S-proteiinista, mikä omaa suuren roolin isäntäsolun valinnassa, sekä se toimii merkittävimpanä SARS-CoV-2:een kohdistuvien vasta-aineiden kohteena (Taulukko I). Näistä esimerkkeinä toimivat pandemian alkuvaiheessa levinnyt D614G (Boehm et al., 2021) ja useassa eri viruslinjassa erikseen kehittynyt N501Y-mutaatio, jotka muuttavat viruksen fenotyyppiä merkittävästi ja löytyvät useista viruslinjoista (Gómez et al., 2021).

Taulukko I. Yleisimmät mutaatiot VOC:den S-proteiinissa ja niiden vaikutukset viruksen toimintaan. X tarkoittaa, että variantti omaa kyseisen mutaation. X tarkoittaa, että mutaatio on havaittu joissain variaation sekvensseissä, muttei kaikissa. Taulukon lähteet: Tao et al. (2021) & Aleem et al. (2023).*

Mutaatio: domeeni	B.1.1.7	B.1.351	P.1	B.1.617.2
L18F: NTD		X	X	
T19R: NTD				X
T20N: NTD			X	
P26S: NTD			X	
69del: NTD	X			
70del: NTD	X			
D80A: NTD		X		
D138Y: NTD			X	
G142D: NTD				X*
144del: NTD	X			
156del: NTD				X
157del: NTD				X
R158G: NTD				X
R190S: NTD			X	
D215G: NTD		X		
242-244del: NTD		X		
R246I: NTD		X		
K417T: RBD			X	
K417N: RBD		X		
L452R: RBD				X
T478K: RBD				X
E484K: RBD		X	X	
N501Y: RBD	X	X	X	
A570D: N/A	X			
D614G: N/A		X		X
H655Y: N/A			X	
P681R: N/A				X
P681H: N/A	X			
A701V: N/A		X		
T716I: N/A	X			
D950N: HR-1				X
S982A: HR-1	X			
T1027I: N/A			X	
D1118H: N/A	X			
V1176: HR-2			X	

4.1. B.1.1.7

SARS-CoV-2:n variantti B.1.1.7, joka tunnetaan myös nimillä Alfa-variantti, on syyskuussa 2020 Yhdistyneissä kuningaskunnissa havaittu VOC, joka levisi sieltä lähtien nopeaan tahtiin. Globaalien raporttien mukaan B.1.1.7-variantti havaintoja oli maaliskuussa 2021 114 maassa (Janik et al., 2021). Vuoden 2021 kesäkuuhun mennessä B.1.1.7 oli levinnyt pisteeseen, missä se aiheutti suurimman osan COVID-19 infektiosta Yhdysvalloissa ja monissa Euroopan maissa (Tao et al., 2021).

B.1.1.7-variantti omaa 18 mutaatiota, joista 9 on SARS-2-S:ssä. NTD:n deleetiot [69del, 70del ja 144del] 1 RBD:ssä [N501Y] ja 1 HR-1:ssä [S982A] ja domeenien ulkopuolille sijoittuvat 3 mutaatiota [A570D, P681R, T716I ja D1118H]. Näistä mutaatioista RBD:n N501Y:n uskotaan lisäävän SARS-2-S:n affiniteettiä ACE2:lle (Aleem et al., 2023). Deleetiot 69del, 70del ja 144del aiheuttivat sen, että osa diagnostisista PCR:ään pohjautuvista kokeista ei pystynyt aina havaitsemaan tätä variaatiota (Tao et al., 2021).. Y114del aiheuttaa SARS-CoV-2:n immuuniresistenssiä monille NTD:hen tähtäävistä neutraloivista mAb:sta (Janik et al., 2021).

N501Y on yleinen mutaatio, joka on havaittu kolmessa tässä tutkituista VOC:stä (B.1.1.7, B.1.351 ja P.1) ja B.1.1.7-variantin ainoa mutaatio S-proteiinin RBD:ssä. N501Y lisää affiniteettia millä RBD kiinnittyy ACE2:een ja on liitetty ihmisissä viruksen lisääntyneeseen replikaatioon ylempien hengitysteiden soluissa. P681H mutaation rooli puolestaan ei ole vielä selvä, mutta se sijoittuu alaosiot S1 ja S2 erottavan furiinin leikkauspaikan viereen ja vastaavia mutaatioita kuten P681R, joissa proliini on vaihtunut isommaksi positiivisesti varautuneeksi aminohapoksi, on ilmestynyt itsenäisesti useille eri viruslinjoille, kuten B.1.618.2:lle (Tao et al., 2021). Mutaatioiden A570D, T716I, S982A ja D1118H, jotka eivät kuulu mihinkään määritettyyn domeeniin, rooleista ei ole selvyttä ja niitä ei ilmene muilla tässä tutkituilla varianteilla.

Näiden SARS-2-S:n mutaatioiden lisäksi se omaa muitakin mutaatioita, kuten nsp6:n deleetiot [106-108del] ja mahdollisesti leviämistä lisäävät nukleokapsidin mutaatiot [D3L, R203K ja G204R] (Tao et al., 2021).

4.2. B.1.351

SARS-CoV-2 variantti B.1.351, joka tunnetaan myös nimeltä, Beta-variantti on joulukuussa 2020 Etelä-Afrikassa ensin havaittu VOC, josta tuli kuukauden sisällä havaitsemisesta Etelä-Afrikan dominantti SARS-CoV-2 variantti. Ensimmäiset kliiniset näytteet variantista ovat lokakuulta 2020 (Gómez et al., 2021). Tämän variantin on raportoitu omaavan merkittävää resistanssia neutralisaatiolle joillekin aikaisempien variaatioiden NTD:hen ja RBD:hen kohdistetuille mAb:lle, sekä sen havaittiin voivan paeta aikaisempien varianttien aiheuttaman luonnollisen infektion neutralisoivilta vasta-aineilta. Nämä ominaisuudet ovat todennäköisesti seurausta mutaatioista SARS-2-S RBD:ssä ja NTD:ssä (Janik et al., 2021). Tätä puoltaa se, että joidenkin SARS-CoV-2 Wuhanin referenssilinjaan perustuvien rokotteiden tehokkuus B.1.351-varianttia kohtaan on laskenut merkittävästi alkuperäiseen varianttiin verrattuna (Gómez et al., 2021).

B.1.351-variantti omaa 9 mutaatiota, sekä deleetion SARS-2-S:ssä [L18F, D80A, D215G, LAL 242–244del, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G, ja A701V]. Näistä 3 on RBD mutaatioita [K417N, E484K ja N501Y], K417N aiheuttaa suurempaa resistanssia joillekin mAb:lle, mutta se saattaa myös aiheuttaa ACE2-affiniteetin laskua. E484K, joka löytyy myös P.1-variantista estää useiden RBM:ään sitoutuvien mAb:n toimintaa. N501Y lisää affiniteettia, millä RBD kiinnittyy ACE2:een (Tao et al., 2021).

Neljä SARS-2-S:n mutaatioista ja deleetio sijoittuu NTD:hen [L18F, D80A, D215G, LAL 242–244del ja R246I]. Nämä mutaatiot ovat joustavien muuttuja lupprien sisällä tai vieressä, mistä johtuen ne eivät muokkaa SARS-2-S:n funktionaalisten domeenien rakenteita ja vaikuta merkittävästi proteiinin toimintaan (Gómez et al., 2021). LAL242-244del on todettu johtavan immuuniresistanssiin (Janik et al., 2021). NTD:n L18F-mutaation on todettu antavan replikatiivisia etuja virukselle. Tämän oletetaan olevan seurausta siitä, että tämä mutaatio vähentää neutralisoivien vasta-aineiden sitoutumista (Grabowski et al., 2021).

Loput 2 SARS-2-S mutaatioista ovat D614G ja A701V, jotka eivät sijoitu mihinkään määritettyyn domeeniin. Näistä A701V sijoittuu RBD:n ja FP:n väliin, kun taas D614G on yleinen mutaatio, joka levisi pandemian alussa melkein kaikkiin viruskantoihin niin antamiensa leviämisetujen, kuin epidemiologistenkin syiden takia. D614G aiheuttaa suuremman todennäköisyyden, että ainakin yksi RBD:stä trimeerissä on ”ylhäällä” konformaatioissa, mikä parantaa sen mahdollisuuksia sitoutua ACE2:een (Tao et al., 2021).

Näiden lisäksi variantilla on useita mutaatioita SARS-2-S:n ulkopuolella, kuten ORF1a:n [K1655N], SARS-2-E:n [P71L] ja SARS-2-N:n [T205I] (Gómez et al., 2021).

4.3. P.1 (B.1.1.28.1)

SARS-CoV-2 variantti P.1, joka tunnetaan myös nimellä Gamma-variantti tai B.1.1.28.1, on tammikuussa 2021 Brasiliassa havaittu variantti. P.1-variantista tuli sen jälkeen vallitseva variantti Brasiliassa ja helmikuussa 2021 se vastasi melkein 40 % sekvensoiduista tapauksista Etelä-Amerikassa (Boehm et al., 2021). Maaliskuussa 2021 varianttia oli levinnyt Yhdysvalloissa 31 osavaltioon, kun taas EU/EAA alueella oli havaittu noin 30 tapausta. Globaalien raporttien mukaan P.1 varianttia oli havaittu maaliskuussa 2021 37 maassa. P.1-variantti omaa resistanssia useille RBD-ohjatuille mAb:lle heikentäen tai joissain tapauksissa poistaen niiden tehokkuuden sitä vastaan, vaikkakin tämä tehokkuuden lasku ei ole yhtä merkittävä kuin B.1.351-variantissa. P.1-variantti omaa myös suuren potentiaalin uudelleen infektoida jo muun SARS-CoV-2variantin sairastaneen henkilön (Janik et al., 2021).

P.1-variantti omaa 16 ei-synonyymistä mutaatiota, joista 11 sijoittuu S-proteiiniin [L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, H655Y, T1027I, ja V1176F], 3 ORF1ab:ssa [S1188L, K1795Q, ja E5665D], 1 ORF8:ssa [E92K] ja yksi N-proteiinissa [P80K]. Lisäksi P.1-variantti sisältää deletion ORF1ab:ssa [SGF 3675-3677 del] ja 4 synonyymistä pistemutaatiota (Gómez et al., 2021). SARS-2-S:n mutaatioista 5 sijoittuu NTD:hen [L18F, T20N, P26S, D138Y ja R190S], 3 RBD:hen [K417T, E484K ja N501Y], 1 HR-2:een [V1176] ja 2 eivät sijoitu mihinkään määritettyyn domeeniin [H655Y ja T1027I].

P.1 jakaa RBD:n mutaatiot [K417T, E484K ja N501Y], sekä NTD:n [L18F]:n täysin B.1.1.7:n kanssa ja N501Y:n B.1.1.7:nkin kanssa. K417T ja /N omaavat samantyyliiset vaikutukset proteiinin toimintaan ja mAb:den vastustamiseen (Tao et al., 2021). Nämä vaikuttavat merkittävästi viruksen leviämiseen, uudelleeninfektio tasoihin ja vasta-ainepohjaisen immunitetin välttämiseen (Gómez et al., 2021).

4.4. B.1.617.2

SARS-CoV-2 variantti B.1.617.2, joka tunnetaan myös nimellä Delta-variantti, jonka edeltäjä B.1.617 on ensin Intiassa havaittu variantti, joka 2021 kevään aikana alkoi korvaamaan B.1.1.7-varianttia UK:n dominanttina viruslinjana (Torjesen, 2021).

B.1.617.2-variantti omaa 10 ei-synonyymistä mutaatiota S-proteiinissa, joista 2 on deleetioita: T19R, (G142D*), 156del, 157del, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R ja D950N. G142D

mutaatio ei löydy kaikista varianteissa. Tämä variantti omaa 5 mutaatiota NTD:ssä [T19R, (G142D*), 156del, 157del, R158G], 2 RBD:ssä [L452R ja T478K], yhden HR-1:ssä [D950N] ja 2 RBD ja HR-1 domeenien välistä [D614G ja P681R] Muista VOC:sta poiketen B.1.617.2-variantti ei omaa RBD:n N501Y mutaatioita ja ainoa mutaatio, minkä se jakaa muiden kanssa on D614G.

B.1.617.2 jakaa RDB:n L452R mutaation B.1.617.1-variantin kanssa. Sen tiedetään vähentävän useiden RBM spesifisten luokan 2 mAb:n herkkyyttä sen mutaation omaaville SARS-2-S:lle ja niiden on havaittu lisäävän keuhkokudokseen pääsemistä. Furiinin katkaisupaikan lähellä oleva P681R vaikuttaa lisäävän katkaisupaikan 1 katkaisua ihmisen hengitystien epiteelisoluissa. Näiden lisäksi tämä variantti omaa useita mutaatioita ORF3, ORF7 ja SARS-2-N:ssä (Tao et al., 2021).

5. Yhteenveto

Pandemian aikana SARS-CoV-2 muuntui nopeasti luoden useita variantteja. Suurin osa varhaisimpien SARS-CoV-2 varianttien mutaatioista kohdistuivat SARS-2-S:ään. Nämä mutaatiot sijoittuivat enimmäkseen NTD- ja RBD-domeeneihin. Ne paransivat pääasiassa RBD:n kykyä tunnistaa ihmisen ACE2-reseptoria ja niiden sitoutumisaffiniteettia, kuten laajalle levinnyt mutaatio N501Y ja RBD:n ”ylhällä”-konformaation yleisyyteen vaikuttava D614G. Toiset näiden lisäksi yleiset mutaatiot kehittyivät vastaiskuna immuunipuolustuksen neutraloiville mAb:lle, jotka alkoivat yleistymään COVID-19 infektion jo sairastaneiden ja rokotteen saaneiden määrien kasvaessa. Nämä mutaatiot tapahtuivat immuunijärjestelmien neutraloivien mAb:den kohdealueille pääasiallisesti NTD:n ja RBD:n alueille nostoen variaatioiden immuuniresistanssia.

Suuri osa mutaatioista ja niiden yhdistelmistä SARS-2-S:sä aiheuttavat vaikutuksia, joita ei vielä täysin ymmärretä. Näiden muutosten tutkimista tulee jatkaa, koska se auttaa niin SARS-2-S:n, kuin muidenkin SARS-viruksen proteiinien toiminnan ymmärtämisessä.

6. Kirjallisuusviitteet

- Aleem, A., Bari, A., Samad, A., & Vaqar, S. (2023, May 8). Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19). StatPearls. Retrieved May 15, 2023, from <https://www.statpearls.com/point-of-care/132707>
- Anttila, V. J. (2023, February 6). Koronavirus (SARS-CoV-2, COVID-19). DUODECIM TERVEYSKIRJASTO. Retrieved May 15, 2023, from <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk01257/koronavirus-sars-cov-2-covid-19>
- Arya, R., Kumari, S., Pandey, B., Mistry, H., Bihani, S. C., Das, A., Prashar, V., Gupta, G. D., Panicker, L., & Kumar, M. (2021). Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of Molecular Biology*, 433(2), 166725. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2020.11.024>
- Boehm, E., Kronig, I., Neher, R. A., Eckerle, I., Vetter, P., & Kaiser, L. (2021). Novel SARS-CoV-2 variants: the pandemics within the pandemic. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(8), 1109. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2021.05.022>
- Denison, M. R., Graham, R. L., Donaldson, E. F., Eckerle, L. D., & Baric, R. S. (2021). Domains and Functions of Spike Protein in SARS-Cov-2 in the Context of Vaccine Design. *Viruses 2021, Vol. 13, Page 109, 13(1)*, 109. <https://doi.org/10.3390/V13010109>
- Gómez, C. E., Perdiguero, B., & Esteban, M. (2021). Emerging SARS-CoV-2 Variants and Impact in Global Vaccination Programs against SARS-CoV-2/COVID-19. *Vaccines*, 9(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/VACCINES9030243>
- Grabowski, F., Kochańczyk, M., & Lipniacki, T. (2021). L18F substrain of SARS-CoV-2 VOC-202012/01 is rapidly spreading in England. *MedRxiv*, 2021.02.07.21251262. <https://doi.org/10.1101/2021.02.07.21251262>
- Huang, Y., Yang, C., Xu, X. feng, Xu, W., & Liu, S. wen. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica 2020 41:9, 41(9)*, 1141–1149. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
- 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. <https://doi.org/10.1038/S41580-021-00418-X>

- Janik, E., Niemcewicz, M., Podogrocki, M., Majsterek, I., & Bijak, M. (2021). The Emerging Concern and Interest SARS-CoV-2 Variants. *Pathogens*, *10*(6).
<https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10060633>
- Kadam, S. B., Sukhramani, G. S., Bishnoi, P., Pable, A. A., & Barvkar, V. T. (2021). SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *Journal of Basic Microbiology*, *61*(3), 180. <https://doi.org/10.1002/JOBM.202000537>
- Kirtipal, N., Bharadwaj, S., & Kang, S. G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, *85*, 104502.
<https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2020.104502>
- Mishra, S. K., & Tripathi, T. (2021). One year update on the COVID-19 pandemic: Where are we now? *Acta Tropica*, *214*, 105778.
<https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2020.105778>
- Oz, M., Lorke, D. E., & Kabbani, N. (2021). A comprehensive guide to the pharmacologic regulation of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), the SARS-CoV-2 entry receptor. *Pharmacology & Therapeutics*, *221*, 107750.
<https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2020.107750>
- Scialo, F., Daniele, A., Amato, F., Pastore, L., Matera, M. G., Cazzola, M., Castaldo, G., & Bianco, A. (2020). ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2. *Lung*, *198*(6), 867. <https://doi.org/10.1007/S00408-020-00408-4>
- Tao, K., Tzou, P. L., Nouhin, J., Gupta, R. K., de Oliveira, T., Kosakovsky Pond, S. L., Fera, D., & Shafer, R. W. (2021). The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nature Reviews. Genetics*, *22*(12), 757. <https://doi.org/10.1038/S41576-021-00408-X>
- Torjesen, I. (2021). Covid-19: Delta variant is now UK's most dominant strain and spreading through schools. *BMJ*, *373*, n1445. <https://doi.org/10.1136/BMJ.N1445>
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Velesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, *181*(2), 281-292.e6.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.02.058/ATTACHMENT/0D452E6C-56C8-4028-8AFB-CFC22B1A37FF/MMC2.PDF>

World Health Organization (2023, March 15). Historical working definitions and primary actions for SARS-CoV-2 variants. Retrieved May 15, 2023, from <https://www.who.int/publications/m/item/historical-working-definitions-and-primary-actions-for-sars-cov-2-variants>