

Niklas Nordfjellmark  
Hedda Henriksen  
Are Gjelsest

# S-protein og Angiotensin Converting Enzyme 2 sin funksjon ved SARS-CoV- og SARS-CoV-2-infeksjon

Bacheloroppgave i Bachelor i bioingeniørfag  
Veileder: Lutz Schwettmann

Mai 2020



Niklas Nordfjellmark  
Hedda Henriksen  
Are Gjelseth

# **S-protein og Angiotensin Converting Enzyme 2 sin funksjon ved SARS-CoV- og SARS-CoV-2-infeksjon**

Bacheloroppgave i Bachelor i bioingeniørfag  
Veileder: Lutz Schwettmann  
Mai 2020

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for biologiske fag Ålesund



**NTNU**

Kunnskap for en bedre verden





## **Forord**

Grunnet coronapandemien ble bacheloroppgaven annerledes enn forventet. På svært kort tid ble det utdelt nye typer oppgaver som vi ikke har vært borte i før, nemlig helt teoretiske oppgaver. Der skal forskning hentes ut fra flere artikler og settes sammen til å svare på en problemstilling vi selv har valgt innenfor et gitt tema og problemområde. Forskningen rundt problemområdet, viruset som forårsaker den nåværende pandemien, ble publisert kontinuerlig mens oppgaven ble skrevet. Det har vært spennende å skrive en tidsrelevant oppgave der ny forskning publiseres daglig, selv om det har vært enkelte utfordringer å forholde seg til ettersom dette er en ny type oppgave for oss. Vi vil takke vår veileder, Lutz Schwettmann, for god hjelp gjennom hele perioden.

Ålesund, 17. mai 2020.

# **S-protein og Angiotensin Converting Enzyme 2 sin funksjon ved SARS-CoV- og SARS-CoV-2-infeksjon**

## **Sammendrag**

SARS-CoV-2 er et nylig oppdaget virus som deler flere likheter med SARS-CoV som forårsaket SARS-epidemien i 2003. I denne bacheloroppgaven ble det tatt sikte på å identifisere mulige faktorer som kan forklare hvorfor dagens situasjon er annerledes enn SARS-utbruddet i 2003. Fokuset ble rettet mot å finne vitenskapelig publisert informasjon om ulikheter i de to virusenes “spike”-proteiner på aminosyrenivå og en nylig utviklet modell for å predikere coronavirus sin motstandsdyktighet.

Teoridelen beskriver først virus og coronavirus på generell basis etterfulgt av en detaljert forklaring på SARS-CoV-2 sin struktur og en generell betraktning av hvordan SARS-CoV-2 fusjonerer med, og replikeres, i vertscellen. Videre belyses funksjonen til renin-angiotensin-systemet (RAS) i menneskekroppen og det blir gitt en detaljert forklaring av G-koblet reseptor (GPCR) som er en viktig reseptortype å forstå i sammenheng med RAS. Det ble tatt stilling til funksjon og oppbygging av angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), som er reseptoren både SARS-CoV og SARS-CoV-2 binder seg til før fusjon kan initieres.

For å finne relevant litteratur ble det brukt lærebøker, review-artikler og forskningsartikler fra søk via PubMed. Resultatet består av 11 artikler som er spesielt relevant for vår problemstilling.

Diskusjonsdelen er todelt og tar først og fremst sikte på å identifisere relevante ulikheter mellom SARS-CoV og SARS-CoV-2. Her ble det funnet at SARS-CoV-2 binder med høyere affinitet til ACE2 og benytter en ekstra protease i fusjonsprosessen som er uttrykt i svært mange av kroppens vev. I tillegg ble det satt fokus på et nytt klassifiseringssystem (PID) for coronavirus som er ment å kunne predikere virusets motstandsdyktighet mot ytre påvirkninger. Ifølge dette bør SARS-CoV-2 ha en relativt hard ytre skallstruktur, og resultater derfra tyder på at SARS-CoV-2 kan ha større evne til å motstå ytre påvirkninger sammenliknet med SARS-CoV. I praksis antyder resultater fra anvendelsen av metoden at

SARS-CoV-2 vil kunne beholde sin ytre beskyttende struktur lengre i miljøer utenfor vertsorganismen og ekstracellulært i kroppsvæsker, som igjen vil si at man trenger færre infektive viruspartikler for å videreføre smitten effektivt.

Den andre delen av diskusjonen tar for seg det kliniske bildet ved COVID-19, først og fremst med hensyn til den patologiske effekten på lunger og hjerte. Dette blir sett i sammenheng med RAS på et overordnet nivå. Koekspressjon av vertscellerreseptoren ACE2, med de nødvendige proteasene for fusjon, er også tatt med her. Dette ble gjort for å kartlegge hvilke vev SARS-CoV-2 kan angripe. Til sammenlikning med SARS-CoV ble det funnet at SARS-CoV-2 har større potensiale til å angripe flere vev; blant annet lunge, hjerte, lever og tarm.

### **Abstract**

SARS-CoV-2 is a newly discovered virus that bears many similarities to SARS-CoV, which caused the SARS epidemic in 2003. This bachelor's thesis was aimed at identifying possible factors that may explain why the current situation is different from the one surrounding the SARS outbreak in 2003. The focus was aimed at determining differences in amino acid sequences in S protein and a recently developed model for predicting coronavirus resistance.

The theoretical background section initially describes viruses and coronaviruses on a general basis, followed by a detailed explanation of the structure of SARS-CoV-2 and a general consideration of how SARS-CoV-2 enters and replicates in the host cell. Furthermore, the renin-angiotensin system (RAS) of the human body is elucidated, and a detailed explanation is provided for GPCR, a receptor type that is important to understand in the context of RAS.

The function and structure of ACE2 was considered. This is the receptor with which both SARS-CoV and SARS-CoV-2 bind before entry by endocytosis and membrane fusion can be initiated.

In order to procure relevant literature textbooks, review articles and research articles from PubMed database searches were used. The result consists of 11 articles that were deemed particularly relevant to our thesis.

The discussion section is two-fold and aims primarily at identifying relevant differences between SARS-CoV and SARS-CoV-2. Here, it was found that SARS-CoV-2 binds with higher affinity to ACE2 and utilizes an additional protease prior to the fusion process. This protease is expressed in many body tissues. In addition, a new coronavirus classification system (PID) was introduced, which is intended to predict the virus's resistance to external influences. Accordingly, SARS-CoV-2 should have a relatively hard outer shell structure and results from the same research group suggest that SARS-CoV-2 may have greater ability to withstand external influences compared to SARS-CoV. In practice, the method suggests that SARS-CoV-2 is able to retain its outer protective structure shielding the viral RNA longer in environments outside the host organism and extracellularly in body fluids, which in turn means that fewer infectious particles are needed to infect effectively.

The second part of the discussion deals with the clinical features of COVID-19; primarily with regard to the lungs and heart. This is seen in the context of RAS at an overall level. An overview of tissues with coexpression of the host cell receptor ACE2 with the necessary proteases for fusion is also included here. This was to identify which tissues and cells are susceptible to being attacked by SARS-CoV-2. When compared to SARS-CoV, it was found that SARS-CoV-2 has the greater potential to infect multiple tissues and organs, including lungs, heart, liver and intestines.

## Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Introduksjon .....</b>	<b>6</b>
1.1	Bakgrunn.....	6
1.2	Virus.....	6
1.3	Coronavirus.....	7
1.4	SARS-CoV og SARS-CoV-2 struktur .....	8
1.4.1	Van der Waalske krefter.....	9
1.4.2	Hydrogenbinding .....	10
1.5	Mekanismen for membranfusjon og behovet for proteolytisk spaltning.....	10
1.6	Replikasjonen av SARS-CoV-2 .....	12
1.6.1	Furin .....	13
1.6.2	Transmembran protease serin 2 (TMPRSS2).....	13
1.6.3	Cathepsin B og L .....	14
1.7	Renin-Angiotensin-Systemet (RAS).....	14
1.8	Aktuelle reseptorer .....	15
1.8.1	ACE2 .....	15
1.8.2	G-koblet reseptor (GPCR).....	16
1.8.3	Aktivering av AT1R og MAS-reseptor. ....	17
1.9	Blodtrykkssenkende medisiner.....	19
1.9.1	Funksjon .....	19
1.9.2	Effekter ved COVID-19.....	19
<b>2</b>	<b>Metode.....</b>	<b>20</b>
2.1	Fremgangsmåte.....	20
2.2	Nøkkelord .....	21
<b>3</b>	<b>Resultat .....</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>Diskusjon.....</b>	<b>23</b>
4.1	PID gruppering av coronavirus.....	23
4.2	Forskjeller i S-protein mellom SARS-CoV og SARS-CoV-2.....	25
4.2.1	Overensstemmelse mellom S-protein for SARS-CoV-2 og SARS-CoV .....	25
4.2.2	Reseptorbinding .....	26
4.2.3	Bindingsforskjeller mellom S-protein for SARS-CoV-2 og SARS-CoV .....	27
4.2.4	En ny potensiell spaltningssekvens i SARS-CoV-2.....	29
4.2.5	Forskjeller mellom virusene basert på sesongvariasjoner i infektivitet, fri energi- basert stabilitet og relasjon til evolusjonsmekanismer.....	31
4.3	Normal ekspresjon av ACE2, TMPRSS2 og furin.....	33
4.4	Det kliniske bildet for SARS og COVID-19 i ulike organer .....	34
4.4.1	Lunger og hjertet.....	35
4.4.2	Lever .....	36
4.4.3	Mage- og tarmsystemet. ....	37
4.5	Konklusjon .....	37
<b>5</b>	<b>Referanser .....</b>	<b>38</b>

# 1 Introduksjon

## 1.1 Bakgrunn

I desember 2019 identifiserte helsemyndighetene i Wuhan, Kina, flere pneumonitilfeller av ukjent etiologi tilknyttet byens sjømatmarked. Nærmere undersøkelser avdekket et nytt coronavirus, som nå har fått navnet Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2).

I denne bacheloroppgaven skal vi undersøke funksjonen av angiotensin converting enzyme (ACE2) og hvordan biokjemiske og fysiologiske prosesser forstyrres ved infeksjon med SARS-CoV eller SARS-CoV-2. Vi skal se nærmere på strukturforskjeller mellom de to virusene og hvordan forskjellene påvirker ACE2-reseptorbinding, samt undersøke om de strukturelle forskjellene kan hjelpe oss med å forstå hvorfor situasjonen er annerledes med SARS-CoV-2 sammenlignet med SARS-CoV.

## 1.2 Virus

Et virus er en intracellulær ikke-levende parasitt/partikkel som ikke kan utøve livsfunksjoner alene (1). Det har ingen egen metabolisme og er derfor avhengig av en vertscelle for viral replikasjon. Replikasjon av virus skjer gjennom lytisk eller lysogen syklus der nye virioner dannes. Ved lytisk syklus overtar viruset vertscellens maskineri slik at store mengder nye virus dannes, og vertscellen til slutt sprekker (lysis). Ved lysogen syklus smelter det virale arvestoffet sammen med vertscellens arvestoff uten å overta kommandoen, slik at virusgenene kopieres sammen med vertscellens DNA ved hver celledeling. Virusets arvestoff kan enten være DNA eller RNA og er pakket inn i et kapsid (1).

### 1.3 Coronavirus

Virusfamilien *Coronaviridae* (se tabell 1) inneholder både human- og dyrepatogene arter (1). Sykdomsbildet mellom de forskjellige artene varierer. Hos kyllinger forårsaker coronavirus infeksjon i de øvre luftveier, mens de forårsaker diaré hos storfe og svin. Hos mennesker kan coronavirus gi mild forkjølelsesykdom, men de kan også forårsake alvorlig sykdom og død. Siden 2002 har coronavirus forårsaket tre zoonotiske utbrudd som har gitt alvorlig sykdom. SARS-epidemien i 2003 skyldes SARS-CoV, og resulterte i 8096 smittetilfeller og 774 dødsfall i flere land (2). I 2012 forårsaket Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) MERS-epidemien, som førte til 2494 smittetilfeller og 858 dødsfall. Pandemien som ble erklært av Verdens helseorganisasjon (WHO) 11. mars 2020 skyldes et nylig oppdaget coronavirus som fikk navnet SARS-CoV-2, og forårsaker sykdommen coronavirus disease 2019 (COVID-19). Per 18. mai 2020 er det registrert 4.768.957 smittetilfeller og 316.890 dødsfall i verden (3).

**Tabell 1:** *Klassifisering av coronavirus (4,5).*

Rike	<i>Riboviria</i>
Rekke	<i>Incertae sedis</i>
Orden	<i>Nidovirales</i>
Familie	<i>Coronaviridae</i>
Subfamilie	<i>Orthocoronavirinae</i>

Subfamilien inkluderer fire slekter: alfacoronavirus, betacoronavirus, gammacoronavirus og deltacoronavirus. Alfa- og betacoronavirus er kjent for å forårsake infeksjon hos mennesker. Beta-CoV-slekten er videre inndelt i fem subslekter.

Coronavirus er membrankledde virus med et positivt sens enkelttrådet RNA-genom (+ssRNA) og et nukleokapsid med spiralformet symmetri. I membranen sitter det små pigger ("spikes"), som gir assosiasjon til solens *corona* (derav navnet coronavirus). Genomstørrelsen til coronavirus varierer fra omtrent 27 til 34 kilobaser. Vanlig

genomstørrelse for RNA-virus er omtrent 10 kilobaser. Coronavirus er dermed de største kjente RNA-virus (1).

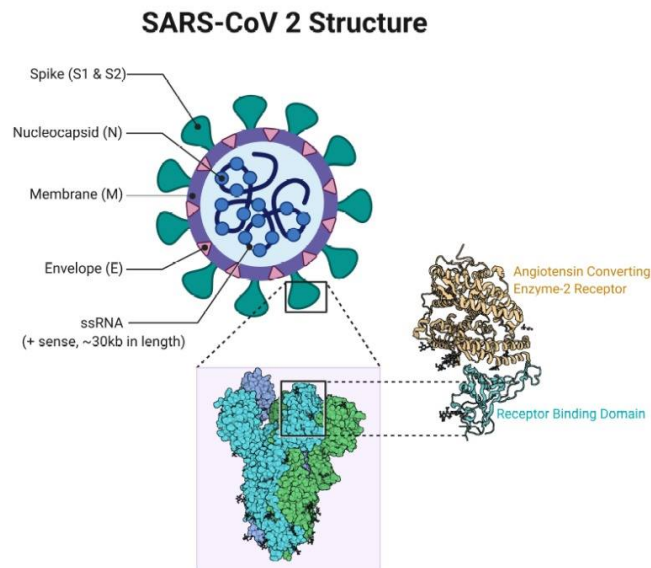
#### **1.4 SARS-CoV og SARS-CoV-2 struktur**

SARS-CoV og SARS-CoV-2 er begge coronavirus i subfamilien beta-CoV i subslekten 2B. De stammer originalt fra flaggermus, men er blitt overført videre til andre arter. I disse artene har virusene replikert og mutasjoner har forekommet slik at virusene kan smitte videre til mennesker. Genomet koder for minst 27 proteiner, inkludert 15 ikke-strukturelle proteiner, 4 strukturelle proteiner og 8 hjelpeproteiner (6). De fire ulike strukturelle proteinene er: spike-protein (S-protein), membran-protein (M-protein), nukleokapsid (N-protein) og envelope-protein (E-protein) (se figur 1). Den virale membranen inneholder tre proteiner hvor M- og S-protein er de to viktigste glykoproteinene, mens E-protein er et ikke-glykosylert protein. M-proteinet består av et kort N-terminalt glykosylert ektodomene med tre transmembrane domener (TM) og et langt C-terminalt CT-domene. M- og E-proteinene er nødvendige for virusmorfogenese, montering og "budding".

S-protein inneholder blant annet et type I fusjonsvirusprotein som har to heptad-repetisjonsregioner (HR) lokalisert sentralt i S2-domenet. En heptad-repetisjon er en repeterende sekvens på syv aminosyrer. De to regionene er kjent som "heptad repeat N" (HR-N) og "heptad repeat C" (HR-C) og utgjør en helikslignende struktur i kjernen av S-proteinet. HR-N og HR-C er omsluttet av et proteinektodomene, som utgjør resten av S-proteinet (7). SARS-CoV og SARS-CoV-2 S-protein bindes til enzymet ACE2, som er lokalisert på utsiden av endotel- og andre celler iblant annet lungene. S-proteinet har 1104 aminosyrer i SARS-CoV og 1273 aminosyrer i SARS-CoV-2. Det inneholder en amino (N)-terminal S1-subenhet og en karboksyl (C)-terminal S2-subenhet. I S1-subenheten finnes det reseptorbindende domenet (RBD), som består av to subdomener: kjerne og eksternt subdomene. Kjernerdomenet danner S-trimerpartikler, mens det eksterne subdomenet inneholder to eksponerte sløyfer på overflaten som binder til ACE2 (6). RBD i SARS-CoV og SARS-CoV-2 inneholder en lengre, lett tilgjengelig struktur langs dets periferi som kommer i kontakt med ACE2 og er betegnet som det reseptorbindende motivet (RBM). RBM er også en viktig antigendeterminant som er i stand til å frembringe produksjon av nøytraliserende antistoffer (8). Mens S1-subenheten medierer



reseptorbinding gjennom RBD, er S2-subenheten ansvarlig for membranfusjonen med endosomet i vertscellen (7).



**Figur 1:** SARS-CoV-2-struktur med dens respektive strukturelle proteiner og arvemateriale: S-protein, N-protein, M-protein, E-protein og +ssRNA. Nærbildet av S-proteinet viser også RBD bundet til ACE2 (9).

RBM er den delen av S1 som medierer binding til vertscellereseptoren ACE2. I denne interaksjonen oppstår det ulike bindingstyper. I diskusjonsdelen av oppgaven vil vi gå nærmere inn på disse bindingene. Bindingstypene omfatter blant annet van der Waalske krefter og hydrogenbindinger.

#### 1.4.1 Van der Waalske krefter

Van der Waalske krefter oppstår mellom molekyler i en kjemisk forbindelse. Det er en form for midlertidig binding som følge av polarisering av et atom. Rundt atomene dannes en sky av elektroner med en ikke-permanent romlig plassering. Dette medfører svake ladninger på hver side i atomet og åpner for at selv nøytrale partikler kan inngå bindinger. Van der Waalske krefter er en svak bindingstype, men i et større molekyl vil det kunne være mange kontaktpunkter til nabomolekylene. Summen av alle kreftene kan gi store utslag på stoffets fysiske egenskaper (10).

#### 1.4.2 Hydrogenbinding

En hydrogenbinding er en annen form for intermolekylær kraft. Elektronegativiteten til et atom er relatert til størrelsen på atomet og om det har oppfylt oktettregelen. Mindre atomer har høyere elektronegativitet fordi elektronene befinner seg nærmere kjernen som vil trekke sterkere på elektronene. Generelt kan man si at elektronegativiteten øker bortover i en periode og oppover i en gruppe i periodesystemet. Oksygen og fluor er de mest elektronegative atomene og har en tendens til å danne bindinger med hydrogen. Dersom hydrogen befinner seg mellom to atomer med høy elektronegativitet, polar-kovalent bundet til det ene atomet kan det oppstå hydrogenbinding til det andre atomet. Bindingstypen er en dipol-dipol-binding og kan bli opptil ti ganger så sterk som andre dipol-dipol-bindinger (10,11).

### 1.5 Mekanismen for membranfusjon og behovet for proteolytisk spaltning

Både SARS-CoV og SARS-CoV-2 er membrankledde virus og kommer seg inn i vertscellen ved hjelp av reseptormediert endocytose. Felles for virus av denne typen er at det på et tidspunkt i løpet av prosessen må skje en sammensmelting av virusets og cellens (endosomets) membran, før den virale nukleinsyren kan “ankomme” i cytosol.

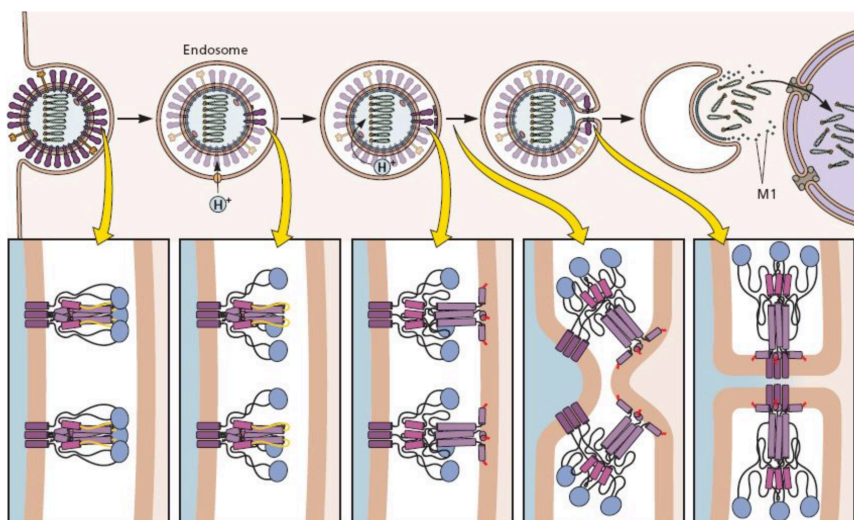
Membrankledde virus deles inn i tre klasser etter strukturen og funksjonmetoden til det proteinet som er sentralt i fusjonsprosessen. De to virusene som det snakkes om her benytter begge klasse I-fusjonsmekanismen, som fra før er blitt inngående studert hos influensaviruset (illustrert i figur 2) (12).

S-proteinet på virusmembranen til disse to virusene er altså funksjonelt karakterisert som klasse I fusjonproteiner. Denne klassens proteiner er trimerer i sine prefusjons- og postfusjonskonformasjoner. Slutt-tilstanden for den delen av proteinet som aktivt virker til at membranene føres tilstrekkelig nært hverandre til at fusjoneringen skjer spontant, er en hårnålsform med en såkalt 6 Helix Bundle (6HB)-struktur i “hårnålssvingen”, og hvor de to forankrede endene til den utstrakte trimeren møtes i den ferdig fusjonerte membranen. For at den hydrofobe sekvensen som sørger for forankring i endosomets membran (fusjonspeptidet) skal “nå fram”, må fusjonsproteinet kuttes av en protease. Dette kalles priming, og kan også være gjort på et tidligere tidspunkt. Så strekkes fusjonsproteinet ut i sin fulle lengde fra det transmembrane domenet i virusmembranen til selve

forankringsstedet i den endosomale membranen. Strukturendringene (sekundær og tertiær proteinstruktur) som fører til både den utstrakte formen og hårnålsformen drives progressivt framover av endringen i pH i endosomet, som jo har protonpumper som øker  $H^+$ -konsentrasjonen i rommet mellom de to membranene etter hvert som endosomet modnes (12).

For at fusjonspeptidet skal kunne utføre sin oppgave i denne prosessen, som er avgjørende nødvendig for at membrankledde virus skal kunne infisere cellen, er det i varierende grad avhengig av proteasespaltning. De aktuelle proteasene for SARS-CoV og SARS-CoV-2 er furin, TMPRSS2 og cathepsin B/L, og bidrar både til å skille bort den reseptorbindende delen og til å “prime” fusjonsproteinet. Disse proteasene kommer vi tilbake til senere i teoridelen.

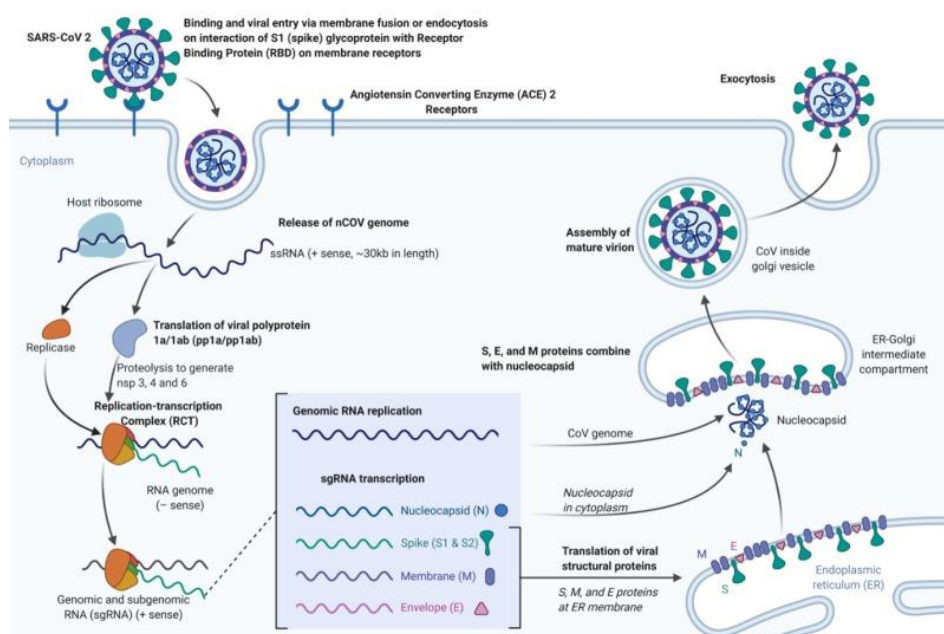
De to regionene i hver monomer som i avsnittet over om S-proteinets struktur beskrives som HR-N og HR-C har hydrofobe sidekjedder som repeteres med faste intervaller, og er de delene som gjennomgår de mest betydelige modifikasjonene for re-foldingen. De kan intuitivt ses på som “hengsler” i hårnålsdannelsen. Når membranene er dratt tilstrekkelig nærme hverandre ved hjelp av to eller flere sett av trimerstrukturer vil det dannes en fusjonspore som slipper innholdet i virusmembranen ut i vertscellens cytosol (12).



**Figur 2:** Illustrerer (reseptormediert) endocytose og mekanismen for membranfusjon med klasse I fusjonspeptid. I eksempelet brukes influensavirus. Det lyseblå hemagglutinet tilsvarende reseptorbindende domene, og deltar ikke aktivt i selve fusjonsmekanismen. Tredje trinn i figuren viser at protoner også går gjennom ionekanaler til virusets indre, og endringen i pH her fører til at RNA-et dissosierer fra nukleokapsidet (merket M1) (12).

## 1.6 Replikasjonen av SARS-CoV-2

Etter binding til ACE2, endocytose og fullført membranfusjon kan det virale RNA-et frigjøres i vertscellens cytoplasma. Genomet til SARS-CoV-2 gjenkjennes umiddelbart av vertscellens ribosomer på grunn av +ssRNA-strukturen med 5'-prime cap og 3'-poly-A-hale. Translasjonen, hvor RNA-et oversettes til forløperproteiner, starter med en gang det virale genomet frigjøres i vertscellen. Det neste steget er replikasjon og transkripsjon, der deler av genomet brytes ned for å danne subgenomisk RNA. Subgenomisk RNA koder for spesifikke deler av viruset, som S-protein, M-protein, E-protein og N-protein. Gjennom transkripsjon og translasjon av subgenomisk RNA dannes flere kopier av de ovennevnte proteinene. Proteinene modifiseres videre i vertscellens endoplasmatiske retikulum (ER) og overføres etter hvert til golgiapparatet hvor et intakt infeksiosøst virion frigjøres i en vesikkel (se figur 3). Coronavirusets overtakelse pålegger vertscellen stress, og apoptose blir resultatet dersom infeksjonen overvelder vertscellens kapasitet til å opprettholde homeostase. RNA-rekombinasjon uten korrekturlesingsmekanisme blant de eksisterende coronavirus er mye av grunnen til utviklingen og fremveksten av nye coronavirus. Hyppigheten av rekombinasjon er foreslått å være høyere i genet som koder for det virale S-proteinet (7).



Figur 3: Skjematisert fremstilling av replikasjonsprosessen til SARS-CoV-2 (9).

### 1.6.1 *Furin*

Furin er et proteolytisk enzym og tilhører en proteinfamilie som kalles proprotein-konvertaser. Det spiller en stor regulatorisk rolle ved inaktivering, aktivering og modifisering av enzymer, hormoner, vekstfaktorer, reseptorer, adhesjonsproteiner og plasmaproteiner. Furin er også involvert i en rekke patologiske tilstander, blant annet ved flere virusinfeksjoner som HIV, meslinger, influensa og SARS-CoV-2 (13).

Mesteparten av furin akkumuleres i golgiapparatet hvor det aktiverer forløperproteiner. Det er også uttrykt i det endosomale systemet, og er aktivt ved en pH på 5-8. Furin har en veldefinert og smal substratspesifisitet. Den er også kjent som paired basic amino acid cleaving enzyme (PACE) som henviser til at den spalter ved en sekvens med to basiske aminosyrer, der plasseringen og type aminosyre er av betydning. Den foretrukne sekvensen er RXKR eller RXRR, og furinet spalter etter den siste aminosyren i sekvensen. Når man skal henvise til spesifikke aminosyrer i en slik sekvens, betegner man aminosyren nærmest spaltningstedet P1, neste aminosyre P2 osv. P1 og P4 skal altså helst være okkupert av arginin (R), og P3 enten av lysin (K) eller arginin (R). Til tross for dette kan furin også spalte ved enden av sekvensen RXXR, men mindre effektivt (13).

### 1.6.2 *Transmembran protease serin 2 (TMPRSS2)*

TMPRSS2 er en del av en serinprotease-familie som blant annet finnes i eukaryoter. Det er 17 medlemmer av denne familien og hos mennesker er de ansvarlig for koordinering av diverse fysiologiske funksjoner. Noen av disse funksjonene omfatter immunrespons, fordøyelse, koagulasjon og reproduksjon ved aktivering av forløperproteiner.

Serinproteaser har også betydning for patologiske prosesser som prostatakreft og virusinfeksjon. Det forskes mye på inhibering av TMPRSS2 og andre type 2 transmembrane serinproteaser med hensyn til virusinfeksjon. Grunnlaget for dette er deres viktige rolle i priming av fusjonsproteinene iblant annet influensa, parainfluensa og coronavirus. TMPRSS2 har trypsinliknende egenskaper. I dette ligger det at enzymet har spesifisitet for monobasiske spaltningsteder. I en substratsekvens vil TMPRSS2 spalte etter R (arginin) eller Y (tyrosin) i P1 (14).

### 1.6.3 Cathepsin B og L

Cathepsin B og L tilhører papain-familien (C1) i CA-klanen av cysteinproteaser (15). Hos mennesker er 11 subtyper av cathepsiner funnet. De spiller en viktig rolle i degradering og prosessering av proteiner i lysosomer som er involvert i hydrolysering av forløperpeptidet for noen zymogener (proenzymer) eller hormoner slik at de oppnår en aktiv form.

Avvikende aktiviteter hos cathepsiner kan være involvert i patologiske tilstander.

Cathepsin B er assosiert med flere sykdommer som tumorinvasjon og metastase, revmatoid artritt (leddgikt), osteoartritt (slitasjegikt), osteoporose, pankreatitt, Alzheimers sykdom, inflammatorisk luftveissykdom, pneumocystose (lungebetennelse med soppen *Pneumocystis jiroveci*) og leverfibrose. Cathepsin L er involvert i invasjon og metastase av tumorer, aterosklerose, nyresykdom, virale infeksjoner osv.

Cathepsin B/L er begge endosomale proteaser, cathepsin B har pH-optimum på 3,0-6,5, mens cathepsin L har et noe høyere pH-optimum. Biokjemiske analyser har funnet at cathepsiner ofte foretrekker R i P1 etterfulgt av en aromatisk ring i P2 (16).

## 1.7 Renin-Angiotensin-Systemet (RAS)

RAS er et system av hormoner som regulerer blodtrykket og væskebalansen i kroppen (17). Aktivisering av RAS fører til en kjedereaksjon der arterioler kontraherer, tørstesenteret i hjernen stimuleres og utskillelse av urin reduseres. Resultatet av dette er økt blodtrykk og økt væskevolum.

Det første viktige enzymet i RAS er det peptidasespaltende enzymet renin. Renin produseres i de juxtaglomerulære cellene i nyrene. Frigjøring av renin kan skje på tre forskjellige måter: ved blodtrykksfall, redusert natriumionkonsentrasjon ( $\text{Na}^+$ ) i distale tubuli og stimulering av det sympatiske nervesystemet (17). Ved frigjøring av renin skilles enzymet ut til resten av sirkulasjonssystemet og føres med blodet rundt i hele kroppen.

Renin spalter proteinet angiotensinogen, som produseres og lagres i leveren.

Angiotensinogen er et inaktivt protein, det har ingen biologisk funksjon. Når angiotensinogen spaltes av renin dannes peptidet angiotensin I (Ang I), som er 10 aminosyrer langt. Klinisk sett har Ang I ingen stor betydning før det føres med blodstrømmen til lungene. I lungene produseres et enzym som kalles angiotensin

converting enzyme (ACE). ACE spalter av to aminosyrer fra Ang I, og danner angiotensin II (Ang II). Ang II er en generalisert vasokonstriktor. Økt plasmakonsentrasjon av Ang II fører til at arterioler i alle organer kontraherer. Reduksjon i arteriolenes diameter fører til at motstanden øker og dersom hjertets minuttvolum holder seg uforandret, øker det arterielle blodtrykket. Vasokonstriksjon i nyrenes efferente arterioler vil øke filtrasjonshastigheten i glomeruli (GFR) slik at mindre  $\text{Na}^+$  reabsorberes. Dermed vil plasmavolumet øke og blodtrykket stige. Som følge av mindre reabsorpsjon av  $\text{Na}^+$ , vil  $\text{Na}^+$ -konsentrasjonen øke i distale tubuli slik at renin ikke lenger skilles ut. Ang II fungerer altså som en negativ feedback for reninutskillelsen.

Ang II stimulerer også binyrebarken til å skille ut hormonet aldosteron. Aldosteron stimulerer distale tubuli i nyrene til reabsorpsjon av  $\text{Na}^+$ . Sammen med  $\text{Na}^+$  reabsorberes også kloridioner og vann, slik at virkningen av aldosteron blir redusert utskillelse av salt og vann (17). Som følge av dette øker plasmavolum og blodtrykket. Ang II stimulerer også utskillelse av ADH (antidiuretisk hormon) fra hypofysens baklapp. Dette hormonet øker epitelcellenes permeabilitet for vann i distale tubuli og samlerør (17). Dermed reabsorberes mer vann og slik at blodtrykket og blodvolum igjen stiger.

I forhold til infeksjon med SARS-CoV eller SARS-CoV-2 er RAS relevant ettersom virusene benytter ACE2 som reseptor. ACE2 er sentralt i RAS, særlig når det er snakk om å motvirke de negative følgene av systemet.

## **1.8 Aktuelle reseptorer**

### *1.8.1 ACE2*

ACE2 ble oppdaget som en homolog av ACE og fungerer som dens fysiologiske motvekt og gir homeostatisk regulering av sirkulerende Ang II-nivåer. ACE2 er et glykosylert sinkmetalloenzym og har funksjon som karboksypeptidase. Det er lokalisert som ektoenzym på overflaten av endotel og andre celler (18). Enzymet uttrykkes blant annet i lunger, hjerte, nyrer og tarm.

ACE2 i full lengde består av et N-terminalt peptidasedomene (PD) og et C-terminalt kollektinlignende domene (CLD) som ender med en enkelt transmembran spiral og et ca. 40-sidekjedet intracellulært segment (19). Det primære substratet for ACE2 er Ang II, men det kan også hydrolysere en rekke andre fysiologiske substrat. I tillegg fungerer ACE2 i andre ikke-katalytiske cellulære roller, inkludert transportregulering av nøytrale aminosyrer i tarmen. Den fungerer også som reseptor for SARS-CoV og SARS-CoV-2. ACE2 reguleres på flere nivåer, inkludert transkripsjonell, posttranskripsjonell (miRNA og epigenetisk) og posttranslasjonell gjennom avfelling fra celleoverflaten.

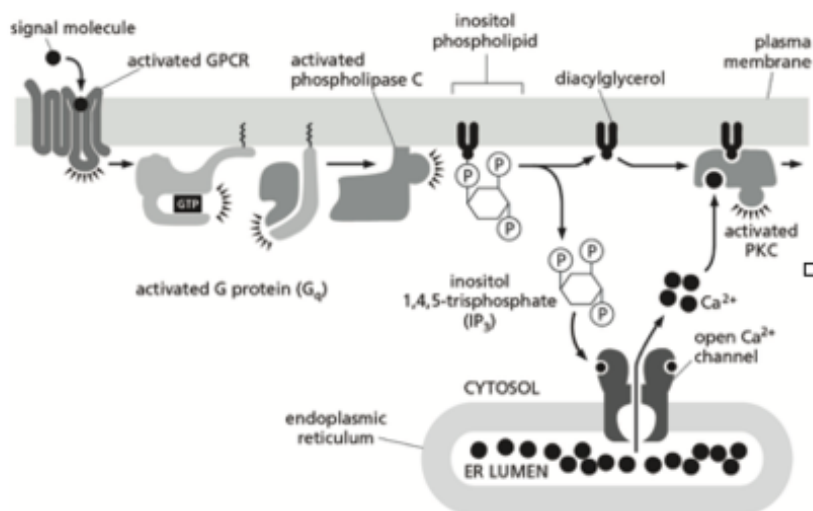
Til tross for store sekvenslikheter mellom ACE og ACE2, er det noen forskjeller i substratspesifisitet ved at ACE2 utelukkende fungerer som en karboksypeptidase som fjerner en enkelt C-terminal aminosyre fra Ang II og genererer Ang-(1-7). I kontrast fungerer ACE hovedsakelig som en karboksydipeptidase (peptidylpeptidase) som fjerner det C-terminale dipeptidet fra Ang I for å danne Ang II. Angiotensinmetabolismen, med ACE som danner Ang II og ACE2 som fjerner den ved konvertering til Ang-(1-7), gir metabolitter som virker gjennom tre forskjellige reseptorer: Ang II type 1 reseptor (AT1R), Ang II type 2 reseptor (AT2R) og MAS.

### 1.8.2 *G-koblet reseptor (GPCR)*

Flere av de aktuelle reseptorene er G-protein. Når liganden binder til reseptoren vil guanin trifosfat (GTP) aktiveres med påfølgende dissosiering av  $\alpha$ -subenhet fra  $\beta\gamma$ -komplekset (se figur 4). Signalveien ved aktivering av G-proteiner er distinkt fra andre ved at fosfolipase C (PLC) som også er et membranbundet enzym initierer kaskadereaksjonen. PLC initierer kaskade ved å spalte en del av inositol fosfolipid fra plasmamembranen, dette fører til to nye strukturer, diacylglycerol (DAG) som fortsatt er membranbundet, og inositol 1,4,5-trifosfat (IP3) som frigjøres til cytosol. IP3 binder  $\text{Ca}^{2+}$ -kanaler på ER. Konsentrasjonen av  $\text{Ca}^{2+}$  i cytosol er vanligvis mye lavere enn i ER og ekstracellulær væske. Det er godt kjent at økt konsentrasjon av cytosolisk  $\text{Ca}^{2+}$  stimulerer ulike celler til biologisk aktivitet. DAG, som fortsatt er membranbundet binder protein kinase C (PKC) som også aktiveres av økt  $\text{Ca}^{2+}$ -konsentrasjon. PKC fosforylerer bestemte målproteiner for å aktivere disse. Dette medfører ytterligere kaskade, og har en forsterkende effekt på det opprinnelige signalet fra liganden. I det kardiovaskulære systemet er effektene av en slik stimulering hypertrofi,



hyperplasi, celleprolifisering, inflammasjon og kontraksjon av glatt muskulatur i endotel. I hjertemuskulaturen er det vist at aktivering av PKC bidrar til en abnormal regulering av cytosolisk  $\text{Ca}^{2+}$ . Konsekvensene av dette er rearrangering av cytoskjelett og skade på T-tubuli (20).



**Figur 4:** En generell fremstilling av GPCR som starter med aktivering ved binding av et signalmolekyl. Reaksjonsveien ender i ER der  $\text{Ca}^{2+}$ -kanaler åpnes og den cytosoliske  $\text{Ca}^{2+}$ -konsentrasjonen øker (21).

### 1.8.3 Aktivering av AT1R og MAS-reseptor.

AT1R i det kardiovaskulære systemet er en G-koblet reseptor (GPCR) som binder ligand.

Ang II er det aktuelle signalmolekylet (liganden) som binder til reseptoren.

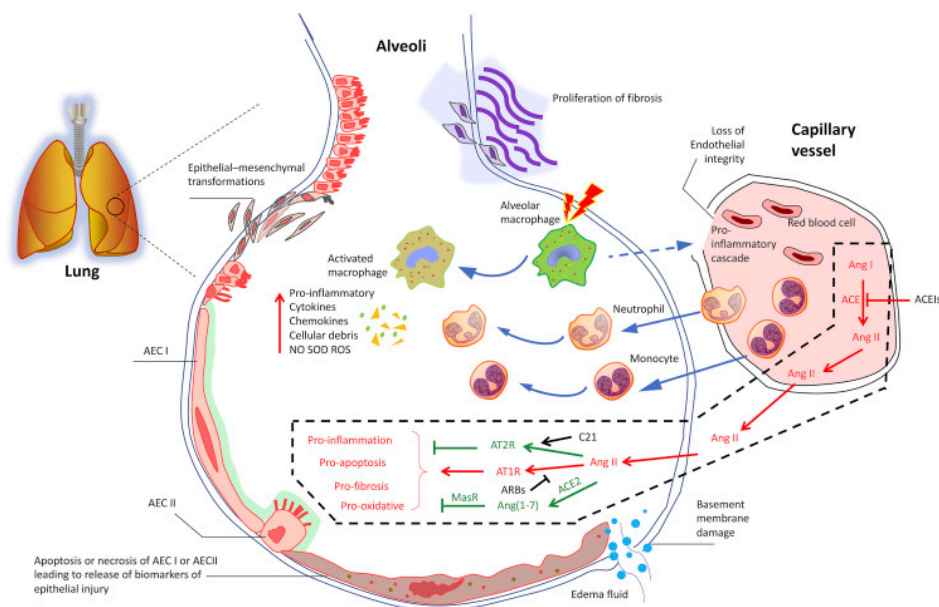
SARS-CoV-2 kan indusere såkalt acute respiratory distress syndrome (ARDS) som kjennetegnes ved infiltrering av betennelsesceller, tap av vevsintegritet, økt permeabilitet i kapillærer, lungeødem og fibrose. Aktivering av den klassiske RAS akse

(ACE/AngII/AT1R) er knyttet til flere av disse tilstandene. ACE er uttrykt i store mengder i lungenes kapillærnettverk. Ettersom ACE katalyserer dannelsen av Ang II har man derfor høyere konsentrasjoner av Ang II i dette området. Ved ARDS induseres lekkasje av Ang II til alveolene. Ang II opererer som ligand for AT1R. Denne reseptoren er funnet primært i clara og type 2 alveolære epitelceller i lungene (22). Clara-celler finnes i bronkiolene som markerer overgangen til den delen av respirasjonssystemet der gassutveksling foregår.

Type 2 alveolære epitelceller er svært tallrike i alveolene og er den celletypen som produserer og sekreterer surfaktant (23).

Aktivering av AT1R promoterer rekruttering av betennelsesceller og inducerer apoptose i alveolære epitelceller og mikrovaskulære endotelceller (se figur 5). Dette resulterer i økt mikrovaskulær permeabilitet og nedsatt vevsintegritet og er knyttet til pro-inflammatorisk cytokinutskillelse og kjemotakse av makrofager og nøytrofile granulocytter. Man har funnet at Ang II-nivåer har positiv korrelasjon med tumor nekrose faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Det er kjent at TNF- $\alpha$  er med på å øke karendotelets permeabilitet og er en bidragsyter til kjemotakse (24). TNF- $\alpha$  er også i stand til å aktivere NF- $\kappa$ B-reaksjonsvei som er knyttet til utskillelse av pro-inflammatoriske signaler, apoptose og økt cytokinproduksjon (25). Pro-oksiderende signaler ved AT1R/Ang II er vist å fremme dannelsen av fibrøst vev og skade på lungeepitelet gjennom blant annet frie radikaler, slik som superoksid (22).

Ang-(1-7)/MAS-aksen utgjør en viktig motvekt til den klassiske RAS aksens. Ang-(1-7) er et nedbrytningsprodukt av Ang II. Ang-(1-7) fungerer som ligand på MAS-reseptoren. Dette er en GPCR og de underliggende mekanismene rundt denne stimuleringen er ikke fullstendig kartlagt. Man vet dog at MAS reduserer cytokinutskillelse og inhiberer fibrotiske reaksjonsveier i sykdommer som aterosklerose, cerebral iskemi, overvekt, kronisk leversykdom og astma (26;27).



**Figur 5:** Figuren gir en enkel oversikt over immunrespons og effektene ved stimuli av ulike reseptorer i alveolene (22).

## 1.9 Blodtrykkssenkende medisiner

### 1.9.1 Funksjon

ACE-inhibitorer (ACEi) og angiotensinreseptor blokkere (ARB) brukes i behandling av hypertensjon. Selv om effekten er den samme fungerer de på ulik måte. ACEi inhiberer katalytisk evne hos ACE, slik at det dannes mindre Ang II. ARB konkurrerer med Ang II om binding til AT1R og fungerer dermed som en antagonist (28).

### 1.9.2 Effekter ved COVID-19

Det har vært mange spørsmål rundt hvilken innvirkning ARB og ACEi kan ha ved COVID-19-infeksjon. Det er kjent fra studier på dyr at ACE2-ekspressjon øker ved bruk av disse medisinene og dermed er det naturlig å tenke at mer tilgjengelig ACE2 kan fremme infeksjon med SARS-CoV-2. Dette spørsmålet har man tatt stilling til ved å indusere luftveisinfeksjon med SARS-CoV-2 i mus, samtidig som det ble gitt behandling med ARB. Resultatene tyder på at ARB hindrer forverring av luftveisinfeksjonen. Det finnes heller ingen kliniske eller eksperimentelle bevis som tyder på at man er mer mottakelig for SARS-CoV-2-infeksjon eller at tilstanden til COVID-19-pasienter forverres dersom vedkommende behandles med slike medisiner (29).

## 2 Metode

Teoridelen av denne oppgaven tar for seg temaer fra flere fag vi har hatt gjennom de tre årene ved NTNU. De aktuelle fagene er mikrobiologi, cellebiologi, anatomi/fysiologi og kjemi, og mye av informasjonen er hentet fra disse lærebøkene. I tillegg ble PubMed benyttet, som er en forskningsdatabase for biomedisin i regi av National Center for Biotechnology Information (NCBI) i USA. PubMed ble brukt for å finne relevant forskningslitteratur og informasjon som gikk dypere enn lærebøkene vi hadde tilgjengelig. For å få tilgang til flest mulig artikler gikk vi gjennom Oria som har grensesnitt mot PubMed, og når campus nå har vært stengt har dette har latt seg gjøre hjemmefra ved bruk av VPN.

### 2.1 Fremgangsmåte

I starten av søkeprosessen ble det brukt generelle søkeord som “COVID-19”, “SARS-CoV-2” og “SARS-CoV”. Gjennomgang av noen artikler ga en generell kunnskap om SARS-CoV-2 slik at videre søk kunne spesifiseres ytterligere. De nye søkeordene “ACE2” og “furin” ble satt sammen med “SARS-CoV-2” og “SARS-CoV” og et nytt søk ble foretatt:

```
((SARS-CoV-2) AND (SARS-CoV)) AND (("2019/01/01"[Date - Completion]:  
"3000"[Date - Completion])) AND ((ACE2) OR (furin)).
```

Fra dette ble artikkel #3, #4 og #7 i resultatlisten funnet, i tillegg til flere artikler som ikke ble satt opp i resultatlisten ved dette søket. Artikkel #3, Wrapp *et al.* ledet i retning av å se videre på S-protein.

Ettersom COVID-19 nylig oppsto var det mye ny forskning rundt temaet. På grunn av dette hadde ikke alle artiklene ennå blitt fagfellevurdert, men allikevel publisert ettersom COVID-19-situasjonen var prekær. Disse artiklene ble brukt i minst mulig grad da det manglet kvalitetssjekk.

Det ble også brukt en kombinasjon av søkeord ved bruk av “(AND)” og “(OR)” for å begrense antall treff. Da det ble søkt etter etablert forskning, for eksempel forskning på intracellulære reaksjonsveier, ble det filtrert ut forskning nyere enn hhv. 5 og 10 år.

Filtrering av review og kliniske forsøk ble også benyttet til tider.

Da søkeprosessen ble vanskelig benyttet vi ytterligere filter, et eksempel er søking på Cathepsin B/L. Her var det vanskelig å finne relevante artikler, men ett søk som ga resultater ble som følger:

Søkeord: cathepsin (and) function (or) viral.

Tid: Nyere enn 10 år

Type artikkel: Review

Art: Human

Språk: Engelsk

## 2.2 Nøkkelord

De viktigste nøkkelordene brukt som søkeord i PubMed er vist i tabell 2.

**Tabell 2:** Søkeord som ble brukt i PubMed for å finne relevante artikler.

SARS-CoV-2
SARS-CoV
ACE2
S-protein
COVID-19
Proteases
TMPRSS2
Cathepsin B/L
Predicted intrinsic disorder (PID)
ARDS
AT1R
AT2R
MAS
Ang-(1-7)
Ang II
RAS
Furin

### 3 Resultat

De utvalgte artiklene i tabell 3 utgjør grunnlaget for diskusjonen og er spesielt relevante for å kunne besvare hvorfor dagens situasjon er annerledes enn SARS-CoV-utbruddet i 2003.

**Tabell 3:** Tabellen gir en oversikt over artiklene som var mest relevante for å besvare problemstillingen.

Artikkel 1	Tittel	Shell disorder analysis predicts greater resilience of the SARS-CoV-2 (COVID-19) outside the body and in body fluids.
	Forfattere	Goh GK-M, Dunker AK, Foster JA, Uversky VN.
	Publikasjon	Microbial Pathogenesis
	Relevans	Infektivitet
Artikkel 2	Tittel	Phylogenetic Analysis and Structural Modeling of SARS-CoV- 2 Spike Protein Reveals an Evolutionary Distinct and Proteolytically Sensitive Activation Loop.
	Forfattere	Jaimés JA, André NM, Chappie JS, Millet JK, Whittaker GR.
	Publikasjon	Journal of Molecular Biology
	Relevans	S-protein
Artikkel 3	Tittel	Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation.
	Forfattere	Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh C-L, Abiona O, et al.
	Publikasjon	Science
	Relevans	S-protein
Artikkel 4	Tittel	Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein.
	Forfattere	Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler D.
	Publikasjon	Cell
	Relevans	S-protein
Artikkel 5	Tittel	Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2.
	Forfattere	Wang Q, Zhang Y, Wu L, Niu S, Song C, Zhang Z, et al.
	Publikasjon	Cell
	Relevans	S-protein
Artikkel 6	Tittel	The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade.
	Forfattere	Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E.
	Publikasjon	Antiviral Research
	Relevans	S-protein
Artikkel 7	Tittel	Molecular Mechanism of Evolution and Human Infection with SARS-CoV-2.
	Forfattere	He J, Tao H, Yan Y, Huang S-Y, Xiao Y.
	Publikasjon	Viruses (Open Access online tidsskrift under mdpi.com)
	Relevans	S-protein
Artikkel 8	Tittel	SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes.
	Forfattere	Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, Litvinukova M, et al.
	Publikasjon	Nature Medicine
	Relevans	Patogenese
Artikkel 9	Tittel	Hypertension, the renin–angiotensin system, and the risk of lower respiratory tract infections and lung injury: implications for COVID-19.
	Forfattere	Kreutz R, Algharably, Azizi, Dobrowolski, Guzik, Januszewicz et al.
	Publikasjon	Cardiovascular Research
	Relevans	Patogenese
Artikkel 10	Tittel	Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China.
	Forfattere	Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al.
	Publikasjon	Lancet
	Relevans	Patogenese
Artikkel 11	Tittel	Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure.
	Forfattere	Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, et al.
	Publikasjon	Nature (som "brev til redaktøren")
	Relevans	Patogenese

## 4 Diskusjon

Diskusjonen er todelt og tar for seg reseptorbinding mellom virus og ACE2, samt forskjeller mellom SARS-CoV og SARS-CoV-2 på protein- og aminosyrenivå. Disse forskjellene er essensielle for å forstå hvorfor dagens situasjon med SARS-CoV-2 er annerledes enn situasjonen med SARS-CoV i 2003. Den andre delen tar for seg ekspresjon av ACE2 og vertsproteaser, og hvilke organer som potensielt kan infiseres av virusene. Det kliniske sykdomsbildet gir en bredere forståelse av virusene og alvorligheten av situasjonen.

### 4.1 PID gruppering av coronavirus

Før MERS-utbruddet i 2012 ble en modell laget for å klassifisere og forutsi nivåene av respirasjons- og fekal-oralt overføringspotensiale for coronavirus (30). Modellen ble laget ved bruk av artificial intelligence (AI) og empiribaserte molekylære verktøy for å forutsi nivået av uorden i proteiner. Ved å bruke prosentene av intrinsisk uorden i N- og M-proteiner fra coronavirus, grupperte modellen virusene i tre grupper: A, B og C. Denne modellen kalles predicted intrinsic disorder (PID). Proteinenes egenforstyrrelse vil si at deler av, eller et helt protein, mangler en fast eller ordnet tredimensjonal struktur.

Hovedfokuset for modellen er de virale M- og N-proteinene. Det er kun Goh *et al.* som har utført denne typen gruppering for coronavirus og det er derfor lite data som direkte bygger opp under teorien. Ser en på hvordan de ulike coronavirus oppfører seg i miljøet kan teorien likevel se ut til å stemme.

Proteinsekvensene for de utvalgte coronavirus M- og N-proteiner ble lastet ned fra kunnskapsdatabasen UniProt (31). Sekvensene ble matet inn i ulike databaser som til slutt ga predisposisjon av egenforstyrrelse for hver sidekjede. Sidekjeder med score på 0,5 og over anses som forstyrret, mens sidekjeder med score under 0,5 sees på som ordnet (30). Resultatet fra analysene representeres i form av prosentandelens egenforstyrrelse (PID),

som er definert som antall forstyrrede sidekjeder dividert på det totale antallet sidekjeder i det aktuelle proteinet.

Modellen er hovedsakelig basert på analysen av PID-verdier for N-protein. N-PID indikerer virusets overføringsmetode, og grupperer virusene i tre grupper. M-PID gir en indikator på virusets motstandsdyktighet i tøffe miljø. Kategori A består av virus som har større luftveisoverføringsevne og lavere fekal-oralt overføringspotensiale. Kategori B involverer virus med intermediære nivåer av både respirasjons- og fekal-oralt overføringspotensiale, mens kategori C består av virus med lavere luftveisoverføring og høyere nivå av fekal-oralt overføringspotensiale. Høyere indre skallforstyrrelse er ofte assosiert med større smitteevne, spesielt med tanke på luftveisoverføringspotensial. Virus i kategori A har N-PID over 53 %, mens kategori C omfatter virus med N-PID under 47 %. Virus med N-PID mellom disse verdiene anses som kategori B. Tabell 4 viser PID-kategori og verdier for SARS-CoV og SARS-CoV-2.

**Tabell 4:** PID-klassifisering og PID-verdier for SARS-CoV og SARS-CoV-2 (32).

Kategori	CoV	M PID	N PID
B	SARS-CoV	8 %	50 %
B	SARS-CoV-2	6 %	48 %

I følge PID-klassifisering tilhører både SARS-CoV og SARS-CoV-2 gruppe B. SARS-CoV har M-PID = 8 % og N-PID = 50 %, mens SARS-CoV-2 har M-PID = 6 % og N-PID = 48 %. M-PID-prosentene for andre coronavirus som er gruppert i PID varierer fra 4 til 23 % og gjennomsnittlig M-PID-verdi er 10 %. Det er kun ett coronavirus (HCoV-HKU1) som har lavere M-PID verdi enn SARS-CoV-2. Dermed har SARS-CoV-2 et av de hardeste ytre skallene blant de coronavirusene som er gruppert i PID (30). Ettersom det ytre skallet spiller en stor rolle i å beskytte virionet, gir det hardere ytre skallet viruset større motstandskraft mot omgivelsene utenfor kroppen og i tilstedeværelsen av fordøyelsesenzymer som finnes i spytt, slim og andre kroppsvæsker. Som et resultat av det harde ytre skallet er SARS-CoV-2 i stand til å forbli aktivt i lenger tid, og derfor kreves det trolig et mindre antall virale partikler for å infisere andre mennesker. Fordi SARS-CoV-2



er mer motstandsdyktig mot fordøyelsesenzymer, kan en infisert kropp potensielt skille ut mer smittsomme viruspartikler. Dette er dog vanskelig å si med sikkerhet da flere studier kun har påvist SARS-CoV-2-RNA i fæces hos COVID-19-pasienter. I en studie med 73 pasienter testet over 50 % positivt på SARS-CoV-2-RNA i avføring. I tillegg ble det funnet at 23,3 % av disse også testet positivt på virus-RNA etter de testet negativt på SARS-CoV-2 i luftveiene (32). Fra teoridelen i denne oppgaven vet vi at virus-RNA ikke er nok til å infisere en vert ettersom viruset er avhengig av sin ytre struktur for å binde seg til, og fusjonere med vertscellemembranen. Samtidig er det et betydelig antall flere smittetilfeller for SARS-CoV-2 i 2020 enn SARS-CoV i 2003. Deler av forklaringen på dette kan ligge i PID, og teorien bak PID-klassifiseringen bør undersøkes ytterligere da det kan gi forskere en viktig pekepinn rundt spredningspotensialet til coronavirus.

Det er også forsket på forskjeller i konkrete aminosyresekvenser med hensyn på SARS-CoV-2 og SARS-CoV sin binding til ACE2 og fusjon til vertscellemembranen. Dette vil bli belyst i den neste delen.

## **4.2 Forskjeller i S-protein mellom SARS-CoV og SARS-CoV-2**

### *4.2.1 Overensstemmelse mellom S-protein for SARS-CoV-2 og SARS-CoV*

Ved sammenlikning av proteinsekvensene (se figur 6) til én utvalgt stamme av SARS-CoV-2 med SARS-CoV (med hensyn på S-protein) har man funnet en overensstemmelse på 76 %. S1 har en likhet på 64 % og S2 en likhet på 90 %. RBM er den minst preserverte proteinsekvensen, og her har man funnet 50 % likhet mellom de to virusene (33). I tillegg har det blitt observert en potensielt relevant innsatt sekvens i S1/S2 (34). Forskjellene i RBM og S1/S2 kan ha betydning for SARS-CoV-2 sin virulens og vevstropisme, og dette undersøkes videre i diskusjonen.





Figur 7



Figur 8

**Figur 7:** Viser RBD i grønt, her befinner det seg i ned konformasjon. **Figur 8:** Viser RBD i grønt, her befinner det seg i opp konformasjon (35). Begge figurene er fra SARS-CoV-2.

#### 4.2.3 Bindingsforskjeller mellom S-protein for SARS-CoV-2 og SARS-CoV

Peptidasedomenet (PD) i ACE2 inneholder den regionen der bindingssetet til RBD befinner seg. Man har identifisert tre kritiske bindingspunkter i ACE2. I PD består denne regionen av to alfahelikser (lilla alfahelikser i figur 9). Bindingen oppstår som følge av polare interaksjoner (van Der Waalske bindinger og hydrogenbindinger) og ionebindinger. I proteinfolding er det vanlig at de ikke-polare sidekjedene pakkes innvendig i proteinet for å unngå kontakt med vann (hydrofobt). De polare sidekjedene ligger i den ytre strukturen, og det er disse aminosyrene som reagerer med det omkringliggende miljøet.



**Figur 9:** De stiplede linjene peker ut de tre kritiske bindingsområdene fra RBM i SARS-CoV-2 og SARS-CoV. Totalt for dette området er det identifisert 69 flere van der Waalske bindinger for SARS-CoV-2. Lyseblå og orange struktur definerer henholdsvis internt domene og eksternt domene i RBD. Lilla og grønt definerer subdomene 1 og 2 (PD) i ACE2 (36).

Sammenligninger på atomnivå avdekker et større antall interaksjoner mellom SARS-CoV-2 og ACE2 enn for SARS-CoV og ACE2. Det er viktig å presisere at én aminosyre kan inngå flere bindinger samtidig. På det meste er det funnet nærmere 30 van der Waalske bindinger fra én aminosyre. Dette sier noe om kompleksiteten i å kartlegge disse bindingene da RBD inneholder rundt 200 aminosyrer. I tillegg til flere interaksjoner tyder forskning på at SARS-CoV-2 også binder sterkere til ACE2, noe som kan skyldes både flere bindinger, og sterkere bindinger. Det er noe usikkerhet rundt nøyaktig hvor mye sterkere bindingen for SARS-CoV-2 er da én forskergruppe fant 10-20 ganger så sterk binding (35), mens en annen fant ca. 4 ganger så sterk binding (36). Ut fra denne observasjonen kan det se ut til at SARS-CoV-2 har utviklet seg til å gjenkjenne og binde til det kritiske bindingsstedet på ACE2 sterkere og enda mer spesifikt, noe som gjør smitteoverføringsevne og kapasitet desto større og mer effektiv. Tabell 5 viser en sammenlikning av bindingstyper fra RBM i SARS-CoV-2 og SARS-CoV, som er det området i S-proteinet hvor man har funnet størst forskjeller i aminosyresammensetning. I ACE2 er det funnet 24 aminosyrer som har van der Waalske bindinger til dette området i de respektive virusene.

**Tabell 5:** Viser en sammenlikning av antall bindinger av de forskjellige typene mellom SARS-CoV-2 og SARS-CoV i RBM med hensyn på van der Waalske krefter (36).

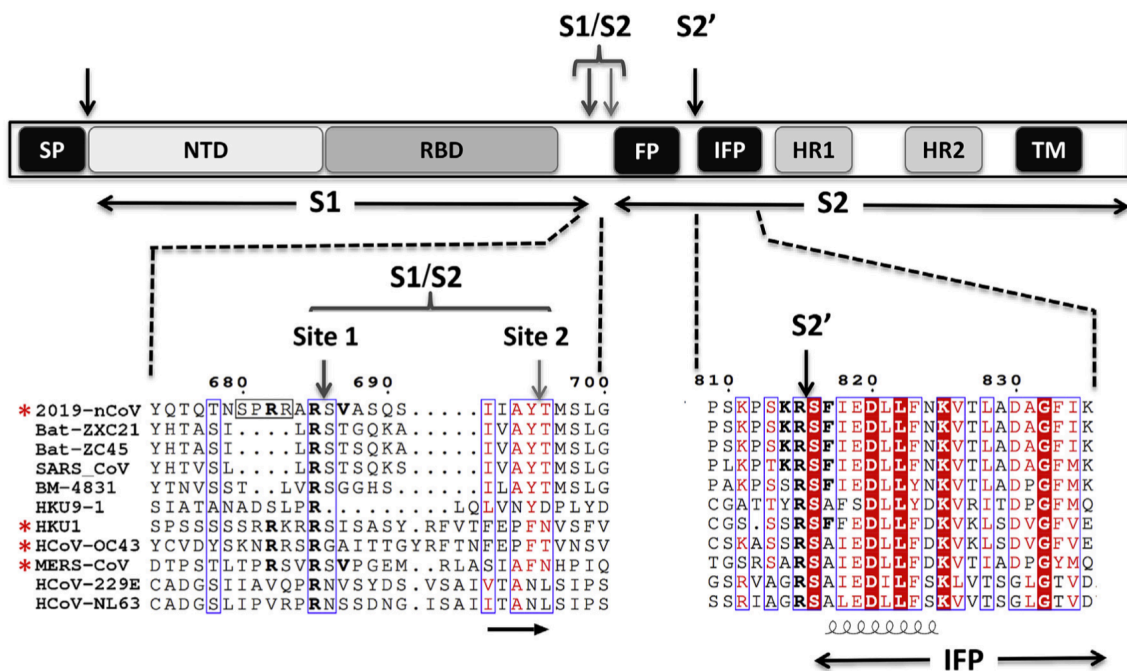
Bindingstype	SARS-CoV	SARS-CoV-2
Van der Waalske krefter	213	288
Hydrogenbindinger	11	16
Ionebindinger	0	1

#### 4.2.4 En ny potensiell spaltningssekvens i SARS-CoV-2

I tillegg til betydningen av økt antall og styrke i bindingene til ACE2, kan tilstedeværelsen av en ny sekvens i SARS-CoV-2 føre til økt sannsynlighet for at den nødvendige primingen av fusjonsproteinet skjer tidlig nok, og i flere celletyper.

S1-delen av sekvensen til S-proteinet har betydning for binding til vertscellerreseptoren ACE2, mens S2-delen er knyttet til fusjon. Det finnes tre spesifikke spaltningssteder i S2-delen som er relatert til fusjonsprosessen. De to første spaltningsstedene referes ofte til som site 1 og site 2, disse befinner seg i S1/S2 (se figur 10). Det er denne delen av sekvensen som definerer skillet mellom S1 og S2. Man har satt grensen akkurat her fordi S1 som er bundet til ACE2 vil falle bort som et eget kompleks (S1-ACE2) ved spaltning. Den gjenstående delen av S-proteinet består altså av S2. Det er essensielt å forstå dette spaltningsstedet (S1/S2) ettersom det er identifisert karakteriske forskjeller mellom SARS-CoV-2 og SARS-CoV her (36;37). Det tredje spaltningsstedet, ofte referert til som S2', er uinteressant i denne sammenhengen da sekvensene for de to virusene er identiske her.

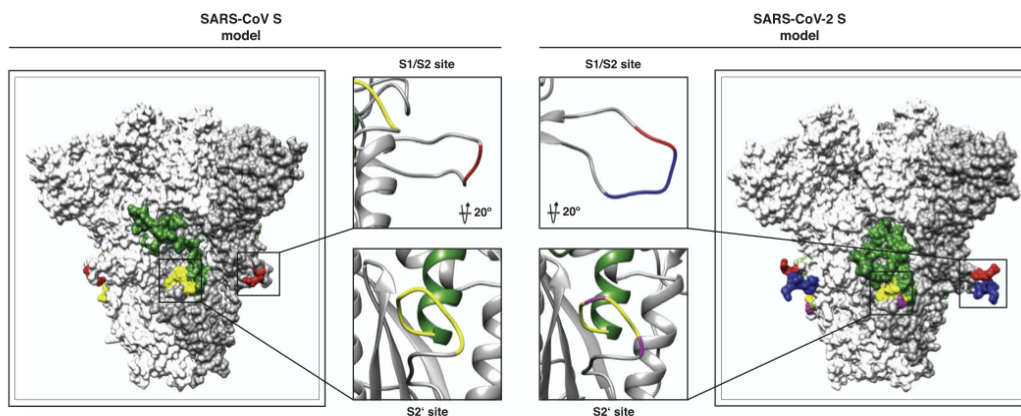
S1/S2 hos SARS-CoV-2/SARS-CoV innehar 27 aminosyrer og 23 aminosyrer, respektivt. De fire ekstra aminosyrene hos SARS-CoV-2 kan forklare deler av den omfattende vevstropismen da disse aminosyrene åpner for spaltning av furin (se figur 10). S1/S2 deles i to konkrete områder av betydning for proteasespaltning. Det første refereres til som "site 1" og det andre som "site 2" (34), vi velger å kalle disse område 1 (O1) og område 2 (O2).



**Figur 10:** En mer detaljert fremstilling av S-proteinet med det viktige spaltningsstedet i S1/S2 (O1 og O2) (34).

I aminosyre #680-684 for SARS-CoV-2 har man funnet følgende sekvens: serin (S), prolin (P), arginin (R) og arginin (R). Denne sekvensen er ny og er ikke tidligere funnet hos noen andre beta-coronavirus i subslekt B. Furin gjenkjenner aminosyrene i #682-685, RRAR etterfulgt av restriksjonsspaltning før SV i O1. Denne gjenkjenningen er mulig som følge av den nye sekvensen med SPRR, som altså tilfører en spaltningssekvens som er unik for SARS-CoV-2 i denne klassen (men finnes hos flere andre beta-coronavirus i slektene A og C) (34). Dersom prosesseringen i O1 ikke finner sted har viruset i tillegg mulighet til å benytte seg av proteasespaltning ved O2 slik som SARS-CoV (34).

Sekvensen som utgjør spaltningsstedet S1/S2 i SARS-CoV danner en struktur som ligger tett inntil siden av S-proteinet. I SARS-CoV-2 er denne delen utvidet og har en mer eksponert plassering (se figur 11). Dersom denne kritiske sekvensen er mer tilgjengelig for miljøet rundt er det også tenkelig de aktuelle proteasene lettere får tilgang til spaltning (33).

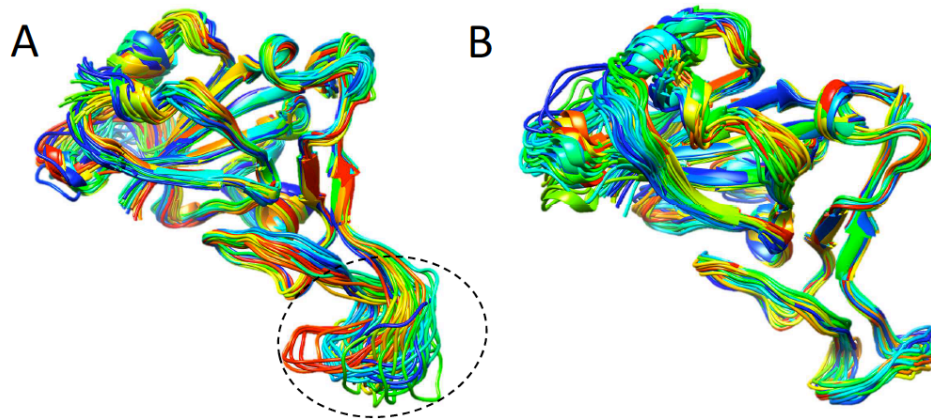


**Figur 11:** Viser en fremstilling av den mer eksponerte S1/S2-delen for SARS-CoV-2 sammenliknet med SARS-CoV. På figuren vises også S2'som tidligere nevnt har identiske sekvenser hos de to virusene (33).

#### 4.2.5 Forskjeller mellom virusene basert på sesongvariasjoner i infektivitet, fri energi-basert stabilitet og relasjon til evolusjonsmekanismer

He *et al.*, som ble publisert 10. april fant blant annet at SARS-CoV-2 kan binde humant ACE2 med høyere bindingsaffinitet enn SARS-CoV. Det ble brukt svært omfattende datamodelleringsforsøk med anerkjente egenutviklede verktøy som også viser flere andre betydningsfulle resultater (38). De var i stand til å lage en teoretisk modell som samsvarte svært godt med den eksperimentelle røntgenkristallografimodellen til Yan *et al.* (19), og brukte denne til å gjøre inngående studier av bindingsatferd. Modellen brukte proteinstruktur, kjente bindingsstrukturer fra SARS-CoV, samt avansert programvare og langvarige simulasjoner med store prosesseringsressurser til å analysere forskjeller i RBD-ACE2-bindingsaffinitet for de to virusene. Data fra samme modell ble også brukt til å vurdere forskjeller i total fri energi mellom S-protein-strukturene og dermed finne ulikheter i deres stabilitet i miljøer utenfor en vert, samt å vurdere fleksibilitet (se figur 12) i bindingsstrukturen for selve RBD-domenene med hensyn til ulikheter i løselighet og temperatursensitivitet.





**Figur 12:** *Fleksibilitet i RBD-proteinet (datamodell): A (SARS-CoV-2) og B (SARS-CoV) viser 50 representative simulerte forløp av RBD-proteinet til de to virusene. Reseptorbinding skjer i den svært fleksible innringede regionen, og forskjellen indikerer at SARS-CoV-2 trolig vil ha betydelig redusert sjanse for å binde effektivt til ACE2 ved høyere temperaturer (38).*

De konkluderer med at SARS-CoV-2 beviselig har høyere total bindingsaffinitet til humant ACE2 enn SARS-CoV, og at dette kan bidra til å forklare den høyere graden av infektivitet. Det slås også fast at S-proteinet i SARS-CoV-2 har lavere fri energi enn hos SARS-CoV, og dermed er mer stabil og kan tåle høyere temperaturer. Det antydes at dette kan knyttes til det evolusjonære trykket fra den vesentlig høyere kroppstemperaturen hos flaggermus, det naturlige reservoaret for disse coronavirusene. Til slutt påpekes betydningen av at SARS-CoV-2 sitt RBD-protein viser betydelig større fleksibilitet, i forhold til at bindingen da tross bedre overlevelse vil måtte overvinne en betydelig større “entropi-straff” for å binde i sommertemperaturer/varmt klima - noe som kan føre til en periode med vesentlig lavere infektivitet om sommeren sammenlignet med SARS-CoV. Men i motsetning til SARS-CoV, som i praksis forsvant etter sommeren, vil disse resultatene tyde på at man må kunne forvente en ny oppblomstring av pandemien når været blir kaldere igjen.

Forskjeller i S-proteinet har betydning for hvilke typer proteaser som er tilgjengelige, og er delaktig i spaltning av S-protein. SARS-CoV-2 sin nye sekvens i S1/S2 åpner for spaltning ved hjelp av furin. Videre vil vi beskrive ekspresjon av de ulike proteasene og betydningen av dette.



### 4.3 Normal ekspresjon av ACE2, TMPRSS2 og furin

Infeksjon med SARS-CoV eller SARS-CoV-2 er ikke kun avhengig av ACE2-reseptoren, men også av proteaser for priming. Koekspresjon av ACE2 og særlig TMPRSS2 er derfor nødvendig for viral inngang i en vertscelle.

For å undersøke hvilke vevstyper SARS-CoV-2 potensielt kan infisere, ble ekspresjon av viral inngangs-assosierte gener undersøkt i single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq) data i ulike vev fra friske donorer (39). ACE2-ekspresjonen var generelt lav i alle datasett som ble analysert, men ble oppdaget i celler fra flere vevstyper. Disse vevstypene inkluderte luftveier, hornhinne, spiserør, tarm, lever, galleblære, hjerte, nyrer og testikler. TMPRSS2 var sterkere og bredere uttrykt blant vevstyper. Celler fra luftveiene, hornhinnen, spiserøret, ileum, tarmen, galleblæren og vanlige galleganger viste ekspresjon av både ACE2 og TMPRSS2 i samme celle.

For å karakterisere spesifikke epitelcelletyper med ACE2-ekspresjon ytterligere, ble ACE2-ekspresjon i lungene og luftveiseepitel undersøkt. Til tross for den generelt lave ekspresjonen ble ACE2-ekspresjon funnet i flere typer epitelceller i luftveiene, samt i type II alveolære epitelceller i parenkymet. Blant cellene som ble undersøkt i luftveiene, viste nasale epitelceller, to klynger av goblet-celler og en klynge av cilierte celler den høyeste ACE2-ekspresjonen. Det er verdt å nevne at TMPRSS2 kun er uttrykt blant noen ACE2<sup>+</sup>-celler (celler som uttrykker ACE2). Dette indikerer at SARS-CoV-2 kan utnytte alternative proteaser for priming. Det er tidligere vist at SARS-CoV-2 kan infisere TMPRSS2<sup>-</sup>-celler (celler som ikke uttrykker TMPRSS2) ved å bruke Cat B/L (40). Cathepsin B uttrykkes i minst 70-90 % av ACE2<sup>+</sup>-celler, men om Cat B/L kan fullstendig erstatte TMPRSS2 er enda ikke kartlagt.

Ettersom SARS-CoV-2 har et furin-lignende spaltningssted ble furin-ekspresjonen i lungene og bronkialgrener undersøkt i en annen studie (41). Generelt ble det oppdaget høy ekspresjon av furin i lungene. Innsettingen av det furin-lignende spaltningsstedet kan potensielt gjøre 25 % flere celler sårbare for infeksjon med SARS-CoV-2 sammenlignet med SARS-CoV som ikke utnytter furin til priming. Det har tidligere blitt rapportert at furin kan sekreteres og være aktivt i naboceller omkring de furin<sup>+</sup>-cellene (42). Dermed kan furin-ekspresjon i kun noen celler i lungevevet eller bronkialgrener ha en sterk

innvirkning på hele celleområdet. Dette øker sannsynligheten for infeksjon med SARS-CoV-2 i alle ACE2<sup>+</sup>-celler i disse vevene. Sterk ekspresjon av furin ble funnet i lungene i denne studien, og data fra Protein Atlas viser proteinekspresjon av furin i nasopharynx og bronkialgrener (43;44).

Ekspresjon av ACE2, TMPRSS2 og furin ble også undersøkt i lever (45). Analysen viste at ACE2, TMPRSS2 og furin er uttrykt i lever, men at ekspresjonsnivået varierer blant ulike celletyper. Kolangiocyttene i leveren viste høyest ACE2-ekspresjon, mens hepatocytter viste noe lavere ACE2-ekspresjon. TMPRSS2 er også uttrykt i kolangiocytt og hepatocytter, men i tillegg i sinusoidale epitelceller i nærheten av portalområdet og erytroide celler. Furin-ekspresjon ble detektert i alle celletyper i leveren.

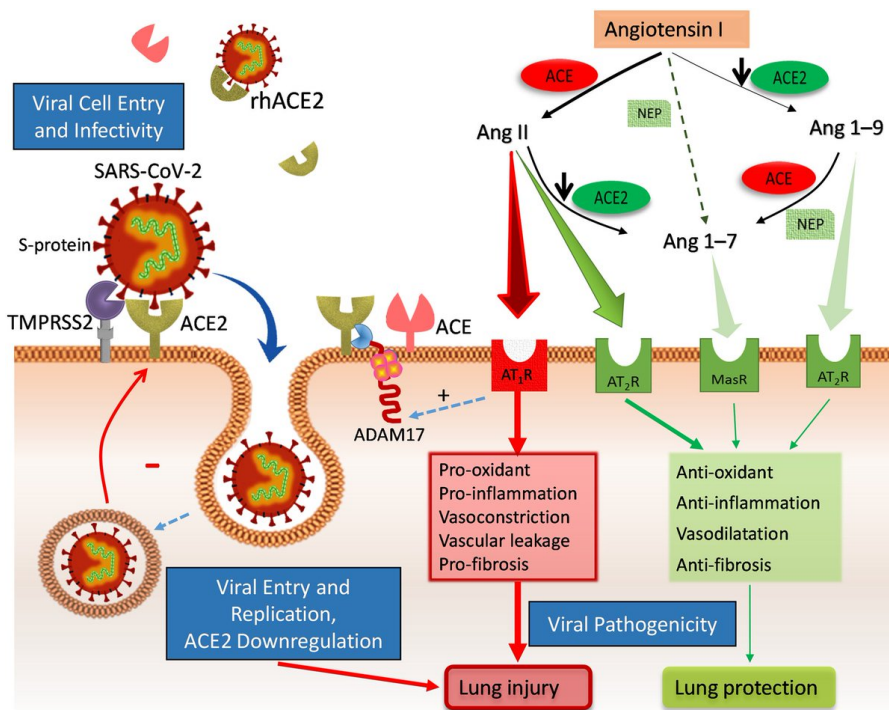
Data fra kunnskapsdatabasen The Human Protein Atlas viser høy proteinekspresjon av ACE2, TMPRSS2 og furin i tarmen (43;44). ACE2 har høy grad av ekspresjon i duodenum og tynntarm, og medium grad i tykktarm og rektum. TMPRSS2-ekspresjon finnes i lav grad i duodenum, tynntarm og rektum, men er ikke detektert i tykktarm. Furin uttrykkes i medium grad i hele tarmen. Kunnskap om hvor ekspresjon av ACE2, TMPRSS2, furin og Cat B/L finner sted kan bidra med å forutsi hvilke organer viruset kan infisere og skade. Ettersom den cellulære vertsreseptoren for både SARS-CoV og SARS-CoV-2 er ACE2, kan en infeksjon bli alvorlig på grunn av den viktige og beskyttende effekten ACE2 har i organer.

#### **4.4 Det kliniske bildet for SARS og COVID-19 i ulike organer**

Ved infeksjon med SARS-CoV eller SARS-CoV-2 nedreguleres ekspresjonen av ACE2 som følge av S-proteinets binding til reseptoren. ACE2 er en viktig beskyttende komponent i RAS, ettersom ACE2 spalter én aminosyre fra Ang II og danner Ang-(1-7). Generelt er de kliniske symptomene og konsekvensene av infeksjon med SARS-CoV og SARS-CoV-2 like ettersom de benytter den samme reseptoren for viral inngang i vertsceller. De kliniske konsekvensene er viktige å undersøke for å få en helhetlig forståelse av situasjonen med både SARS-CoV og SARS-CoV-2.

#### 4.4.1 Lunger og hjertet

Etter SARS-epidemien ble en studie på mus utført for å undersøke effekten av ACE2 ved lungeskade. En gruppe mus med sepsis eller syreinspirasjon fikk fjernet genet som kodet for ACE2 (*ace2* knockout). Dette resulterte i en mer alvorlig lungeskade sammenlignet med vanlige mus (med ACE2-genet). Økt vaskulær permeabilitet, et av kjennetegnene i patogenesen ved ARDS, er spesielt uttalt i *ace2* knockout mus (46). Det er aktivering av Ang II/AT1R-aksen som assosieres med alvorlighetsgraden av lungeskade, mens ACE2/Ang-(1-7)/MAS-signaliseringen motvirker den skadelige effekten. Nedregulering av ACE2, som følge av infeksjon med SARS-CoV eller SARS-CoV-2, vil kunne gi økte lokale nivåer av Ang II og forårsake skade gjennom AT1R. Som en ser i figur 13 kan binding av Ang II til AT1R i lungene blant annet føre til fibrose (47). Fibrose er dannelse av bindevev, for eksempel som følge av en betennelsesprosess. Det fibrotiske vevet vil ikke lenger ha samme funksjon som det opprinnelige lungevevet. Lungene blir mindre elastiske og gassutvekslingen med oksygen og karbondioksid hemmes (48).



**Figur 13:** Figuren viser ACE2 sin beskyttende effekt gjennom dannelse av Ang-(1-7) som binder til Mas. SARS-CoV-2 eller SARS-CoV nedregulerer ACE2-ekspressjonen og kan gi økte Ang II-nivåer. Ang II gir lungeskade gjennom binding til AT1R (47).

En betennelsesreaksjon i lungene gir konsekvenser for hjerte (49). Ved dannelsen av fibrotisk vev i lungene vil hjertets høyre side, som er forbundet med lungene, utsettes for stress ettersom det kreves mer kraft for at en tilstrekkelig mengde blod skal pumpes gjennom lungene. Denne motstanden kan etter hvert bli så stor at høyre ventrikkel svikter. Dersom blodet i stor nok grad ikke kommer seg gjennom lungene, vil også mindre blod komme tilbake til venstre side av hjertet og pumpes ut til resten av kroppen. På denne måten kan hele sirkulasjonen kollapse.

Ettersom ACE2 også uttrykkes i hjertet kan SARS-CoV-2 potensielt angripe og ødelegge hjertemuskelceller og forårsake myokarditt (betennelse i hjertemuskelen). Ødeleggelse av hjertemuskelceller kan påvises gjennom en økning av troponin i blodprøver. Blant 5 av de første 41 pasientene med COVID-19 i Wuhan ble en økning av troponin observert som en følge av virus-indusert hjerteskaade (50). For pasienter med underliggende hjertesykdommer, som kransåresykdom (trange årer) og hjertesvikt (dårlig pumpekraft), kan infeksjon med SARS-CoV-2 være alvorlig. De har høyere risiko for et mer alvorlig sykdomsforløp ettersom virusinfeksjonen setter hjertet under ytterligere press (49). For pasienter med hjertesykdom, som høyt blodtrykk, er det vanlig med medikamenter som inhiberer ACE eller blokkerer AT1R. Bruk av disse medikamentene kan øke ekspresjonen av ACE2. Det har blitt diskutert om bruken av slike medikamenter disponerer individer for COVID-19, men forskningen har ikke fullstendig kartlagt dette enda (47). I tillegg kan lungefibrose føre til lavere oksygenmetning ettersom gassutvekslingen hemmes. For COVID-19-pasienter med trange kransårer, hvor det fra før er lite blodgjennomstrømming, vil blodet som strømmer gjennom disse årene ha "dårligere kvalitet" (lavere oksygeninnhold). Hjertemuskelcellene som skal forsynes med blod fra kransårene får ikke tilstrekkelig med oksygen og vil bli mer skadelidende.

#### 4.4.2 *Lever*

ACE2 opptrer i både hepatocytter og kolangiocyttene i leveren, henholdsvis i 3 % og 60 % av de respektive cellene. Ettersom kolangiocyttene er en viktig celletype i gallegangene kan SARS-CoV-2 potensielt medføre direkte skade i dette området. I tillegg spiller de en viktig rolle i regenerering og immunrespons for leveren (51). Det har blitt rapportert leverskade hos opptil 60 % av SARS-CoV-pasienter (52). Unormale leververdier (ASAT

og ALAT) hos rundt 43 % av pasienter med SARS-CoV-2 har blitt funnet, og hos én av pasientene i studien ble det målt ALAT- og ASAT-verdier henholdsvis 100 og 30 ganger høyere enn øvre referansegrense. Man er dog usikker på om disse leverskadene skyldes virus, medikamenter brukt til behandling eller inflammatorisk respons induisert av betennelse i lungene (51).

#### 4.4.3 Mage- og tarmsystemet.

ACE2 er påvist hos mennesker i magesekken, tynntarm, tykktarm og endetarm ved å farge nukleokapsidet til SARS-CoV-2. Farging av epitel fra mage/tarm-systemet har kunnet påvise SARS-CoV-2 i cytoplasma i ovennevnte vev. I en stor studie fra Kina der man samlet data fra 1099 COVID-19-pasienter, ble det rapportert om kvalme og oppkast hos 5 %, og diaré hos 3,8 % (32). I en studie gjort i Wuhan så man på symptomer hos 140 COVID-19-pasienter, og det ble rapportert om gastrointestinale symptomer hos 39,6 %, noe som inkluderer kvalme, oppkast og diaré (32). Dette tallet er høyere enn mange andre studier har kommet med, noe som tyder på stor variasjon i grad av symptomer. Sammenliknet med SARS-CoV peker forskning i retning av at langt færre får gastrointestinale symptomer ved COVID-19. En studie fra 2003 med 75 SARS-pasienter viste at 73 % hadde diaré underveis i sykdomsforløpet (32).

## 4.5 Konklusjon

Pandemien i 2020 med SARS-CoV-2, som forårsaker COVID-19, er annerledes enn SARS-utbruddet i 2003. Det kliniske bildet mellom de to virusene er nokså likt, men det høye antallet smittetilfeller med SARS-CoV-2 gjør dagens situasjon mer alvorlig. Vi tror deler av forklaringen kan tilskrives SARS-CoV-2 sin høye affinitet til ACE2, dens potensielt større motstandsdyktighet mot ytre påvirkninger og at den kan bruke furin som protease i fusjonsprosessen. Kombinert sett kan disse faktorene potensielt medføre økt vevstropisme, viral inngang og større spredning av SARS-CoV-2. Videre forskning bør fokusere på kvalitetssikring av PID og videreutvikling av metoder som vil kunne bidra til utvikling av medisiner.

## 5 Referanser

1. Degré M, Hovig B, Rollag H, Kaltenborn KF, Toverud KC. Medisinsk mikrobiologi. 3. utg. Oslo: Gyldendal; 2008.
2. Verdens helseorganisasjon (WHO). Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003 [Internett]. Genève, Sveits: Verdens helseorganisasjon [oppdatert 31.12.03; lest 13.05.20]. Tilgjengelig fra: [http://www.who.int/csr/sars/country/table2004\\_04\\_21/en/](http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/)
3. Johns Hopkins Center for Systems Science and Engineering. Coronavirus Resource Center [Internett] 18/5/2020[oppdatert 18/5/2020; lest 18/5]. Tilgjengelig fra: <http://coronavirus.jhu.edu/>
4. NCBI. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res 2018;46(D1):D8-d13.
5. NCBI. BDKRB1 bradykinin receptor B1 [Homo sapiens (human)] [Internett]. Bethesda, Maryland, U.S: NCBI [oppdatert 13.03.20; lest 13.05.20]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=623>
6. Liu Z, Xiao X, Wei X, Li J, Yang J, Tan H, et al. Composition and divergence of coronavirus spike proteins and host ACE2 receptors predict potential intermediate hosts of SARS-CoV-2. J. Med. Virol. 2020.
7. Kumar S, Maurya VK, Prasad AK, Bhatt MLB, Saxena SK. Structural, glycosylation and antigenic variation between 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) and SARS coronavirus (SARS-CoV). [New Delhi] :2020. s. 13-21.
8. Freund NT, Roitburd-Berman A, Sui J, Marasco WA, Gershoni JM. Reconstitution of the receptor-binding motif of the SARS coronavirus. Protein Eng Des Sel 2015;28(12):567-75.
9. Cascella M, Rajnik M, Cuomo A, Dulebohn SC, Di Napoli R. Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). I: StatPearls. Treasure Island (FL)2020. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32150360>
10. Steen B-G. Himmelsk kjemi. 2. utg. utg. Oslo: Cappelen Damm akademisk; 2014.
11. Store norske leksikon. Hydrogenbinding [Internett].Universitet i Oslo: Foreningen store norske leksikon [oppdatert 31.10.19; lest 13.05.20]. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/hydrogenbinding>
12. Flint SJ, Enquist LW. Principles of virology. : Volume 1, : Molecular biology. Fourth edition. Washington, District of Columbia: ASM Press; [lest].
13. Solovyeva NI, Gureeva TA, Timoshenko OS, Moskvitina TA, Kugaevskaya EV. Furin as proprotein convertase and its role in normal and pathological biological processes. Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry 2017;11(2):87-100.

14. Shin W-J, Seong BL. Type II transmembrane serine proteases as potential target for anti-influenza drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2017;12(11):1139-52.
15. Li Y-Y, Fang J, Ao G-Z. Cathepsin B and L inhibitors: a patent review (2010 - present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2017;27(6):643-56.
16. Millet JK, Whittaker GR. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res* 2015;202:120-34.
17. Sand O, Toverud KC. *Menneskekroppen : fysiologi og anatomi*. 3. utg. Oslo: Gyldendal akademisk; 2018.
18. Turner AJ. Chapter 25 - ACE2 Cell Biology, Regulation, and Physiological Functions. I: Unger T, Steckelings UM, dos Santos RAS, red. *The Protective Arm of the Renin Angiotensin System (RAS)*. Boston: Academic Press; 2015. s. 185-9. Tilgjengelig fra: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128013649000250>
19. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *New York, N.Y.* :2020. s. 1444-8.
20. Kawai T, Forrester SJ, O'Brien S, Baggett A, Rizzo V, Eguchi S. AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system. *Pharmacological research* 2017;125(Pt A):4-13.
21. Alberts B. *Essential cell biology*. 4th ed. New York: Garland Science; 2014.
22. Wang D, Chai XQ, Magnussen CG, Zosky GR, Shu SH, Wei X, et al. Renin-angiotensin-system, a potential pharmacological candidate, in acute respiratory distress syndrome during mechanical ventilation. *Pulm Pharmacol Ther* 2019;58:101833.
23. Harkema JR, Nikula KJ, Haschek WM. Chapter 51 - Respiratory System. I: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, red. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)*. Boston: Academic Press; 2013. s. 1935-2003. Tilgjengelig fra: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124157590000510>
24. Lea T. *Immunologi og immunologiske teknikker*. 3. utg. utg. Bergen: Fagbokforl.; 2006.
25. Huang W, Cao Y, Liu Y, Ping F, Shang J, Zhang Z, et al. Activating Mas receptor protects human pulmonary microvascular endothelial cells against LPS-induced apoptosis via the NF-kB p65/P53 feedback pathways. *J Cell Physiol* 2019;234(8):12865-75.
26. Simões e Silva AC, Teixeira MM. ACE inhibition, ACE2 and angiotensin-(1-7) axis in kidney and cardiac inflammation and fibrosis. *Pharmacological Research* 2016;107:154-62.
27. Rodrigues Prestes TR, Rocha NP, Miranda AS, Teixeira AL, Simoes ESAC. The Anti-Inflammatory Potential of ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas Receptor Axis: Evidence from Basic and Clinical Research. *Curr Drug Targets* 2017;18(11):1301-13.

28. Li ECK, Heran BS, Wright JM. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors versus angiotensin receptor blockers for primary hypertension. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;2014(8):CD009096-CD.
29. Kai H, Kai M. Interactions of coronaviruses with ACE2, angiotensin II, and RAS inhibitors-lessons from available evidence and insights into COVID-19. *Hypertens Res* 2020:1-7.
30. Goh GK-M, Dunker AK, Foster JA, Uversky VN. Rigidity of the Outer Shell Predicted by a Protein Intrinsic Disorder Model Sheds Light on the COVID-19 (Wuhan-2019-nCoV) Infectivity. Basel, Switzerland :2020.
31. Consortium TU. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research* 2018;47(D1):D506-D15.
32. Wong SH, Lui RN, Sung JJ. Covid-19 and the digestive system. *J Gastroenterol Hepatol* 2020;35(5):744-748.
33. Jaimes JA, André NM, Chappie JS, Millet JK, Whittaker GR. Phylogenetic Analysis and Structural Modeling of SARS-CoV-2 Spike Protein Reveals an Evolutionary Distinct and Proteolytically-Sensitive Activation Loop. London2020.
34. Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res* 2020;176:104742.
35. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh C-L, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. New York, N.Y. :2020. s. 1260-3.
36. Wang Q, Zhang Y, Wu L, Niu S, Song C, Zhang Z, et al. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. Cambridge, Mass. :2020.
37. Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 2020;181(2):281-92.e6.
38. He J, Tao H, Yan Y, Huang S-Y, Xiao Y. Molecular Mechanism of Evolution and Human Infection with SARS-CoV-2. Basel, Switzerland :2020.
39. Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, Litvinukova M, et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nature Medicine* 2020.
40. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Kruger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 2020;181(2):271-80.e8.
41. Lukassen S, Chua RL, Trefzer T, Kahn NC, Schneider MA, Muley T, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. [Houndmills, Basingstoke]2020. s. e105114.
42. Vidricaire G, Denault JB, Leduc R. Characterization of a Secreted Form of Human Furin Endoprotease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993;195(2):1011-8.
43. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015;347(6220):1260419.



44. The Human Protein Atlas. FURIN [Internett]. The Human Protein Atlas: <http://www.proteinatlas.org/about/organization> [lest 9/5]. Tilgjengelig fra: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000140564-FURIN/tissue>
45. Pirola CJ, Sookoian S. SARS-CoV-2 virus and liver expression of host receptors: Putative mechanisms of liver involvement in COVID-19. *Liver International* 2020;n/a(n/a).
46. Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 2005;436(7047):112-6.
47. Kreutz R, Algharably EAE-H, Azizi M, Dobrowolski P, Guzik T, Januszewicz A, et al. Hypertension, the renin–angiotensin system, and the risk of lower respiratory tract infections and lung injury: implications for COVID-19: European Society of Hypertension COVID-19 Task Force Review of Evidence. *Cardiovascular Research* 2020.
48. Store norske leksikon. Lungefibrose [Internett].Universitetet i Oslo: Foreningen store norske leksikon [oppdatert 01.11.18; lest 13.05.20]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/lungefibrose>
49. Kochi AN, Tagliari AP, Forleo GB, Fassini GM, Tondo C. Cardiac and arrhythmic complications in patients with COVID-19. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 2020;31(5):1003-8.
50. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395(10223):497-506.
51. Chai X, Hu L, Zhang Y, Han W, Lu Z, Ke A, et al. Specific ACE2 Expression in Cholangiocytes May Cause Liver Damage After 2019-nCoV Infection. *bioRxiv* 2020:2020.02.03.931766.
52. Chau T-N, Lee K-C, Yao H, Tsang T-Y, Chow T-C, Yeung Y-C, et al. SARS-associated viral hepatitis caused by a novel coronavirus: report of three cases. *Hepatology* 2004;39(2):302-10.

