



Scan online to view this article

Simulation and comparison of the tertiary structure of spike protein belong SARS-CoV-2, Bat-SL-CoVZC21, PCoV_GX-P4L, and identification the hotspot amino acids in the trimeric structure of protein

Azadeh Lohrasbi-Nejad^{1*}

Department of Agricultural Biotechnology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Abstract

Aim and Background: Covid-19 disease with acute respiratory symptoms appeared in 2019. The disease was associated with fever, cough, and severe respiratory distress. The causative agent of the disease belonged to the beta-coronavirus family and was named SARS-CoV-2. The outbreak of Covid-19 and the creating of a global epidemic led to many attempts to understand the structure and function of the virus. The spike protein is a relatively heavy glycosylated protein consisting of three identical subunits that appear as a homo-trimer on the virus's surface. After binding to the surface cell receptor (angiotensin-converting enzyme), the protein conformational changes and eventually causes the virus to enter the host cell. This process is necessary for viruses to enter human cells and infect them. Therefore, investigating the structural details of the spike protein through molecular dynamics simulation can play an influential role in understanding how the subunits connect and identifying the hotspot amino acids.

Materials and Methods: First, the tertiary structure of spike proteins related to SARS-CoV-2, bat-SL-CoVZC21 (Bat Coronavirus), and PCoV_GX-P4L (Pangolin coronavirus) was constructed through modeling homology. After evaluation and validation, these structures were simulated using NAMD software. The structural properties of spike proteins were evaluated in the level of 3D structure, measurement of the interface area between monomers, thermodynamic parameters, trimer structures' stability, and hotspot amino acids' identification in making connections between subunits.

Results: Evaluation of the trimeric structure of spike protein showed that this protein in SARS-CoV-2 has the highest ΔG^{diss} value (113.2 kcal/mol), which indicates the stability of the oligomeric protein structure among other spike proteins. The lowest ΔG^{diss} (100.6 kcal/mol) was obtained for the spike protein of PCoV_GX-P4L. The interface area between the subunits was almost the same in all spike proteins. Y369, D405, Y707 in subunit A, Y369, D574, Y707, Y837, D985 in subunit B, and Y707 in subunit C were identified as red hotspot amino acids for SARS-CoV-2 spike protein.

Conclusion: The study of the structure of virus surface proteins at the atomic scale, and the recognition of hotspot residues that play an essential role in establishing monomeric connections, has created a window to further recognition and function of the virus. Thus, it can provide new information about neutralizing the virus.

Keywords: SARS-CoV-2, spike protein, three-dimensional structure, simulation, hotspot residues, Iau Science.

Corresponding author:

Department of Agricultural Biotechnology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Email: a.lohrasbi@uk.ac.ir



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

شبیه سازی و مقایسه ساختار سوم پروتئین اسپایک

PCoV_GX-P4L, Bat-SL-CoVZC21, SARS-CoV-2

و شناسایی اسیدهای آمینه هات اسپات در ایجاد ساختار تریمر پروتئین

آزاده لهراسبی نژاد

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بیماری کووید-۱۹ با علائم حاد تنفسی در سال ۲۰۱۹ ظاهر شد. این بیماری با تب، سرفه و عوارض شدید تنفسی همراه بود. عامل بیماری متعلق به خانواده بتا کرونا ویروس بوده و تحت عنوان SARS-CoV-2 نام گذاری شد. شیوع کووید-۱۹ و ایجاد حالت اپیدمیک جهانی موجب شد تلاش های بسیاری برای شناخت ساختار و عملکرد این ویروس انجام شود. پروتئین اسپایک، یک پروتئین گلیکوزیله به نسبت سنگین است که از سه زیر واحد یکسان ساخته شده است و به صورت یک هومو تریمر در سطح ویروس ظاهر می شود. این پروتئین پس از اتصال به گیرنده سطح سلول میزبان (آنزیم مبدل آنژیوتانسین-۲) دچار تغییر ساختاری می شود و در نهایت موجب ورود ویروس درون سلول میزبان می شود. این روند برای ورود ویروس ها به درون سلول های انسانی و آلوده کردن آن ها لازم است. بنابراین بررسی جزئیات ساختاری پروتئین اسپایک از طریق شبیه سازی دینامیک مولکولی می تواند نقش مؤثری در شناخت نحوه اتصال زیرواحدهای سازنده و شناسایی اسیدهای آمینه حیاتی در ایجاد اتصالات داشته باشد.

مواد و روش ها: ابتدا ساختار سوم پروتئین های اسپایک مربوط به SARS-CoV-2 (کرونا ویروس انسانی)، bat-SL-CoVZC21 (کرونا ویروس خفاش) و PCoV_GX-P4L (کرونا ویروس پانگولین) از طریق همولوژی مدلینگ ساخته شد. این ساختارها پس از ارزیابی و اعتبار سنجی، به کمک نرم افزار NAMD شبیه سازی شدند. ویژگی ساختاری پروتئین های اسپایک از نظر شکل فضایی، اندازه گیری مساحت سطح رابط بین مونومرها، پارامترهای ترمودینامیکی، تعیین پایداری ساختارهای تریمر و شناسایی اسیدهای آمینه مهم در ایجاد اتصالات بین زیرواحدها ارزیابی شدند.

یافته ها: ارزیابی زیر واحدهای سازنده پروتئین تریمر اسپایک نشان دادند پروتئین های اسپایک در SARS-CoV-2 دارای بیشترین مقدار ΔG^{diss} (۱۱۳/۲ kcal/mol) است که بیانگر پایدار بودن ساختار پروتئین تریمر در بین سایر پروتئین های اسپایک است. کمترین میزان ΔG^{diss} (۱۰۰/۶ kcal/mol) برای پروتئین اسپایک PCoV_GX-P4L به دست آمد. مساحت سطح رابط بین زیر واحدها در تمام پروتئین های اسپایک کمابیش یکسان بود. اسیدهای آمینه Y369, D405, Y707 در زیر واحد A و Y369, D574, Y707, Y837, D985 در زیر واحد B و Y707 در زیر واحد C به عنوان اسیدهای آمینه هات اسپات قرمز برای پروتئین اسپایک SARS-CoV-2 شناخته شدند.

نتیجه گیری: بررسی ساختار پروتئین های سطح ویروس در مقیاس اتمی و شناخت رزیدوهای هات اسپات که نقش مهمی در ایجاد اتصالات بین مونومری بازی می کنند، موجب درک بهتر عملکرد ویروس شده و امکان خنثی سازی این ویروس را فراهم می کند.

واژگان کلیدی: سارس-کووید-۲، پروتئین اسپایک، ساختار سه بعدی، شبیه سازی، اسیدهای آمینه هات اسپات، Iau seince

مقدمه

بیماری کووید-۱۹ اولین مرتبه در سال ۲۰۲۰ در شهر ووهان در استان هوبی چین همراه با تب، بیماری شدید تنفسی و ذات الریه ظاهر شد (۲،۱). بررسی های انجام شده

نویسنده مسئول:

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

پست الکترونیکی: a.lohrasbi@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۱

می‌دهد و واسطه ورود ویروس به داخل سلول‌های میزبان است (۱۳). تیمرهای اسپایک دارای گلیکان‌های N-linked بسیاری هستند که برای ایجاد فولد مناسب پروتئین ضروری هستند. علاوه بر این، این گلیکان‌ها برای دسترسی به پروتئین‌های سلولی و خنثی‌سازی عملکرد آنتی‌بادی‌ها برای ویروس‌ها ضروری هستند (۱۷-۱۴).

پروتئین اسپایک دارای دو دامین عملکردی است. دامین S1 مسئول اتصال به گیرنده سلول میزبان است و دامین S2 مسئول هم‌جوشی غشاهای ویروس و سلول میزبان است. در بسیاری از کرونا ویروس‌ها در مرز بین دو دامین S1 و S2 یک شکاف ایجاد می‌شود. اما این دو دامین در ساختار پیش هم‌جوش هم‌چنان به صورت غیر کووالان متصل به یکدیگر باقی می‌مانند (۲۳-۱۳، ۱۴، ۱۸). دامین S1 شامل ناحیه متصل شونده به گیرنده میزبان (RBD) است و به ثبات و پایدارسازی حالت پیش‌فیوژن زیرواحد S2 لنگر شده با غشا کمک می‌کند (۲۸-۲۰، ۲۴). در نتیجه، ورود کرونا ویروس به سلول‌های میزبان نیازمند یک فرآیند پیچیده است که ابتدا بایستی ویروس به گیرنده موجود در سطح سلول میزبان متصل شود و سپس پردازش پروتئولیتیکی توسط آنزیم‌های میزبان بر روی آن انجام شود و در نهایت هم‌جوشی غشاهای سلولی ویروس و سلول میزبان ایجاد می‌شود. کرونا ویروس‌های مختلف از توالی‌های متفاوت در دامین S1 استفاده می‌کنند تا بسته به گونه‌های ویروسی، انواع مختلف گیرنده‌های اتصالی و ورودی در سلول میزبان را شناسایی کنند. SARS-CoV-2 به طور مستقیم به آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین-۲ (ACE2) برای ورود به سلول‌های هدف متصل می‌شود.

بررسی و مقایسه توالی پروتئین اسپایک در دو ویروس SARS-CoV-2 و SARS-CoV نشان داد که پروتئین اسپایک متعلق به SARS-CoV-2 حاوی ۴ اسید آمینه اضافی (PRRA) در مرز بین دامین‌های S1 و S2 است. با افزوده شدن این اسیدهای آمینه یک جایگاه برش توسط آنزیم فورین در SARS-CoV-2 ایجاد شده است که تنها در این ویروس دیده می‌شود. علیرغم شباهت بسیار زیاد توالی پروتئین اسپایک SARS-CoV-2 با BatCoV-RaTG13 جایگاه برش توسط آنزیم فورین در اسپایک BatCoV-RaTG13 دیده نشد (۲۹). با توجه به توزیع به‌طور تقریبی زیاد پروتئین‌هایی مانند فورین وجود یک محل برش پلی‌بازیک در گلیکوپروتئین اسپایک که به-

مشخص کرد که پاتوژن جدید (SARS-CoV-2) عضو جدیدی از جنس بتا کرونا ویروس‌ها است که ارتباط نزدیکی با چندین نوع کرونا ویروس متعلق به خفاش و همچنین SARS-CoV دارد (۳، ۴). مطالعه‌های صورت گرفته نشان داد که SARS-CoV-2 در مقایسه با SARS-CoV، با سرعت بیشتری از انسان به انسان منتقل می‌شود. بنابراین با سرعت بیشتری در بین کشورهای مختلف گسترش پیدا کرد که موجب بروز نگرانی از سوی سازمان بهداشت جهانی شد (۱، ۵، ۶).

کرونا ویروس‌ها دارای پروتئین‌های مختلفی هستند مانند پروتئین‌های ساختاری اسپایک (S)، پروتئین‌های غشایی (M)، پروتئین‌های پوششی (E)، پروتئین‌های نوکلئوکپسید (N) و پروتئین هم‌گلویتینین استراز (HE) در برخی از بتا کرونا ویروس‌ها (۷). پروتئین‌های S، M و E همه در پوشش ویروسی تعبیه شده‌اند. اما پروتئین N با RNA ویروسی تعامل دارد و در هسته ذره ویروسی قرار دارد و نوکلئوکپسید را تشکیل می‌دهد (۷). پروتئین M یکی از مهم‌ترین پروتئین‌ها در ساختار ویرون است. این پروتئین از لحاظ کمی به نسبت سایر پروتئین‌های ویروسی دارای مقادیر بالاتری است، برخلاف پروتئین E که در مقادیر کمی در ویرون یافت می‌شود (۸). این تفاوت در فراوانی پروتئین‌ها به احتمال به این دلیل است که پروتئین M نقش مهمی در ایجاد شکل ظاهری ویروس بر عهده دارد و همراه با پروتئین E در اجتماع قسمت‌های مختلف و شکل‌گیری پوشش‌های ویروسی بسیار حیاتی هستند. پروتئین E علاوه بر عملکردهای دیگر، در آزادسازی ذرات ویروسی از سلول‌های میزبان نیز فعالیت می‌کند (۹).

پروتئین N به RNA ویروسی متصل می‌شود و برای بسته‌بندی RNA ویروسی به صورت ذرات ویروسی در طول مرحله مونتاژ ضروری هستند (۱۱، ۱۰). پروتئین‌های HE در برخی از بتا کرونا ویروس‌ها دیده می‌شوند. این پروتئین یک هم‌گلویتینین شبیه هم‌گلویتینین ویروس آنفلوانزا است که دارای فعالیت استیل استراز است و اسید سیالیک را بر روی گلیکوپروتئین‌های سطح سلول میزبان متصل می‌کند (۱۲). این پروتئین به احتمال بیماری‌زایی و ورود کرونا ویروس‌ها به درون سلول‌های میزبان را تقویت می‌کند. پروتئین اسپایک یک پروتئین گلیکوزیله است که سنبله‌های هموتریمیک را روی سطح ذرات ویروسی تشکیل

NCBI و QIA48614 و AJA91196 از پایگاه اطلاعاتی NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) دریافت شد. با توجه به این که بعضی از قسمت‌های ساختار سوم اسپایک در کرونا ویروس انسانی و تمام ساختار سوم مربوط به پروتئین اسپایک کرونا ویروس bat-SL-CoVZXC21 و PCoV_GX-P4L هنوز مشخص نشده بود از هومولوژی مدلینگ به منظور پیش‌بینی ساختار سوم استفاده شد. ابتدا به کمک سرور SWISS-MODEL به آدرس <https://swissmodel.expasy.org> الگو مناسب برای این پروتئین‌ها انتخاب شد. مدل سازی انجام شد و پارامترهای مربوط به کیفیت ساختاری مدل‌ها چک شدند. اعتبارسنجی مدل‌ها به کمک اندازه‌گیری پارامتر پروچک (<https://saves.mbi.ucla.edu>)، انجام شد و در نهایت مختصات اتمی مربوط به ساختار سوم مدل‌های تأیید شده برای شبیه‌سازی استفاده شد.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

شبیه‌سازی ساختار اتمی برای هر سه پروتئینی توسط نرم-افزار NAMD انجام شد (۳۱). فایل ساختاری پروتئین (psf) بر اساس پارامترهای میدان نیرو CHARMM27 ساخته شد. با توجه به حضور پروتئین در سطح غشاء پلاسمایی و در یک محیط هیدروفیل، پروتئین‌های مورد نظر در یک جعبه از مولکول‌های آب در نظر گرفته شدند. برای خنثی شدن بار الکتریکی، مولکول‌های NaCl با غلظت ۰/۱۵ mM به سیستم ساخته شده اضافه شدند. در نهایت شبیه‌سازی برای سیستم طراحی شده انجام شد. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به وسیله نرم افزار NAMD انجام شد (۳۱). میدان‌های نیرو CHARMM27 برای توصیف مولکول‌های پروتئین‌ها، یون‌ها و مدل TIP3 برای توصیف مولکول‌های آب استفاده شد. شبیه‌سازی تحت فشار ۱ بار و دمای ۳۱۰ درجه کلوین در آنسامبل دما و فشار ثابت (NPT) انجام شد. الکترواستاتیک دوره‌ای سیستم کامل با روش Particle Mesh Ewald (PME) اعمال شد. کنترل دما به وسیله دینامیک لنگوین با ضریب میرایی 1 ps^{-1} انجام شد. کنترل فشار بر پایه باروستات پیستون لنگوین نوز-هورور در حالتی که Langevin piston decay برابر ۵۰ فمتو ثانیه و Langevin piston period معادل ۲۰۰ فمتو ثانیه بود انجام شد (۳۲). Cut off و pairlistdist به ترتیب معادل ۱۰ و ۱۳/۵ آنگستروم در نظر گرفته شدند. شبیه‌سازی تحت شرایط مرزی دوره‌ای در

راحتی توسط آنزیم فورین برش می‌خورد می‌تواند موجب افزایش قابلیت سرایت SARS-CoV-2 از فرد به فرد دیگر در مقایسه با SARS-CoV باشد.

مطالعه‌هایی که در سال ۲۰۲۱ برای شناسایی نواحی دارای نوترکیبی همولوگ درون ژنوم SARS-CoV-2 صورت گرفت، منجر به شناسایی والد‌های احتمالی SARS-CoV-2 شد (۳۰). بر اساس این مطالعه کرونا ویروس‌های bat-SL-CoVZXC21 متعلق به خفاش و PCoV_GX-P4L متعلق به پانگولین به‌عنوان والد‌های احتمالی SARS-CoV-2 در نظر گرفته شدند (۳۰). با توجه به نقش پروتئین اسپایک در اتصال ویروس به گیرنده‌های سلولی و نفوذ به درون سلول‌های میزبان، در این مطالعه پروتئین اسپایک در SARS-CoV-2 و کرونا ویروس‌هایی که به عنوان والد احتمالی این ویروس در نظر گرفته شده بودند بررسی شد. ابتدا ساختار سه بعدی پروتئین شبیه‌سازی شد و سپس اسیدهای آمینه مهم در ایجاد اتصالات بین مونومرها مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

مدل سازی ساختار سوم پروتئین اسپایک

بر اساس مطالعه قبلی دو رخداد نوترکیبی در موقعیت‌های ابتدایی و انتهایی ژنوم SARS-CoV-2 (ناحیه ابتدایی ژن ab1 و قسمت انتهایی ژن‌های S، E، M و ناحیه ابتدایی ژن N) مشخص شده بود. در این رخداد نوترکیبی کرونا ویروس bat-SL-CoVZXC21 (با کد دسترسی MG772934) به‌عنوان والد SARS-CoV-2 شناخته شده بود (۳۰). علاوه بر این، نتیجه تجزیه و تحلیل توالی ژنوم SARS-CoV-2 و Pangolin-CoVs وقوع یک رویداد نوترکیبی در ژن اسپایک موقعیت ۳۵۲-۹۰۱ در توالی نوکلئوتیدی SARS-CoV-2 را مشخص کرده بود. والد مشخص شده برای این رخداد کروناویروس PCoV_GX-P4L با شماره دسترسی MT040333 تعیین شد (۳۰). بنابراین ساختار پروتئین اسپایک در کرونا ویروس انسان (SARS-CoV-2)، کرونا ویروس خفاش (bat-SL-CoVZXC21) و کرونا ویروس پانگولین (PCoV_GX-P4L) مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفتند.

توالی آمینو اسیدی مربوط به پروتئین‌های اسپایک در این کرونا ویروس‌ها با کد دسترسی QIA20044،

PDB= به عنوان الگو برای تمام پروتئین‌های اسپایک SARS-CoV-2، bat-SL-CoVZXC21 و PCoV_GX-P1E در نظر گرفته شد.

درصد شباهت بین الگو و توالی‌های پروتئین اسپایک در SARS-CoV-2 (کرونا ویروس انسان)، bat-SL-CoVZXC21 (کرونا ویروس خفاش) و PCoV_GX-P1E (کرونا ویروس پانگولین) به ترتیب ۹۱/۶۰٪، ۷۹/۱۶٪ و ۹۹/۲۶٪ تعیین شد.

پارامتر QMEAN Z-score در مدل‌های ساخته شده برای SARS-CoV-2، bat-SL-CoVZXC21 و PCoV_GX-P1E به ترتیب معادل ۲/۲۲، -۲/۳۹ و -۲/۱۴ به دست آمد (شکل ۱). QMEAN Z-score درجه طبیعی بودن مدل ساخته شده را با توجه به ویژگی‌های ساختاری مدل تخمین می‌زند. بر اساس نتایج Benkert و همکارانش QMEAN Z-score مدل‌ها هرچقدر به صفر نزدیک‌تر باشد مدل ساخته شده از کیفیت مطلوب‌تری برخوردار است و با ساختارهای سوم که از طریق روش‌های آزمایشگاهی مشخص شده‌اند، شباهت بیشتری دارد (۳۳). امتیاز ۴- یا کمتر از آن نشان دهنده کیفیت پایین مدل ساخته شده است. بنابراین مدل‌های ساخته شده پروتئین اسپایک برای هر سه کرونا ویروس از کیفیت ساختاری مطلوب برخوردار هستند.

تست‌های اعتبارسنجی توسط اندازه‌گیری عددی پارامترهای پروچک انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد ۹۴/۱۵٪، ۹۳/۳۰٪ و ۹۵/۳۱٪ از اسیدهای آمینه مربوط به پروتئین‌های اسپایک در مدل‌های ساخته شده برای SARS-CoV-2، bat-SL-CoVZXC21 و PCoV_GX-P1E در ناحیه مورد قبول نمودار رامچاندران قرار گرفته‌اند. در نهایت فایل مربوط به مختصات اتمی مدل‌های ساخته شده به منظور شبیه‌سازی استفاده شد. پس از انجام مراحل شبیه‌سازی ساختارهای سوم به دست آمده برای آنالیز خصوصیات ساختاری مورد استفاده قرار گرفتند. $\Delta\Delta G = \Delta G^{MUT} \text{complex} - \Delta G^{WT} \text{complex}$

مدت زمان ۲ نانو ثانیه انجام شد. در نهایت برای نمایش ساختارهای سوم به دست آمده از برنامه VMD (https://www.ks.uiuc.edu) و PYMOL (https://pymol.org) استفاده شد.

شناسایی آمینو اسیدهای مؤثر در ایجاد اتصالات بین مونومرهای تشکیل دهنده پروتئین اسپایک

اطلاعات مربوط به سطح در دسترس حلال هر پروتئین و اندازه‌گیری سطح رابط بین واحدهای سازنده هر پروتئین تریمر به کمک سرور PDBePISA (https://www.ebi.ac.uk) انجام شد. مساحت سطح رابط با توجه به فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Interface area } (\text{\AA}^2) = \frac{\text{SASA}_{\text{monomer A}} + \text{SASA}_{\text{monomer B}} - \text{SASA}_{\text{dimer AB}}}{2}$$

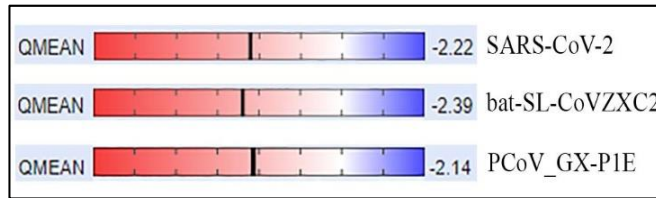
در این رابطه SASA به عنوان سطح در دسترس حلال در نظر گرفته شده است. پارامترهای ΔG^{int} و ΔG^{diss} مربوط به هر ساختار پروتئینی محاسبه و با توجه به اعداد به دست آمده پایداری ساختاری پروتئین‌ها تخمین زده شد. علاوه بر این اسیدهای آمینه‌ای که موجب برهمکنش بین زیر واحدها در هر ساختار پروتئینی می‌شوند با توجه به اندازه-گیری مقدار انرژی آزاد انحلال (ΔG) پس از تشکیل رابط شناسایی شدند.

برای شناسایی رزیدوهای هات اسپات بین هر کدام از دایمرها (AB، AC، CB) در ساختار تریمر اسپایک از وب سرور DrugScore^{PPI} (https://cpclab.uni-duesseldorf.de) استفاده شد. در این نرم‌افزار ابتدا تمام اسیدهای آمینه موجود در ناحیه رابط در ساختار دایمرها بررسی شده و مشخص می‌شود کدام اسیدهای آمینه در برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین نقش حیاتی دارد. این رزیدوها به کمک فرمول زیر از طریق اندازه‌گیری تفاوت بین تغییرات انرژی آزاد اتصالات در حالت موتانت و طبیعی پیش‌بینی می‌شوند.

یافته‌ها

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پروتئین اسپایک

در مدل‌سازی ساختار سوم پروتئین اسپایک توسط سرور SWISS-MODEL پروتئین اسپایک با کد 7CN8



شکل ۱: پارامتر QMEAN Z-score مدل های ساخته شده برای پروتئین های اسپایک موجود در SARS-CoV-2، bat-SL-CoVZXC21 و PCoV_GX-PIE

رابط بین مونومرها در پروتئین اسپایک تمام ویروس ها تقریباً در یک محدوده قرار می گیرد.

اتصالات بین زیر واحدها از طریق محاسبه پارامتر ΔG توسط سرور PDBePISA انجام شد. این نتایج در جدول ۱ ارائه شده‌اند. پارامتر ΔG بر اساس تفاوت انرژی توتال حلال هنگامی که مونومرها مجزا در نظر گرفته می‌شود نسبت به زمانی که مونومرها با هم بر همکنش دارند محاسبه می‌شود.

بررسی ویژگی‌های ساختاری واحدهای سازنده پروتئین اسپایک

پس از شبیه‌سازی ساختار سوم پروتئین‌های اسپایک، نوع برهمکنش‌ها و اسیدهای آمینه مهم که در ایجاد برهمکنش‌ها بین زیر واحدهای این پروتئین‌های تریمر نقش دارند، بررسی شدند. نتایج به‌دست آمده در جدول ۱ ارائه شده‌اند. بر اساس نتایج به‌دست آمده مساحت منطقه

جدول ۱: ویژگی‌های مونومرهای سازنده ساختار پروتئین اسپایک

GenBank accession number	زیر واحد ۱			زیر واحد ۲			Interface area Å ²	*ΔG kcal/mol
	name	^o N _{res}	^β Surface area Å ²	name	^o N _{res}	^β Surface area Å ²		
#QIA20044	A	۲۴۱	۵۶۲۷۶	B	۲۳۶	۵۶۲۶۸	۸۵۵۵	-۲۴/۱
	A	۲۳۶	۵۶۲۷۶	C	۲۳۶	۵۵۹۱۹	۸۵۷۶	-۳۵/۴
	B	۲۳۹	۵۶۲۶۸	C	۲۲۷	۵۵۹۱۹	۸۷۲۳	-۳۴/۶
#AVP78042	A	۲۲۹	۵۶۲۵۹	B	۲۳۲	۵۶۳۹۷	۸۲۸۷	-۲۵/۴
	A	۲۳۰	۵۶۲۵۹	C	۲۲۵	۵۶۵۳۸	۸۵۰۷	-۳۴/۵
	B	۲۲۵	۵۶۳۹۷	C	۲۲۸	۵۶۵۳۸	۸۳۱۴	-۲۴/۹
#QIA48614	A	۲۳۲	۵۵۸۹۰	B	۲۲۸	۵۶۰۷۹	۸۵۰۶	-۲۶/۷
	A	۲۲۹	۵۵۸۹۰	C	۲۳۵	۵۵۶۱۱	۸۵۵۹	-۲۱/۲
	B	۲۴۰	۵۶۰۷۹	C	۲۳۵	۵۵۶۱۱	۸۷۷۷	-۲۶/۰

#QIA20044 (پروتئین اسپایک SARS-CoV-2)، #AVP78042 (پروتئین اسپایک bat-SL-CoVZXC21)، #QIA48614 (پروتئین اسپایک PCoV_GX-PIE)

^oN_{res}: تعداد باقی مانده های رابط بین دو مونومر است
^βSurface area: کل سطح قابل دسترس با حلال است
 ΔG : انرژی آزاد انحلال پس از تشکیل رابط

وقتی دیده می‌شود که بر همکنش‌ها بین مونومرهای A و C ایجاد شوند. بنابراین تمایل این دو زیر واحد برای ایجاد اتصال با یکدیگر بیشتر از سایر زیر واحدها است.

مقدار منفی این پارامتر نشان دهنده یک سطح رابط آگزیز بین مونومرها و یا تمایل زیرواحدها برای اتصال را نشان می‌دهد. مقایسه مقادیر عددی ΔG هنگام تشکیل دایمرهای متفاوت در SARS-CoV-2 نشان می‌دهد که کم‌ترین مقدار ΔG ، kcal/mol -۳۵/۴،

نیروی محرک الزامی است بنابراین ساختار اسمبل شده از نظر ترمودینامیک پایدار است. با توجه به نتایج به-دست آمده (جدول ۲)، پروتئین اسپایک در SARS-CoV-2 بالاترین مقدار عددی ΔG^{diss} (kcal/mol) ۱۱۳/۲ در بین سایر ویروس‌ها را دارد. بنابراین، می-توان نتیجه گرفت که پروتئین اسپایک در SARS-CoV-2 دارای پایدارترین ساختار الیگومر است.

مقادیر پارامترهای ΔG^{int} و ΔG^{diss} برای bat-SL-CoVZXC21 معادل ۹۶/۲ kcal/mol و ΔG^{diss} ۱۰۲/۴ به دست آمد. کمترین مقدار ΔG^{diss} برای PCoV_GX-P1E (۱۰۰/۶ kcal/mol) به دست آمد که نشان می‌دهد پروتئین اسپایک در این کرونا ویروس پایداری دمایی پایینی دارد. مقدار ΔG^{int} برای این پروتئین ۸۳/۴ kcal/mol به دست آمد.

مقدار ΔG برای دایمرهای تشکیل شده در پروتئین اسپایک bat-SL-CoVZXC21 برای دو زیر واحد A و B $34/5$ kcal/mol به دست آمد که بیانگر تمایل زیاد این دو مونومر برای ایجاد ساختارهای دایمر است. در حالی که بیشترین تمایل برای تشکیل ساختارهای دایمر در پروتئین اسپایک PCoV_GX-P1E برای زیرواحدهای A و B دیده شد (ΔG معادل kcal/mol ۲۶/۷-). محاسبه پایداری ترمودینامیکی پروتئین‌های اسپایک به کمک اندازه‌گیری پارامترهای ΔG^{int} و ΔG^{diss} انجام شد. بر اساس تفاوت انرژی توتال حلال برای ساختارهای جدا شده و اسمبل شده محاسبه می‌شود و ΔG^{diss} انرژی آزاد جداسازی واحدهای اسمبل شده را مشخص می‌کند. مقادیر بزرگ‌تر از صفر برای ΔG^{diss} نشان می‌دهد که برای جدا شدن زیر واحدهای یک ساختار الیگومر حضور یک

جدول ۲. پایداری ترمودینامیکی پروتئین‌های اسپایک

	ΔG^{int} (kcal/mol)	ΔG^{diss} (kcal/mol)
*QIA20044	-۱۰۶/۸	113/2
*AVP78042	-۹۶/۲	102/4
*QIA48614	-۸۳/۴	100/6

*QIA20044 (پروتئین اسپایک SARS-CoV-2)، *AVP78042 (پروتئین اسپایک bat-SL-CoVZXC21)، *QIA48614 (پروتئین اسپایک PCoV_GX-P1E)

ΔG^{int} : تفاوت انرژی توتال حلال برای ساختارهای جدا شده و اسمبل شده
 ΔG^{diss} : انرژی آزاد جداسازی واحدهای اسمبل شده

PCoV_GX-P1E در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده‌اند.

ساختار سوم پروتئین‌های اسپایک موجود در SARS-CoV-2، bat-SL-CoVZXC21 و PCoV_GX-P1E پس از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی تعیین شد (شکل ۵). موقعیت رزیدوهای هات اسپات قرمز در هر مونومر تشکیل دهنده اسپایک در این سه کرونا ویروس نشان داده شده است.

بحث

شناسایی میزبان‌های اصلی و میزبان‌های واسطه SARS-CoV-2 امروزه مورد توجه بسیار قرار گرفته

شناسایی اسیدهای آمینه حیاتی در ایجاد

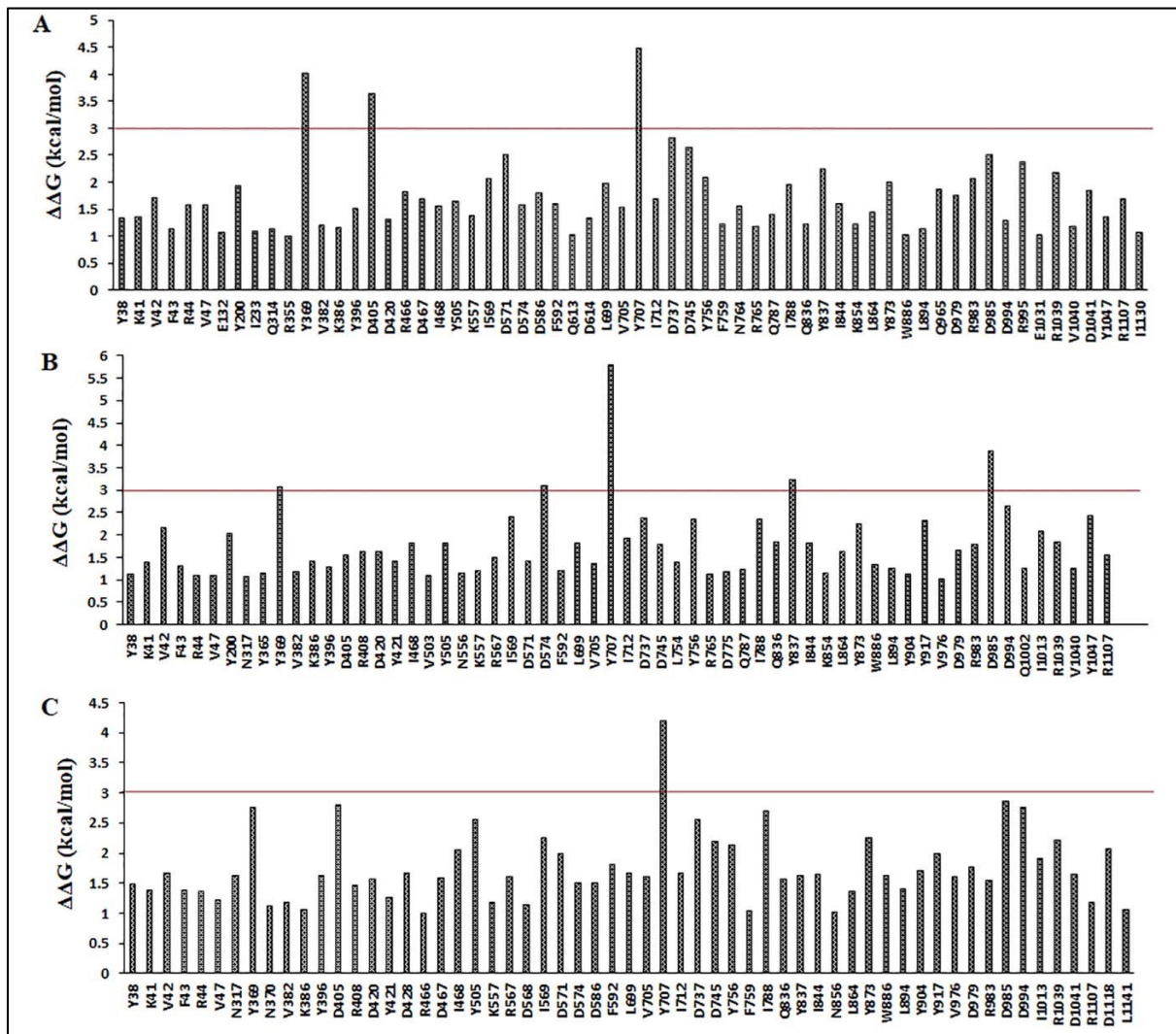
اتصالات بین زیر واحدهای پروتئین اسپایک

به‌منظور پیدا کردن اسیدهای آمینه حیاتی در اتصال بین زیرواحدها، از سرور DrugScore^{PPI} استفاده شد. آمینو اسیدهای هات اسپات بر اساس مقدار $\Delta \Delta G \geq 1$ مشخص شدند. برای مونومر A، B و C در SARS-CoV-2 به ترتیب ۶۲ و ۶۰ و ۵۹ هات اسپات مشخص شد این رزیدوها در شکل‌های 2A-C نشان داده شده‌اند. اسیدهای آمینه‌ای که $\Delta \Delta G \geq 3$ داشتند به‌عنوان اسیدهای آمینه هات اسپات قرمز در نظر گرفته شدند که نقش مهمی در ایجاد ارتباط بین مونومرها دارند. رزیدوهای هات اسپات در bat-SL-CoVZXC21 و

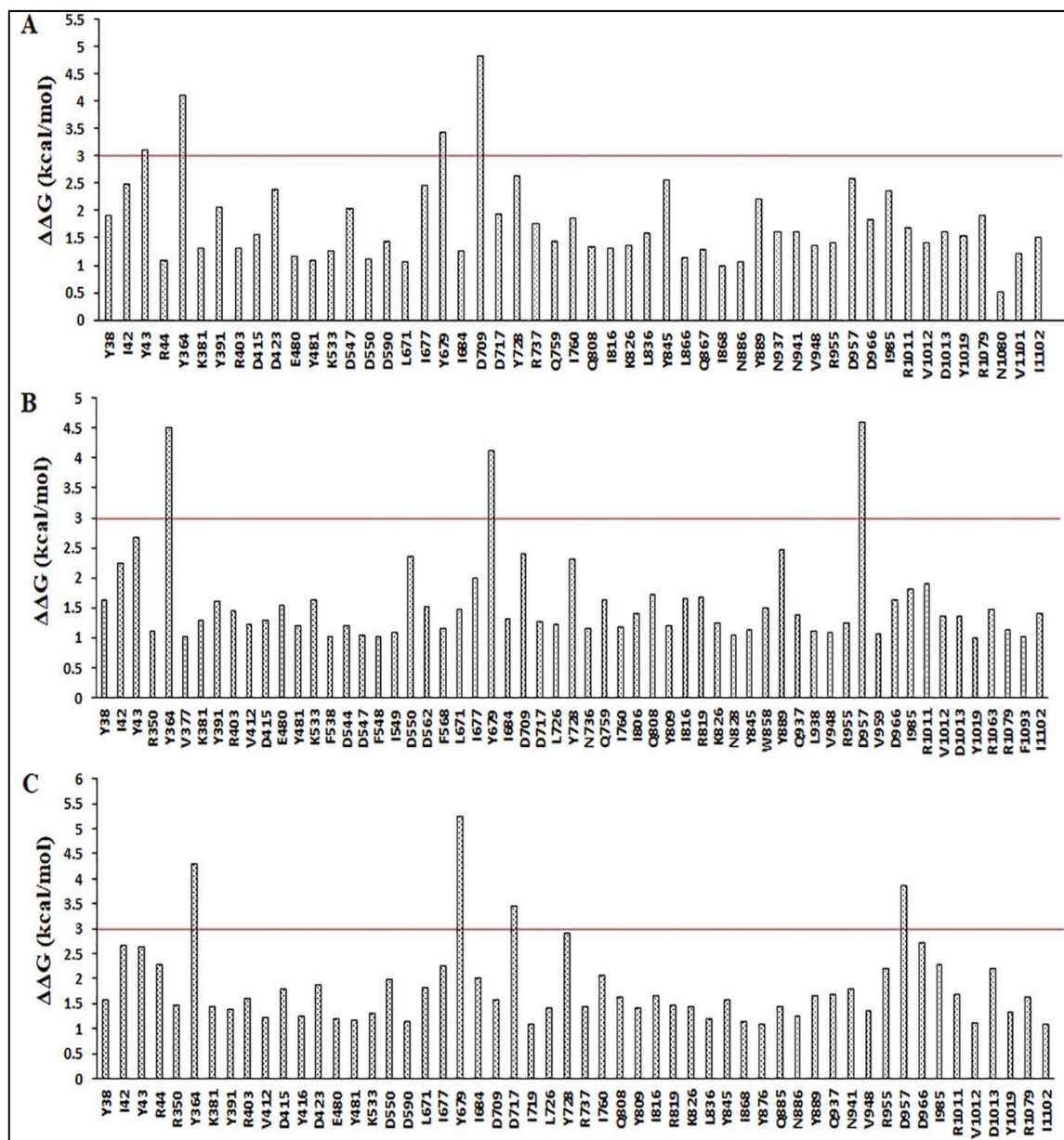
CoVZC21 ارتباط نزدیکی دارد و پیشنهاد کردند که SARS-CoV-2 ممکن است از این خفاش‌ها منشأ گرفته باشد (۳۰). مطالعه‌های انجام شده توسط Zhang و همکارانش نیز نشان دادند که کرونا ویروس‌های پانگولین ارتباط نزدیکی با SARS-CoV-2 دارند (۳۴).

با توجه به شناسایی والدهای احتمالی و نقش مهمی که پروتئین اسپایک در اتصال و ورود سلول میزبان دارد و بازیگر اصلی در همجوشی غشاهای سلولی است، در این مطالعه به بررسی و مقایسه ساختار این پروتئین در سه نوع کرونا ویروس SARS-CoV-2، bat-SL-CoVZXC21 و PCoV_GX-PIE پرداخته شد.

است. شناسایی این میزبان‌ها روند تکامل SARS-CoV-2 و بیماری‌زایی انسان‌ها را نشان می‌دهد. مطالعه‌های متعددی در این زمینه انجام شده است. بر اساس مطالعه‌های نو ترکیبی همولوگ در سال ۲۰۲۱ توسط Lohrasbi-Nejad, bat-SL-CoVZXC21 به‌عنوان والد ابتدایی و PCoV_GX-PIE به‌عنوان والد میانی در نظر گرفته شدند، این کرونا ویروس‌ها به ترتیب در *Manis javanica* و *Rhinolophus Sinicus* شناسایی شده بودند (۳۰). علاوه بر این، مطالعه‌ها، Lu و همکارانش بیان کردند که SARS-CoV-2 با دو سویه کرونا ویروس مشتق شده از خفاش، Bat-SL-CoVZC45 و Bat-SL-



شکل ۲. اسیدهای آمینه‌ها ت اسپات در منطقه رابط بین مونومرها در SARS-CoV-2 (A) زیر واحد A، (B) زیر واحد B و (C) زیر واحد C. اسیدهای آمینه حاوی $\Delta\Delta G \geq 3$ به عنوان هات اسپات قرمز شناخته می‌شوند

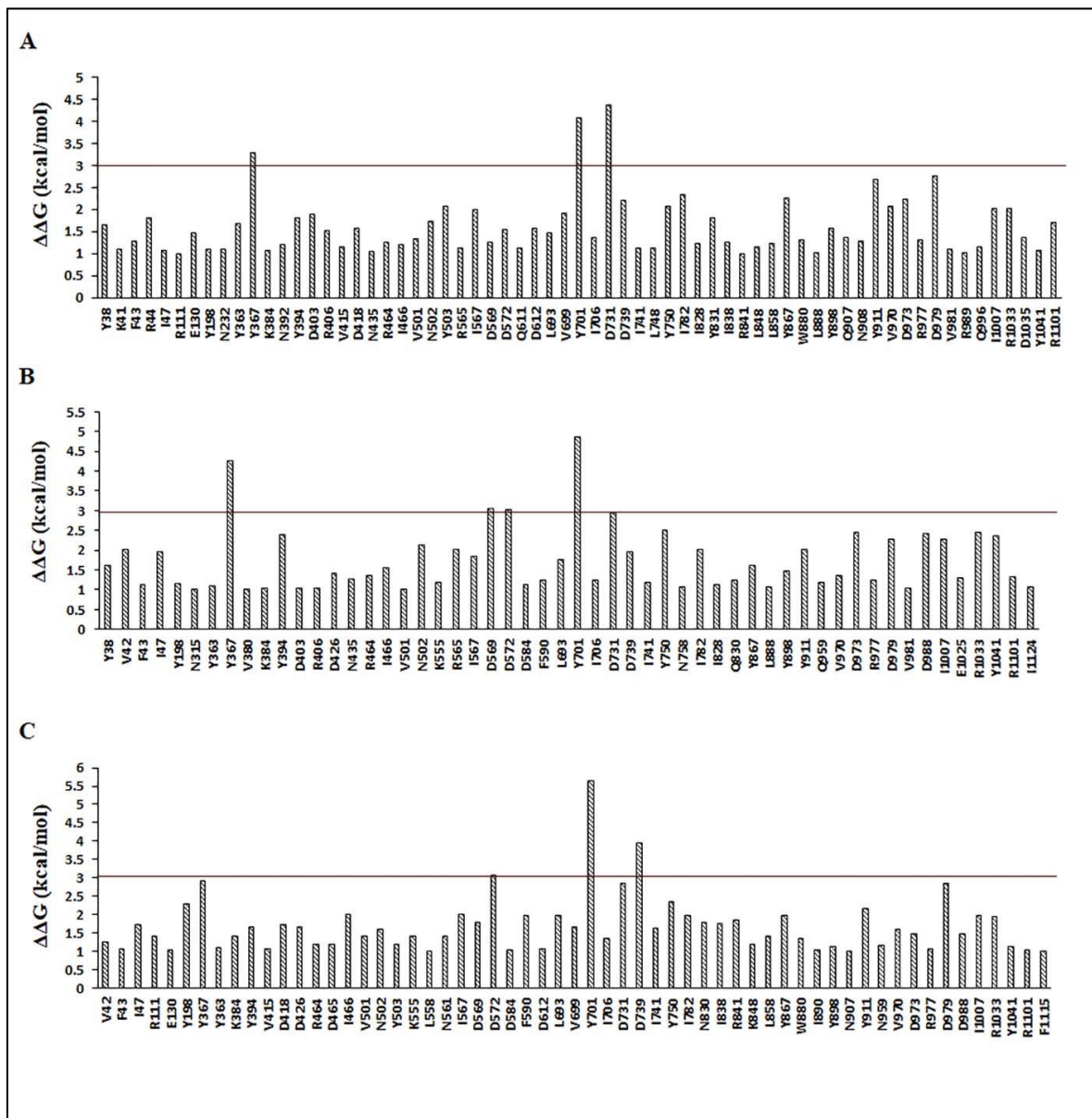


شکل ۳. اسیدهای آمینه هات اسپات در منطقه رابط بین موتورها در bat-SL-CoVZXC21 (A) زیر واحد A، (B) زیر واحد B و (C) زیر واحد C. اسیدهای آمینه حاوی $\Delta\Delta G \geq 3$ به عنوان هات اسپات قرمز شناخته می‌شوند.

در اولین قدم برای مدل سازی ساختارهای پروتئینی، الگوی مناسب (PDB= 7CN8) شناسایی و انتخاب شد. این نتایج همراستا با مطالعات انجام شده توسط Garushyants و همکارانش بود. آن‌ها برای مدل‌سازی ساختار سوم پروتئین اسپایک SARS-CoV-2 از اطلاعات ساختاری پروتئین با کد 7CN8 استفاده کردند و در نهایت نشان دادند ورود اسیدهای آمینه جدید در ساختار گلیکو پروتئینی اسپایک بر خواص آنتی‌ژنی آن تأثیر دارد و ممکن است موجب فرار ویروس از سیستم ایمنی شود (۳۵). به‌تازگی مشخص شده است که اسپایک

SARS-CoV-2 از طریق RBD به یک اسید چرب آزاد با نام لینولئیک اسید (LA) متصل می‌شود که به تثبیت اسپایک در ساختار فشرده و بسته کمک می‌کند (۳۶). مطالعه جدید توسط Zhang و همکارانش نشان داد که در هر دو پروتئین اسپایک متعلق به SARS-CoV-2 و PCoV_GX، LA در یک پاکت آبگریز قرار دارد که به‌طور عمده توسط بقایای فنیل آلانین شکل گرفته است. یک آرژنین (R406) در PCoV_GX و یک آرژنین (R408) و یک گلوتامین (Q407) در PCoV_GX و

SARS-CoV-2: Q409) لنگر را برای تعامل با
کربوکسیل سرگروه LA فراهم می‌کند (۳۴).



شکل ۴. اسیدهای آمینه هات اسپات در منطقه رابط بین مونومرها در PCoV_GX-P1E در واحد A، B، زیر واحد B و C) زیر واحد C. اسیدهای آمینه حاوی $\Delta\Delta G \geq 3$ به عنوان هات اسپات قرمز شناخته می‌شوند.

گیرنده سلولی ACE2 دارند (۳۴). در مطالعه حاضر، Y503 و Y505 به‌عنوان اسیدهای آمینه در گیر در ایجاد اتصالات بین زیر واحدهای A، B و C در SARS-CoV-2 و زیر واحدهای B و C در PCoV_GX-P1E شناخته شدند (شکل‌های ۲ و ۴).

با توجه به اهمیت پروتئین اسپایک، مطالعه‌های مقایسه‌ای روی اسپایک‌های موجود در کرونا ویروس‌های مختلف،

در مطالعه حاضر، مشخص شد که R408 در مونومرهای B و C مربوط به SARS-CoV-2 (شکل ۲) و R406 در مونومرهای A و B مربوط به PCoV_GX-P1E (شکل ۴) به‌عنوان اسیدهای آمینه هات اسپات شناخته شده‌اند. مطالعه‌های Zhang و همکارانش نشان دادند که Y503 و T499، Y505، Y447، N501، Y449 در SARS-CoV-2 نقش مهمی در اتصال اسپایک به

مطالعه ساختار پروتئین می‌تواند به درک عملکردهای زیستی و توسعه داروها در مقابل ویروس‌ها کمک کند. تلاش‌های زیادی برای شناسایی ساختار عملکرد پروتئین‌های اسپایک کرونا ویروس‌ها صورت گرفته است. اما در این مطالعه‌ها تنها قسمت‌هایی از کل ساختار پروتئین اسپایک در SARS-CoV-2 مشخص شده است. در حالی که در مطالعه حاضر از طریق شبیه‌سازی دینامیک مولکولی کل ساختار سوم اسپایک در SARS-CoV-2 شبیه‌سازی شد. علاوه بر این، شبیه‌سازی برای پروتئین اسپایک مربوط به bat-SL-CoVZXC21 و PCoV_GX-P1E که به‌عنوان والد احتمالی و والد ذخیره‌ای در نظر گرفته شدند، انجام شد. اسیدهای آمینه مهم در اتصال هر یک از زیرواحدها برای تشکیل ساختار تریمر اسپایک مشخص شدند. اسیدهای آمینه Y369, D405, Y707 در زیر واحد A و Y369, D574, Y707, Y837, D985 در زیر واحد B و Y707 در زیر واحد C به‌عنوان هات اسپات قرمز در SARS-CoV-2 شناخته شدند که برای اتصال زیر واحدها به یکدیگر نقش حیاتی ایفا می‌کنند. اندازه‌گیری میزان ΔG نشان داد که مونومرهای A و C تمایل بیشتری برای اتصال به یکدیگر دارند. پروتئین‌های اسپایک از نظر سطح رابط و میزان ΔG^{diss} ارزیابی و با یکدیگر مقایسه شدند. مقادیر بزرگتر از صفر برای ΔG^{diss} نشان داد که پروتئین اسپایک در SARS-CoV-2 دارای پایداری ترمودینامیک بالایی است.

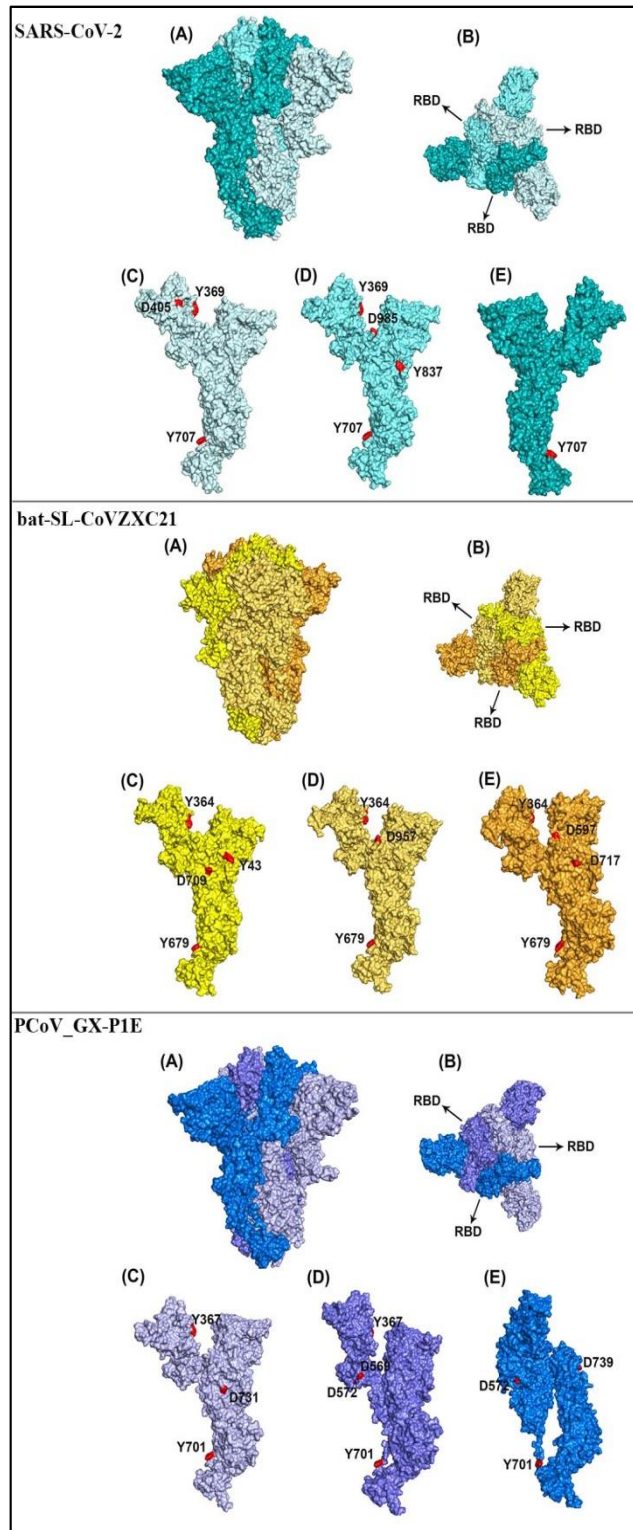
سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت معاونت پژوهشی و حمایت مالی پژوهشکده تحقیقات و فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران، با شماره گرنت [۹۰/۴۱] انجام شده است.

می‌تواند نقش مؤثری در شناخت تکامل ویروسی و انتقال بین گونه‌ای داشته باشد. مطالعه ساختار پروتئین‌ها مدت‌ها است که برای درک عملکرد زیستی پروتئین‌ها و توسعه داروها در مقابل ویروس‌های نوظهور مفید بوده است. بررسی ساختاری پروتئین اسپایک اطلاعات لازم در زمینه انتقال ویروس به میزبان‌های جدید و روش‌های خنثی کردن ویروس را فراهم می‌کند (۳۷،۳۸). امروزه پیشرفت‌های جدید در زمینه میکروسکوپ الکترونی روبشی (cryo - EM) امکان بازیابی کنفورماسیونی پروتئین‌های تریمریک اسپایک را فراهم کرد (۳۹). تلاش‌های حاصل نه تنها درک ما از عملکرد زیستی SARS-CoV-2 را بهبود بخشیده، بلکه راه‌های جدیدی برای درمان این ویروس نیز ارائه می‌کند. بیش‌ترین مطالعه‌هایی که تا امروز بر روی ساختار پروتئین اسپایک SARS-CoV-2 انجام شده است بر روی ناحیه RBD بوده است که موجب اتصال اسپایک به گیرنده آن در سطح سلول‌های هدف می‌شود. درحالی‌که در این مطالعه برهمکنش بین زنجیره‌های اسپایک برای تشکیل یک پروتئین تریمر بررسی شده است و اسیدهای آمینه حیاتی برای ایجاد اتصالات مشخص شده‌اند.

نتیجه‌گیری

بیماری همه‌گیر کووید-۱۹ در سال ۲۰۱۹ در ووهان چین شایع شد. شیوع این بیماری و ایجاد حالت اپیدمیک جهانی موجب شد تلاش‌های بسیاری برای شناخت ساختار و عملکرد این ویروس انجام شود. با توجه به اهمیت پروتئین اسپایک در بروز بیماری کووید-۱۹، محققان درصدد بررسی ساختار این پروتئین برآمده‌اند. اولین نقشه در مقیاس اتمی از پروتئین ویروس برای تولید واکسن علیه آن تهیه شده است. تاکنون مشخص شده است که قسمتی از این پروتئین (RBD) مسئول اتصال ویروس به گیرنده‌های سلول‌های انسانی است و موجب جوش خوردن سایر قسمت‌های ویروس به غشاء سلول‌های میزبان می‌شود. این روند برای ورود ویروس‌ها به درون سلول‌های انسانی و آلوده کردن آن‌ها لازم است.



شکل ۵. ساختارهای سه بعدی پروتئین اسپایک متعلقه به SARS-CoV-2، bat-SL-CoVZXC21، PCoV_GX-PIE است. (A، B) ساختار سه بعدی پروتئین، دمین متصل شونده به گیرنده (RBD) نشان داده شده است. (C، D، E) زیر واحدهای A، B و C که ساختار یک پروتئین را به همراهات اسپات قرمز آن را نشان می دهد. شبیه سازی دینامیک مولکولی برای هر یک از ساختارهای پروتئینی توسط نرم افزار NAMD انجام شد.

1. Chan JFW, Yuan S, Kok K-H, To KK-H, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*. 2020;395:514-23.
2. 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*. 2020a;395:497-506.
3. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395:565-74.
4. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y-M, Wang W, Song Z-G, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579:265-9.
5. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan China: a descriptive study. *Lancet*. 2020;395:507-13.
6. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan China of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med*. 2020;382:1199-207.
7. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol*. 2015;1282:1-23.
8. Nal B, Chan C, Kien F, Siu L, Tse J, Chu K, et al. Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. *J Gen Virol*. 2005;86:1423-34.
9. Siu YL, Teoh KT, Lo J, Chan CM, Kien F, Escriou N, et al. The M, E, and N structural proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus are required for efficient assembly, tracking, and release of virus-like particles. *J Virol*. 2008;82:11318-30.
10. Chang CK, Sue SC, Yu TH, Hsieh CM, Tsai CK, Chiang YC, et al. Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein. *J Biomed Sci*. 2006;13:59-72.
11. Hurst KR, Koetzner CA, Masters PS. Identification of in vivo-interacting domains of the murine coronavirus nucleocapsid protein. *J Virol*. 2009;83: 7221-34.
12. Klausegger A, Strobl B, Regl G, Kaser A, Luytjes W, Vlasak R. Identification of a coronavirus hemagglutinin-esterase with a substrate specificity different from those of influenza C virus and bovine coronavirus. *J Virol*. 1999;73:3737-43.
13. Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, Rottier PJ. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol*. 2003;77:8801-11.
14. Walls AC, Tortorici MA, Bosch BJ, Frenz B, Rottier PJM, DiMaio F, et al. Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. *Nature*. 2016;531:114-7.

15. Walls AC, Xiong X, Park YJ, Rey FLA, Corti D, Velesler D, et al. Unexpected Receptor Functional Mimicry Elucidates Activation of Coronavirus Fusion. *Cell*. 2019;176:1026-39.
16. Xiong X, Tortorici MA, Snijder J, Yoshioka C, Walls AC, Li W, et al. Glycan shield and fusion activation of a deltacoronavirus spike glycoprotein fine-tuned for enteric infections. *J Virol*. 2018;92:e01628-17.
17. Yang Y, Liu C, Du L, Jiang S, Shi Z, Baric RS, et al. Two Mutations Were Critical for Bat-to-Human Transmission of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol*. 2015b;89:9119–23.
18. Belouzard S, Chu VC, Whittaker GR. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:5871–6.
19. Burkard C, Verheije MH, Wicht O, van Kasteren SI, van Kuppeveld FJ, Haagmans BL, et al. Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. *PLoS Pathog*. 2014;10:e1004502.
20. Kirchdoerfer RN, Cottrell CA, Wang N, Pallesen J, Yassine HM, Turner HL, et al. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature*. 2016; 118:531-21.
21. Millet JK, Whittaker GR. Host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus after two-step, furin-mediated activation of the spike protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:15214–9.
22. Millet JK, Whittaker GR. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res* 2015;202:120-34.
23. Park JE, Li K, Barlan A, Fehr AR, Perlman S, McCray PBJ, et al. Proteolytic processing of Middle East respiratory syndrome coronavirus spikes expands virus tropism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113:12262–7.
24. Gui M, Song W, Zhou H, Xu J, Chen S, Xiang Y, et al. Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding. *Cell Res* 2017;27:119-29.
25. Pallesen J, Wang S, Corbett KS, Wrapp D, Kirchdoerfe RN. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERSCoV spike antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114:E7348-E57.
26. Song W, Gui M, Wang X, Xiang Y. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLoS Pathog* 2018;14:e1007236.
27. Walls AC, Tortorici MA, Snijder J, Xiong X, Bosch B-J, Rey FA, et al. Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *PNAS*. 2017;114:11157-62.
28. Yuan Y, Cao D, Zhang Y, Ma J, Qi J, Wang Q, et al. Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains. *Nat Commun*. 2017;8:1509.
29. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579:270–3.