
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Características de la proteína S relacionadas con infectividad de SARS-CoV-2 en comparación a SARS-CoV-1

Characteristics of S protein related to infectivity of SARS-CoV-2 compared to SARS-CoV-1.

Martín Díaz De Valdés Williamson¹, Patricia Dölz Torres¹, Bastián Estrada Cárdenas¹.

¹Estudiante de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

RESUMEN

El coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave tipo 2 (SARS-CoV-2), responsable de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), tiene similitudes estructurales y comparables mecanismos de patogenia con el virus del SARS 2003 (SARS-CoV-1). En esta revisión buscamos identificar las características y propiedades de la glicoproteína estructural "Spike" (Proteína S) involucrada en los mecanismos por los que SARS-CoV-2 ingresa a la célula, poniendo énfasis en las modificaciones del procesamiento enzimático y los cambios conformacionales que justifican la función de la proteína S en el reconocimiento con el receptor y la fusión de membrana (adsorción y penetración). También, nos proponemos indagar las diferencias que expliquen en parte el comportamiento diferencial de ambos coronavirus mencionados, y las implicancias de la mayor afinidad que tiene SARS-CoV-2 por el receptor Enzima Convertidora de Angiotensina 2 (ACE2) en comparación a SARS-CoV-1. La importancia del conocimiento estructural y funcional de la proteína radica ante todo en su utilidad para la identificación de segmentos potenciales para el desarrollo de vacunas específicas y de fármacos que intervengan en el proceso de infección.

PALABRAS CLAVE: SARS-CoV-2, SARS-CoV-2 Glicoproteína Spike, SARS-CoV-2 Infección.

ABSTRACT

The severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2), responsible for coronavirus disease 2019 (COVID-19), has structural similarities and comparable pathogenesis mechanisms with the SARS virus 2003 (SARS-CoV-1). In this review we seek to identify the characteristics and properties of the structural glycoprotein "Spike" (Protein S) involved in the mechanisms by which SARS-CoV-2 enters the cell, emphasizing enzyme processing modifications and conformational changes that justify the function of protein S in receptor recognition and membrane fusion (adsorption and penetration). Also, we propose to investigate the differences that explain in part the differential behavior of both coronaviruses mentioned, and the implications of the greater affinity that SARS-CoV-2 has for the receptor Angiotensin Converter Enzyme 2 (ACE2) compared to SARS-CoV-1. The importance of the structural and functional knowledge of the protein lies above all in its usefulness for the identification of potential segments for the development of specific vaccines and drugs involved in the infection process.

KEYWORDS: SARS-CoV-2, SARS-CoV-2 spike glycoprotein, SARS-CoV-2 infection.

INTRODUCCIÓN

Los coronavirus (CoVs) pertenecen a la familia Coronaviridae y se clasifican en cuatro géneros (α -, β -, γ -, δ - coronavirus) (1,2). Estos causan enfermedades que tienen manifestaciones respiratorias, gastrointestinales, hepáticas y neurológicas; afectando animales y humanos con variable severidad (3). Se caracterizan por ser encapsulados, con un genoma que consta de una hebra única (no segmentada) y positiva de ARN, de 26 a 32 kilobases de largo, siendo el genoma de ARN viral más largo conocido (1,4).

A la fecha hay siete CoVs humanos (HCoVs) identificados, de los cuales cuatro son responsables de infecciones respiratorias leves (229E, NL63, OC43 y HKU1) (1) y en un 10 a 15 % del resfriado común (5).

La nueva enfermedad COVID-19 es causada por un emergente "coronavirus del síndrome grave agudo respiratorio tipo 2" (SARS-CoV-2), que así como el tipo 1 (SARS-CoV-1) y el "coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio" (MERS-CoV), producen una infección grave. El actual brote de SARS-CoV-2 se ha extendido a tal punto que hoy es pandemia mundial y tiene significativa mortalidad. Esto contrasta mucho con los efectos leves de los otros coronavirus que afectan a humanos.

Solo recientemente los coronavirus empezaron a representar un problema de salud pública. No fue hasta 2002 que los coronavirus fueron ampliamente reconocidos como una amenaza importante, cuando comenzaron a aparecer casos de infección por SARS-CoV-1, llegando a producir 8422 infectados y causando 916 muertes (6). Luego, la emergencia de MERS-CoV para el 2012 implicó la infección de 1401 personas y la muerte de 543 personas en el mundo (OMS, 2020).

La emergencia de estos nuevos CoVs tiene su explicación en su gran prevalencia, su amplia distribución global, su diversidad genética y el aumento de la interfaz humano-animal, que promueve la zoonosis (7).

En general, los virus RNA se caracterizan por tener un genoma que muta con facilidad, ya que la exonucleasa de la ARN polimerasa no corrige los errores nucleotídicos al replicar las partículas virales (8). Lo cual explica su capacidad de emerger en nuevos hospedadores y eludir la inmunidad inducida por vacunas (9).

Así pues, en la presente revisión se busca describir los mecanismos de adsorción y penetración de SARS-CoV-2, identificando la estructura y función de la glicoproteína ligando S, para así, comparar estos hallazgos con los de SARS-CoV-1, estableciendo posibles diferencias que expliquen la ventaja y la mayor infectividad de SARS-CoV-2.

MACROESTRUCTURA

El diámetro de la partícula viral varía de aproximadamente 60 a 140 nm (10). Estructuralmente SARS-CoV-2 está constituido por cuatro proteínas: nucleocápside (N), membrana (M), envoltura (E) y Spike (S) (10,11).

La proteína N está unida al ARN viral y se asocia con las membranas celulares para realizar el ensamblaje del virión, por ello se encuentran en el retículo endoplásmico rugoso, donde participa en procesos asociados al genoma viral, principalmente, en el ciclo de replicación viral, entre otros. La proteína N se encuentra altamente fosforilada, y se sugiere que llevaría a cambios estructurales que mejoren la afinidad por el ARN viral (12,13).

La proteína M tiene un rol esencial en la determinación de la forma que presenta la envoltura del virus. Esta proteína es capaz de unirse a todas las otras proteínas estructurales, ayudando a mantener la curvatura de la membrana y la unión y estabilización de la nucleocápside (2).

La proteína E tiene un rol en la producción y maduración del virus, ya que participa en los procesos de ensamblaje y liberación de este (14).

La proteína S corresponde a la proteína ligando, que es distintiva para cada coronavirus. Mide aproximadamente 9 a 12 nm y da a los viriones la apariencia de una corona, a lo que debe su nombre (10,11).

CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA S Y DE SUS SUBUNIDADES S1 Y S2

La glicoproteína S (proteína S) está categorizada como proteína de fusión viral clase 1 (15).

Como tal, es responsable de la unión a un receptor del huésped y luego de la fusión entre las membranas lipídicas viral y celular.

Estructuralmente se encuentra en la superficie del virión como un homotrímero compuesto por tres cadenas polipeptídicas idénticas (15,16,17).

La subunidad S1 se encarga de unir la proteína al receptor, en la membrana de la célula hospedera y estabilizar el estado conformacional previo a la fusión de membranas (15,17).

A su vez, esta constituye la mayor parte del área de superficie de la proteína S e incluye el dominio de unión al receptor (RBD), es decir el tramo de aminoácidos que permite la unión al receptor. El receptor del huésped en el caso de SARS-CoV-2 es la enzima convertidora de angiotensina 2 humana (ACE2) (15). La cual está presente en varios tipos celulares, que harían vulnerables no sólo al pulmón, también a riñones, corazón, segmentos del tracto gastrointestinal, entre otros (18).

En el estudio de modelos sobre la estructura cristalizada de la proteína S al estar asociada al receptor ACE2 para SARS-CoV-1 se observó que el RBD viral contiene un motivo de unión a receptor (RBM) cuya característica es que este segmento se asocia a la superficie externa de ACE2, generando enlaces intermoleculares. Este mismo segmento se halla para SARS-CoV-2 (19).

También, se ha visto en estudios de criomicroscopía electrónica que la localización de RBM para la proteína S varía cuando se encuentra formando un homotrímero en un estado previo a la fusión con ACE2. En el estado “cerrado”, se observó que RBM para cada monómero se encontraba menos accesible en la estructura trimétrica, mientras que en su estado “semi abierto”, RBM en solo uno de los monómeros se encontraba expuesto. La apertura de la proteína S se espera que sea necesaria para la interacción con el receptor ACE2 e iniciación del proceso de fusión de membrana. Se hipotetiza, a su vez, que la proteína S de aquellos coronavirus más patógenos (SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, MERS) poseen como propiedad la alternancia entre ambos estados (20,21).

Cabe señalar que para que la proteína cumpla su función, es necesario que esta sea procesada por proteasas de la célula huésped (2,15,25). Existen dos sitios de procesamiento proteolítico, uno ubicado en la interfaz S1/S2 y otro ubicado en la subunidad S2.

El sitio ubicado en la interfaz S1/S2 es poli básico, está compuesto por residuos de arginina y no esta presente en SARS-CoV-1. Su importancia radica en que permite dejar ambas subunidades en la proteína S unidas por medio de un enlace no covalentes, procesamiento que se realiza posterior a su síntesis por medio de enzimas furinas (15,26).

Además, se plantea, a partir de experimentos in vitro, que la presencia de este segmento es esencial para la infección de células pulmonares (27). En cambio, el sitio ubicado en la subunidad S2 se piensa que activa la proteína S para la fusión de membranas. El mecanismo propuesto es que luego de la unión a receptor, la escisión de este sitio expone el péptido de fusión (dominio funcional de S2) encargado de anclar la proteína S a la membrana celular. Una vez que se encuentra anclada, tiene lugar la formación del complejo HB-6 (2,26).

En relación con lo anterior, la entrada de SARS-CoV-2 se puede clasificar dependiendo del tipo de proteasa celular que procese el sitio de clivaje S2. Una vía, sería dependiente de proteasas endosomales (catepsinas B/L), mientras la otra, dependiente de proteasas de membrana (Proteasa Transmembrana Serina 2 o TMPRSS2) asociado a furina, ampliamente expresada en tejido pulmonar y bronquial. Al intervenir en la acción de ambas vías, se inhibe la entrada de SARS-CoV 2 (23,25). Cabe aclarar que ambas vías dependen de la endocitosis.

COMPARACIÓN ENTRE PROTEÍNA S DE SARS-COV2 Y SARS-COV1

El análisis proteico comparativo entre las glicoproteínas S de SARS-CoV-2 y SARS-CoV-1 permite identificar cambios en la composición de aminoácidos que permiten entregar conocimiento relacionado con el comportamiento diferencial entre ambos coronavirus, como también sobre las relaciones evolutivas que ambos virus comparten.

Al comparar ambas proteínas se halló una similitud alrededor de 77% en su composición aminoacídica y para RBM un 50% de similitud (19,28). Además, se identificó la presencia de 22 aminoácidos variantes y un total de 5 inserciones de grupos de aminoácidos. Estas inserciones se relacionaron con cambios en el NTD, RBD y en el sitio de escisión S1 / S2, permitiendo el procesamiento proteolítico por enzimas furinas (28).

En relación con la subunidad S1, se observó que el RBD es la porción menos conservada entre los coronavirus humanos, que comparte sólo un 73% de similitud con el SARS-CoV-1 y un 21%-25% de similitud con el resto de los coronavirus y son estas las diferencias proteicas que dictan, en parte, la especificidad del receptor del virus (19).

Al comparar ambos dominios HR1 se observó una similitud del 92,6%, no así para el dominio HR2, que se encuentra conservado. La diferencia entre ambos dominios HR1 se presenta dentro de una región relacionada con la fusión de dominios HR1 y HR2, que contiene 8 residuos aminoácidos diferentes, los cuales

contribuirían a fortalecer las interacciones entre ambos dominios y a estabilizar la conformación del complejo HB-6 de SARS-CoV-2. Este cambio estructural en la secuencia de aminoácidos permite que se formen interacciones mediante puentes salinos y puentes de hidrógeno de menor longitud que en el SARS-CoV, explicando las propiedades mencionadas. Además, esta mayor afinidad entre ambos dominios aceleraría el proceso de fusión de la membrana viral e incrementará la infectividad (24).

La comparación de estructuras 3D de las proteínas S reveló tener una secuencia semi conservada, presentando en SARS-CoV-2 cuatro residuos más cargados positivamente y cinco residuos menos cargados negativamente que SARS-CoV-1. A pesar de la aparente pequeña diferencia de cargas entre las proteínas S, las repercusiones en las fuerza electrostáticas son notables. Esto debido a que el efecto para un monómero es amplificado por la distribución de proteínas presentes en una partícula viral (29).

Tomando lo anterior en consideración, cabe destacar que en la fase de anclaje son las fuerzas electrostáticas las que conducen la formación de los complejos receptor-ligando transitoria y no específica, cuando el estado de la proteína S es cerrado o no receptivo. Ya luego del cambio conformacional que sufre la Proteína S, los tres RBD se abren, presentando RBD para la formación de un complejo bien definido, estabilizado ya no solo por fuerzas electrostáticas sino también interacciones no polares e hidrofóbicas (29).

En cuanto a las relaciones evolutivas, se ha propuesto, en base a las características estructurales conservadas que presentan las diversas glicoproteína S de distintos coronavirus, que SARS-CoV-2 posee más cercanía con coronavirus encontrados en murciélago (RaTG13) y pangolin (CoV-pangolin/GD) que con SARS-CoV-1, insinuando un origen zoonótico relacionado con estos virus (2,20). No obstante, la similitud en la estructura ligado-receptor formada por las proteínas SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2 sustenta que ambos coronavirus comparten un antepasado común (20).

SUSCEPTIBILIDAD Y AFINIDAD CON ACE2

La susceptibilidad a la infección viral está determinada por la afinidad de RBD hacia el receptor del huésped celular (19). La calidad de la interacción receptor/ligando, por ende, determina el rango hospedero del virus, así como también la capacidad de transmitirse entre una misma y entre distintas especies. Adaptaciones de RBD al receptor ACE2 han dotado a SARS-CoV-2 la capacidad de infectar y propagarse entre humanos (19, 2).

En este sentido, análisis de diversos estudios y experimentos sugieren que la proteína S en SARS-CoV-2 posee mayor afinidad por el receptor ACE2 que para la proteína S en SARS-CoV-1 (15,21,23), lo que podría estar relacionado con una mayor transmisibilidad del virus entre humanos. No obstante, a pesar de poseer distintas afinidades, ambas proteínas forman un complejo proteína-receptor similar (15,23).

Se desconoce exactamente qué cambios moleculares explican el salto entre especies, sin embargo, por medio del estudio de estructuras cristalizadas se visualizaron a nivel molecular nuevas interacciones entre RBM de SARS-CoV-2 y ACE2 no vistas para SARS-CoV-1, que explican una mayor afinidad por el receptor, y, posiblemente, den cuenta de los aminoácidos involucrados en la transmisión zoonótica (unión a ACE2 humano) (20, 30).

Se destacan cambios en las interacciones para los sitios de unión a virus en ACE2 (Hotspots 31 LYS y 353 LYS), cambios estructurales en RBD, la emergencia de un "bolsillo" hidrofóbico para RBM que conlleva nuevos enlaces (en presencia de Phe 486 y TYR 489) y la inclusión de aminoácidos 481-485 (alias, loop $\beta 1'/\beta 2'$) asociado a una conformación espacial diferencial de RBM exclusivo para RaTG13 y SARS-CoV-2 que permite una mayor cantidad de enlaces tipo fuerzas de Van der Waals con el receptor (23,28,31). Estos cambios, junto con la presencia de un sitio de clivaje para enzimas furina (20), se relacionan con una mayor interacción molecular y afinidad hacia el receptor, y posiblemente con una alta tasa de transmisibilidad. Además, se especula que la presencia del sitio de clivaje para furina se podría relacionar con la expansión del tropismo celular, la transmisibilidad e incluso un cambio en la patogenicidad del virus (15, 26). Se ha observado en estudios in vitro que la modificación de estos aminoácidos o la eliminación del sitio de clivaje S1/S2 modifica la susceptibilidad del virus a ciertos tipos celulares (15,20).

CONCLUSIONES

El estudio de la proteína S de SARS-CoV-2 presenta especial relevancia dado que permite explicar cómo el virus infecta, qué cualidades de la proteína hacen distintivo a este virus en comparación a SARS-CoV-1, qué tejidos son susceptibles de ser infectados, que organismos son capaces de enfermar por el virus, cuál es el origen del virus mismo, entre otras preguntas. En este sentido, abordamos 3 focos que entregan información para responder a las preguntas planteadas:

Las características estructurales y proteicas de la glicoproteína S que están involucradas en el mecanismo de entrada a la célula de SARS-CoV-2, la mención de las características exclusivas para SARS-CoV-2 en contraste con SARS-CoV-1 y la relación que existe entre las características moleculares de la unión ligando-receptor con la susceptibilidad y tasa de transmisión del virus.

Recalamos que la entrada de SARS-CoV-2 a células susceptibles es un proceso concertado entre la unión a ACE2 y el procesamiento proteolítico de la proteína S, que promueven la adsorción y penetración viral. Esencialmente la glicoproteína S, que forma un homotrímero protruyendo de la superficie viral, tiene dos subunidades: una encargada de la unión al receptor (S1), por medio de RBD, y la otra de la mecánica de la fusión de membranas (S2). En adición, la adhesión electrostática a superficies, el reconocimiento y anclaje a receptor ACE2, los cambios conformacionales precedidos a la escisión entre S1 y S2 (furina) y en S2 (TMPRSS2, Catepsina L/B) relacionados con la separación de las subunidades y la exposición del péptido de fusión, y la conformación del núcleo de fusión HB-6 resultan ser procesos esenciales que permiten la adsorción y penetración de SARS-CoV-2.

Al momento de comparar las proteínas S para SARS-CoV-2 y SARS-CoV-1 destacamos que las principales diferencias se hallaron para RBD, HR1 y en un segmento con propiedades eléctricas, además de la presencia del sitio poli básico en S1/S2. Estas diferencias están involucradas en propiedades intrínsecas de la proteína S para SARS-CoV-2, tal como una mayor afinidad entre RBD y el receptor ACE2, la conformación de un núcleo de fusión más estable y una mayor capacidad de adherencia inespecífica a superficies.

Ahondando en las diferencias comparativas encontradas para RBD, SARS-CoV-2 presenta mutaciones que conllevan asociadas la formación de enlaces más estrechos y más numerosos con el receptor ACE2. El aumento de la afinidad por el receptor es probable que esté asociado a un incremento en la tasa de transmisión y en una mayor infectividad por parte del virus.

Las mutaciones y diferencias mencionadas son fuente de variabilidad del virus (32), las cuales causan permanente preocupación, por lo que se debe estar constantemente pesquisando estas variables, secuenciando el genoma en pos de identificar cambios que impliquen una mayor infectividad del virus.

Entre las limitaciones que tiene estudiar a SARS-CoV-2, mediante el enfoque trabajado en esta revisión, es que la búsqueda se realizó sin metodología referente a la fecha de publicación de los artículos, los cuales fueron admitidos por la información que aportan, y dada la gran cantidad de información emergente y la variabilidad propia del virus, se corre el riesgo de que la información trabajada aquí puede ser obsoleta en poco tiempo. Sin ir más lejos, estudios prospectivos de secuencias registradas en la base de datos “Global Initiative on Sharing All Influenza Data” (GISAID), identificaron una variación de 4 nucleótidos en el genoma viral de SARS-CoV-2 que podría explicar un aumento en la tasa de infectividad y un incremento aparente en la carga viral. Esta nueva cepa viral habría desplazado en prevalencia a la anterior (32). Esto da cuenta de lo rápido que puede cambiar la proteína S, dando cuenta de lo mencionado.

El estudio de la estructura y propiedades de la glicoproteína S, así como las interacciones moleculares entre el virus y el receptor del huésped, permiten identificar las zonas o etapas que pudiesen ser objetivo de un tratamiento específico y eficaz, interviniendo en su patogenia (23). Además, dado que la proteína S es crucial en la infectividad de SARS-CoV-2, por su exposición y especificidad se ha propuesto que es posiblemente inmunogénica (33) y se requiere mayor estudio para el desarrollo de vacunas.

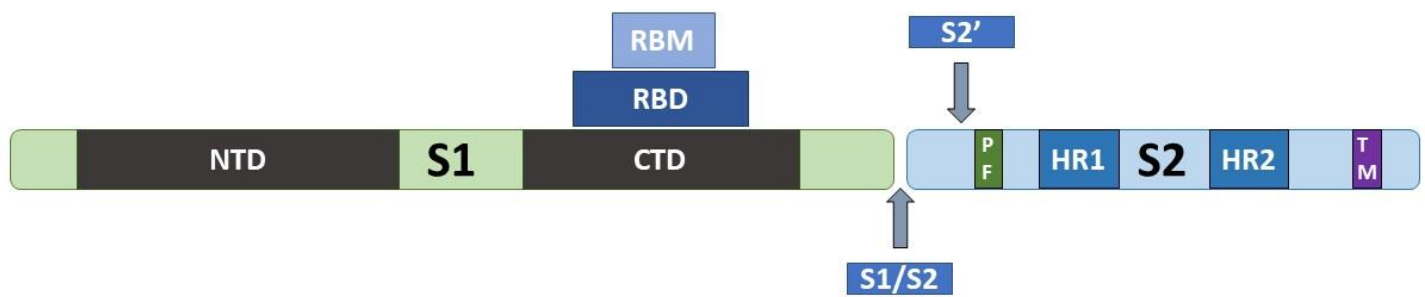


Figura 1: Representación gráfica no a escala de las subunidades S1 y S2, junto con los dominios relevantes en este contexto y ambos sitios de escisión indicados por flechas. La superposición de los dominios CTD, RBD y RBM indican que uno (rectángulo menor) está contenido sobre el otro (rectángulo mayor), formando parte de este. S1, Subunidad 1; S2, Subunidad 2; NTD, Dominio N Terminal; CTD, Dominio C Terminal; RBD, Dominio de Unión a Receptor; RBM, Motivo de Unión a Receptor; PF, Péptido de Fusión; HR1, Región Heptada Repetida 1; HR2, Región Heptada Repetida 2; TM, Dominio Transmembrana; S1/S2, Sitio de Escisión S1/S2; S2', Sitio de Escisión S2. Elaboración propia, modificado de (20,24,25).

Correspondencia

Martín Díaz De Valdés

martin.diazdevaldes@ug.uchile.cl

Agradecimientos

Agradecimientos a Rodrigo Rivera Martínez y Diego Muñoz Salamanca por haber aportado en un inicio a la producción del documento.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses en relación a este trabajo.

Información sobre el artículo

Recibido el 28 de julio de 2020.

Aceptado el 27 de agosto de 2020.

Publicado el 8 de octubre de 2020.

Referencias

1. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol.* 2020;92(4):418-423.
2. Malik YA. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol* 2020;42(1) :3 – 11.
3. Woo P, Lau S, Lam C, Lau C, Tsang A, Lau J et al. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *J Virol.* 2012;86(7):3995-4008.
4. Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P et al. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol.* 2020;92(4):424-432.
5. Wat D. The common cold: a review of the literature. *Eur J Intern Med.* 2004;15(2):79-88.
6. Koh D, Sng J. Lessons from the past: perspectives on severe acute respiratory syndrome. *Asia Pac J Public Health.* 2010;22(3 Suppl):132s-136s.
7. Cui J, Li F, Shi Z. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2018;17(3):181-192.
8. Elena S, Sanjuán R. Adaptive Value of High Mutation Rates of RNA Viruses: Separating Causes from Consequences. *J Virol.* 2005;79(18):11555-11558.
9. Duffy S. Why are RNA virus mutation rates so damn high?. *PLoS Biol.* 2018;16(8):e3000003.
10. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;382(8):727-733.
11. Tortorici M, Velesler D. Structural insights into coronavirus entry. *Adv Virus Res.* 2019;93-116.
12. Rabaan A, Al-Ahmed S, Haque S, Sah R, Tiwari R, Malik YS, et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: A comparative overview. *Infez Med.* 2020 Ahead Of Print Jun 1;28(2):174-184.
13. Astuti I, Ysrafil. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab Syndr.* 2020 July-August; 14(4): 407-412.
14. Tilocca B, Soggiu A, Sanguinetti M, Babini G, De Maio F, Britti D et al. Immunoinformatic analysis of the SARS-CoV-2 envelope protein as a strategy to assess cross-protection against COVID-19. *Microbes Infect.* May-Jun 2020;22(4-5):182-187.
15. Walls A, Park Y, Tortorici M, Wall A, McGuire A, Velesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.* 2020 Apr;181(2):281-292.e6.
16. Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol.* 2016; 3(1): 237-261.

17. Zhou P, Yang X, Wang X, Hu B, Zhang L, Zhang W et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-273.
18. Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med*. 2020;14(2):185-192.
19. Wan Y, Shang J, Graham R, Baric R, Li F. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *J Virol*. 2020;94(7).
20. Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*. 2020;581(7807):221-224.
21. Wrapp D, Wang N, Corbett K, Goldsmith J, Hsieh C, Abiona O et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020;367(6483):1260-1263.
22. Okba N, Müller M, Li W, Wang C, GeurtsvanKessel C, Corman V et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg. Infect. Dis*. 2020;26(7):1478-1488.
23. Sivaraman H, Yin E, Choong Y, Gavor E, Sivaraman J. Structural Basis of the SARS-CoV-2/SARS-CoV Receptor Binding and Small-Molecule Blockers as Potential Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2020 Jun ;61(1).
24. Xia S, Liu M, Wang C, Xu W, Lan Q, Feng S et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Res*. 2020 Apr;30(4):343-355.
25. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*. 2020 Mar;11(1):1620.
26. Pillay T. Gene of the month: the 2019-nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike protein. *J Clin Pathol*. 2020 Jul;73(7):366-369.
27. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol Cell*. 2020 May;78(4):779-784.e5.
28. Lokman S, Rasheduzzaman M, Salauddin A, Barua R, Tanzina A, Rumi M et al. Exploring the genomic and proteomic variations of SARS-CoV-2 spike glycoprotein: A computational biology approach. *Infect Genet Evol*. 2020 Oct; 84: 104389.
29. Hassanzadeh K, Perez Pena H, Dragotto J, Buccarello L, Iorio F, Pieraccini S et al. Considerations around the SARS-CoV-2 Spike Protein with Particular Attention to COVID-19 Brain Infection and Neurological Symptoms. *ACS Chem Neurosci*. 2020 Jul;.
30. 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. *Cell*. 2020;181(4):894-904.e9.
31. 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(10224):565-574.
32. Korber B, Fischer W, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*. 2020
33. Motley M, Bennett-Guerrero E, Fries B, Spitzer E. Review of Viral Testing (Polymerase Chain Reaction) and Antibody/Serology Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 for the Intensivist. *Crit Care Explor*. 2020;2(6):e0154.