

УДК 577.12

СВОБОДНЫЕ S1-СУБЪЕДИНИЦЫ БЕЛКА ШИПОВ ВИРУСА SARS-CoV-2 МОГУТ ДЕЙСТВОВАТЬ В КАЧЕСТВЕ ФАКТОРА ПАТОГЕНЕЗА COVID-19

© 2021 А.В. Летаров^{1,2*}, В.В. Бабенко³, Е.Е. Куликов¹

¹ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского,
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
117312 Москва, Россия; электронная почта: letarov@gmail.com

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119234 Москва, Россия

³ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России,
119435 Москва, Россия

Поступила в редакцию 25.11.2020

После доработки 04.12.2020

Принята к публикации 04.12.2020

Ранее было высказано предположение, что в патогенезе заболевания COVID-19 важную роль может играть дисбаланс ренин-ангиотензиновой системы. На мышинной модели было показано, что экспрессия белка-рецептора ACE2 на клеточной поверхности подавляется в ответ на инфекцию SARS-CoV, и такой же эффект может быть вызван экспозицией клеток к рекомбинантному вирусному белку шипов S. В случае естественной инфекции циркуляция S-белка в растворимой форме маловероятна, однако у вируса SARS-CoV-2 при созревании вириона большая часть тримеров S-белка подвергается препроцессингу протеазой фурином с расщеплением исходного полипептида по сайту на границе субъединиц S1 и S2. В результате при переходе белка шипов в конформацию слияния субъединицы S1, несущие рецептор-связывающие домены, могут свободно отделяться от связанных с мембраной субъединиц S2. Судьба S1-субъединиц, отщепившихся из-за спонтанного изменения конформации некоторых тримеров S-белка, экспонированных на вирионах и на внешней поверхности инфицированных клеток, никогда не исследовалась. Мы предполагаем, что свободные S1-субъединицы белка шипов SARS-CoV-2, выделяемые с поверхности инфицированных клеток и из вирионов *in vivo*, могут связываться с рецептором ACE2 и снижать его представленность на поверхности клетки. Снижение активности ACE2 на фоне постоянной или повышенной активности ACE в легких может приводить к преобладанию эффектов ангиотензина II, ведущих к усилению тромбоза, воспаления и повреждению легочной ткани. Этот механизм также предполагает связь между пониженной (по сравнению с формой D614G дикого типа) продукцией субъединиц S1 клетками при инфекции вирусом, несущим мутацию S-белка D614G, и отсутствием повышенной тяжести протекания COVID-19 при заражении этой линией вируса, несмотря на показанные для неё повышенную инфекционность и более высокую вирусную нагрузку *in vivo*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: SARS-CoV-2, ренин-ангиотензиновая система, отщепление субъединицы S1 белка S, патогенез COVID-19, мутация D614G.

DOI: 10.31857/S0320972521030131

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия COVID-19, которая уже привела примерно к двум миллионам смертей во всем мире, вызвана коронавирусом SARS-CoV-2, который, скорее всего, перешел к человеку от какого-то вида животных в конце 2019 года [1]. Вирус SARS-CoV-2 имеет большую степень сходства с Coronavirus RaTG13 летучих мышей,

однако высказывались предположения об участии промежуточного хозяина (вероятно, панголина) [2]. Считается, что адаптация вируса SARS-CoV-2 к репликации в клетках человека в основном была связана с приобретением новой последовательности рецептор-связывающего домена (RBD) белка шипов S. RBD вируса SARS-CoV-2 эффективно распознает находящийся на клеточной мембране ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2) человека. Хотя родственный SARS-CoV-2, коронавирус SARS-CoV, также распознает ACE2 в качестве клеточного рецептора [1], только 8 из 14 критических для узнавания аминокислотных остатков

Принятые сокращения: ACE – ангиотензин-превращающий фермент; RBD – рецептор-связывающий домен; PAC – ренин-ангиотензиновая система.

* Адресат для корреспонденции.

оказываются консервативными между RBD этих вирусов [2].

Для проникновения коронавируса в клетку хозяина необходим процессинг вирусного S-белка протеазами хозяина, расщепляющими полипептидную цепь на стыке субъединиц S1 и S2 [1]. Этот процессинг может происходить непосредственно после присоединения вириона к клеточной поверхности за счет протеазы TMPRSS2 или уже в лизосомном компартменте после интернализации вируса [1, 3]. Протеолитический процессинг белка S позволяет субъединице S1 диссоциировать, запуская перестройку субъединицы S2 в конформацию, необходимую для инициации слияния вирусной и лизосомной мембран [4].

У некоторых коронавирусов протеолитический процессинг S-белка может происходить во время сборки вириона в аппарате Гольджи. Такой процессинг требует, чтобы на стыке субъединиц S1 и S2 присутствовал сайт узнавания протеазы фурина [3]. В SARS-CoV-2 вставка последовательности аминокислот PRRA после 675 а.о. S-белка создала сайт расщепления фурином – RRAR [2]. Наличие этого сайта приводит к эффективному процессингу S-белка в инфицированной клетке [3, 5]. Предварительный протеолитический процессинг S-белка перед высвобождением вируса делает последующую инфекцию более эффективной [3] и потенциально может позволить части вирусных частиц проникать в инфицируемые клетки непосредственно через плазматическую мембрану, не попадая в лизосомный компартмент [6]. Более эффективное проникновение SARS-CoV-2 в клетку, равно как и более высокое сродство его RBD к рецепторам (по сравнению с RBD SARS-CoV, в котором также отсутствует сайт процессинга фурином), может компенсировать для SARS-CoV-2 относительное снижение доступности RBD для связывания с рецептором ACE2, связанное с тем, что на большинстве тримеров S-белка SARS-CoV-2 два из трех RBD находятся в «закрытой» конформации [3]. В этой конформации RBD закрыты как для факторов гуморального иммунитета хозяина (например, антител), так и для распознавания рецепторов. У вируса SARS-CoV на большинстве шипов все три RBD присутствуют в «открытой» конформации [7].

Как и в случае любой вирусной пневмонии, патогенез заболевания COVID-19, а также SARS, как полагают, в основном связан с поражением вирусом эпителиальных клеток легких, а также, и даже в большей степени, с явлениями, связанными с ответом иммунной системы на инфекцию [1, 8].

ФОРМУЛИРОВКА ГИПОТЕЗЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установление роли белка ACE2 в качестве рецептора как SARS-CoV, так и SARS-CoV-2 породило предположение о том, что помимо вышеупомянутых механизмов (которые могут быть дополнительно усилены вторичной бактериальной инфекцией), патогенез заболеваний COVID-19 и SARS может в значительной степени быть связан с вызванным вирусом дисбалансом ренин-ангиотензиновой системы (РАС) [9, 10].

ACE2 – это металлопротеаза клеточной поверхности (карбоксипептидаза), которая превращает декапептид ангиотензина I в нонапептид – ангиотензин (1–9). В отличие от ACE2, фермент ACE1 (или ACE) превращает ангиотензин I в физиологически активный октапептид ангиотензин II (или ангиотензин (1–8)). Ангиотензин (1–9), производимый ACE2, может быть далее преобразован в гептапептид ангиотензин (1–7) с помощью фермента ACE1. Ангиотензин II, в свою очередь, также может превращаться в ангиотензин (1–7) с помощью ACE2 [9, 10]. Нормальная физиологическая активность ангиотензина II способствует повышению артериального давления за счет вазоконстрикции, но в то же время этот гормон способствует развитию местных воспалительных реакций, повышению свертываемости крови, тромбозу, фиброзу, увеличению проницаемости капилляров и возникновению отеков. Ангиотензин (1–7) имеет в основном противоположные эффекты, снижая воспаление, тромбоз, фиброз и вызывая расширение сосудов [9, 10]. Следовательно, повышение представленности функционального белка ACE1 и/или понижение представленности функционального белка ACE2 на поверхности клеток приводят к усилению вызванного вирусной инфекцией повреждения лёгочной ткани.

В экспериментах на мышинной модели было показано, что инфекция SARS-CoV действительно снижает представленность белка ACE2 на поверхности клеток [9–11]. Было высказано предположение, что прикрепление вируса к молекулам ACE2 вызывает их удаление с поверхности клетки посредством ко-эндоцитоза с вирусом, снижая интегральную активность ACE2. Этот эффект предположительно приводит к дисбалансу между ангиотензином II и ангиотензином (1–7) в легочной ткани, что увеличивает тромбоз и степень повреждения легких [9, 10].

С нашей точки зрения, прямое механическое удаление молекул ACE2 путем прикрепления к ним вирионов вряд ли способно внести существенный вклад в общую активность фер-

мента в ткани легких. Для достижения такого эффекта потребовалось бы одновременное прикрепление вируса к значительной части клеток, продуцирующих ACE2 (таких, например, как альвеоциты II). Мы считаем, что при такой высокой вирусной нагрузке прямое повреждение эпителиальных клеток не было бы совместимо с выживаемостью пациента. В то же время наблюдаемая смертность даже в тяжелых случаях COVID-19 является весьма умеренной [1, 8]. Насколько нам известно, о случаях COVID-19 с выявленной экстремальной вирусной нагрузкой также пока не сообщалось.

В то же время в вышеупомянутом исследовании [11] снижение уровня ACE2 у мышей вызывалось не только экспериментальной инфекцией SARS-CoV, но и рекомбинантным белком шипа SARS-CoV. Мыши, предварительно обработанные этим белком (путем внутрибрюшинной инъекции), не обнаруживали значительных патологических изменений, однако при экспериментальном впрыскивании в легкие кислоты предварительная обработка животных рекомбинантным белком приводила к усилению повреждения легких [11].

Таким образом, белок шипов, который синтезируется в значительном молярном избытке по сравнению с вирусными частицами, может опосредовать подавление представленности функционального белка ACE2 на клеточной поверхности и вызвать таким образом дисбаланс PAC. Было показано, что S-белки мышинных коронавирусов и вируса SARS-CoV доставляются на поверхность клетки, предположительно, как побочный продукт процесса сборки и высвобождения вируса. Эти молекулы могут вызывать некоторые физиологические эффекты, такие как микропиноцитоз и/или слияние мембран соседних клеток [6], однако S-белок всегда остается прикрепленным к инфицированной клеточной мембране. Следует отметить, что значительное число копий белка S также присутствуют и на поверхности вирусных частиц, высвобождаемых инфицированными клетками в среду.

Недавно с помощью прямой криоэлектронной и просвечивающей электронной микроскопии [12] было продемонстрировано, что большинство тримеров S-белка на поверхности культивируемых *in vitro* частиц SARS-CoV-2 присутствует в конформации, характерной для фазы после слияния мембран. Другими словами, диссоциация субъединиц S1 и изменение конформации белка происходили до фактического связывания белком рецептора. Несмотря на то что в условиях исследования диссоциация субъединиц S1 могла частично происходить

из-за физико-химических воздействий во время градиентного центрифугирования, используемого для очистки вируса, или при инактивации вируса 0,05% β -пропиолактоном [12], этот результат демонстрирует, что в процессированных фурином вирионах SARS-CoV-2 диссоциация субъединицы S1 может быть вызвана относительно мягкими воздействиями или даже происходить спонтанно. Также было показано отщепление субъединиц S1 от частиц жизнеспособных лентивирусов, псевдотипированных белком шипа SARS-CoV-2 [13], что подтверждает возможность спонтанного «срабатывания» S-белка.

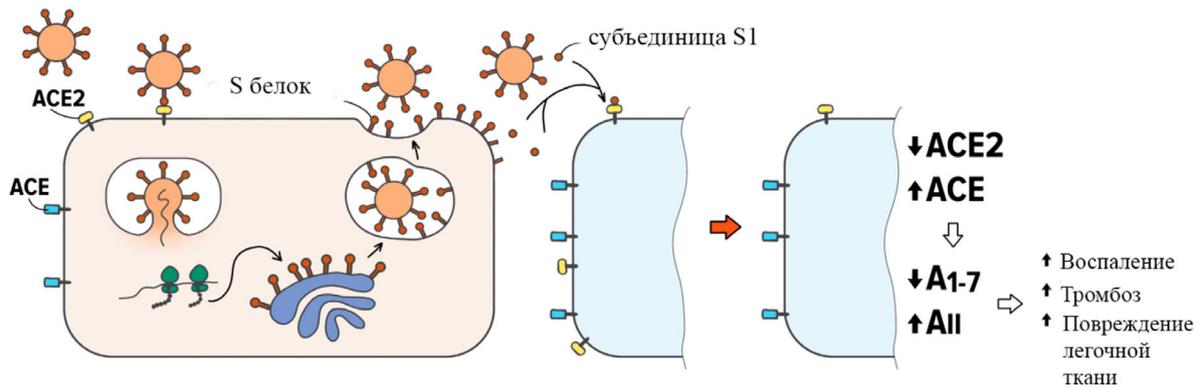
Мы предполагаем, что значительное количество свободных растворимых субъединиц S1 может таким образом высвобождаться с поверхности инфицированных клеток и вирионов (рисунков).

Эти молекулы несут интактные домены RBD, и их связывание с рецептором ACE2 может вызывать снижение активности ACE2 и последующие вредные для организма эффекты, как и предполагалось ранее [9, 14].

Если наша гипотеза окажется верной, высвобождение свободных S1-субъединиц из инфицированных клеток и вирионов должно снижать инфекционность вируса по отношению к клеткам, соседствующим с уже инфицированными вирусом клетками, уменьшая количество доступных для связывания с вирионами молекул рецептора ACE2 на их поверхности. Таким образом, можно прогнозировать две стадии развития инфекции SARS-CoV-2 в легких.

I. Вирус инфицирует определенные локусы ткани, где выработка свободного белка S1 вызывает подавление ACE2 в неинфицированных клетках, находящихся в непосредственной близости от инфицированных клеток. Одновременно экспрессия ACE2 на более удаленных клетках, которые еще не столкнулись с частицами S1, может быть увеличена за счет действия интерферона [15], активно продуцируемого инфицированными клетками. Локальный дисбаланс уровней ангиотензина II/ангиотензина (1–7) также может вызывать компенсаторное увеличение уровня ACE2 в клетках, не затронутых вирусом (хотя такая компенсаторная схема еще не описана, логично предположить, что она может существовать). Следовательно, распространение вируса на большие расстояния (например, в другие альвеолы) будет облегчено. В то же время степень повреждения тканей, вызванная вирусной инфекцией, будет ограничена.

II. Когда инфицировано большее количество лёгочной ткани, в единицу времени вырабатывается большее количество свободных S1-субъединиц, и за счёт их влияния возникает



Гипотеза об участии свободных субъединиц S1 белка шипов SARS-CoV-2 в патогенезе COVID-19. Спонтанное «срабатывание» тримеров S-белка, присутствующих на поверхности вирионов и инфицированных клеток, высвобождает свободные S1-субъединицы, содержащие RBD. Связывание этих частиц с рецепторами ACE2 на поверхности незараженных клеток может вызвать снижение представленности ACE2 и привести к дисбалансу ренин-ангиотензиновой системы. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

дисбаланс РАС на уровне органа или организма. Это вызывает вредные эффекты, такие как усиление воспаления, тромбоза и повреждения легких, как предполагалось ранее [9, 14]. Одновременно продукция вируса тканями должна снижаться из-за подавления экспрессии белка ACE2 в инфицированных областях легких.

Эта модель хорошо соответствует известным клиническим признакам COVID-19 [16, 17]: сообщалось о патологическом процессе, который обычно затрагивает большие участки легких с частой двусторонней пневмонией (стадия I нашей модели). При этом пациенты нередко чувствуют себя относительно хорошо, несмотря на то что, по данным рентгенологического исследования, вирусом поражена значительная часть легких; за этим может последовать резкое ухудшение состояния пациента через несколько часов или дней (поздняя стадия I и стадия II).

Предлагаемая нами модель позволяет предсказать, что ранее предложенные клинические вмешательства, направленные на поддержание баланса РАС [18], будут иметь синергический эффект с ингибиторами протеаз, особенно с ингибиторами фурина. Хотя данные исследований *in vitro* показывают, что отсутствие предварительного процессинга фурином белка S SARS-CoV-2 может быть компенсировано после присоединения вируса процессингом другими протеазами [3], наша модель предполагает, что ингибирование фурина не только уменьшит общую инфекционность вируса, но и сократит количество диссоциирующих от вирионов и инфицированных клеток частиц S1, в целом смягчая опосредованное дисбалансом РАС повреждение ткани.

Варианты SARS-CoV-2, содержащие мутацию D614G в белке S, которые были обнаруже-

ны недавно [13, 19–22], за короткое время стали эпидемиологически доминировать во многих регионах мира, где было отмечено их присутствие. Было продемонстрировано, что мутация D614G снижает стабильность тримера белка S, а также способствует переходу RBD в открытую конформацию [23]. Эта мутация увеличивает общую инфекционность и приспособленность вируса [19–22, 24], повышая сродство фурина к S-белку [25] и усиление репликации вируса [26]. Однако нет никаких указаний на то, что мутация D614G связана с более серьезными симптомами заболевания COVID-19. Интересно, что, несмотря на дестабилизацию тримера S-белка, несущего замену D614G, было показано, что высвобождение S1-частиц лентивирусами, псевдотипированными мутантным белком шипов SARS-CoV-2 [13], значительно снижено по сравнению с белком D614 дикого типа. Наша гипотеза предполагает, что уменьшение выделения растворимых субъединиц S1 может быть одним из факторов, ограничивающих заболеваемость и смертность при инфекциях SARS-CoV-2 D614G, несмотря на возросшую инфекционность вируса и более высокие уровни вирусной нагрузки, наблюдаемые при инфекциях SARS-CoV-2 мутантного генотипа [20].

Эксперименты, которые могут позволить проверить нашу гипотезу о S1-опосредованном патогенетическом процессе при COVID-19, относительно просты. Они могут быть основаны на количественных измерениях концентрации частиц S1 в культурах клеток, инфицированных SARS-CoV-2, получении препаратов частиц S1 путем ультрафильтрации супернатантов клеточных культур, экспериментальном тестировании способности таких частиц связываться с рецеп-

тором ACE2, а также на оценке влияния этих частиц на экспрессию ACE2 и параметры PAC как в культурах клеток, так и в моделях на животных.

Также следует отметить, что свободные молекулы S1 могут представлять собой потенциальную мишень для терапии или профилактики COVID-19. После отделения субъединицы S1 от S2 потенциальные эпитопы, свободные от гликанов, экранирующих в норме внешнюю поверхность полного S-белка [27], становятся экспонированными. Таким образом, иммунизация рекомбинантными белками, способными вызвать появление антител к этим консервативным эпитопам, становящимся доступными для связывания антител, может привести к секвестри-

рованию свободных молекул S1 в иммунные комплексы и их последующему устранению, что снизит вероятность тяжелого течения вирусной пневмонии, вызванной COVID-19.

Благодарности. Авторы благодарны Ксении Сайфулиной из Московского государственного психолого-педагогического университета за помощь в создании рисунка.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chen, Y., Liu, Q., and Guo, D. (2020) Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis, *J. Med. Virol.*, **92**, 418–423, doi: 10.1002/jmv.25681.
- Zhang, T., Wu, Q., and Zhang, Z. (2020) Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak, *Curr. Biol.*, **30**, 1578, doi: 10.1016/j.cub.2020.03.063.
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., and Li, F. (2020) Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 11727–11734, doi: 10.1073/pnas.2003138117.
- Walls, A. C., Tortorici, M. A., Snijder, J., Xiong, X., Bosch, B. J., Rey, F. A., and Veesler, D. (2017) Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 11157–11162, doi: 10.1073/pnas.1708727114.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., and Pöhlmann, S. (2020) A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells, *Mol. Cell*, **78**, 779–784, doi: 10.1016/j.molcel.2020.04.022.
- Freeman, M. C., Peek, C. T., Becker, M. M., Smith, E. C., and Denison, M. R. (2014) Coronaviruses induce entry-independent, continuous macropinocytosis, *mBio*, **5**, doi: 10.1128/mBio.01340-14.
- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., et al. (2020) Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation, *Science*, **367**, 1260–1263.
- Matricardi, P. M., Dal Negro, R. W., and Nisini, R. (2020) The first, holistic immunological model of COVID-19: Implications for prevention, diagnosis, and public health measures, *Pediatr. Allergy Immunol.*, **31**, 454–470, doi: 10.1111/pai.13271.
- Gheblawi, M., Wang, K., Viveiros, A., Nguyen, Q., Zhong, J. C., et al. (2020) Angiotensin-converting enzyme 2: SARS-CoV-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system: celebrating the 20th anniversary of the discovery of ACE2, *Circ. Res.*, **126**, 1456–1474, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317015.
- Verdecchia, P., Cavallini, C., Spanevello, A., and Angeli, F. (2020) The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection, *Eur. J. Int. Med.*, **76**, 14–20, doi: 10.1016/j.ejim.2020.04.037.
- Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Gao, H., Guo, F., et al. (2005) A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury, *Nat. Med.*, **11**, 875–879, doi: 10.1038/nm1267.
- Liu, C., Mendonça, L., Yang, Y., Gao, Y., Shen, C., et al. (2020) The architecture of inactivated SARS-CoV-2 with postfusion spikes revealed by cryo-EM and cryo-ET, *Structure*, **28**, 1218–1224, e1214.
- Zhang, L., Jackson, C. B., Mou, H., Ojha, A., Rangarajan, E. S., Izzard, T., Farzan, M., and Choe, H. J. B. (2020) The D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces S1 shedding and increases infectivity, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.06.12.148726.
- Verdecchia, P., Cavallini, C., Spanevello, A., and Angeli, F. (2020) The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection, *Eur. J. Int. Med.*, **76**, 14–20, doi: 10.1016/j.ejim.2020.04.037.
- Ziegler, C. G. K., Allon, S. J., Nyquist, S. K., Mbanjo, I. M., Miao, V. N., et al. (2020) SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues, *Cell*, **181**, 1016–1035, e19, doi: 10.1016/j.cell.2020.04.035.
- Siordia, J. A., Jr. (2020) Epidemiology and clinical features of COVID-19: a review of current literature, *J. Clin. Virol.*, **127**, 104357, doi: 10.1016/j.jcv.2020.104357.
- Zhao, D., Yao, F., Wang, L., Zheng, L., Gao, Y., Ye, J., Guo, F., Zhao, H., and Gao, R. (2020) A comparative study on the clinical features of COVID-19 pneumonia to other pneumonias, *Clin. Infect. Dis.*, **71**, 756–761, doi: 10.1093/cid/ciaa247.
- Sriram, K., and Insel, P. A. (2020) A hypothesis for pathobiology and treatment of COVID-19: The centrality of ACE1/ACE2 imbalance, *Br. J. Pharmacol.*, **177**, 4825–4844, doi: 10.1111/bph.15082.
- Groves, D. C., Rowland-Jones, S. L., and Angyal, A. (2020) The D614G mutations in the SARS-CoV-2 spike protein: implications for viral infectivity, disease severity and vaccine design, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.10.109.
- Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., et al. (2020) Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus, *Cell*, **182**, 812–827, e819, doi: 10.1016/j.cell.2020.06.043.

21. Long, S. W., Olsen, R. J., Christensen, P. A., Bernard, D. W., Davis, J. J., et al. (2020) Molecular architecture of early dissemination and massive second wave of the SARS-CoV-2 virus in a major metropolitan area, *mBio*, **11**, doi: 10.1128/mBio.02707-20.
22. Plante, J. A., Liu, Y., Liu, J., Xia, H., Johnson, B. A., et al. (2020) Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness, *Nature*, doi: 10.1038/s41586-020-2895-3.
23. Yurkovetskiy, L., Wang, X., Pascal, K. E., Tomkins-Tinch, C., Nyalile, T. P., et al. (2020) Structural and functional analysis of the D614G SARS-CoV-2 spike protein variant, *Cell*, **183**, 739-751.e8, doi: 10.1016/j.cell.2020.09.032.
24. Ogawa, J., Zhu, W., Tonnu, N., Singer, O., Hunter, T., Ryan, A. L., and Pao, G. M. (2020) The D614G mutation in the SARS-CoV2 Spike protein increases infectivity in an ACE2 receptor dependent manner, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.07.21.214932.
25. Mohammad, A., Alshawaf, E., Marafie, S. K., Abu-Farha, M., Abubaker, J., and Al-Mulla, F. (2020) Higher binding affinity of Furin to SARS-CoV-2 spike (S) protein D614G could be associated with higher SARS-CoV-2 infectivity, *Int. J. Infect. Dis.*, doi: 10.1016/j.ijid.2020.10.033.
26. Hou, Y. J., Chiba, S., Halfmann, P., Ehre, C., Kuroda, M., et al. (2020) SARS-CoV-2 D614G variant exhibits enhanced replication *ex vivo* and earlier transmission *in vivo*, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.09.28.317685.
27. Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S., and Crispin, M. (2020) Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike, *Science*, **369**, 330-333, doi: 10.1126/science.abb9983.

FREE SARS-CoV-2 SPIKE PROTEIN S1 PARTICLES MAY ACT AS A FACTOR OF COVID-19 PATHOGENESIS

Hypothesis

A. V. Letarov^{1,2*}, V. V. Babenko³, and E. E. Kulikov¹

¹ *Winogradsky Institute of Microbiology, RC Biotechnology RAS, 117312 Moscow, Russia; E-mail: letarov@gmail.com*

² *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

³ *Federal Research and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, 119435 Moscow, Russia*

The imbalance of the renin-angiotensin system is currently considered as a potentially important factor of the pathogenesis of COVID-19 disease. It has been shown previously in the murine model, that the expression of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) on the cell surface is downregulated in response to the infection by SARS-CoV virus or recombinant spike protein (S protein) alone. In the case of natural infection, circulation of the S protein in a soluble form is unlikely. However, in SARS-CoV-2, a large fraction of S protein trimers is pre-processed during virion morphogenesis due to the presence of furin protease cleavage site between the S1 and S2 subunits. Therefore, S protein transition into the fusion conformation may be accompanied by the separation of the S1 subunits carrying the receptor-binding domains from the membrane-bound S2 subunits. The fate of the S1 particles shed due to the spontaneous "firing" of some S protein trimers exposed on the virions and on the surface of infected cells has been never investigated. We hypothesize that the soluble S1 subunits of the SARS-CoV-2 S protein shed from the infected cells and from the virions *in vivo* may bind to the ACE2 and downregulate cell surface expression of this protein. The decrease in the ACE2 activity on the background of constant or increased ACE activity in the lungs may lead to the prevalence of angiotensin II effects over those of angiotensin (1-7), thus promoting thrombosis, inflammation, and pulmonary damage. This hypothesis also suggests the association between less pronounced shedding of the S1 particles reported for the S protein carrying the D614G mutation (vs. the wild type D614 protein), and lack of increased severity of the COVID-19 infection caused by the mutant (D614G) SARS-CoV-2 strain, despite its higher infectivity and higher *in vivo* viral load.

Keywords: SARS-CoV-2, renin-angiotensin system, Spike protein S1 subunit shedding, COVID-19 pathogenesis, D614G mutation