



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский университет
«Высшая школа экономики»

ПАТОГЕНЕЗ COVID-19: микроРНК И ГЛАВНЫЙ КОМПЛЕКС ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ

М.Ю. Шкурников,
А.Г. Тоневицкий,
С.И. Колесников

МОСКВА
2025

УДК 616
ББК 54.12
Д 87

Рецензенты:

Дыгай А.М., академик РАН
Зыков К.А., член-корреспондент РАН

Шкурников М.Ю., Тоневицкий А.Г., Колесников С.И. Патогенез COVID-19: микроРНК и главный комплекс гистосовместимости. М.: РАН, 2025. – с. 144, 31 ил.

DOI:

В монографии представлен материал о патогенезе новой коронавирусной инфекции в разные периоды пандемии COVID-19 с позиции обоснования роли микроРНК и ГКГС-I в формировании, развитии заболевания и стойкости иммунитета к вирусу SARS-CoV-2. Представленные в монографии результаты исследований могут стать основой для создания высокоэффективных вакцин на основе пептидов ORF1ab вируса SARS-CoV-2. Особое внимание в работе уделено разработке научно обоснованного патофизиологического подхода к анализу индивидуальных особенностей генотипа ГКГС-I пациентов, которые позволяют совершенствовать прогноз развития тяжелых и крайне тяжелых форм COVID-19 и, вероятно, других вирусных инфекций, а значит, более эффективно оказывать медицинскую помощь в условиях продолжающихся вспышек заболевания и в периоды смены генотипа возбудителя.

Для патофизиологов, пульмонологов, фармакологов и других специалистов.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	8
НОВАЯ КОРОНАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ: ПАТОГЕНЕЗ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ	10
Патогенез COVID-19	10
Формирование иммунитета к SARS-CoV-2	12
Врожденный иммунитет в борьбе с SARS-CoV-2	12
Приобретенный иммунитет к SARS-CoV-2	15
Роль главного комплекса гистосовместимости класса 1 в формировании противовирусного иммунитета	19
Роль микроРНК в противовирусном иммунитете	21
Молекулярно-генетические особенности SARS-CoV-2	27
Факторы прогноза тяжести течения COVID-19	31
Демографические факторы риска	32
Метаболические заболевания	33
Генетические факторы	33
ВЗАИМОСВЯЗЬ ГКГС-I С ТЯЖЕСТЬЮ COVID-19	35
Оценка влияния мутаций на иммунодоминантные эпитопы вируса SARS-CoV-2	37
Прогноз аффинности взаимодействия молекула ГКГС-I – пептид	42
Создание набора последовательностей пептидов SARS-CoV-2	42
Выбор модели прогноза и прогноз аффинности взаимодействия молекула ГКГС-I– пептид	43

РОЛЬ МИКРОРНК В РЕГУЛЯЦИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСА И МАКРООРГАНИЗМА.....	45
Мутации SARS-CoV-2 приводят к снижению числа регионов связывания с микроРНК ткани лёгких	45
Влияние микроРНК кишечника на эволюцию SARS-CoV-2	49
Влияние микроРНК на экспрессию рецептора ACE2	58
Профили экспрессии ACE2 и TMPRSS2 в разных органах	59
Взаимодействия между изо-микроРНК и ACE2/TMPRSS2	59
Лизин-специфическая деметилаза 5B регулирует ACE2 и TMPRSS2 посредством репрессии активности let-7e/miR-125a и miR-141/miR-200	62
Экспрессия JARID1B ассоциирована с экспрессией ACE2 и TMPRSS2 в большинстве клеток человека	63
Роль циркулирующей микроРНК miR-19b в прогнозе исхода COVID-19	66
РАЗРАБОТКА И ПРОВЕРКА КЛИНИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ОБОСНОВАННОГО АЛГОРИТМА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ ДЛЯ ПРОГНОЗА ТЯЖЕЛОГО И КРАЙНЕ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ COVID-19 НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ГЕНОТИПА ГКГС-I	72
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	77
БИБЛИОГРАФИЯ	83
ПРИЛОЖЕНИЕ А. ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ, КЛИНИЧЕСКИЕ ГРУППЫ И МЕТОДЫ	123
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. РУКОВОДСТВО ПО РАСЧЕТУ «ИНДЕКСА РИСКА» С ПОМОЩЬЮ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ «АФФИСЕНС»	139

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АГ** – артериальная гипертензия
БД – база данных
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
ГКГС – главный комплекс гистосовместимости
ДИ – доверительный интервал
ДМСО – диметилсульфоксид
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИВЛ – инвазивная механическая вентиляция легких
ИЛ-6 – интерлейкин 6
ИМТ – индекс массы тела
ИФА – иммуноферментный анализ
кДНК – комплементарная ДНК
ЛПВП – липопротеины высокой плотности
ЛПНП – липопротеины низкой плотности
микроРНК – малые некодирующие молекулы РНК длиной 18-25 нуклеотидов
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
НАН РА – Национальная академия наук Республики Армения
ОИТ – отделение интенсивной терапии
ОП – оптическая плотность
ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром
ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ОХ – общий холестерол
ОШ – отношение шансов
ПО – программное обеспечение
при-микроРНК – от англ. pri-miRNA или long primary miRNA transcript; длинный первичный микроРНК-транскрипт
РНК – рибонуклеиновая кислота
РПЖ – рак предстательной железы
СД – сахарный диабет
СД2 – сахарный диабет 2 типа
сиРНК – от англ. siRNA, small interfering RNA; малые интерферирующие РНК
СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ЭВМ – электронная вычислительная машина
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭПР – эндоплазматический ретикулум
АВИ – Армянский институт биоинформатики
АСЕ2 – от англ. angiotensin-converting enzyme 2; ангиотензинпревращающий фермент 2
АИМ-V – безсывороточная среда для выращивания и активации лимфоцитов

- AIM2** – от англ. absent in melanoma 2 – отсутствующий при меланоме белок 2
- BVDV** – от англ. bovine viral diarrhea virus; вирусная диарея коров
- CD** – от англ. cluster of differentiation; кластер дифференцировки
- COVID-19** – от англ. COroNaVIrus Disease 2019; коронавирусная инфекция 2019 года
- CTD** – от англ. C-terminal domain; С-концевой домен
- СРБ** – С-реактивный белок
- Е-белок** – от англ. Envelope – оболочка
- ELISpot** – от англ. Enzyme-Linked ImmunoSpot; иммуноферментный тест с локальным связыванием для качественного выявления выработки антител и интерлейкинов на клеточном уровне в системе *in vitro*
- FASTA** – текстовый формат файлов для нуклеотидных или полипептидных последовательностей
- FDR** – от англ. false discovery rate; ожидаемая доля ложных отклонений
- GISAID** – от англ. Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data; база данных Глобальной инициативы по обмену данными о птичьей гриппе
- QWAS** – от англ. genome-wide association study; полногеномное исследование ассоциаций
- HbA1c** – гликозилированный гемоглобин
- HDAC** – от англ. histone deacetylases; гистоновая деацетилаза
- HLA** – от англ. Human Leukocyte Antigen; человеческий лейкоцитарный антиген
- IEDB** – от англ. Immune Epitope Database and Analysis Resource; База данных и ресурс для анализа иммунных эпитопов
- IFN- γ** – от англ. interferon gamma; интерферон гамма
- IgG** – от англ. Immunoglobulin G, иммуноглобулин класса G
- IRF** – от англ. interferon regulatory factors; интерферон-регулирующие факторы
- KDM5B** – от англ. lysine demethylase 5B; JARID1B; лизин-специфическая деметилаза 5B
- М-белок** – от англ. Membrane – мембрана
- МАРК** – от англ. mitogen-activated protein kinases; митоген-активируемые протеинкиназы
- MAVS** – от англ. mitochondrial antiviral signaling protein; белок противовирусного сигнального пути митохондрий
- MDA5** – от англ. melanoma differentiation-associated protein 5; белок, ассоциированный с дифференцировкой меланомы 5
- MERS-CoV** – коронавирус ближневосточного респираторного синдрома
- МНС** – от англ. Major Histocompatibility Complex; главный комплекс гистосовместимости
- miRISC** – от англ. microRNA-induced silencing complex; микроРНК-индуцируемый сайленсинг-комплекс
- Мpro** – от англ. Main protease; основная протеаза
- Н-белок** – от англ. Nucleocapsid – нуклеокапсид
- NF- κ B** – от англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; транскрипционный фактор NF- κ B

NGS – от англ. next generation sequencing; секвенирование нового поколения
NK-клетки – от англ. Natural killer cells; клетки- естественные киллеры
NLR – от англ. NOD-like receptors, где NOD – nucleotide-binding oligomerization domain, нуклеотид-связывающий олигомеризационный домен; NOD-подобные рецепторы
NSP – от англ. Nonstructural protein; неструктурный белок
NTD – от англ. N-terminal domain; N-концевой домен
ORF – от англ. open reading frame; открытая рамка считывания
PAMP – от англ. pathogen-associated molecular patterns; патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
PBMC – от англ. peripheral blood mononuclear cell; мононуклеарная клетка периферической крови
Ppro – от англ. Papain-like protease; папаиноподобная протеаза
PRR – от англ. pattern recognition receptors; рецепторы распознавания паттернов
RBD – от англ. Receptor-binding domain; рецептор-связывающий домен
RHDV – от англ. rabbit hemorrhagic disease virus; вирус геморрагической болезни кроликов
RLR – от англ. RIG-I-like receptors, где RIG-I – retinoic acid-inducible gene I, индуцируемый ретиноевой кислотой ген I; RIG-I-подобные рецепторы I
RSV – от англ. rice stripe virus; вирус штриховатости риса
S-белок – от англ. Spike — шип
SARS-CoV-2 – от англ. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2; коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома 2
scRNA-seq – от англ. Single cell RNA sequencing; секвенирование РНК одиночных клеток
SIRS – от англ. systemic inflammatory response syndrome; синдром системного воспаления
STAT1 – от англ. Signal transducer and activator of transcription 1; преобразователь сигнала и активатор транскрипции 1
STAT2 – от англ. Signal transducer and activator of transcription 2; преобразователь сигнала и активатор транскрипции 2
TCGA – от англ. The Cancer Genome Atlas; атлас ракового генома
Tcm – от англ. central memory T-cells; T-клетки центральной памяти
TLR – от англ. Toll-like receptors; толл-подобные рецепторы
TMPRSS2 – от англ. Transmembrane protease, serine 2; мембрано-связанная сериновая протеаза 2

ВВЕДЕНИЕ

SARS-CoV-2 представляет собой одноцепочечный РНК-вирус с положительной цепью, который вызывает вирусную пневмонию, сопряженную с тяжелым респираторным синдромом у людей (Kim et al., 2020). По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) эпидемия коронавирусной инфекции 2019 года (COronaVirus Disease 2019, COVID-19), вызванная SARS-CoV-2, унесла более 7 миллионов жизней во всем мире. Однако ряд независимых оценок свидетельствует о значительном занижении этих цифр официальной статистикой и называют цифры в 15–20 млн умерших (Косенок, 2024).

В ряде исследований была продемонстрирована взаимосвязь тяжести течения COVID-19 с генотипом главного комплекса гистосовместимости класса 1 (ГКГС класса 1). Прежде всего, была продемонстрирована взаимосвязь частоты встречаемости аллелей HLA-A*01:01 и HLA-A*02:01 с числом случаев заражения и уровнем смертности от COVID-19 в различных регионах Италии (Pisanti et al., 2020). Также на выборке пациентов с различной тяжестью течения COVID-19 (Iturrieta-Zuazo et al., 2020) были подтверждены результаты теоретического моделирования взаимодействия пептидов SARS-CoV-2 с различными аллельными вариантами молекул ГКГС класса 1. Была продемонстрирована взаимосвязь числа пептидов с высокой константой взаимодействия с индивидуальным набором молекул ГКГС класса 1: чем больше вирусных пептидов с высокой аффинностью связываются с HLA-I, тем легче течение заболевания. Позднее была показана взаимосвязь генотипа ГКГС класса 1 пациента с риском смерти от COVID-19 в возрасте до 60 лет (M. Shkurnikov et al., 2021).

Молекулы ГКГС класса 1 являются ключевыми медиаторами первых звеньев развития специфического иммунного ответа на заражение SARS-CoV-2. После попадания в клетку SARS-CoV-2 индуцирует трансляцию своих белков, часть из которых попадает в протеасомы инфицированной клетки, расщепляется до пептидов длиной 8–12 аминокислотных остатков и связывается с молекулами ГКГС класса 1. После связывания комплекс из молекулы ГКГС класса 1 и пептида вируса переносится на поверхность зараженной клетки, где может быть распознан T-клеточным рецептором CD8⁺ T-лимфоцитов. В ответ на взаимодействие зрелый CD8⁺ T-лимфоцит активируется и уничтожает зараженную клетку с помощью перфоринов и сериновых протеаз (Wherry & Ahmed, 2004), прерывая размножение вируса.

В организме человека присутствует три основных вида молекул ГКГС класса 1, кодируемых генами HLA-A, HLA-B, HLA-C. Каждый из этих генов у отдельного человека может быть представлен в двух вариантах – аллелях, наследуемых от родителей. Таким образом, генотип ГКГС класса 1 у отдельного человека может включать от трех до шести аллельных вариантов. В человеческой популяции существуют сотни аллельных вариантов генов HLA-A, HLA-B, HLA-C. Каждого из них кодирует молекулу ГКГС класса 1, обладающую индивидуальной способностью к узнаванию различных чужеродных белков. Распределение аллелей специфично для разных стран и популяций (J. H. Wang et al., 2009).

От индивидуальной комбинации молекул ГКГС класса 1 зависит тяжесть течения ряда инфекционных заболеваний (малярия, туберкулез, СПИД, вирусные гепатиты) (J. H. Wang et al., 2009). Продемонстрирована связь между генотипом ГКГС класса 1 и чувствительностью к SARS-CoV – первому вирусу, вызвавшему тяжелый респираторный синдром в 2003 году. Так, аллели HLA-B*07:03 (Ng et al., 2004), HLA-B*46:01 (M. Lin et al., 2003), HLA-C*08:01 (Y.-M. A. Chen et al., 2006) являются факторами предрасположенности к развитию заболевания в тяжелой форме. В свою очередь аллель HLA-C*15:02 ассоциирована с легким течением заболевания (S.-F. Wang et al., 2011).

За более чем два года пандемии COVID-19 накоплена значительная информация о фактических эпитопах различных штаммов SARS-CoV-2 (Vita et al., 2019), особенностях формирования Т-клеточной памяти (Francis et al., 2022), тенденциях в частоте мутаций в вирусе (Nersisyan et al., 2022).

Однако взаимосвязь генотипа ГКГС класса 1 и течения COVID-19 преимущественно анализировали по данным, относящимся к первой волне пандемии и исходному варианту вируса (Hovhannisyan et al., 2022; Langton et al., 2021; Lorente et al., 2021; Tavasolian et al., 2021; Venet et al., 2022).

Более того, при исследованиях ассоциаций генотипа и тяжести течения COVID-19 практически не учитывался возраст переболевших, сопутствующие заболевания. Необходимо отметить, что возраст является значимым фактором в формировании иммунного ответа к COVID-19 (McGroder et al., 2021; Promislow, 2020; Sanchez-Vazquez et al., 2021). В частности показано, что у людей старше 60 лет в значительной степени падает длина теломер наивных Т-лимфоцитов, что приводит практически к десятикратному падению их способности к делению при активации (Anderson et al., 2022), сокращается репертуар Т-клеточных рецепторов (Britanova et al., 2014).

НОВАЯ КОРОНАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ: ПАТОГЕНЕЗ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

ПАТОГЕНЕЗ COVID-19

Новый коронавирус SARS-CoV-2 характеризовался быстрым, сложно контролируемым распространением и определенными особенностями. В частности, у пациентов без симптомов часто наблюдалась вирусная нагрузка на том же уровне, что и у симптоматических пациентов (Rothe et al., 2020; Q. Yang et al., 2021; Zou et al., 2020). Кроме того, выделение вирусных частиц часто начиналось до проявления первых симптомов болезни (X. He et al., 2020). Было оценено, что значимая доля случаев заражения приходится на передачу вируса от пациентов в бессимптомный период (Johansson et al., 2021; Subramanian et al., 2021).

Другой причиной быстрого распространения COVID-19 является мутирование вируса и появление новых штаммов (Rambaut et al., 2020). Ряд штаммов, обладающих одной или несколькими новыми мутациями, называется «вариантом». К началу 2023 года ВОЗ выделяла 5 вариантов SARS-CoV-2, вызывающих озабоченность (Альфа, Бета, Гамма, Дельта и Омикрон), а также три варианта, вызывающих интерес (Эта, Лямбда и Мю), при этом в человеческих популяциях из всех вариантов к 2023 году циркулировал преимущественно Омикрон, практически полностью вытеснив остальные варианты (World Health Organization, 2023b).

По сравнению с вирусом SARS-CoV (циркулировавшим в 2003 году), SARS-CoV-2 значительно легче передается от человека к человеку и быстро распространился на все континенты (Chan et al., 2020; Q. Li et al., 2020).

Как правило, коронавирусы вызывают заболевания органов дыхания, желудочно-кишечного тракта и центральной нервной системы у людей и животных (F. Li, 2016; Perlman & Netland, 2009). Коронавирусы способны адаптироваться к новой среде посредством мутаций и запрограммированы на изменение трофизма хозяина (F. Li, 2013; Perlman & Netland, 2009).

Коронавирусы относятся к семейству Coronaviridae и делятся на альфа (α -CoV), бета (β -CoV), гамма (γ -CoV) и дельта (δ -CoV) коронавирусы. Альфа- и бета-коронавирусы могут инфицировать млекопитающих. Вирусы, обнаруженные у людей, генетически схожи с родом β -CoV. β -CoV подразделяются на разные линии (линии A, B, C и D): SARS-CoV и SARS-CoV-2 сгруппированы в линию B, в которой имеется около 200 опубликованных вирусных последовательностей, тогда как MERS-CoV принадлежит к линии C, которая имеет ~ 500 вирусных последовательностей (Letko et al., 2020).

НCoV-229E и НCoV-NL63 принадлежат к семейству альфакоронавирусов, тогда как НCoV-OC43, НCoV-HKU1 и SARS-CoV относятся к бетакоронавирусам (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020; Simmons et al., 2013; Wan et al., 2020).

Филогенетический анализ показывает, что белки SARS-CoV-2 имеют высокую степень сродства с линией β -рода коронавирусов летучих мышей (Wan et

al., 2020). Весь геном SARS-CoV-2 на 80% идентичен геному SARS-CoV и на 96% идентичен коронавирусу летучих мышей BatCoV-RaTG13 (P. Zhou et al., 2020). Сходство последовательности Спайк-белка между SARS-CoV-2 и SARS-CoV составляет около 76–78%. Один только RBD имеет сходство 73–76%.

Напротив, человеческий MERS-CoV схож с коронавирусом летучих мышей *Tylonycteris HKU4*, имеет меньшее сходство последовательностей (~54%) и распознает DPP4 в качестве своего рецептора. Сходство последовательностей между Спайк-белками SARS-CoV-2 и SARS-CoV объясняет возможность связывания с одним и тем же рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2) в клетке-хозяине (Wan et al., 2020).

Коронавирус обладает одним из самых больших геномов среди всех РНК-вирусов размером от 27000 до 32000 п.н. Рецептор-опосредованный эндоцитоз является основным процессом проникновения вируса в клетки-хозяева. SARS-CoV-2 использует ACE2, рецептор клеточной поверхности, который присутствует в почках, кровеносных сосудах, сердце и, что важно, в эпителиальных клетках альвеолярных дыхательных путей легких второго типа (Hamming et al., 2004). S-белок, отвечающий за проникновение вируса, имеет N-концевой и C-концевой домены, а также две основные субъединицы S1 и S2, характерные для всех семейств коронавирусов (F. Li, 2016). Одна из этих субъединиц S1 или S2 связывается с рецепторами хозяина и действует как рецептор-связывающий домен (RBD).

С момента идентификации первых коронавирусов у человека (229E и OC43) в конце 1960-х годов коронавирусные инфекции считались относительно безвредными (Simmons et al., 2013; Wan et al., 2020). Однако вспышка SARS-CoV на юге Китая зимой 2002 г. имела летальность на уровне около 10% инфицированных пациентов (Hamming et al., 2004; Peiris et al., 2004; Stadler & Rappuoli, 2005). Вирусологический анализ вспышки атипичной пневмонии показал, что летучие мыши являются естественными резервуарами для SARS-CoV. Циветты и енотовидные собаки – промежуточными хозяевами.

В 2012 году был выявлен у людей и идентифицирован новый высокопатогенный коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) (Zaki et al., 2012). MERS-CoV имел низкую скорость распространения, заболело около 1700 человек. При этом летальность составила 36% (F. Li, 2016; Zaki et al., 2012).

Вскоре после открытия SARS-CoV-2 в патогенезе COVID-19 были выделены две фазы: фаза ответа на вирусную инфекцию и фаза воспалительного ответа хозяина (иногда переходящая в фазу цитокинового шторма) (рис. 1).

Вирусная нагрузка SARS-CoV-2 высока в первые дни инфекции и неуклонно снижается с течением времени у иммунокомпетентных хозяев (Sette & Crotty, 2021). В первые несколько дней инфекция SARS-CoV-2 может варьироваться от бессимптомной до слабо выраженной у большинства пациентов и обычно включает симптомы со стороны верхних дыхательных путей и/или системное гриппоподобное заболевание. Тяжелая форма COVID-19 обычно развивается, по крайней мере, через 1 неделю после начала заболевания, что может указывать на большую роль дисрегуляции иммунного ответа, а не прямого вирусного цитопатического эффекта.

Оценка последовательности патофизиологических событий позволяет предположить, что среднее время от появления симптомов до госпитализации,

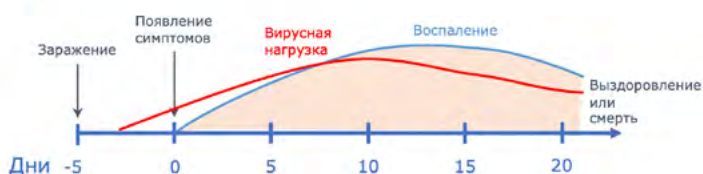
ПАТОГЕНЕЗ COVID-19: микроРНК и главный комплекс гистосовместимости

одышки, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), потребности в искусственной вентиляции легких и поступления в отделение интенсивной терапии (ОИТ) составляло 7,0, 8,0, 9,0, 10,5 и 10,5 дней соответственно (С. Huang et al., 2020) для исходного варианта SARS-CoV-2. Необходимо отметить, что сроки возникновения симптомов немного различаются в зависимости от варианта вируса, что подтверждает гипотезу о нарушении регуляции иммунного ответа, вызывающего тяжелую форму COVID-19.

Среднетяжелое течение COVID-19



Тяжелое и крайне тяжелое течение COVID-19



Симптомы

Симптомы отсутствуют

Лихорадка, сухой кашель, потеря обоняния, головная боль, диарея. Возможны кожные проявления, неврологическая и сердечная симптоматика

ОРДС
Системное воспаление
Поллиорганная недостаточность

Гиперкоагуляционный синдром

Затрудненность дыхания с гипоксией

Иммунитет

Врожденный: внутриклеточный иммунитет, моноциты, макрофаги, дендритные и NK-клетки, микроРНК

T-клеточный: зрелые цитотоксические T-лимфоциты (CD8⁺), T-хелперы

Гуморальный

Рис. 1. Временная шкала COVID-19 среднетяжелого, тяжелого и крайне тяжелого течения и ее взаимосвязь с вирусной нагрузкой, интенсивностью воспалительной реакции, клинической симптоматикой и формированием специфического иммунитета.

ФОРМИРОВАНИЕ ИММУНИТЕТА К SARS-COV-2

Врожденный иммунитет в борьбе с SARS-CoV-2

Первой линией защиты организма от вирусов, включая SARS-CoV-2, является врожденный иммунный ответ, который ограничивает вход вирусов в клетки, трансляцию, репликацию и сборку вирионов, а также позволяет обна-

руживать и уничтожать зараженные клетки, координирует и усиливает приобретенный иммунитет (Diamond & Kanneganti, 2022).

После попадания вируса в клетку и синтеза неструктурных белков формируется репликационно-трансляционный комплекс, который считывает с плюс-цепи РНК SARS-CoV-2 антисмысловые минус-цепи РНК, а неструктурные белки реорганизуют мембраны, полученные из эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и комплекса Гольджи, чтобы скрыть область вирусной репликации и транскрипции от иммунных сенсоров клетки-хозяина (Knoops et al., 2008). После синтеза структурных белков они переносятся к мембранам ЭПР и комплекса Гольджи, комбинируются с геномной РНК и N-белками для последующей сборки вирион-содержащих везикул, которые в процессе экзоцитоза высвобождают вирионы во внеклеточное пространство (Lee et al., 2020).

Различные этапы жизненного цикла вируса могут подвергаться действию врожденного иммунитета. Например, сенсоры на поверхности клеток могут определять S, E и M-белки во время этапа связывания, а цитоплазматические сенсоры могут обнаруживать вирусные белки и нуклеиновые кислоты до компартиментализации с участием неструктурных белков вируса. Это приводит к активации воспалительных сигнальных путей, продукции цитокинов и клеточной гибели (Diamond & Kanneganti, 2022).

Клетки врожденного иммунитета, включая макрофаги, моноциты, дендритные клетки, нейтрофилы и лимфоидные клетки врожденного иммунитета, такие как клетки-естественные киллеры (NK-клетки, от англ. Natural killer cells) имеют различные рецепторы распознавания паттернов (PRR, от англ. pattern recognition receptors), узнающие патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP, от англ. pathogen-associated molecular patterns) или молекулярные паттерны, связанные с повреждением клеток, что вызывает развитие воспалительного и иммунного ответа. Выделяют пять основных типов PRR: толл-подобные рецепторы (TLR, от англ. Toll-like receptors), RIG-I-подобные рецепторы I (RLR, от англ. RIG-I-like receptors, где RIG-I – retinoic acid-inducible gene I, индуцируемый ретиноевой кислотой ген I), NOD-подобные рецепторы (NLR, от англ. NOD-like receptors, где NOD – nucleotide-binding oligomerization domain, нуклеотид-связывающий олигомеризационный домен), AIM2-подобные рецепторы (от англ. absent in melanoma 2 – отсутствующий при меланоме белок 2) и рецепторы лектинов С-типа (Kanneganti, 2020).

TLR активируют продукцию воспалительных цитокинов через адапторные молекулы MyD88 и TRIF (Manik & Singh, 2022). MyD88 активирует ядерный фактор NF-κB, митоген-активируемые протеинкиназы (MAPK, от англ. mitogen-activated protein kinases) и интерферон-регулирующие факторы (IRF, от англ. interferon regulatory factors), которые перемещаются в ядро клетки и активируют транскрипцию провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли и интерлейкины 1 и 6, экспрессию ряда сенсоров врожденного иммунитета, интерферонов и интерферон-стимулирующих генов. TRIF также активирует продукцию интерферонов и ряда противовирусных факторов (Manik & Singh, 2022). E-белок SARS-CoV-2 активирует воспалительную реакцию через TLR2, а ингибирование TLR2 у трансгенных мышей, зараженных SARS-CoV-2, уменьшало выраженность цитокинового шторма и улучша-

ло выживаемость (Potapov et al., 2022; M. Zheng et al., 2021). При изучении SARS-CoV было показано, что активация пути TLR3 играет защитную роль при инфекции (Lee et al., 2020). В исследованиях *in silico* была показана возможность S-белка SARS-CoV-2 связываться с белками TLR1, TLR4 и TLR6 (Choudhury & Mukherjee, 2020). TLR7 и TLR8 могут распознавать повышенные при COVID-19 антифосфолипидные антитела, а мутации гена *TLR7* были связаны с тяжелым течением COVID-19 (van der Made et al., 2020).

Однопочечные РНК SARS-CoV-2, включая геномные, субгеномные и репликативные РНК, могут детектироваться с помощью молекул RLR, таких как MDA5, RIG-I и LGP2 (D.-M. Yang et al., 2021). После посттрансляционных модификаций MDA5 и RIG-I перемещаются в митохондрии, где образуют сигналосому с белком MAVS (от англ. mitochondrial antiviral signaling protein, белок противовирусного сигнального пути митохондрий). Данная сигналосома индуцирует фосфорилирование IRF3 и активацию интерферонов I и III типов (AL Hamrashdi & Brady, 2022).

Секреция интерферонов приводит к стимуляции рецепторов интерферонов по аутокринному и паракринному механизму, что приводит к активации множества интерферон-стимулируемых генов с различными противовирусными функциями (Schoggins, 2019). Так, Ly6E может предотвращать вход SARS-CoV-2, белки IFIT — ингибировать вирусную репликацию, а BST2 — предотвращать выход вируса из клетки (Martin-Sancho et al., 2021; Pfaender et al., 2020). Как чрезмерная, так и недостаточная активация интерфероновой ответа может быть негативным фактором при COVID-19.

NLR также могут отвечать на инфекцию SARS-CoV-2, индуцируя выработку интерферонов I типа и провоспалительных цитокинов. NLRP3 является одним из самых изученных сенсоров инфламмосомы и приводит к активации каспазы-1, синтезу и высвобождению интерлейкинов 1 β и 18 и клеточной смерти (Christgen & Kanneganti, 2020). NLRP3 может детектировать SARS-CoV и SARS-CoV-2 (Campbell et al., 2021), а уровни интерлейкинов 1 β и 18 в плазме крови коррелируют с тяжестью заболевания и смертностью при COVID-19 (Laing et al., 2020). Помимо NLRP3 при COVID-19 в инфламмосоме могут активироваться сенсоры AIM2 и NLRC1, связанные с продукцией интерферона бета (Karki & Kanneganti, 2022).

Помимо TLR, RLR и NLR существуют дополнительные цитозольные сенсоры, которые могут детектировать вирусы и активировать провоспалительные сигнальные пути. SARS-CoV-2 может приводить к повреждению митохондрий и активировать сигнальный путь cGAS-STING и стимулировать врожденный иммунитет, однако у SARS-CoV-2 существуют механизмы подавления этого сигнального пути через белки ORF3a и Mpro (Rui et al., 2021). Агонист STING восстанавливает ответ через данный сигнальный путь и улучшает прогноз при COVID-19 (Humphries et al., 2021).

Ранее уже были упомянуты различные механизмы, с помощью которых SARS-CoV-2 может уклоняться от врожденного иммунного ответа, подавляя выработку интерферонов. Второй линией защиты организма от вирусной инфекции является приобретенный иммунитет.

Приобретенный иммунитет к SARS-CoV-2

Приобретенный иммунитет состоит из клеточного и гуморального иммунных ответов и может возникать в ответ на проникновение в организм патогенных микроорганизмов либо их антигенов, в том числе при вакцинации. Антигены первично распознаются иммунными клетками врожденного иммунитета в периферических тканях. После этого антигены либо пассивно дренируются в лимфатические узлы, либо первоначально процессируются мигрирующими антигенпрезентирующими клетками, которые в свою очередь перемещаются в лимфатические узлы. После этого в лимфатических узлах происходит активация В-клеток и Т-клеток и их созревание в эффекторные клетки. Антитела, продуцируемые эффекторными В-клетками, и зрелые цитотоксические Т-клетки распространяются по организму, обеспечивая длительную защиту от патогена (Ou et al., 2022).

Активация иммунных клеток в лимфатических узлах является сложным, скоординированным процессом. Антигены микроорганизма и антигенпрезентирующие клетки достигают лимфоузлов в течение нескольких часов. Эти периферические антигенпрезентирующие клетки, такие как мигрирующие дендритные клетки, могут представлять антигены непосредственно наивным Т-клеткам в лимфатических узлах или передавать их вместе с пассивно дренируемыми антигенами резидентным дендритным клеткам лимфатических узлов.

Активация и созревание CD8⁺ Т-клеток происходят при их взаимодействии с комплексом пептида и молекулы главного комплекса гистосовместимости класса I на дендритных клетках при содействии костимуляторных сигналов и цитокинов. После активации CD8⁺ Т-клетки взаимодействуют с CD4⁺ Т-клетками, что превращает их либо в короткоживущие эффекторные (цитотоксические) Т-клетки, либо долгоживущие клетки памяти. В свою очередь CD4⁺ Т-клетки для активации должны взаимодействовать с комплексами пептидов с ГКГС класса II на антигенпрезентирующих клетках, включая В-клетки в лимфатических узлах (Ou et al., 2022).

Активация и созревание В-клеток происходит в В-клеточных фолликулах периферической лимфатической ткани. В-клетки могут напрямую распознавать растворимые антигены, дренирующиеся из периферических тканей. Кроме того, фолликулярные дендритные клетки могут представлять антигены наивным В-клеткам путем захвата и удержания опсонизированных антигенов. Помимо указанных антигенов для активации В-клеток также требуется субпопуляция CD4⁺ клеток, так называемые фолликулярные Т-хелперы, обеспечивающие костимулирующие сигналы.

Активированные В-клетки затем мигрируют в герминативные центры периферической лимфатической ткани, претерпевают клональную экспансию и соматическую гипермутацию для увеличения и диверсификации синтезируемых антител. Среди данных мутировавших В-клеток происходит положительная селекция на представленных антигенах, поскольку эти клетки конкурируют между собой за костимулирующие сигналы фолликулярных дендритных клеток и фолликулярных Т-клеток. В итоге зрелые В-клетки покидают герминативные центры в виде эффекторных плазматических клеток, секретирующих антитела, и клеток памяти (Ou et al., 2022).

Приобретенный иммунитет необходим для контроля и элиминации инфекции вируса SARS-CoV-2. Существует повышенный интерес к изучению клеточного компонента приобретенного иммунитета. Результаты исследований SARS-CoV и MERS-CoV позволяют предположить, что Т-клетки могут быть основными элементами контроля болезни (J. Zhao et al., 2017), в то время как некоторые исследования показывают, что повышенный уровень антител, то есть гуморальное звено приобретенного иммунитета, может быть связан с более высоким уровнем воспаления и ухудшенным клиническим исходом (L. Liu et al., 2019).

Титры антител IgG коррелируют с защитой от инфекции (Khoury et al., 2021; Lumley et al., 2021; Molodtsov et al., 2022), а специфичные IgG могут обеспечивать защиту от SARS-CoV-2 даже в отсутствие клеточного иммунного ответа как в исследованиях на животных (Hasenkrug et al., 2021; McMahan et al., 2021), так и в проспективных клинических исследованиях (McMahan et al., 2021; Wyllie et al., 2020).

Однако гуморальный ответ развивается значительно позднее клеточного ответа (Kalimuddin et al., 2021; Painter et al., 2021), поэтому именно клеточное звено первым встречает и контролирует инфекцию. Кроме того, было показано, что достаточный гуморальный ответ не развивается у определенной доли пациентов, вплоть до 15% (Gudbjartsson et al., 2020; Jain et al., 2022; Wajnberg et al., 2020). Также гуморальный ответ постепенно снижается после инфекции или вакцинации и может не обнаруживаться на достаточном уровне уже спустя 6 месяцев (Bayart et al., 2021; Sherina et al., 2021; Zuo et al., 2021), в то время как клеточный иммунитет сохраняется значительно дольше (Bilich et al., 2021; Dan et al., 2021; Zuo et al., 2021). Так, после первого острого респираторного синдрома, вызванного SARS-CoV, клеточный иммунитет сохранялся вплоть до 17 лет после инфекции (Le Bert et al., 2020).

Нейтрализующие антитела чаще всего взаимодействуют с S-белком, особенно с доменом RBD, препятствуя взаимодействию S-белка с рецептором ACE2 (Corti et al., 2021). Кроме того, нейтрализующие антитела могут обеспечивать антителозависимую клеточную цитотоксичность, в результате которой зараженные вирусом клетки, экспрессирующие на поверхности S-белок, подвергаются элиминации (Tso et al., 2021). Именно поэтому в качестве варианта терапии COVID-19 разрабатывается ряд нейтрализующих антител против S-белка (M. S. Cohen et al., 2021; Dougan et al., 2021; Reis et al., 2021). Нейтрализующие антитела также могут связываться с N-концевым и другими доменами S-белка (Amanat et al., 2021; Lok, 2021).

Мутации в S-белке, особенно в домене RBD, приводят к снижению эффективности нейтрализующих антител, накопленных в организме или искусственно введенных в терапевтических целях. Разработаны подходы к изучению молекулярных и структурных характеристик антител, позволяющие предсказывать изменение динамики связывания мутирующего S-белка с антителами и влияние мутаций на нейтрализующую активность (Z. Cui et al., 2022; Mannar et al., 2022; McCallum et al., 2022). Изменение нейтрализующей активности антител с появлением новых штаммов SARS-CoV-2 было выявлено и в экспериментах *in vitro* (Z. Liu et al., 2021; Rees-Spear et al., 2021). Вариант Омикрон избегает большинства нейтрализующих антител, полученных при иммунной реакции на другие варианты вируса (Cao et al., 2022).

Одним из основных средств профилактики COVID-19 являются вакцины. По данным ВОЗ на 7 февраля 2023 г. 199 вакцин находились на стадии до-

клинической разработки и 178 вакцин – на стадии клинических исследований (World Health Organization, 2023a). При этом зарегистрированные и признанные в большинстве стран вакцины показывают высокую эффективность против исходного штамма SARS-CoV-2 (Tregoning et al., 2021), но новые штаммы всё чаще избегают иммунного ответа, выработанного при использовании этих вакцин (Cele et al., 2022; Lu et al., 2022; Planas et al., 2021). Именно из-за всех перечисленных выше фактов всё больше внимания уделяется именно клеточному звену приобретенного иммунитета.

По-видимому, на развитие успешного приобретенного иммунного ответа и хорошие клинические исходы влияет начальная вирусная нагрузка (Rico-Saballero et al., 2022) и эффективность врожденного иммунитета, в частности, обеспечиваемого интерферонами I типа (Hadjadj et al., 2020). Тяжелые клинические случаи характеризуются медленным снижением вирусной нагрузки и ранним развитием воспаления с повышенными уровнями интерферона альфа и гамма и фактора некроза опухоли (Lucas et al., 2020).

Тем не менее, несмотря на важность врожденного иммунитета, скоординированный клеточный иммунный ответ также играет важную роль в контроле болезни. Раннее развитие цитотоксического CD8⁺ Т-клеточного ответа, который обычно развивается в течение первых 7 дней с появления симптомов и имеет пиковое развитие на 14-й день, коррелирует с эффективным снижением вирусной нагрузки (Notarbartolo et al., 2021) и более легким протеканием болезни (Bergamaschi et al., 2021), что характерно и для кинетики развития гуморального иммунитета (Lucas et al., 2021).

В некоторых случаях начальный клеточный иммунный ответ может обеспечиваться не специфичными к SARS-CoV-2 Т-клетками, а CD8⁺ Т-клетками, имеющими фенотип NKG2D⁺IL-7R⁺, защищая организм еще до развития иммунитета, специфичного именно к SARS-CoV-2 (Bergamaschi et al., 2021; Maurice et al., 2021). Около 20% пациентов демонстрируют плохо развивающийся приобретенный иммунитет и могут получить пользу от ранней терапии антителами против SARS-CoV-2 (Abani et al., 2021).

При острой инфекции SARS-CoV-2 часто наблюдается выраженная лимфоцитопения, которая коррелирует с тяжелым клиническим исходом (G. Chen et al., 2020). Одновременно с интенсивной пролиферацией примерно 20% пула Т-клеток, а именно CD8⁺ Т-клеток, происходит потеря остальных 80% периферических Т-клеток (Kuri-Cervantes et al., 2020). Причины такой лимфоцитопении неясны, однако могут быть связаны с нарушенной пролиферацией, апоптозом и экстравазацией в ткани (Notarbartolo et al., 2021). Разрешение лимфоцитопении коррелирует с выздоровлением, но может занимать несколько недель (Diao et al., 2020).

Эффективный контроль вирусной инфекции связан с типом 1 CD4⁺ фенотипа, то есть с Т-хелперами, секретирующими интерлейкин 2 и интерферон гамма, в то время как тип 2, связанный с секрецией интерлейкинов 4, 5 и 10, часто можно наблюдать у пациентов с тяжелым течением COVID-19 (Notarbartolo et al., 2021). Высокий уровень секреции эффекторных молекул CD8⁺ Т-клетками при остром COVID-19 связан с благоприятными клиническими исходами (Su et al., 2020), однако гиперактивация Т-клеток может приводить к ухудшению исходов из-за повреждения собственных клеток (Mathew et al., 2020).

Вирус-специфический Т-клеточный ответ при бессимптомном COVID-19 характеризуется повышенным уровнем интерферона гамма и интерлейкина 2, а также сбалансированной секрецией интерлейкина 10 и провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин 6, фактор некроза опухоли альфа и интерлейкин 1 β , в то время как при симптоматическом течении болезни наблюдалась несбалансированная секреция с преобладанием провоспалительных цитокинов (Le Bert et al., 2021).

Специфичный Т-клеточный ответ на SARS-CoV-2 развивается практически у всех заболевших. В исследовании с использованием технологии ELISpot было обнаружено, что у пациентов с более тяжелой изначальной инфекцией SARS-CoV-2 наблюдается более сильный клеточный ответ (Y. Peng et al., 2020). Использование наборов пептидов, перекрывающих весь протеом SARS-CoV-2, показало наличие Т-клеточного ответа практически на все белки вируса, сила которого коррелировала с уровнем экспрессии соответствующих белков (Grifoni et al., 2020; Tarke et al., 2021). Уровень CD4⁺ и CD8⁺ активации коррелирует практически для всех белков, хотя Nsp12 вызывает слабый CD8⁺ ответ (Tarke et al., 2021). S-белок вызывает преимущественно CD4⁺ Т-клеточный ответ, что, вероятно, направлено на поддержание выработки антител и повышенный уровень фолликулярных Т-хелперов (Vorrana et al., 2021).

Большинство исследований сконцентрированы на изучении Т-клеточного ответа на структурные белки, такие как S-, M-, N- и E-белки, однако ORF3, Nsp3, Nsp4, Nsp12 и другие белки также несут важные эпитопы (Quadeer et al., 2021). CD4⁺ Т-клетки при COVID-19 характеризуются полифункциональным профилем с высоким уровнем интерлейкина 2, хотя уровень продукции интерферона гамма несколько ниже, чем при других респираторных вирусных инфекциях (Rha et al., 2021). Транскриптомный анализ отдельных клеток через 4 недели после начала инфекции продемонстрировал высокую степень развития цитотоксических популяций CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, хотя обычно развитие цитотоксических CD4⁺ субпопуляций не является характерным признаком стадии формирования клеток памяти. CD4⁺-ассоциированный ответ был несколько сильнее, чем для CD8⁺-пула (Bieberich et al., 2021), и мог даже усиливаться с течением времени (Bilich et al., 2021), что может отражать персистентное присутствие антигенов вируса в период восстановления (J.-R. Yang et al., 2020). Формируется пул стволовых клеток памяти, специфичных к SARS-CoV-2 (Jung et al., 2021), а среди CD4⁺ клеток преобладают центральные клетки памяти (с фенотипом CCR7⁺ CD45RA⁻) (K. W. Cohen et al., 2021), что создает предпосылки для длительного сохранения иммунного ответа. Есть надежда, что SARS-CoV-2-специфичные Т-клетки будут сохраняться многие годы, хотя это может зависеть от тяжести изначальной инфекции (Wheatley et al., 2021). В ряде исследований устойчивый иммунитет сохранялся в течение 6 месяцев и дольше (Jung et al., 2021; Zuo et al., 2021). В то же время, проспективные исследования показали некоторую переориентацию специфичности Т-клеток с течением временем (Bilich et al., 2021), и период полуэлиминации вирус-специфичных клеток оценивается на уровне 200 дней (K. W. Cohen et al., 2021). Долговременный Т-клеточный ответ характерен для фенотипа эффекторных клеток памяти CD45RA⁺ и демонстрирует характерный интерфероновый транскриптом (Adamo et al., 2022).

SARS-CoV-2-специфичные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки памяти составляют около 0,5 и 0,2% от пула всех CD4⁺ и CD8⁺ клеток соответственно (K. W. Cohen et al., 2021), хотя характерной особенностью является гетерогенность между донорами. Широта ответа у отдельных доноров оценивается примерно в 19 и 17 эпигенетических ответов у большинства людей для CD4⁺ и CD8⁺ клеток соответственно (Tarke et al., 2021). Это дает уверенность в том, что вирусной мутации вряд ли будет достаточно для того, чтобы избежать распознавания Т-клетками.

Большинство Т-клеток в организме представлено как резидентные клетки памяти в тканях, и развитие сторожевых вирус-специфичных пулов памяти в дыхательных путях, вероятно, будет иметь важное значение для защиты от повторного заражения. Количество SARS-CoV-2-специфичных резидентных Т-клеток памяти в легких коррелирует с защитой от повторного заражения (Szabo et al., 2021), а поскольку их можно обнаружить в течение, как минимум, 10 месяцев после заражения, вероятно, они играют важную роль в ограничении тяжести реинфекции (Grau-Exposito et al., 2021). Индукция этих клеток после вакцинации в животных моделях также обнадеживает (Routhu et al., 2021).

РОЛЬ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ КЛАССА I В ФОРМИРОВАНИИ ПРОТИВОВИРУСНОГО ИММУНИТЕТА

Риск летального исхода при инфицировании новой коронавирусной инфекцией повышается в зависимости от ряда факторов, в числе которых возраст, мужской пол (вероятность смерти при заражении коронавирусом выше для мужчин, чем для женщин), индекс массы тела, уровень глюкозы. Тяжелое течение с летальным исходом наиболее часто регистрируют у людей старшей возрастной группы с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, цереброваскулярной патологией и злокачественными новообразованиями. Из всех хронических заболеваний наиболее опасным при COVID-19 является сахарный диабет. На втором месте после диабета по опасности при COVID-19 находятся болезни почек и сердечно-сосудистые заболевания (T. Wang et al., 2020).

На характер течения COVID-19 также влияет фактор генетической предрасположенности. Известно, что молекулы HLA класса I являются одним из ключевых медиаторов первых звеньев в развитии специфического иммунного ответа при COVID-19. Сразу после попадания в клетку SARS-CoV-2 индуцирует трансляцию своих белков. Некоторые из этих белков попадают в протеасомы инфицированной клетки, расщепляются до пептидов длиной 8–12 аминокислотных остатков, так называемых эпитопов, и связываются с молекулами HLA класса I. Т-клеточные эпитопы могут быть не только чистыми пептидами, но и гаптенами, сахарами и посттрансляционно модифицированными пептидами (Petersen et al., 2009; L. Sun et al., 2016). После связывания комплекс, состоящий из молекулы HLA класса I и эпитопа, переносится на поверхность инфицированной клетки, где он может взаимодействовать с Т-клеточным рецептором CD8⁺ Т-лимфоцитов. В ответ на данное взаимодействие зрелый CD8⁺

Т-лимфоцит активируется и разрушает инфицированные клетки с помощью перфоринов и сериновых протеаз (Wherry & Ahmed, 2004).

Существует три гена, кодирующие молекулы HLA класса I: HLA-A, HLA-B и HLA-C. Каждый из этих генов может быть представлен в геноме человека в двух вариантах – аллелях, унаследованных от родителей. Существуют десятки вариантов каждого аллеля молекул HLA-I; молекулы, кодируемые каждым аллелем, обладают индивидуальной способностью распознавать различные чужеродные белки. Распределение аллелей является специфичным для отдельных популяций (J. H. Wang et al., 2009). Комбинации молекул HLA класса I существенно влияют на тяжесть течения различных инфекционных заболеваний, включая малярию (Lima-Junior & Pratt-Riccio, 2016), туберкулез (Mazzaccaro et al., 1996), СПИД (Goulder & Watkins, 2008) и вирусный гепатит (J. H. Wang et al., 2009).

Существует ряд публикаций, в которых описаны взаимосвязи между генотипом HLA и чувствительностью к SARS-CoV. В частности, известно, что аллели HLA-B*07:03 (Ng et al., 2004), HLA-B*46:01 (M. Lin et al., 2003) и HLA-C*08:01 (Y.-M. A. Chen et al., 2006) являются факторами предрасположенности к тяжелой форме заболевания; аллель HLA-C*15:02 ассоциирован с легкой формой (S.-F. Wang et al., 2011). В исследовании, проведенном китайскими учеными, было выявлено наличие редкого аллеля HLA-C*07:29 и HLA-B*15:27 у китайских пациентов с COVID-19 (W. Wang et al., 2020).

Известна взаимосвязь количества пептидов с высокой константой взаимодействия с индивидуальным генотипом HLA: чем больше вирусных пептидов с высокой аффинностью связывается с HLA I класса, тем легче протекает заболевание. Также было показано, что частота встречаемости аллелей HLA-A*01:01 и HLA-A*02:01 связана с числом случаев COVID-19 и смертей от нее в различных регионах Италии (Pisanti et al., 2020).

Специфичный CD8⁺ Т-клеточный ответ на эпитоп NP₁₀₅₋₁₁₃ с участием HLA-B*07:02 является наиболее распространенным у лиц, инфицированных SARS-CoV-2, и коррелирует с легким течением болезни (Y. Peng et al., 2022). Для молекулы HLA-A*02:01, которая является наиболее изученной для CD8⁺ ответа на SARS-CoV-2, в 81% случаев у HLA-A2⁺ пациентов обнаруживался эпитоп S₂₆₉₋₂₇₇ (Nielsen et al., 2021). Также было показано, что среди эпитопов, связывающихся с HLA-A*02:01, S₁YLQ более иммуногенный в сравнении с S₈RLQ (Shomuradova et al., 2020; D. Wu et al., 2022).

Влияние различных сочетаний аллелей HLA I класса на течение заболевания, вызванного SARS-CoV-2, продемонстрировано в значительном количестве исследований. При этом очевидно, что сочетание отдельных аллелей, прогностически значимых для оценки риска развития тяжелого течения COVID-19, для разных популяций может отличаться. Практически отсутствуют исследования по влиянию комбинации аллелей HLA I класса для российской популяции, которые бы обеспечивали получение достоверных прогнозных оценок по течению данного заболевания.

Подобное исследование было проведено для испанской популяции. Был разработан способ оценки риска развития тяжелой формы COVID-19 (Iturrieta-Zuazo et al., 2020), включающий забор биологического материала, выделение геномной ДНК с последующим генотипированием аллелей генов HLA-A, HLA-B, HLA-C,

обработку результатов генотипирования и прогнозирование риска развития тяжелой формы COVID-19 с высокой вероятностью летального исхода. Данный способ основан на исследовании биологического материала 5 пациентов с легкой формой, 20 пациентов средней тяжести и 20 пациентов с тяжелой формой COVID-19. Выделение геномной ДНК с последующим генотипированием аллелей генов HLA-A, HLA-B, HLA-C было проведено с помощью наборов реагентов RSSOW1A, RSSOW1B и RSSOW1C (One lambda inc) и мультиплексного анализатора FlexMap 3D. Критерии для оценки риска развития тяжелой формы COVID-19 были получены на основе анализа аффинности взаимодействия пептидов вируса SARS-CoV-2 с молекулами HLA-I пациента, относящегося к одной из трех групп по тяжести течения заболевания; в случае, если аффинность взаимодействия пептида с одной из молекул HLA-I была менее 50 нмоль, то Индекс высокоаффинных пептидов увеличивали на 1; пороговые значения для прогноза риска развития тяжелой формы COVID-19 для всех пациентов определяли после определения Индекса высокоаффинных пептидов.

Однако к числу недостатков данного способа можно отнести то, что пороговые значения для прогноза риска развития тяжелой формы COVID-19 определялись на основе выборки без учета данных об умерших пациентах. При этом малый объем выборки, использование только качественных, а не количественных характеристик взаимодействия вирусный пептид – молекула HLA-I, отсутствие этапа проверки чувствительности и специфичности критериев прогноза риска развития тяжелой форма COVID-19 на контрольной выборке, ставят под сомнение точность и достоверность получаемых прогнозных оценок развития тяжелой формы COVID-19.

РОЛЬ МИКРОРНК В ПРОТИВОВИРУСНОМ ИММУНИТЕТЕ

МикроРНК являются консервативными эндогенными короткими некодирующими РНК, которые в комплексе с белками-аргонатами образуют микроРНК-индуцируемый сайленсинг-комплекс (miRISC, от англ. microRNA-induced silencing complex), осуществляющий посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов. Механизм регуляции экспрессии с помощью микроРНК обнаружен у различных эукариот, включая растения, животных и человека (Jungers & Djuranovic, 2022). При этом микроРНК могут не только участвовать в регуляции экспрессии собственных генов клетки, но и играть роль в противовирусном иммунитете (Lopez-Gomollon & Baulcombe, 2022).

У растений в противовирусном иммунитете участвует, как минимум, два типа коротких РНК: микроРНК и малые интерферирующие РНК (чтобы не создавать путаницу, будет использоваться сокращение сиРНК, от англ. siRNA, small interfering RNA). МикроРНК закодированы в геноме клетки и транскрибируются РНК-полимеразой II в виде молекулы-предшественника, при-микроРНК (от англ. pri-miRNA или long primary miRNA transcript, то есть длинный первичный микроРНК-транскрипт). При-микроРНК сворачивается в структуру в виде шпильки с неполной комплементарностью, из которой в результате нескольких этапов созревания вырезается зрелая микроРНК, регулирующая экспрессию генов в составе уже упоминавшегося комплекса miRISC (рис. 2). При этом ми-

кроРНК комплементарно связывается с матричной РНК (мРНК) регулируемого гена преимущественно за счет так называемого сид-региона, включающего нуклеотиды со 2-й по 7-ю позицию с 5'-конца микроРНК (Komatsu et al., 2023). В то же время, сиРНК вырезается из идеально комплементарной двухцепочечной молекулы РНК, эндогенной или экзогенной для растения, и с мРНК-мишенью также взаимодействует по принципу полной комплементарности. Противовирусные сиРНК могут вырезаться из двухцепочечной РНК вируса при инфекции, что впервые было обнаружено именно у растений, а позже было выявлено и у беспозвоночных животных и млекопитающих (Jin et al., 2022).

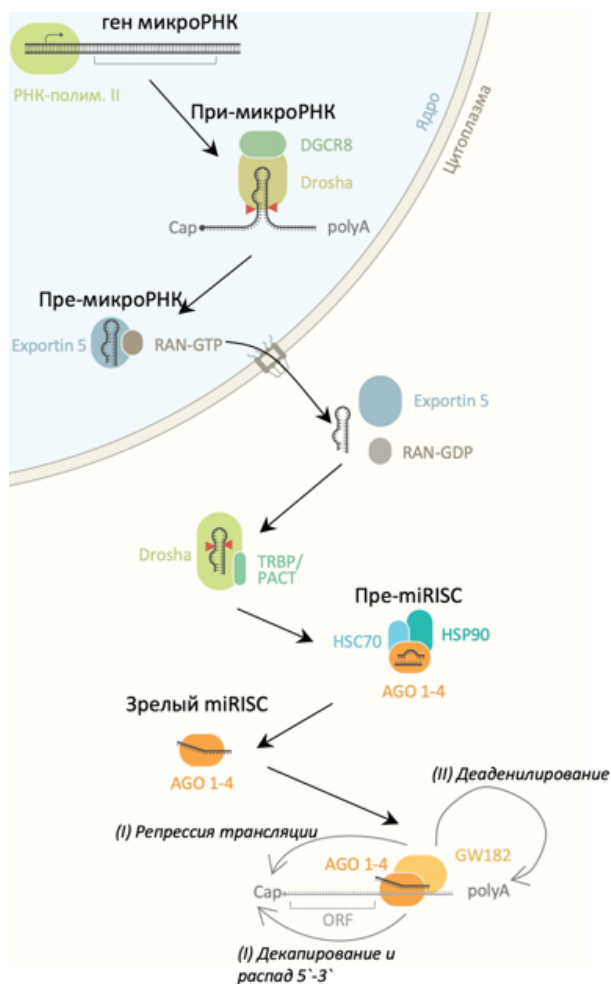


Рис. 2. Биогенез и функциональная активность микроРНК (адаптировано из Makarova et al., 2021)

Различить некоторые эндогенные сиРНК и микроРНК у растений бывает трудно, поскольку локусы микроРНК могут эволюционно формироваться из локусов сиРНК с наличием промежуточных типов коротких РНК, которые сложно классифицировать (J. Cui et al., 2017).

Поскольку сиРНК, вырезаемые из двухцепочечных РНК вируса, меняются одновременно с мутированием вируса, то это не позволяет вирусу уходить от сиРНК-ассоциированного противовирусного иммунитета. В то же время, микроРНК, которые потенциально могут связываться с вирусной РНК, закодированы в геноме клетки и сохраняют каноническую последовательность, поэтому мутации генома вируса могут позволить избежать микроРНК-ассоциированного противовирусного иммунитета. В этой связи изучение роли микроРНК в противовирусном иммунитете представляет особый интерес. Регуляция экспрессии вирусных РНК с помощью эндогенных микроРНК изучена у растений значительно хуже, чем у животных (Satish et al., 2019).

Было показано, что вирусные инфекции могут приводить к повышению или понижению экспрессии ряда микроРНК у растений. Так, заражение вирусом штриховатости риса (RSV, от англ. rice stripe virus) приводило к увеличению уровня микроРНК miR444, а гиперэкспрессия miR444 повышала резистентность риса *Oryza sativa* к инфекции RSV, однако механизм такого эффекта связан скорее не с прямым взаимодействием микроРНК и РНК вируса, а с регуляцией специфичных генов противовирусного ответа (H. Wang et al., 2016). Аналогичным образом заражение риса RSV приводило к уменьшению уровня свободной miR528 и повышению активности L-аскорбатоксидазы и антивирусного ответа (J. Wu et al., 2017). Растения с повышенной экспрессией osa-miR171b были более устойчивы к инфекции RSV и имели менее выраженные симптомы инфекции, однако это также было связано с изменением экспрессии ряда эндогенных белков (Tong et al., 2017).

О возможности прямого взаимодействия микроРНК и вирусных РНК у растений известно гораздо меньше, чем об опосредованном влиянии через регуляцию собственных генов клетки. Модифицированный вирус скрытой мозаики сливы, несущий таргетные последовательности для микроРНК miR171, miR167 и miR159, экспрессированных у *Arabidopsis*, имел сниженную инфективность, а при внесении мутаций в данные таргетные последовательности инфективность снова повышалась (Simón-Mateo & García, 2006). Были получены растения риса, высокорезистентные к RSV за счет экспрессии искусственной микроРНК на основе osa-miR528, мишенью которой является ген MP RSV (L. Zhou et al., 2022). Ряд искусственных микроРНК на основе последовательности растительных микроРНК приводил к повышению резистентности к различным вирусам, в частности, данные эффекты были отмечены для микроРНК *Arabidopsis thaliana* ath-miR156, ath-miR157, ath-miR159a, ath-miR164, ath-miR167b, ath-miR169a, ath-miR171a, ath-miR319a, ath-miR390a, также для микроРНК hvu-miR-171 ячменя обыкновенного, miR169a хлопка, микроРНК риса osa-miR395, osa-miR528, микроРНК томата sly-miR159a, sly-miR168a, sly-miR319a, микроРНК кукурузы zma-miR159a (Satish et al., 2021).

Для ряда микроРНК животных была отмечена роль в обеспечении противовирусного иммунитета. Так, уровень микроРНК osu-miR-155-5p повышался в печени кроликов при инфицировании вирусом геморрагической болезни кроликов (RHDV, от англ. rabbit hemorrhagic disease virus). При этом повышение, вероятно, вызывал процесс воспаления, а сама микроРНК регулирует экспрессию генов, связанных с острой печеночной недостаточностью и воспалительным от-

ветом (Hukowska-Szematowicz et al., 2020). Уровень микроРНК miR-155-5p повышался при инфекции вирусом птичьего гриппа и коррелировал с тяжестью симптомов, что может объясняться регуляцией экспрессии генов ответа на инфекцию (Woods et al., 2020). При инфекции вирусом птичьего гриппа в клетках значительно повышается уровень микроРНК miR-146a, что приводит к подавлению продукции интерферонов и развитию воспаления, а снижение уровня данной микроРНК улучшает противовирусный ответ (F. Zhang et al., 2019). Уровень микроРНК miR-145 снижался у свиней при инфекции вирусом гриппа, что приводило к повышению экспрессии гемагглютинаина и усилению инфекции (T. He et al., 2009). Уровень микроРНК miR-21-5p повышался в ткани легкого свиней при инфекции вирусом гриппа, что может объясняться ролью данной микроРНК в регуляции процессов созревания лимфоцитов и вовлечения в иммунный ответ моноцитов, макрофагов, Т-клеток и НК-клеток (Skovgaard et al., 2013).

Указанные примеры провирусных и противовирусных микроРНК у животных описывают регуляцию экспрессии генов клетки-хозяина в рамках развития вирусных инфекций. В то же время, существуют примеры прямого взаимодействия микроРНК клетки-хозяина с РНК вируса в рамках противовирусного ответа. МикроРНК miR-130 связывается с 5'-нетранслируемой областью генома вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней и ингибирует его репликацию (L. Li et al., 2015). МикроРНК miR-181 может ингибировать репликацию этого же вируса свиней как напрямую связываясь с его геномом, так и регулируя внутриклеточный ответ на инфекцию (Guo et al., 2013). МикроРНК miR-24 и miR-93 связывались с геномом вируса везикулярного стоматита и препятствовали репликации вируса у мышей (Otsuka et al., 2007). Было показано, что возбудитель вирусной диареи коров (BVDV) содержит в своей РНК сайты связывания с микроРНК miR-17, при этом в данном случае связывание микроРНК с вирусной РНК повышает стабильность последней, а не репрессирует её, как это происходит при классическом взаимодействии (Scheel et al., 2016a).

У человека микроРНК также могут оказывать противовирусный или провирусный эффект как за счет регуляции собственных генов клетки-хозяина, так и за счет связывания с вирусным геномом. МикроРНК hsa-miR-199a-3p регулирует множество сигнальных путей в клетке, оказывая противовирусный эффект, например, при инфекции цитомегаловирусом (Santhakumar et al., 2010). Семейства микроРНК miR-34, miR-15 и miR-517 регулируют сигнальный путь Wnt и интерфероновый ответ, противодействуя флавивирусной инфекции (Smith et al., 2017). МикроРНК hsa-miR-494-3p стимулирует репликацию энтеровируса 71 за счет подавления экспрессии гена *P TEN* (Q. Zhao et al., 2018). МикроРНК hsa-miR-296-5p может связываться с вирусным геномом энтеровируса 71, подавляя его репликацию (Z. Zheng et al., 2013). МикроРНК hsa-miR-142-3p связывается с 3'-нетранслируемой областью РНК генома вируса восточного энцефалита лошадей и также подавляет его репликацию (Trobaugh et al., 2014a). МикроРНК miR-323, miR-491 и miR-654 ингибируют вирус гриппа А H1N1 через связывание с вирусным геном *PBI* (Song et al., 2010). МикроРНК hsa-miR-127-3p, hsa-miR-486-5p и hsa-miR-593-5p также ингибируют репликацию вируса

гриппа за счет связывания с его геномом (S. Peng et al., 2018). Прямое ингибирование репликации вируса гепатита В было продемонстрировано для микроРНК let-7, miR-15a, miR-16-1, miR-20a, miR-92a-1, miR-122, miR-125a-5p, miR-196b, miR-199a-3p, miR-205, miR-210, miR-345, miR-433 и miR-511 за счет связывания с различными генами вируса (Bandopadhyay & Bharadwaj, 2020). Было показано, что различные изоформы микроРНК hsa-miR-122-5p по-разному взаимодействуют с РНК вируса гепатита С, и ряд изоформ может приводить к стабилизации РНК вируса и усилению инфекции (Yamane et al., 2017).

Роль микроРНК в противовирусном ответе была показана и при коронавирусных инфекциях. При инфицировании кишечных клеток свиньи вирусом трансмиссивного гастроэнтерита свиней происходит изменение экспрессии 65 микроРНК, которые могут быть опосредованно связаны с процессами противовирусного ответа клетки (X. Ma et al., 2018). В дендритных клетках птиц при заражении коронавирусом инфекционного бронхита птиц происходило изменение экспрессии 19 микроРНК, которые регулируют экспрессию генов цитоскелета и сигнального пути MAPK (J. Lin et al., 2019). У куриных эмбрионов, зараженных вирусом инфекционного бронхита птиц, повышалась экспрессия 13 микроРНК в селезенке и 6 микроРНК в легких, причем для всех микроРНК была предсказана возможность регуляции транскрипции вируса, продукции цитокинов и функционирования лимфоцитов (V. Kemp et al., 2020). При инфицировании мышей коронавирусом SARS-CoV в ткани легких происходило изменение экспрессии 30 микроРНК, которые потенциально могут быть связаны с патогенезом вирусной инфекции (X. Peng et al., 2011a). Белок нуклеокапсида человеческого коронавируса OC43 может связываться с miR-9, способствуя активации NF-κB (Lai et al., 2014a). Биоинформатический подход позволил сделать предположение, что уровень микроРНК miR-335-5p и miR-26b-5p может меняться под воздействием S-белка SARS-CoV-2 через воздействие на сигнальный путь ACE/ACE2-ATR1-холестерин-гистоновая деацетилаза (HDAC) (Teodori et al., 2020). Семейства микроРНК hsa-let-7e/hsa-mir-125a и hsa-mir-141/hsa-miR-200 могут участвовать в регуляции экспрессии генов *ACE2* и *TMPRSS2*, потенциально регулируя чувствительность клеток к вирусу SARS-CoV-2 (Nersisyan, Shkurnikov, et al., 2020a). МикроРНК hsa-miR-214, hsa-miR-98 и hsa-miR-32 потенциально могут подавлять экспрессию гена *TMPRSS2*, при этом для hsa-miR-32 этот эффект был подтвержден экспериментально в человеческих клетках (Kaur et al., 2021). Была показана роль микроРНК miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-142-3p и miR-15b-5p как потенциальных участников патогенеза тяжелой формы COVID-19, что может быть связано с регуляцией иммунитета (Tang et al., 2020). В крови пациентов с COVID-19 происходило изменение уровня 73 микроРНК, которые также могут быть связаны с регуляцией иммунного ответа (C. Li et al., 2020). Однако все перечисленные примеры роли микроРНК в противовирусном иммунитете связаны с регуляцией собственных генов клеток-хозяев в ответ на вирусную инфекцию или для борьбы с ней. В то же время, существуют примеры прямого взаимодействия микроРНК с геномом коронавирусов.

Биоинформатический анализ указывает, что 288 микроРНК человека потенциально могут связываться с геномом вируса SARS-CoV-2 (Pierce et al., 2020). В другом исследовании среди 160 микроРНК, сид-регионы которых идеально соответствуют вирусной РНК SARS-CoV-2, для 15 микроРНК наблюдалось более 3 сайтов связывания, а для 12 микроРНК свободная энергия связывания составляла – 29 ккал/моль, что указывает на сильную связь. Наибольшее число сайтов связывания наблюдалось для семейства miR-29 (Jafarinejad-Farsangi et al., 2020). Анализ профилей связывания человеческих микроРНК с 67 различными геномами SARS-CoV-2 из 24 разных стран с нормализацией на число смертей в этих странах выявил несколько кластеров микроРНК, связанных с повышенной частотой смертей. Всего в этой работе биоинформатически была предсказана возможность связывания 122 и 106 микроРНК человека с генами референсных штаммов вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2 соответственно, из которых 27 микроРНК потенциально могут связываться с обоими вирусами (Khan et al., 2020a). В другом исследовании было выявлено 34 микроРНК, которые могут связываться с плюс-цепью SARS-CoV-2, и 45 микроРНК для минус-цепи (Guterres et al., 2020). После биоинформатического предсказания и экспериментальной валидации выяснилось, что микроРНК miR-219a-2-3p, miR-30c-5p, miR-378d, miR-29a-3p и miR-15b-5p могут связываться с РНК SARS-CoV-2 и регулировать экспрессию генов вируса (Siniscalchi et al., 2021). Была создана база данных miRCOVID-19, описывающая потенциальные взаимодействия человеческих микроРНК с генами SARS-CoV-2 (Alam & Lipovich, 2021).

Мутации в новых штаммах коронавируса SARS-CoV-2 потенциально могут приводить к исчезновению сайтов связывания микроРНК человека, позволяя избежать иммунного ответа. При анализе 24 различных штаммов SARS-CoV-2 было выявлено, что большинство противовирусных микроРНК могут связываться со всеми из изученных в исследовании штаммов, однако для 24 микроРНК были выявлены различные паттерны связывания в зависимости от мутаций в штаммах (Khan et al., 2020a). Мутации в ряде штаммов приводили к потере 3 из 10 сайтов связывания микроРНК в геноме SARS-CoV-2, в частности, для микроРНК miR-197-5p (Hosseini Rad SM & McLellan, 2020). Напротив, одна из мутаций SARS-CoV-2 может улучшать связывание с микроРНК hsa-miR-3620-3p, что может объяснять снижение трансмиссивности вируса (Haddad & Walid Al-Zyouod, 2020). Также ряд мутаций в геноме SARS-CoV-2 приводил к появлению сайтов связывания микроРНК hsa-miR-143-5p и hsa-miR-570-5p с повышенной аффинностью, причем в данном случае микроРНК могли не регулировать репликацию вируса, но при этом связывание этих микроРНК с РНК SARS-CoV-2 приводило к изменению экспрессии генов клетки-хозяина и развитию более тяжелого воспалительного ответа (S. Zhang et al., 2022). Такое явление, как отвлечение собственных микроРНК клетки от генов-мишеней за счет связывания с РНК вируса, в ряде статей было названо «эффектом губки», что может служить одним из механизмов избегания иммунного ответа вирусом SARS-CoV-2 (Bartoszewski et al., 2020; C. Li et al., 2022).

Таким образом, потенциальные противовирусные свойства микроРНК были показаны для различных эукариотических организмов, от растений до животных и человека. При вирусном заражении микроРНК могут регулировать экспрессию собственных генов клетки, увеличивая или уменьшая восприимчивость к инфекции. В то же время, отдельного внимания заслуживает непосредственное

связывание микроРНК человека с вирусной РНК. Для коронавируса SARS-CoV-2 была предсказана и экспериментально подтверждена возможность регуляции экспрессии генов вируса за счет связывания с микроРНК клетки-хозяина. При этом мутации, возникающие в различных штаммах вируса, могут приводить как к исчезновению сайтов связывания микроРНК, так и к появлению новых сайтов связывания. Благодаря этому вирус может избегать регуляции с помощью микроРНК или, наоборот, связывать микроРНК клетки-хозяина, отвлекая их от регуляции внутриклеточных процессов.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ SARS-COV-2

SARS-CoV-2 является вирусом, геном которого закодирован положительной цепью РНК и содержит 14 открытых рамок считывания (ORF, от англ. open reading frame). Две трети последовательности генома с 5'-конца занимают открытые рамки считывания ORF1a и ORF1b, которые транслируются рибосомами клетки-хозяина в два полипротеина, pp1a и pp1ab (Arya et al., 2021). После этого полипротеины подвергаются процессингу с участием двух вирусных протеаз, папаиноподобной протеазы (PLpro, от англ. Papain-like protease) и главной протеазы (Mpro, от англ. Main protease), с образованием шестнадцати неструктурных белков (Nsp, от англ. Nonstructural protein), Nsp1–Nsp16 (W. Yan et al., 2022). Совместно данные белки образуют так называемый репликационно-трансляционный комплекс (Mohan & Wollert, 2021).

Среди неструктурных белков наибольшее внимание с точки зрения изучения функции и разработки лекарств привлекают Nsp3, Nsp5 и Nsp12, которые кодируют соответственно PLpro, Mpro и РНК-зависимую РНК-полимеразу, которая с кофакторами Nsp7/8 обеспечивает репликацию и транскрипцию (Naidu et al., 2021; Shin et al., 2020; L. Yan et al., 2021). Отмечено, что вариабельность последовательности Nsp3 является самой высокой среди неструктурных белков, и у вариантов SARS-CoV-2, вызывающих настороженность, практически отсутствуют одинаковые мутации Nsp3 (C. Sun et al., 2022). Также Nsp3 может ингибировать продукцию интерферонов и нарушать противовирусный иммунный ответ (Low et al., 2022). Nsp5 имеет более консервативную последовательность, причем последовательность Nsp5 совпадает на 96% между SARS-CoV и SARS-CoV-2, и оба белка ингибируют выработку интерферонов (Y. Wu et al., 2020). Для Nsp12, помимо основной функции, также отмечена возможность ослабления интерферонового ответа (Yuen et al., 2020).

Nsp1 является высококонсервативным белком, участвующим в уклонении от иммунной системы и ингибировании трансляции. Nsp1 взаимодействует с малой субъединицей рибосомы, выступая ингибитором трансляции (Schubert et al., 2020), а также взаимодействует с комплексом NXF1-NXT1, участвующем в экспорте мРНК из ядра (K. Zhang et al., 2021). Также Nsp1 способствует разрезанию мРНК клетки-хозяина через привлечение экзонуклеаз, таких как Xrn1 (Gaglia et al., 2012). Nsp1 влияет на сигнальный путь интерферона альфа через ослабление фосфорилирования STAT1 и STAT2, что препятствует их транслокации в ядро

(Lei et al., 2020). Влияние на трансляцию также снижает уровень интерферона бета, интерферона лямбда1 и других элементов иммунного ответа (А. К. Banerjee et al., 2020a). Nsp2 тоже участвует в регуляции интерферонового ответа, а также вносит вклад в развитие воспалительного ответа (Lacasse et al., 2023).

Nsp6 является трансмембранным белком, который взаимодействует с Nsp3 и Nsp4 и способствует образованию двухмембранных везикул в инфицированных клетках, являющихся основой репликационно-транскрипционных комплексов или репликационных органелл, а также блокирует формирование везикул аутофагосом/аутолизосом (Gordon et al., 2020b). С другой стороны, Nsp6 стимулирует аутофагию через путь омегасом для сборки репликационных белков и деградации иммуномодулирующих белков (Cottam et al., 2011). Также Nsp6 способен подавлять интерфероновый ответ (Xia et al., 2020).

Nsp7 и Nsp8, как уже было сказано, являются кофакторами РНК-зависимой РНК-полимеразы и формируют димерные, линейные гетеротетрамерные или кубические гетеротетрамерные конформации (Courouble et al., 2021). При этом Nsp7 также подавляет путь интерферона альфа (Lei et al., 2020), а Nsp8 разрушает комплексы MDA5–MAVS, ингибируя противовирусный ответ (Z. Yang et al., 2020).

Nsp9 образует димеры, формирующие РНК-связывающий сайт и участвующие в вирусной репликации (El-Kamand et al., 2022). Nsp9 также связывается с Nsp12 в репликационно-транскрипционном комплексе, привлекая к взаимодействию Nsp10 и Nsp14 (Littler et al., 2020). Также Nsp9 подавляет транспорт мембранных белков и снижает интерфероновый ответ (А. К. Banerjee et al., 2020a). Nsp10 является высококонсервативным белком и уникален для коронавируса, при этом аналоги этого белка у прокариот и эукариот неизвестны (Rogstam et al., 2020). Nsp10 взаимодействует с экзонуклеазой Nsp14 (Krafcikova et al., 2020) и метилтрансферазой Nsp16 (Vithani et al., 2021). Nsp13 является РНК-трифосфатазой или хеликазой и совместно с Nsp10, Nsp14 и Nsp16 участвует в эффективном образовании кэпа мРНК SARS-CoV-2 (Newman et al., 2021). Nsp14 обладает экзонуклеазной и метилтрансферазной активностью (Yuen et al., 2020). Одной из функций Nsp14 является проверка и удаление ошибок, вносимых РНК-зависимой РНК-полимеразой, и экзонуклеазная активность усиливается при взаимодействии с Nsp10 (Y. Ma et al., 2015). Nsp13 также участвует в процессе метилирования и образовании кэпа совместно с Nsp12, Nsp14 и Nsp16 (Low et al., 2022). Nsp15 является важным ферментом, участвующим в процессинге РНК при вирусной репликации (Yoshimoto, 2021).

Оставшаяся часть генома SARS-CoV-2 экспрессируется с участием РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса, которая также участвует в репликации вирусного генома. Образующиеся субгеномные РНК используют системы транскрипции и трансляции клетки-хозяина для производства четырех структурных белков: S-белок (от англ. Spike – шип), М-белок (от англ. Membrane – мембрана), Е-белок (от англ. Envelope – оболочка) и N-белок (от англ. Nucleocapsid – нуклеокапсид), а также несколько вспомогательных белков, ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c и ORF10 (Redondo et al., 2021). Эти вспомогательные белки считаются антагонистами интерферонов и играют важную роль в патогенезе

COVID-19 (Hassan et al., 2022). Также вспомогательные белки опосредованно подавляют иммунный ответ через влияние на созревание РНК, трансляцию мРНК, транспорт белков и внутриядерный транспорт (Zandi et al., 2022).

N-белок SARS-CoV-2 участвует в упаковке геномной РНК вируса в спиральную структуру и взаимодействует с М-белком для сборки и созревания вирионов (Bai et al., 2021). При этом М-белок – это самый представленный структурный белок SARS-CoV-2, играющий центральную роль в сборке вириона и взаимодействующий со всеми остальными структурными белками (P. Kumar et al., 2023). Е-белок – самый маленький структурный белок, который участвует в сборке вирионов, отщеплении вирусных частиц от клеточной мембраны, а также может собираться в пентамеры и образовывать каналы в клеточной мембране (S. Zhou et al., 2023).

S-белок заключен в мембрану вируса в форме гликопротеина и формирует гомотримеры, непосредственно участвующие в узнавании рецептора ACE2 на поверхности клетки и проникновении в клетку. На один тример приходится 66 N-связанных гликанов (Watanabe et al., 2020). При синтезе S-белка SARS-CoV-2 в клетке-хозяине происходит разрезание белка между субъединицами S1 и S2 внутриклеточными протеазами, такими как фурин (Hoffmann, Kleine-Weber, & Pöhlmann, 2020). Таким образом, S-белок зрелого вириона SARS-CoV-2 состоит из нековалентно связанных субъединиц S1 и S2. При этом S1 несет рецептор-связывающий домен (RBD), узнающий ACE2, а S2 закоривает комплекс в мембране вируса и содержит так называемый пептид слияния или фьюжн-пептид, необходимый для слияния мембраны вируса с мембраной клетки-хозяина при заражении (Shang et al., 2020).

До слияния с клеткой-хозяином S1 субъединица уложена таким образом, что формирует 4 домена: N-концевой домен (NTD, от англ. N-terminal domain), рецептор-связывающий домен (RBD, от англ. Receptor-binding domain) и два С-концевых домена (CTD1 и CTD2, от англ. C-terminal domain). При этом домены S1 субъединицы окружают S2 субъединицу в свернутой конформации, характерной для вириона до слияния с клеткой-хозяином. Три RBD в составе гомотримера формируют верхушку шипа SARS-CoV-2, для которой характерны две конформации, открытая и закрытая (в английской литературе «up» и «down») (Cai et al., 2020).

NTD состоит из четырех бета-складчатых слоев, соединенных гибкими петлями. Остается слабоизученным, играет ли NTD какую-то функциональную роль, однако ряд сильных нейтрализующих антител направлен именно против NTD, что позволяет предположить его роль в осуществлении функции шипа или поддержании его необходимой структуры (L. Liu et al., 2020).

RBD имеет два субдомена: ядерную структуру из пяти антипараллельных бета-слоев, прикрытых короткими соединяющими альфа-спиралями, и выступающую петлю, называемую рецептор-связывающим мотивом и связывающуюся с ACE2 (Lan et al., 2020). В закрытой конформации S-тримера до слияния каждый RBD находится в согнутой конформации, прилегая к CTD1 того же протомера и NTD соседнего протомера, а рецептор-связывающий мотив недоступен для взаимодействия с ACE2. При переходе в открытую конформацию, как минимум, один RBD оказывается в приподнятом состоянии, обнажая рецептор-связывающий мотив для взаимодействия с ACE2 (Wells et al., 2021).

CTD1 и 2 состоят преимущественно из бета-слоев. RBD выглядит как вставка между двумя антипараллельными бета-слоями CTD1, а CTD1 выглядит как вставка между двумя антипараллельными бета-слоями CTD2. При переходе RBD в открытую конформацию и обратно происходит вращательное движение CTD1. CTD1 также соединяет RBD с проксимальным участком фьюжн-пептида (Cai et al., 2020). В CTD2 находится участок разрезания фурином на границе S1 и S2 (J. Zhang et al., 2021).

S2 субъединица может находиться в конформации до слияния и после слияния. Клеточные протеазы могут разрезать S2 субъединицу, стимулируя переход между двумя конформациями, в результате чего фьюжн-пептид способствует слиянию мембраны вируса и клетки-хозяина (Fan et al., 2020). Разрезание возможно на поверхности клетки с участием трансмембранной сериновой протеазы TMPRSS2 и других протеаз, таких как TMPRSS4, TMPRSS11A, TMPRSS11E, матриптаза, трипсиноподобная протеаза дыхательных путей человека (HAT), эластаза (Laporte & Naesens, 2017), а также в поздних эндолізосомах катепсинами, особенно катепсином L (Hoffmann, Kleine-Weber, Schroeder, et al., 2020a).

Со времени обнаружения вируса SARS-CoV-2 наблюдается постоянное изменение его генома за счет возникающих мутаций, что может приводить к изменению последовательности белков и уклонению от иммунитета, а также изменению трансмиссивности, вирулентности и других свойств вируса (Ghosh et al., 2022). Поскольку SARS-CoV-2 является РНК-содержащим вирусом, он использует для копирования собственного генома РНК-зависимую РНК-полимеразу, для которой характерна относительно высокая частота ошибок, что и приводит к высокой скорости возникновения мутаций (Pachetti et al., 2020). Вирусная 3'-экзонуклеаза nsp14 должна предотвращать накопление мутантных РНК вируса, однако она не может полностью исключить процесс образования новых штаммов (Hsu et al., 2021). Начальная эволюция SARS-CoV-2 происходила в природных резервуарах, вероятнее всего, в летучих мышах, где могла происходить рекомбинация с другими вирусами и накопление адаптивных мутаций, которые в дальнейшем позволили вирусу успешно распространиться в человеческих популяциях (MacLean et al., 2021). При попадании в человеческий организм вирус стал адаптироваться к новым условиям, в частности, стала происходить селекция штаммов, которые более эффективно взаимодействуют с протеазами человеческой клетки, что наблюдалось для трансмембранной сериновой протеазы TMPRSS2 и фурина (A. Vanerjee et al., 2021). Также было показано, что у пациентов с иммуносупрессией, которым вводили плазму людей, выздоровевших от COVID-19, происходила селекция и ускоренная эволюция штаммов SARS-CoV-2 с пониженной чувствительностью к нейтрализующим антителам (S. A. Kemp et al., 2021).

В то время как репликационные ошибки приводят к небольшим изменениям генома, рекомбинация может приводить к более выраженным мутациям SARS-CoV-2. Прерывистый процесс транскрипции может вести к тому, что РНК-зависимая РНК-полимераза SARS-CoV-2 может сменить реплицируемую цепь РНК в процессе транскрипции и продолжить синтезировать химерную последовательность РНК. В случае заражения клетки более чем одним видом или вариантом коронавируса могут образовываться химерные РНК из

двух и более вирусов, что вызывает резкие изменения генома в отличие от точечных мутаций (D. Wang et al., 2021).

Также изменения генома SARS-CoV-2 могут происходить за счет механизма гомологичной рекомбинации, когда молекулы РНК с участками с высокой степенью схожести обмениваются частью последовательности. Гомологичная рекомбинация типична для бета-коронавирусов человека (Pollett et al., 2021), а для SARS-CoV-2 могла происходить еще в организме летучих мышей или других животных (Bonì et al., 2020).

Появление точечных мутаций и/или вставок/делеций может приводить к изменению свойств вируса. Так, усиление трансмиссивности вируса связывают с мутациями в белке нуклеокапсида R203M (Syed et al., 2021) и R203K/G204R (H. Wu et al., 2021) и в S-белке N501Y (Y. Liu et al., 2022), D614G (Korber et al., 2020; Ozono et al., 2021) и P681R (Saito et al., 2022). Также за счет мутаций вирус может избегать иммунного ответа, например, мутации E484K, K417T и делеция H69/V70 в S-белке закрепились в ряде штаммов за счет снижения эффективности иммунного ответа организма человека на эти новые генетические варианты (R. E. Chen et al., 2021; Cho et al., 2021; Gaebler et al., 2021; P. Wang et al., 2021).

ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ COVID-19

Во всём мире вызывает озабоченность проблема снижения тяжести течения и летальности COVID-19. Течение и исход COVID-19 зависят от различных факторов, включая возраст, пол, генетические особенности и сопутствующие заболевания (Sonnweber et al., 2023). Понимание влияния каждого фактора риска на прогрессирование заболевания и смертность позволяет определить дальнейший выбор тактики лечения, сделать прогноз течения, а также улучшить понимание патогенеза заболевания (Kowsar et al., 2023; Russell et al., 2023; J. T. Wu et al., 2020).

Выделяют четыре степени тяжести заболевания, вызванного SARS-CoV-2: лёгкое течение, среднетяжёлое, тяжёлое и крайне тяжёлое (*Временные Методические Рекомендации “Профилактика, Диагностика и Лечение Новой Коронавирусной Инфекции (COVID-19),”* 2022). Важно отметить, что COVID-19 имеет три фазы, которые классифицируются как острое вирусное заболевание, иммуноопосредованное воспалительное поражение легких и пост-острые последствия COVID-19 (Post-acute sequelae of COVID-19 – PASC).

1) Раннее вирусное заболевание: репликация вируса максимальна в верхних дыхательных путях; нарушения оксигенации легких нет. Симптомы: лихорадка, недомоганием, миалгия, кишечные симптомы и симптомы со стороны верхних дыхательных путей.

2) Воспалительное поражение легких: происходит иммуноопосредованное повреждение легких (вызванное моноцитами/макрофагами). Симптомы: одышка, кашель и гипоксическая дыхательная недостаточность. Как правило, на этой стадии организм чувствителен к противовоспалительной терапии (дексаметазон, блокаторы рецепторов интерлейкина-6, ингибиторы янус-киназ).

3) Пост-острые последствия. Эта фаза связана с изнурительными длительными симптомами: утомляемость, нейрокогнитивные нарушения и респираторные симптомы. Характерным признаком является неразрешающееся воспаление.

Пациенты на каждой стадии заболевания по-разному реагируют на терапию, что обусловлено различиями в молекулярно-биологических механизмах, лежащих в их основе. Наличие сопутствующих заболеваний было признано фактором риска с первых дней пандемии. Но установление причинно-следственной связи и определение лежащих в основе механизмов и клинических последствий было и является в настоящее время сложной задачей из-за множества смешанных факторов (Altschul et al., 2020; Russell et al., 2023).

Исследования и обзоры, имеющиеся на данный момент, определяют факторы высокой исходной уязвимости человека к коронавирусной инфекции, а также усугубляющие течение болезни. Показано, что худший прогноз течения COVID-19 имеют лица мужского пола старше 60 лет с хроническими заболеваниями, такими как диабет (СД), гипертония (АГ), сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), респираторные заболевания и злокачественные новообразования (Aggarwal et al., 2020; Zeltyn-Abramov et al., 2021).

Также повышенный индекс массы тела (ИМТ; кг/м² более 40), и большинство сопутствующих заболеваний связаны с более высоким риском смерти, связанной с COVID-19: диабет (более высокий коэффициент риска для лиц с недавно измеренным уровнем гликированного гемоглобина (HbA1c) не менее 58 ммоль/моль), тяжелая форма астмы (определяемая как астма на фоне недавнего приема пероральных кортикостероидов), респираторные заболевания, хронические сердечные заболевания, заболевания печени, инсульт, деменция, другие неврологические заболевания, снижение функции почек (более высокий коэффициент риска связан с более низкой расчетной скоростью клубочковой фильтрации), аутоиммунные заболевания (ревматоидный артрит, волчанка или псориаз) и другие иммунодепрессивные состояния. У лиц с недавним (т.е. за последние пять лет) гематологическим злокачественным новообразованием в анамнезе риск был повышен, как минимум, в 2,5 раза. Для других видов рака отношение шансов было меньше. Наличие в анамнезе диализа или терминальной стадии почечной недостаточности ассоциировалось также с повышенным риском крайне тяжёлого течения COVID-19 (C. Wu et al., 2020).

Демографические факторы риска

Пожилой возраст связан с риском тяжёлого течения и дальнейшего летального исхода COVID-19 (C. Wu et al., 2020). В соответствии с исследованиями основная часть диагностированных случаев приходилась на возрастную группу от 25 до 60 лет, в то время как большинство госпитализированных случаев приходилось на возрастную группу от 60 до 80 лет (Kostka et al., 2022). Не выжившие были старше, чем выжившие (76,5 против 46,6 лет), выжившие в отделении интенсивной терапии были младше, чем не выжившие в отделении интенсивной терапии (43,6 против 70,7 лет) (Kowsar et al., 2023; F. Zhou et al., 2020).

Согласно данным, основанным на исследованиях когорт пациентов (самая большая когорта включала 4,5 миллиона пациентов) (Kostka et al., 2022), среди общего числа людей с подтверждённым диагнозом COVID-19 доля госпитализированных мужчин больше доли госпитализированных женщин (Deng et al.,

2020; Gajovic et al., 2023). Среди умерших пациентов процент мужчин составляет 60% (Takahashi et al., 2020; Tian et al., 2020). Предполагаемыми причинами такого соотношения являются различия во врождённых иммунных реакциях мужчин и женщин, а также уровне эстрогена (Gagliardi et al., 2020; Takahashi et al., 2020; Viveiros et al., 2021; Yildirim et al., 2021).

Метаболические заболевания

Метаболические заболевания, включая дислипидемию, ожирение и сахарный диабет, являются хорошо известными факторами риска тяжелого течения COVID-19 (Sonnweber et al., 2023).

Дислипидемия определяется как гипертриглицеридемия (триглицериды в сыворотке более 200 мг/дл), так и сниженный уровень ОХ ЛПВП (ОХ ЛПВП менее 40 мг/дл для мужчин и менее 50 мг/дл для женщин) (Pantoja-Torres et al., 2019).

Тяжелое течение COVID-19 характеризуется «SIRS-подобным» (systemic inflammatory response syndrome) иммунологическим ответом с цитокиновым профилем в плазме, не отличающимся от ОРДС (острый респираторный дистресс-синдром) и сепсиса (Wilson et al., 2020). Следует отметить, что при острой инфекции SARS-CoV-2 сообщалось о быстрых изменениях уровня липидов в крови (Tall & Yvan-Charvet, 2015). Потенциальные механизмы, объясняющие скачки липидов, включают снижение синтеза липидов во время чрезмерного воспаления и дисфункцию печени. Низкий уровень холестерина ЛПВП или нарушение его поглощения надпочечниками может привести к снижению уровня кортикостероидов и повышению уровня смертности.

У пациентов с метаболическими заболеваниями, как правило, были более высокий уровень провоспалительных биомаркеров и маркеров системного воспаления (ИЛ-6, С-реактивный белок (СРБ), сывороточный ферритин и d-димер, а также адипонектин), коррелирующие с экспрессией адипоцитокинов и концентрацией липидов в крови. Недавний комплексный обзор показал, что дислипидемия в анамнезе является фактором риска тяжелого течения острого COVID-19, а острая инфекция SARS-CoV-2 изменяет метаболизм липидов, и концентрации ЛПВП и ЛПНП обратно пропорциональны тяжести течения COVID-19 (G. J. Choi et al., 2020). Гипертриглицеридемия может вызывать апоптоз макрофагов и эндотелиальных клеток человека, что может иметь решающее значение для исхода COVID-19 (Wehinger et al., 2007). Согласно данным клинических исследований, дислипидемия связана с повышением маркеров тромбоза и тенденцией к более тяжелым структурным нарушениям легких в раннем послеостром периоде наблюдения.

Генетические факторы

Хотя установленные факторы риска коррелируют с тяжестью заболевания, сами по себе факторы риска не объясняют, почему у некоторых молодых здоровых людей развиваются тяжелые или крайне тяжелые формы COVID-19 (Gupta et al., 2022). Подобные случаи могут быть обусловлены генетическими факторами,

объясняющими индивидуальные различия в восприимчивости к SARS-CoV-2 и тяжести течения COVID-19 (COVID-19 Host Genetics Initiative et al., 2021). Несколько полногеномных исследований ассоциаций (GWAS) были проведены в различных этнических популяциях. Они позволили выявить потенциальные геномные маркеры, связанные с повышенным риском заражения и прогрессированием до тяжелых клинических проявлений (The Severe Covid-19 GWAS Group, 2020; F. Wang et al., 2020). Были выявлены статистически значимые ассоциации между полиморфизмами ACE1 I/D rs1799752/rs4646994, APOE rs429358, CCR5 rs333 и IFITM3 rs12252 и восприимчивостью к инфекции SARS-CoV-2. Также было обнаружено, что полиморфизмы ACE2 rs2285666, ACE2 rs2106809, ACE2 rs2074192, AGTR1 rs5186 и TNFA rs1800629 связаны с повышенным риском развития тяжелых проявлений заболевания (Gupta et al., 2022).

Врожденные и адаптивные гуморальные и клеточные иммунные реакции, опосредованные Т-клетками, способствуют элиминации вируса SARS-CoV-2, что в большинстве случаев совпадает с клиническим выздоровлением. С другой стороны, чрезмерный клеточно-опосредованный и нерегулируемый врожденный и адаптивный иммунный ответ может привести к неконтролируемой воспалительной реакции с высвобождением большого количества провоспалительных цитокинов. Это состояние, известное как «цитокиновый шторм», напрямую коррелирует с повреждением легких, а, соответственно, неблагоприятным исходом (Migliorini et al., 2021).

Клиническое течение инфекции SARS-CoV-2 сильно зависит от взаимоотношений между вирусом и иммунной системой хозяина. В данном взаимодействии молекулы ГКГС пациента играет центральную роль. Генетическое разнообразие пациентов может помочь объяснить множественность вариантов иммунных реакций на вирус. Знание того, как различия ГКГС могут повлиять на прогрессирование COVID-19, может помочь выявлять людей с более высоким риском заболевания (Tavasolian et al., 2021). ГКГС является наиболее полиморфными генами человека. На сегодняшний день идентифицировано более 30 000 аллелей ГКГС, которые кодируют более 18 000 уникальных белков (Robinson et al., 2015). Большинство нуклеотидных замен аллелях ГКГС сосредоточено в экзонах, кодирующих пептидсвязывающую бороздку и область взаимодействия с Т-клеточными рецепторами (Augusto & Hollenbach, 2022). Интенсивность и характер клеточного иммунного ответа на инфекцию SARS-CoV-2 обусловлены разнообразием как репертуара Т-клеточных рецепторов, так и генотипом ГКГС класса I. Клетки млекопитающих экспрессируют до шести различных аллелей ГКГС класса I, которые определяют презентацию антигенов при заболевании, а вместе с тем и восприимчивость к заболеванию и исход вирусных инфекций. В ряде исследований была продемонстрировано, что аллели HLA-A*01:01, HLA-A*11:01, B*51:01 и C*14:02 были значительно более распространены у пациентов с тяжелой и критической степенью течения заболевания по сравнению с пациентами с легкой и средней степенью тяжести (M. Shkurnikov et al., 2021; F. Wang et al., 2020). По данным исследования наличие аллели HLA-A*01:01 может быть связано с более низким CD8⁺ Т-клеточным ответом (Olafsdottir et al., 2022).

ВЗАИМОСВЯЗЬ ГКГС-I С ТЯЖЕСТЬЮ COVID-19

Ряд исследований показал взаимосвязь между тяжестью течения COVID-19 и генотипом ГКГС класса 1. Была отмечена корреляция между частотой встречаемости аллелей HLA-A01:01 и HLA-A02:01 и уровнем смертности от COVID-19 в различных регионах Италии (Pisanti et al., 2020). Моделирование взаимодействия пептидов SARS-CoV-2 с молекулами ГКГС класса 1 подтвердило результаты теоретического моделирования: чем больше вирусных пептидов связываются с HLA-I, тем легче течение заболевания (Iturrieta-Zuazo et al., 2020). Позднее была установлена взаимосвязь генотипа ГКГС класса 1 с риском смерти от COVID-19 в возрасте до 60 лет (M. Shkurnikov et al., 2021) и разработан способ оценки риска развития тяжелой формы COVID-19.

Данный способ включает забор биологического материала, выделение геномной ДНК с последующим генотипированием аллелей генов HLA-A, HLA-C, обработку результатов генотипирования и прогнозирование по полученным данным риска развития тяжелой формы COVID-19 с высокой вероятностью летального исхода, при этом обработку результатов генотипирования осуществляют с использованием метода главных компонент, посредством определения для каждого аллеля значений 2-й и 3-й главных компонент гена HLA-A и значения 4-й главной компоненты гена HLA-C из базы данных аллелей генов HLA-A, HLA-C, предварительно определенных для популяции, в которую входит исследуемый индивидуум, и содержащей значения упомянутых главных компонент аллелей соответствующих генов, с последующим суммированием всех значений главных компонент, нормированием значения полученной суммы и сравнением с пороговым значением. Прогнозируют риск развития тяжелой формы COVID-19 при получении нормированного значения суммы выше порогового значения.

База данных аллелей генов HLA-A, HLA-C со значениями главных компонент (БД) была сформирована по итогам соответствующего генотипирования популяции, включая пациентов, умерших от COVID-19 (M. Shkurnikov et al., 2021), расчета коэффициентов связывания всех полученных аллелей HLA-A, HLA-C с вирусными пептидами, вызывающими COVID-19 (штамма SARS-CoV-2 и/или его мутаций), с помощью программы netMHCpan (Reynisson et al., 2020), с последующей обработкой полученных данных методом главных компонент, при этом обработку осуществляли отдельно для каждого гена HLA-A, HLA-C, а количество главных компонент определяли таким образом, чтобы доля дисперсии, обусловленной каждой компонентой, составляла не менее 5% от исходной дисперсии.

Кроме того, было проведено сравнение наблюдаемых частот генотипов с ожидаемыми, согласно равновесию Харди-Вайнберга в исследуемых группах. Наблюдаемые частоты генотипов в группах сравнения соответствовали ожидаемым, данные популяции находились в состоянии равновесия.

Нормирование суммы полученных значений главных компонент (S) аллелей генов HLA-A, HLA-C индивидуума реализовано по формуле $N = (S - S_{\min}) /$

($S_{\max} - S_{\min}$), где S_{\min} – сумма всех минимальных значений главных компонент по каждому аллелю из БД, S_{\max} – сумма всех максимальных значений главных компонент по каждому аллелю из базы данных, N – нормированный индекс риска (далее – «Индекс риска»).

Пороговое значение для интерпретации «Индекса риска» было определено на основании использования значений главных компонент умерших пациентов в возрасте до 60 лет и после 60 из БД. При этом для каждого умершего пациента определяли значения 2-й и 3-й главных компонент гена HLA-A и значение 4-й главной компоненты гена HLA-C из БД, с последующим суммированием всех значений главных компонент, нормированием полученных сумм (по формуле выше), после чего из полученных значений N_1, N_2, \dots, N_k (N_i – нормированный «Индекс риска» для i -го пациента, k – общее число пациентов) в качестве порогового значения выбрали значение, характеризующее максимальную долю пациентов, умерших до 60 лет, в группе пациентов, с N_i выше порогового значения. При этом определение максимальной доли пациентов, умерших до 60 лет, было реализовано с помощью точного теста Фишера.

Данный способ был разработан по итогам проведенных исследований генетического материала 539 пациентов, включая генетический материал умерших пациентов в возрасте до 60 лет и после 60 (111 пациентов). В результате были выявлены возможные связи между генотипами умерших пациентов, их возрастом на момент смерти с критическим течением COVID-19.

Использование данных генотипа ГКГС-I пациентов, умерших от COVID-19 в возрасте до 60 лет и старше 60 лет значимо повлияло на повышение точности получаемых оценок. Смерть – сочетание сопутствующих заболеваний, неадекватного ответа иммунной системы, одной из причин которого является генетическая предрасположенность; сравнение умерших от COVID-19 в возрасте до 60 лет с умершими в возрасте старше 60 лет позволило выявить преимущественный вклад наследственного фактора.

Кроме того, в разработанном способе предложены новые критерии оценки аффинности пептидов и аллелей ГКГС-I. В работе Iturrieta-Zuazo и соавторов (Iturrieta-Zuazo et al., 2020), упоминается два способа интерпретации математического моделирования аффинности пептида и молекулы ГКГС-I: при аффинности менее 50 нМоль взаимодействие считалось возможным, при более и равным 50 нМоль – нет; при аффинности менее 500 нМоль взаимодействие считалось возможным, при более и равно 500 нМоль – нет. Способ, предложенный авторами данного исследования, использует непрерывную шкалу значений аффинности от 1 до 5000 в отличие от способа Iturrieta-Zuazo и соавторов, который бинаризирует (0 или 1) значение аффинности.

Разработанный способ оценки риска развития тяжелой формы COVID-19 на основе анализа генотипа ГКГС-I демонстрирует более высокую точность прогнозных оценок течения COVID-19 по сравнению со способом-прототипом, что является важным для применения/изменения тактики лечения пациента. Тем не менее, необходимо учитывать, что в популяции постепенно формируется иммунитет и улучшаются протоколы лечения пациентов с COVID-19, но вирус SARS-CoV-2 постоянно мутирует, что может значительно сказываться на точности прогноза.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МУТАЦИЙ НА ИММУНОДОМИНАНТНЫЕ ЭПИТОПЫ ВИРУСА SARS-COV-2

Для оценки влияния мутаций SARS-CoV-2 на иммуногенность валидированных методом ELISpot эпитопов было отобрано 47 пептидов, полученных из различных белков SARS-CoV-2 (Titov et al., 2022). Для каждого из 133 пациентов, переболевших COVID-19, с известным генотипом ГКГС-I, проанализировали аффинность взаимодействия конкретного пептида с соответствующей молекулой ГКГС. В результате получили 67 уникальных пар «аллель-пептид», для которых известны следующие характеристики: доля пациентов, (не) обладающих заданным HLA аллелем и (не) отвечающих на выбранный пептид. Среди уникальных пар отобрали те, у которых доля пациентов с заданным аллелем, отвечающих на выбранный пептид, была не меньше 0,5, а не отвечающих – не больше 0,2. Оказалось, что среди 67 уникальных пар 33 пары, содержащие 25 уникальных пептидов, удовлетворяли этим условиям, т.е. являются иммунодоминантными.

Были отобраны наиболее распространённые варианты вируса SARS-CoV-2 (21 вариант, включая референсный вариант Wuhan-Hu-1 (Carabelli et al., 2023), табл. 1) и отсортировали их по дате появления их первой расшифрованной последовательности в базе данных GISAID.

Табл. 1. Штаммы SARS-CoV-2, использованные в анализе

GISAID ID	Название штамма по GISAID	Штамм	Впервые детектирован	Дата
EPI_ISL_402125	hCoV-19/Wuhan/Hu-1/2019	Wuhan-Hu-1	China	2019-12-31
EPI_ISL_842052	hCoV-19/England/PORT-2EAF1/2020	Zeta GR/484K.V2 (P.2)	Brazil	2020-00-00
EPI_ISL_581117	hCoV-19/England/MILK-9E2FE0/2020	Alpha 202012/01 GRY (B.1.1.7)	UK	2020-09-21
EPI_ISL_801973	hCoV-19/USA/NY-MSHSPSP-PV21166/2020	Iota GH/253G.V1 (B.1.526)	USA/New York	2020-10-09
EPI_ISL_648527	hCoV-19/USA/CA-CZB-12872/2020	Epsilon GH/452R.V1 (B.1.429+B.1.427)	USA/California	2020-10-16
EPI_ISL_660190	hCoV-19/South Africa/KRISP-K004312/2020	Beta GH/501Y.V2 (B.1.351)	South Africa	2020-10-23
EPI_ISL_1534645	hCoV-19/Peru/LIM-INS-869/2020	Lambda GR/452Q.V1 (C.37)	Peru	2020-11-30

GISAID ID	Название штамма по GISAID	Штамм	Впервые детектирован	Дата
EPI_ISL_895058	hCoV-19/Japan/PG-13394/2020	Delta GK (B.1.617.2+AY.122)	Japan	2020-12-05
EPI_ISL_1663516	hCoV-19/India/ILSGS00941/2020	Delta GK (B.1.617.2+AY.43)	India	2020-12-12
EPI_ISL_760883	hCoV-19/England/CAMC-C769B3/2020	Eta G/484K.V3 (B.1.525)	UK/Nigeria	2020-12-15
EPI_ISL_792680	hCoV-19/Japan/IC-0561/2021	Gamma GR/501Y.V3 (P.1)	Brazil/ Japan	2021-01-02
EPI_ISL_1073934	hCoV-19/Norway/3458/2021	Theta GR/1092K.V1 (P.3)	Philippines	2021-02-05
EPI_ISL_1652555	hCoV-19/Russia/SPE-R11-MH15668S/2021	B.1.1.523	Russia	2021-03-09
EPI_ISL_1315070	hCoV-19/Australia/NSW-R0167/2021	Delta GK (B.1.617.2)	Australia	2021-03-18
EPI_ISL_1372093	hCoV-19/India/ILSGS00308/2020	Kappa G/452R.V3 (B.1.617.1)	India	2021-03-18
EPI_ISL_3099892	hCoV-19/Spain/MD-51402239/2021	Mu GH (B.1.621+B.1.621.1)	Colombia	2021-07-00
EPI_ISL_6699752	hCoV-19/South Africa/CERI-KRISP-K032226/2021	Omicron (BA.1)	South Africa	2021-11-19
EPI_ISL_9884589	hCoV-19/USA/CA-CDPH-3000303104/2022	Omicron (BA.2)	USA	2022-01-24
EPI_ISL_9854919	hCoV-19/Denmark/DCGC-362114/2022	Omicron (BA.3)	Denmark	2022-02-06
EPI_ISL_11873073	hCoV-19/Denmark/DCGC-469344/2022	Omicron (BA.4)	Denmark	2022-04-02
EPI_ISL_13302233	hCoV-19/India/MH-INSACOG-CSIR-NEERI1872/2022	Omicron (BA.5)	India	2022-06-09

Для каждого из ранее отобранных 25 иммунодоминантных пептидов проверили, не исчезают ли они в результате мутаций РНК вируса. Оказалось, что из них лишь 4 исчезают (табл. 2), а оставшийся 21 пептид не подвержен мутациям.

Табл. 2. Пептиды SARS-CoV-2, утратившие иммуногенность в результате мутаций вируса

GISAID	RWYFFYGG TGPEAGL	FQPTN GVGY	HTTDP SFLGRY	TTDPS FLGRY	Дата
EPI_ISL_402125	N	Spike	NSP3	NSP3	2019-12-31
EPI_ISL_842052		Spike	NSP3	NSP3	2020-00-00
EPI_ISL_581117	N		NSP3	NSP3	2020-09-21
EPI_ISL_801973	N	Spike	NSP3	NSP3	2020-10-09
EPI_ISL_648527	N	Spike	NSP3	NSP3	2020-10-16
EPI_ISL_660190	N		NSP3	NSP3	2020-10-23
EPI_ISL_1534645	N	Spike	NSP3	NSP3	2020-11-30
EPI_ISL_895058	N	Spike	NSP3	NSP3	2020-12-05
EPI_ISL_1663516	N	Spike	NSP3	NSP3	2020-12-12
EPI_ISL_760883	N	Spike	NSP3	NSP3	2020-12-15
EPI_ISL_792680	N		NSP3	NSP3	2021-01-02
EPI_ISL_1073934	N		NSP3	NSP3	2021-02-05
EPI_ISL_1652555	N	Spike	NSP3	NSP3	2021-03-09
EPI_ISL_1315070	N	Spike			2021-03-18
EPI_ISL_1372093	N	Spike			2021-03-18
EPI_ISL_3099892	N		NSP3	NSP3	2021-07-00
EPI_ISL_6699752	N		NSP3	NSP3	2021-11-19
EPI_ISL_9884589	N		NSP3	NSP3	2022-01-24

GISAID	RWYFYYG TGPEAGL	FQPTN GVGY	HTTDP SFLGRY	TTDPS FLGRY	Дата
EPI_ ISL_9854919	N		NSP3	NSP3	2022-02-06
EPI_ ISL_11873073	N		NSP3	NSP3	2022-04-02
EPI_ ISL_13302233	N		NSP3	NSP3	2022-06-09

В табл. 3 представлены валидированные иммунодоминантные пептиды, не подвергнувшиеся мутациям в наиболее распространенных вариантах SARS-CoV-2.

Табл. 3. Консервативные Т-клеточные эпитопы вируса SARS-CoV-2, иммуногенность которых экспериментально подтверждена методом ELISpot

Аллель ГКГС	Пептид	Класс ГКГС	Доля ответов у носителей соответствующего аллеля	Доля ответов у пациентов, не являющихся носителями соответствующего аллеля
A*03:01	KCYGVSP TK	I	1,00	0,06
A*11:01	A TEGALNTPK	I	1,00	0,00
A*30:01	KTIQPRVEK	I	1,00	0,02
DRB1*01:01, DRB3*02:02, DQB1*03:01, DQB1*02:01	LSYYKLGASQRVAGD	II	2,60	0,20
DRB1*13:01, DRB1*11:04, DRB1*11:01	IGYYRRATRRIRGGD	II	0,50	0,00
A*03:01	MVTNNTFTLK	I	0,50	0,03
A*02:01	ALSKGVHVFV	I	0,53	0,00
A*02:01	LLLLDRLNQL	I	0,53	0,07
DRB3*02:02, DRB4*01:03	IEDLLFNKVTLADAG	II	0,53	0,00
A*01:01	LTDEMIAQY	I	0,54	0,00
DRB1*13:01, DRB1*11:04	IGYYRRATRRIRGGD	II	0,56	0,15
A*01:01	FTSDYYQLY	I	0,56	0,10

Аллель ГКГС	Пептид	Класс ГКГС	Доля ответов у носителей соответ- ствующего аллеля	Доля ответов у пациентов, не являющих- ся носителя- ми соответ- ствующего аллеля
B*27:05	GRLQSLQTY	I	0,60	0,01
DRB1*11:04, DRB1*11:01	IGYYRRATRRIRGGD	II	0,60	0,18
B*44:03	MEVTPSGTW	I	0,67	0,07
A*01:01	PTDNYITTY	I	0,69	0,00
DRB1*13:01, DRB1*11:01	IGYYRRATRRIRGGD	II	0,69	0,10
DRB1*01:01, DRB1*07:01	TSRTLSYYKLGASQRVA	II	0,71	0,00
A*23:01	QYIKWPWYI	I	0,71	0,12
B*40:01	MEVTPSGTWL	I	0,75	0,05
A*03:01, A*11:01	KCYGVSPTK	I	0,78	0,00
DRB1*13:01, DRB1*11:01, DRB1*11:04	GAVILRGHLRIAGHHLGR	II	0,80	0,00
B*07:02	SPRWYFYYL	I	0,80	0,00
DRB1*07:01	TSRTLSYYKLGASQRVA	II	0,80	0,12
DRB1*13:01, DRB1*11:04	GAVILRGHLRIAGHHLGR	II	0,83	0,20
A*03:01	KTFPPTEPK	I	0,88	0,14
A*03:01, A*30:01	KTFPPTEPK	I	0,92	0,00
DRB1*13:01, DRB1*11:01	GAVILRGHLRIAGHHLGR	II	0,94	0,19
A*02:01	YLQPRTFLL	I	0,98	0,02

Можно заключить, что мутации вируса SARS-CoV-2 практически не затрагивают иммунодоминантные эпитопы. Отсутствие мутаций в иммунодоминантных эпитопах свидетельствует о высокой устойчивости Т-клеточного иммунитета к эволюции вируса.

Прогноз аффинности взаимодействия молекула ГКГС-I – пептид

Создание набора последовательностей пептидов SARS-CoV-2

Протеомы вариантов SARS-CoV-2 (27 вирусных белков) были получены из базы данных GISAID (Elbe & Buckland-Merrett, 2017). В качестве эталонного вируса был использован вариант Wuhan-Hu-1 (EPI_ISL_402125).

Набор вирусных пептидов был создан путем рассмотрения всех возможных фрагментов белков SARS-CoV-2 длиной от 8 до 14 аминокислотных остатков (потенциальные эпитопы CD8+ Т-лимфоцитов).

Учет мутаций SARS-CoV-2, связанных с конкретным вариантом вируса, осуществляли по следующей методике:

– построили попарное глобальное выравнивание эталонных и мутантных белков с помощью Biopython (Cock et al., 2009). Это позволило определить соответствие между эталонными и мутантными пептидами, взяв пары пептидов с одинаковыми координатами начала/конца при выравнивании (пропуски были удалены из последовательностей пептидов). Если эталонный и мутированный пептиды были одинаковыми, то такая пара исключалась из последующего анализа. Проанализировали два частных случая:

1) либо эталонный, либо мутантный пептид был слишком коротким, чтобы его можно было рассматривать как эпитоп CD8+ Т-лимфоцитов. Например, делеция внутри эталонного 8-мерного пептида привела к 7-меру, который не подходит для презентации на ГКГС-I. В этом случае эталонный пептид считался не имеющим пары;

2) мутированный пептид относился к набору эталонных пептидов (после исключения пробелов). В качестве примера рассмотрим пептид FKLKDCVMY из белка NSP6 эталонного протеома. Делеция SGF 106–108 в штамме UK привела к делеции первой аминокислоты пептида, поэтому рассматриваемый пептид после мутации принимает вид KLKDCVMY. Поскольку эта последовательность принадлежала эталонному пептидому, считали пептид FKLKDCVMY не имеющим пары;

– выбор аллельных вариантов генов ГКГС-I: HLA-A, -B, -C. Стремясь составить список наиболее частых аллелей ГКГС-I, использовали базу данных CIWD v3.0.0 (Hurley et al., 2020). Были проанализированы частоты аллелей HLA для разных групп населения, таких как AFA (африканцы/афроамериканцы), API (азиатские/тихоокеанские острова), EURO (европейцы), MENA (Ближний Восток/северное побережье Африки), HIS (Южная или Центральная Америка/латиноамериканцы), NAM (индейские популяции) и UNK (множество предков/другое). Затем из объединения 10 наиболее распространенных аллелей для каждой группы населения был составлен окончательный список аллелей. Список рассматриваемых аллелей представлен в табл. А.1.

Выбор модели прогноза и прогноз аффинности взаимодействия молекула ГКГС-I – пептид

Существует несколько подходов к поиску иммуногенных эпитопов. В частности, разработчики двух наиболее популярных программ для поиска высокоаффинных эпитопов – netMHCpan (Reynisson et al., 2020) и MHCflurry (O'Donnell et al., 2018) – рекомендуют отбирать эпитопы по %рангу. Причем рекомендуется использовать два пороговых значения: 0,5% и 2,0%.

Тем не менее, в данном исследовании был применен широко используемый подход на основе анализа прогнозных оценок аффинности взаимодействия ГКГС-I – пептид (Dearlove et al., 2020; Jaeger et al., 2022; Mahapatra et al., 2020; Sekine et al., 2020).

Было проанализировано влияние двух пороговых значений для %ранг (0,5% и 2,0%) на спектр высокоаффинных пептидов по прогнозу программы netMHCpan. При сравнении пороговых значений (%ранг 0,5% и 2,0% против 50 нМоль) был использован индекс Ранда. Индекс Ранда имеет значение 1 при полной согласованности результатов двух различных пороговых значений и равен 0, если результаты полностью разнятся. Для пары пороговых значений %ранг 0,5% и 50 нМоль для различных аллелей индекс Ранда находился в интервале от 0,97 до 0. В свою очередь, для пары %ранг 2% и 50 нМоль – от 0,62 до 0. Значение индекса Ранда, равное нулю, было отмечено только для аллеля HLA-C*04:01. Это обусловлено тем, что аффинности взаимодействия вирусных пептидов с ней по данным netMHCpan находятся за пределом использованного нами порога в 50 нМоль (в диапазоне от 140 до 5776 нМоль, медиана 3696 нМоль).

Также было проведено сравнение согласованности результатов прогноза высокоаффинных пептидов с помощью NetMHCpan и MHCFlurry для %ранг 0,5% и 2%. Для %ранг 0,5% индекс Ранда составил от 0,68 до 0,33, а для %ранг 2% – от 0,89 до 0,4. В частности, для HLA-A*02:01 индекс Ранда был равен 0,89, а для HLA-A*01:01 – 0,67. Корреляционный анализ оценок аффинности взаимодействия ГКГС-I – пептид для аллелей HLA-A*01:01, HLA-A*02:01, HLA-A*03:01, HLA-A*24:02, HLA-B*07:02, HLA-B*08:01, HLA-B*18:01, HLA-C*04:01, HLA-C*06:02, HLA-C*07:01, HLA-C*07:02, HLA-C*12:03 продемонстрировал значимую согласованность между программами NetMHCpan и MHCFlurry (рис. 3).

Необходимо отметить, что применение любого порога %ранг приводит к тому, что из анализа исчезает возможность оценить преобладание высокоаффинных пептидов из определенного белка SARS-CoV-2. В клетке пептиды вируса конкурируют с эндогенными пептидами, и если их аффинность взаимодействия даже для %ранг 0,5% будет низкой (например, для HLA-C*04:01 140 нМоль), то вероятность их попадания в молекулу ГКГС-I невелика.

Учитывая вышеперечисленное, для предсказания иммуногенных эпитопов была использована рекомендованная разработчиками базы данных Immune Epitope Database (IEDB) программа NetMHCpan 4.1 и критерий иммуногенности IC50 менее или равно 50 нМоль.

При выборе способа прогноза аффинностей мы также руководствовались результатами сравнения NetMHCpan 4.1 и MHCflurry из работы Reynisson et

al. (Reynisson et al., 2020), продемонстрировавшего более высокую точность прогноза NetMHCpan-4.1 по сравнению с MHCFlurry для наиболее частых в анализируемой популяции аллелей (HLA-A*01:01, HLA-A*02:01).

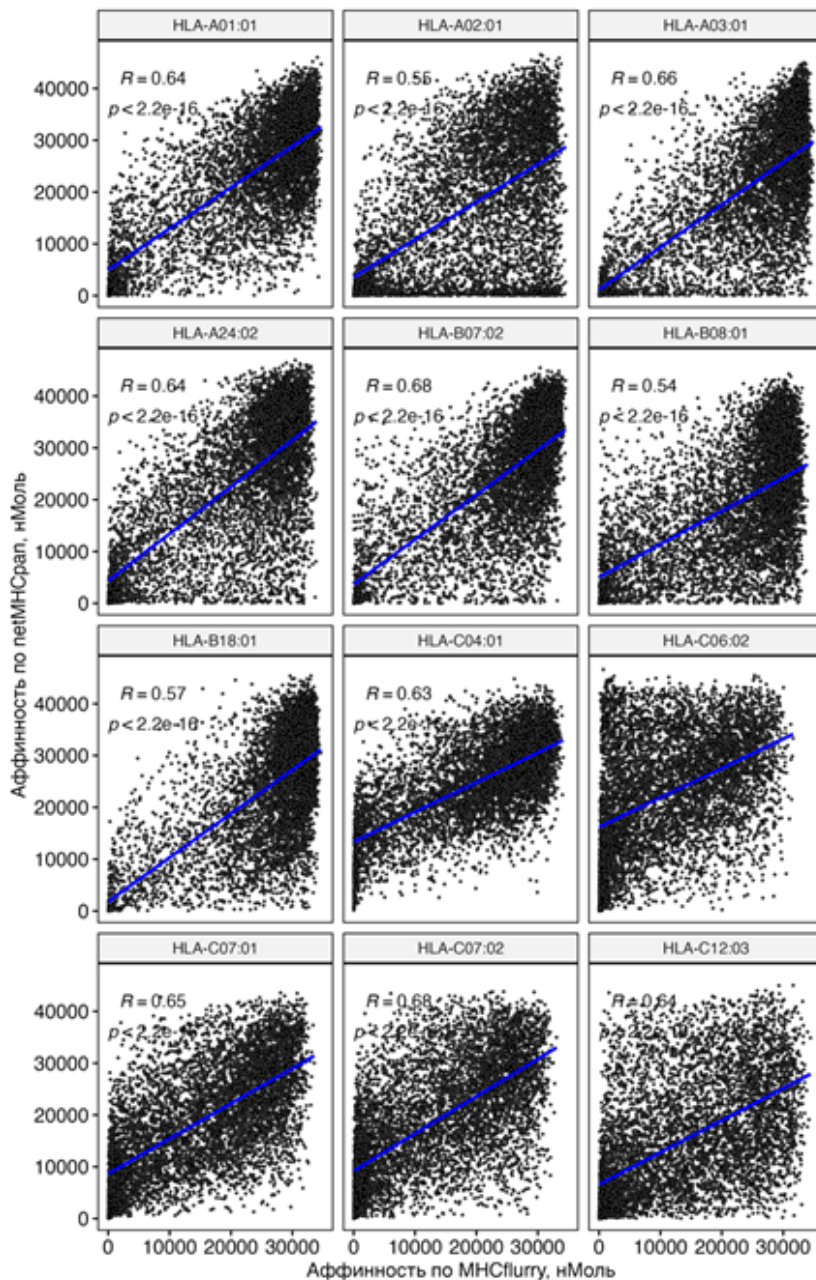


Рис. 3. Согласованность оценок аффинности взаимодействия молекула ГКГС-I

РОЛЬ МИКРОРНК В РЕГУЛЯЦИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСА И МАКРООРГАНИЗМА

МУТАЦИИ SARS-COV-2 ПРИВОДЯТ К СНИЖЕНИЮ ЧИСЛА РЕГИОНОВ СВЯЗЫВАНИЯ С МИКРОРНК ТКАНИ ЛЁГКИХ

За более чем два года пандемии вирус SARS-CoV-2 значительно мутировал, причем далеко не все его мутации привели к изменению последовательности вирусных белков в силу вырожденности генетического кода (Nersisyan et al., 2022). Не исключено, что данные мутации могли закрепляться в геноме вируса под влиянием микроРНК альвеоцитов. Мы проверили гипотезу об эволюционном давлении микроРНК, характерных для ткани лёгких человека, на геном вируса SARS-CoV-2.

Среди более чем 129 миллионов последовательностей SARS-CoV-2 были отобраны 273, отражающие ключевые штаммы и их варианты, циркулировавшие в Москве и московском регионе с начала пандемии и до сентября 2022 года (рис. 4).

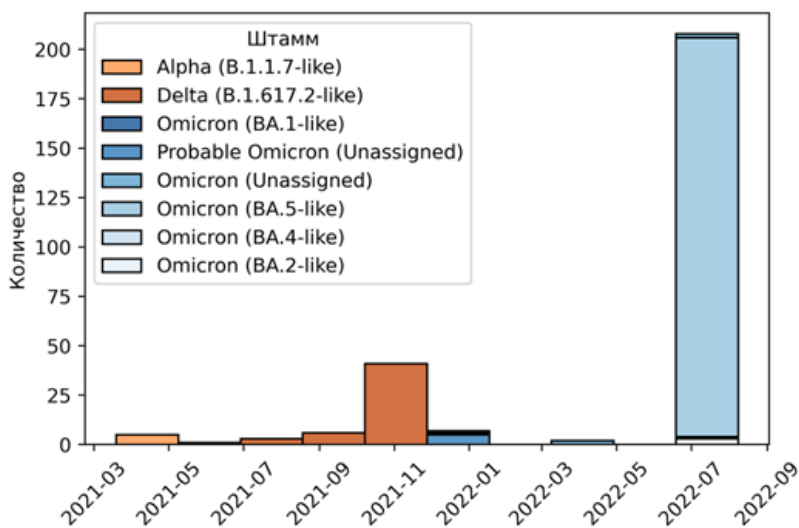


Рис. 4. Варианты вируса SARS-CoV-2, включенные в анализ

Отобранные варианты SARS-CoV-2 были разделены на две группы хронологически:

- группа «Ранние штаммы» включала в себя штаммы «Альфа» (5 вариантов) и «Дельта» (52 варианта), циркулировавшие в московском регионе с начала эпидемии до января 2022 года;

- группа «Штаммы Омикрон» включала 216 вариантов штамма «Омикрон».

Оказалось, что полученные группы имеют схожее качество прочтения РНК: гипотеза доминирования для распределений долей нераспознанных нуклеотидов между двумя группами отклонена (критерий Манна-Уитни, $p = 0,5$).

Анализ результатов секвенирования образцов ткани лёгких позволил выявить более чем 300 видов микроРНК. В то же время, всего на 32 из них пришлось более 95% всех молекул микроРНК в этой ткани. Список высокопредставленных микроРНК и их доля от всех молекул микроРНК в ткани лёгких приведён на рис. 5. Для высокопредставленных микроРНК были определены регионы вирусной РНК, обратнo-комплиментарные их seed-региону.

Для проверки гипотезы об эволюционном давлении микроРНК, характерных для ткани лёгких человека, на геном вируса SARS-CoV-2, было оценено изменение числа регионов связывания между группами сравнения. Усреднили количество регионов связывания каждого варианта SARS-CoV-2 с высокоэкспрессированными микроРНК с учётом их представленности в ткани лёгких (рис. 6). Для того чтобы исключить влияние длины вирусной РНК, полученное взвешенное среднее было нормировано на длину РНК и приведено к длине штамма «Wuhan-Hu-1» (30331 нуклеотид). В группе «Ранние штаммы» взвешенное среднее статистически значимо меньше по сравнению с группой «Штаммы Омикрон» (критерий Манна-Уитни, $p = 0,0002$). Таким образом, более поздние мутации в РНК SARS-CoV-2 приводят к возможной потере регуляторной активности микроРНК.

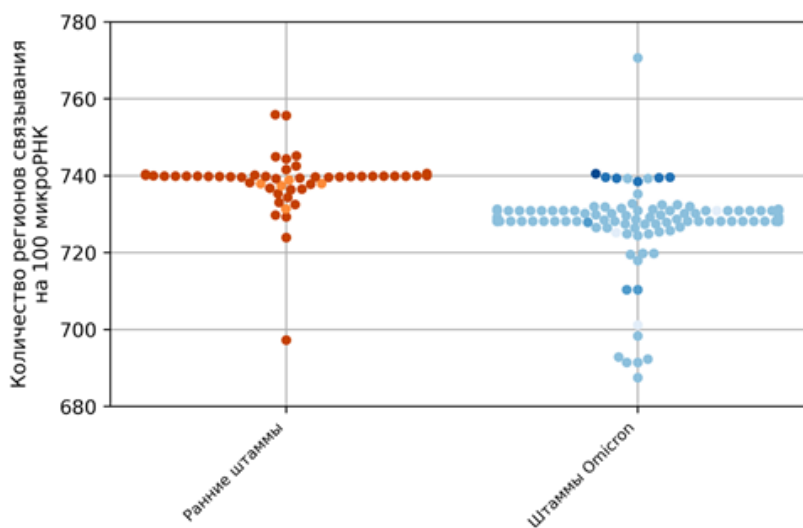


Рис. 5. Взвешенное среднее (по микроРНК с учетом их экспрессии) количества регионов связывания по группам «Ранние штаммы» и «Штаммы Омикрон», приходящихся на 30331 нуклеотид (длина штамма «Wuhan-Hu-1»)

Анализ вклада отдельных микроРНК в данное снижение (рис. 6) показал, что оно, прежде всего, связано с hsa-miR-21-5p, hsa-miR-30a/e-3p, hsa-miR-451a. Необходимо отметить, что в группе «Штаммы Омикрон» возросло влияние hsa-miR-24-3p.

Более детальный анализ значимых изменений регуляторного вклада микроРНК по каждому из кодирующих регионов представлен в табл. 4. В 5'- и 3'-нетранслируемых областях вируса практически полностью отсутствуют места связывания с микроРНК ткани лёгких. При этом можно выделить четыре белок-кодирующие области вируса, на которые приходится подавляющее число мест связывания с микроРНК: NSP3, NSP4, NSP12 и NSP14. Все они принадлежат к ORF1ab.

Табл. 4. Значимые отличия количества регионов связывания в геноме SARS-CoV-2 с микроРНК ткани лёгких

Кодируемый белок	Длина нуклеотидов	Число регионов связывания на 100 молекул микроРНК		
		Ранние штаммы	Штаммы Омикрон	FDR
NSP15	1038	33,72	31,14	0,00001
NS8	366	13,79	14,07	0,00001
NSP6	870	18,60	11,38	0,00001
N	1260	19,54	19,60	0,00001
NSP2	1914	19,15	18,52	0,00001
NSP13	1803	40,21	38,63	0,00001
NSP3	5835	106,36	106,58	0,0037
NSP5	918	32,73	32,70	0,0198
Весь геном вируса	30331	723,88	711,80	0,00001

FDR – значимость различий после поправки на множественность сравнений

Ген ORF1ab кодирует ряд неструктурных белков, ответственных за дальнейшую экспрессию структурных и вспомогательных белков, а также репликацию вируса (Badua et al., 2021). Его трансляция осуществляется вирусом в первую очередь. В результате синтезируется полипептид, который после аутопротеолиза разрезается на 16 отдельных белков (NSP1 – NSP16) (Hartenian et al., 2020). Аутопротеолитическая активность обусловлена наличием папаин-подобных протеолитических доменов в мультидоменном белке NSP3 (Hartenian et al., 2020), на который, по нашим данным, приходится наибольшее число регионов связывания с микроРНК клетки-хозяина. Возможно, это обусловлено эволюционным приспособлением вируса к микроРНК-окружению и использованию его для эпигенетической регуляции своего генома. Более того, в области кодирующей NSP15, NS8, и NSP6 значимо снижается количество регионов связывания с микроРНК в «Штаммах Омикрон» ($p < 0,01$). Ранее было показа-

но, что снижение числа таких регионов приводит к снижению вирулентности вируса восточного конского энцефалита (EEEV) (Trobough et al., 2014b). Более того, белок NS8 (ORF8) способен подавлять созревание молекул главного комплекса гистосовместимости класса I и их транслокацию на поверхность зараженной клетки (Matsuoka et al., 2022; Y. Zhang et al., 2021).

Можно заключить, что вирус SARS-CoV-2 практически не имеет регионов связывания в 5p- и 3p-нетранслируемых областях с микроРНК характерными для ткани лёгких. Тем не менее, вирус обладает значительным числом мест связывания с микроРНК в регионе NSP3-NSP5, ответственном за аутопротеолиз вирусных полипептидов и формирование вирионов. В вариантах штамма Омикрон произошло значимое снижение мест связывания с микроРНК клеток-хозяина, что могло способствовать снижению патогенности данного штамма.

ВЛИЯНИЕ МИКРОРНК КИШЕЧНИКА НА ЭВОЛЮЦИЮ SARS-COV-2

Долгое время считалось, что у позвоночных РНК-интерференция действует как противовирусный механизм преимущественно в недифференцированных эмбриональных стволовых клетках и реализуется через микроРНК (Y. Li et al., 2013). Недавние данные указывают на то, что микроРНК зрелых клеток хозяина также связываются с геномами (+)РНК-вирусов, регулируя их трансляцию и репликацию и изменяя патогенез вирусных инфекций (J. Huang et al., 2007; Ingle et al., 2015; Yekta et al., 2004).

В частности, продемонстрирована возможность влияния на вирус SARS-CoV малых интерферирующих РНК (B. Li et al., 2005; Y. Wang et al., 2010). Выделяют два основных эффекта взаимодействия вирусного РНК-генома и микроРНК клетки-хозяина: ингибирование трансляции вируса и замедление его репликации и стабилизация вирусной РНК и увеличение скорости репликации вируса. При этом замедление репликации вируса связывают, прежде всего, с взаимодействием микроРНК с 3'-нетранслируемой областью вируса (Trobough et al., 2014b), а стабилизацию вирусной РНК – с взаимодействием с 5'-нетранслируемой областью вируса (Shimakami et al., 2012). Более того, (+)РНК вирусы способны эволюционировать под влиянием микроРНК клеток-хозяина (Scheel et al., 2016b).

Опубликован ряд работ, посвященных предсказанию взаимодействия одноцепочечного (+)РНК-вируса SARS-CoV-2 с микроРНК человека (Khan et al., 2020b; Lukiw, 2021; Nersisyan, Engibaryan, et al., 2020; Saçar Demirci & Adan, 2020). Однако в данных исследованиях не учитывалась способность вируса SARS-CoV-2 мутировать и, соответственно, менять последовательность регионов связывания с seed-регионами микроРНК человека. Предпринимались попытки проанализировать влияние мутаций на взаимодействие вируса с микроРНК, однако эти исследования были проведены на ограниченном числе вариантов вируса (VOC) и не для всех регионов генома вируса (Capistrano et al., 2023).

Вирус SARS-CoV-2 преимущественно размножается в альвеоцитах второго типа ткани лёгких. В то же время, значительный объем клинических данных свидетельствует о присутствии вируса и в эпителии кишечника, экспрессиру-

ющем ACE2 и TMPRSS2 (J. Zhou et al., 2022). Кроме того, сохранение вируса в эпителии кишечника рассматривается в качестве одной из причин сохранения низкоинтенсивного воспаления и длительных осложнений после COVID-19 (long COVID-19) (Zollner et al., 2022). Тканевая специфичность SARS-CoV-2 сужает спектр микроРНК, которые могут с ним взаимодействовать с 1500-2000 до 100 (превалирующих в клетках-хозяевах).

В инфицированной SARS-CoV-2 клетке уже через 36 часов насчитывается от 1500 до 15000 копий вируса (Suzuki et al., 2022). При этом в клетке содержится от 100000 до 200000 молекул микроРНК (Bissels et al., 2009). Необходимо учитывать, что каждая микроРНК, помимо регионов связывания с мРНК вируса, имеет от 25 до 50 регионов связывания в генах-мишенях, каждый из которых экспрессирован в количестве от 50 до 100 транскриптов на клетку (более 1250 молекул-мишеней) (Baek et al., 2008; Selbach et al., 2008). По оптимистичным оценкам, микроРНК сможет связаться с вирусной РНК с вероятностью 1/2 (Brown & Naldini, 2009).

За более чем два года пандемии вирус SARS-CoV-2 значительно мутировал, причем далеко не все его мутации привели к изменению последовательности вирусных белков (Nersisyan et al., 2022). Не исключено, что данные мутации могли закрепляться в геноме вируса под влиянием микроРНК альвеоцитов и эпителии кишечника. В рамках исследования Жиянова и соавторов (Zhiyanov et al., 2023) была проверена гипотеза о различии в эволюционном давлении микроРНК, характерных для ткани лёгких и кишечника человека, на геном вируса SARS-CoV-2 (рис. 8).

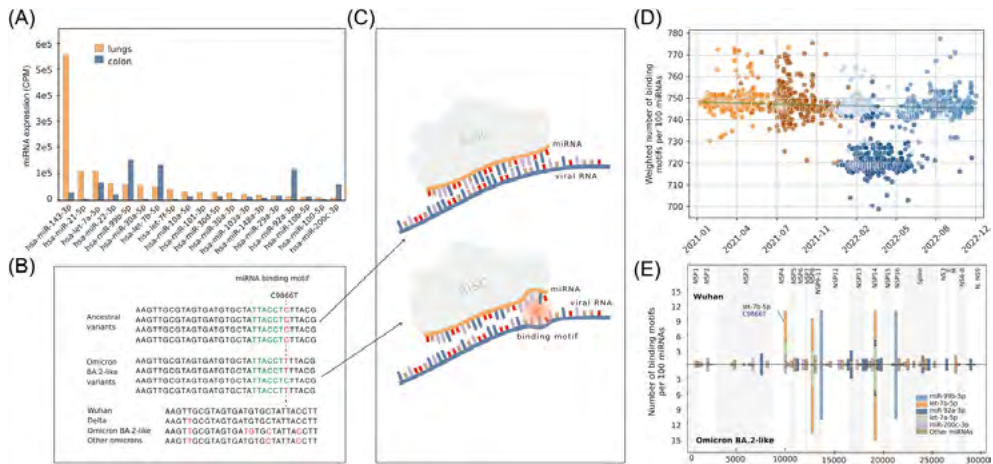


Рис. 8. Изменения в геноме SARS-CoV-2 отражают избирательное эволюционное давление на него микроРНК кишечника человека (Zhiyanov et al., 2023). (A) Репертуар микроРНК ткани легких и кишечника. (B, C) Мутации вирусной РНК приводят к потере регионов связывания с seed-областью микроРНК (мотив связывания). (D) Количество мотивов связывания, взвешенных по репертуару микроРНК, со временем уменьшается. (E) Резкое снижение количества сайтов связывания микроРНК в вариантах Omicron (BA.2-подобных) обусловлено мутациями в кодирующей области NSP4.

В этом исследовании были применены ограничения как по тканеспецифичности микроРНК, так и по их экспрессии для облегчения идентификации наиболее заметных взаимодействий между микроРНК хозяина и вирусным геномом. Во-первых, объем исследования был ограничен тканями легких и толстой кишки, как двух основных мест репликации SARS-CoV-2 в организме человека (Capistrano et al., 2023). Во-вторых, анализировались только те виды микроРНК, которые входят в верхние 95% микроРНКома для их типа ткани (Brown & Naldini, 2009).

В 95% высокопредставленных микроРНКома вошли 32 микроРНК ткани легких и 40 – для кишечника (рис. 9), которые соответствовали вышеупомянутым критериям. Двадцать одна из этих микроРНК была обнаружена в обеих тканях, а 19 экспрессировались либо в одной, либо в другой. В ткани легких специфичные микроРНК составляют 81% всех микроРНК, тогда как в толстой кишке только 56% экспрессируемых микроРНК были специфичными. В легких наиболее распространенной была miR-143-3p, за ней следовали miR-21-5p, miR-22-3p и miR-30a-5p. В толстой кишке в профиле экспрессии микроРНК преобладали let-7b-5p, miR-92a-3p и miR-200c-3p.

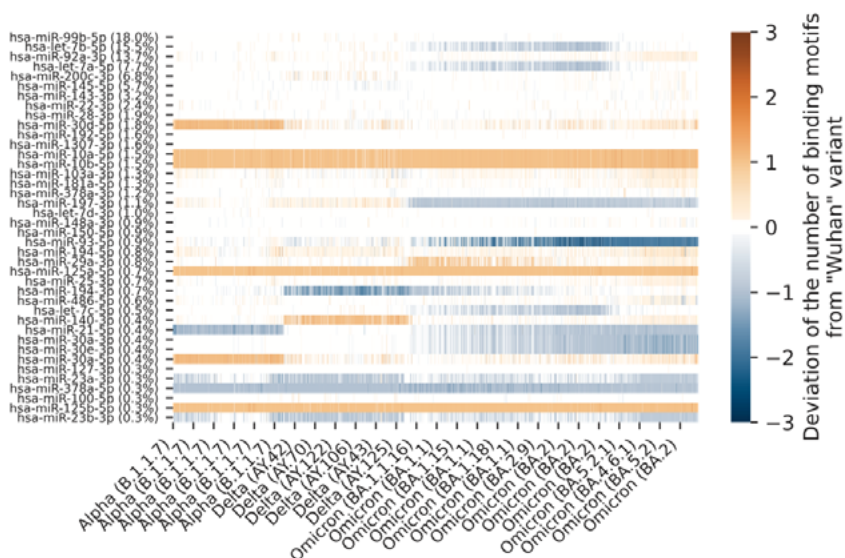


Рис. 9. Количество мотивов связывания в анализируемых вариантах вируса SARS-CoV-2 (Zhiyanov et al., 2023). МикроРНК отсортированы по уровням их экспрессии в кишечнике. Доля микроРНКома, представленные конкретными микроРНК, указаны рядом с идентификаторами микроРНК.

Из базы данных GISAD было получено в общей сложности 3755 последовательностей генома SARS-CoV-2. Последовательности были разделены на следующие группы:

– «Ранние варианты», в которые вошли «Альфа» (B.1.1.7, 759 вариантов), «Бета» (B.1.351, 4 варианта), «Дельта» (B.1.617.2, 841 вариант; AY.4.2, 12 вариантов), а также 7 других штаммов. Все эти последовательности были собраны в январе 2022 года или ранее.

– «Варианты Омикрон», в состав которого вошли восемь разновидностей штамма «Омикрон». Все они были собраны в декабре 2021 года или позже.

Кроме того, приведенный выше набор данных был расширен за счет добавления 1914 последовательностей SARS-CoV-2, полученных в Лондоне (Великобритания), которые также были разделены на «Ранние варианты» и «Варианты Омикрон» (табл. 5).

Табл. 5. Проанализированные последовательности SARS-CoV-2, выделенные в Берлине (ФРГ) и Лондоне (Великобритания) в период с 01.01.2020 по 20.12.2022.

Вариант	Берлин (ФРГ)		Лондон (Великобритания)	
	Последовательностей	Отобрано	Последовательностей	Отобрано
A.23.1-like	0	0	3	1
AV.1-like	0	0	1	0
Alpha (B.1.1.7-like)	3791	759	6738	854
B.1.1.318-like	10	0	4	1
B.1.1.7-like+E484K	87	17	18	1
B.1.617.1-like	16	2	2	0
Beta (B.1.351-like)	102	4	29	0
Delta (AY.4-like)	736	49	4773	552
Delta (AY.4.2-like)	73	12	579	161
Delta (B.1.617.2-like)	8625	841	2447	216
Delta (B.1.617.2-like)+K417N	7	2	6	0
Eta (B.1.525-like)	155	2	7	0
Gamma (P.1-like)	24	1	6	0
Iota (B.1.526-like)	0	0	2	0
Lambda (C.37-like)	8	2	0	0
Mu (B.1.621-like)	3	0	2	0
Omicron (BA.1-like)	2251	539	3377	23
Omicron (BA.2-like)	5736	887	617	31
Omicron (BA.4-like)	204	28	34	8
Omicron (BA.5-like)	4285	591	378	65
Omicron (Unassigned)	767	9	30	0
Omicron (XE-like)	0	0	4	1
Probable Omicron (BA.1-like)	86	2	34	0
Probable Omicron (BA.2-like)	19	3	0	0
Probable Omicron (BA.4-like)	1	0	0	0

Вариант	Берлин (ФРГ)		Лондон (Великобритания)	
	Последовательностей	Отобрано	Последовательностей	Отобрано
Probable Omicron (BA.5-like)	13	5	0	0
Probable Omicron (Unassigned)	32	0	3	0
Zeta (P.2-like)	0	0	1	0
Итого	27031	3755	19095	1914

Для оценки эволюционного давления, оказываемого микроРНК, специфичными для толстой кишки и лёгких, были проанализированы нормированные по экспрессии количества мотивов связывания в пределах 29 903 нуклеотидов вирусной РНК SARS-CoV-2. Влияние каждой микроРНК учитывалось отдельно.

По сравнению с «Ранними вариантами», «варианты Омикрон», обнаруженные в образцах из Берлина, содержат поразительно меньшее количество сайтов связывания для микроРНК толстой кишки (U-критерий Манна-Уитни, $p \leq 4,44 \times 10^{-254}$, рис. 10А), и для микроРНК ткани лёгких (Манн-Уитни U-критерий Уитни, $p \leq 1,07 \times 10^{-146}$). Подобные тенденции также наблюдались в наборе последовательностей, собранных в Лондоне, для микроРНК толстой кишки (U-критерий Манна-Уитни, $p \leq 7,21 \times 10^{-47}$) или микроРНК легких (U-критерий Манна-Уитни, $p \leq 8,69 \times 10^{-20}$).

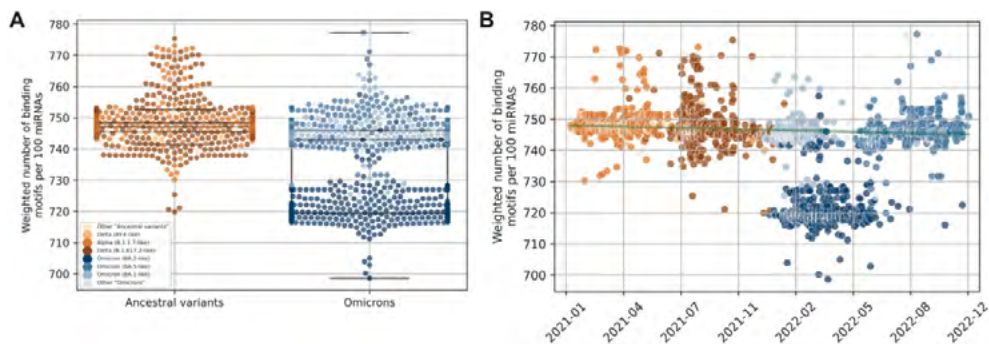


Рис. 10. Взвешенное количество (по экспрессии микроРНК в ткани толстой кишки) мотивов связывания на 100 микроРНК и 29 903 нуклеотидов (Zhiyanov et al., 2023). (А) Сравнение «Ранних вариантов» и «Вариантов Омикрон». (В) Распределены по времени. Корреляция Спирмена между взвешенным числом и количеством дней с начала пандемий составляет $\leq -0,34$ ($p \leq 7,37 \times 10^{-80}$). В анализе были исключены варианты Омикрон (BA.2-подобные).

Путем перетасовки списка микроРНК с предопределенным репертуаром экспрессии, специфичным для высокоэкспрессируемых микроРНК, рассчитывали долю случайных перетасовок, для которых падение числа мотивов связывания было больше, чем падение, обнаруженное для высокоэкспрессируемых микроРНК. Эта доля оказалась ниже 5% для микроРНК толстой кишки

($p \leq 2,50 \times 10^{-2}$, $4,40 \times 10^{-2}$), но не для микроРНК легких ($p \geq 7,79 \times 10^{-2}$, $10,28 \times 10^{-2}$). Значимость влияния микроРНК проверялась для других тканей, включая простату, молочную железу, мочевого пузыря и печень. Уменьшение количества наблюдаемых мотивов не было значимым ни для одной из этих тканей (табл. 6).

Табл. 6. Результаты процедуры отбора проб Монте-Карло для профилей микроРНК нормальных образцов различных тканей (TCGA)

Ткань	Берлин (ФРГ)		Лондон (Великобритания)	
	<i>p</i>	<i>p</i> (с попр.)	<i>p</i>	<i>p</i> (с попр.)
Молочная железы (TCGA-BRCA)	0.070	0.280	0.116	0.464
Предстательная железа (TCGA-PRAD)	0.117	0.234	0.182	0.364
Мочевого пузыря (TCGA-BLCA)	0.166	0.221	0.218	0.291
Печень (TCGA-LIHC)	0.189	0.189	0.223	0.223

Дальнейшее изучение причин падения числа мотивов связывания для микроРНК толстой кишки показало, что оно в основном связано с формированием варианта Omicron (рис.10А). Однако даже после исключения вариантов Omicron (BA.2-подобного) из группы «Омикрон» указанная тенденция сохранила значимость (U-критерий Манна-Уитни, $p \leq 2,57 \times 10^{-69}$). Более того, взвешенное количество мотивов, связывающих микроРНК, неуклонно уменьшалось пропорционально времени развития пандемии (корреляция Спирмена $\leq -0,34$, $p \leq 7,37 \times 10^{-80}$, рис. 10В), что указывает на непрерывную эволюцию генома SARS-CoV-2 внутри эпителия кишечника.

Была оценена разница между количеством мотивов связывания в варианте «Wuhan» и последующими вариантами вируса (рис. 9). Оказалось, что потеря сайтов связывания в первую очередь приводила к снижению числа мотивов связывания с hsa-let-7b-5p, hsa-let7a-5p и hsa-miR-93-5p. Примечательно, что для hsa-miR-194-5p и hsa-miR-29a-3p количество сайтов связывания в «Вариантах Омикрон» увеличилось.

Попарное выравнивание РНК SARS-CoV-2 с эталонным вариантом «Wuhan» позволило сравнить распределение мотивов связывания микроРНК внутри каждого варианта вируса. Было рассчитано распределение мотивов связывания для отдельных микроРНК. Было обнаружено, что вклад каждой микроРНК в эти распределения пропорционален ее экспрессии в тканях толстой кишки. Распределения были усреднены по «Ранним вариантам» и различным вариантам Omicron, включая или исключая BA.2-подобные варианты Omicron.

Как видно из рис. 11, уменьшение количества мотивов связывания, наблюдаемое в BA.2-подобных вариантах Omicron, было главным образом связано с потерей мотивов связывания hsa-let7b-5p, расположенных внутри NSP4.

Действительно, мутация С9866Т встречалась в основном в последовательностях, подобных Omicron BA.2 (872 из 887 вариантов), тогда как 9866-е положение во всех последовательностях «Ранних вариантов» сохраняло цитозин. Последующий анализ показал, что различия в числе мотивов связывания объясняются 13 мутациями вирусной РНК (рис. 12). Две из них не привели к изменению аминокислотной последовательности, тогда как другие мутации затронули кодируемый белок (табл. 7).

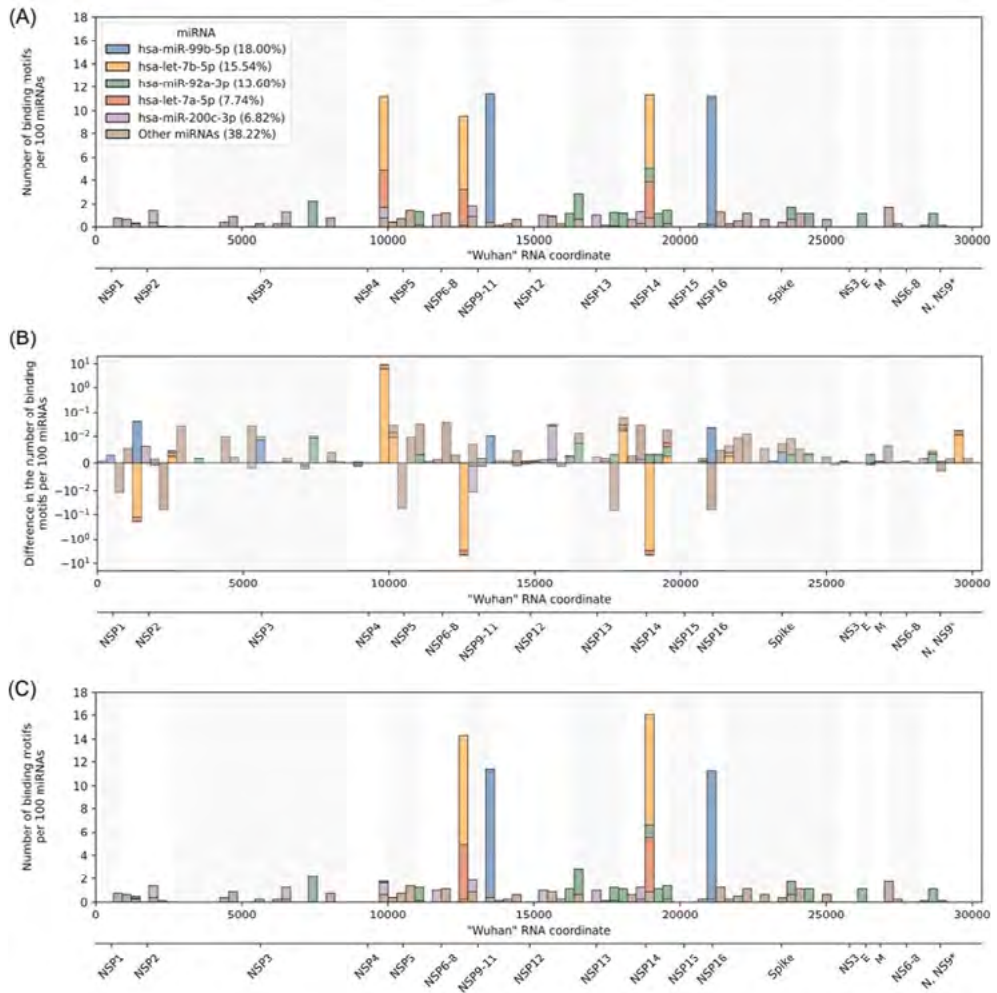


Рис.11. Распределение мотивов связывания микроРНК на выровненных последовательностях РНК «Wuhan» и усредненное по (А) «предковым вариантам», (В) разнице между «предковыми вариантами» и вариантами Omicron (BA.2-подобными) и (С) Варианты Омикрона (BA.2-подобные) (Zhiyanov et al., 2023).

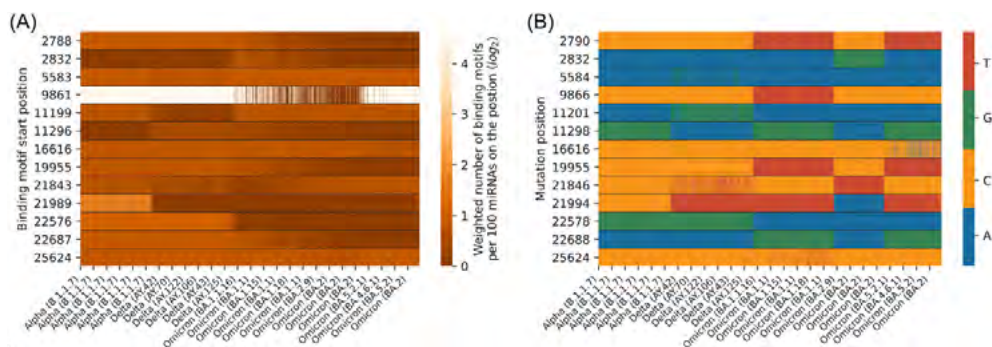


Рис.12. Положения (А) наиболее различных мотивов связывания и (В) соответствующих мутаций в SARS-CoV-2 (Zhiyanov et al., 2023).

Табл.7. Наиболее значимые мутации, приводящие к модификации мотива связывания.

Позиция	Регион	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена
2790	NSP3	aCt/aTt	T/I
2832	NSP3	aAg/aGg	K/R
5584	NSP3	acG/acA	T
9866	NSP4	Ctt/Ttt	L/F
11201	NSP6	Gct/Act	A/T
11298	NSP6	aAg/aGg	K/R
16616	NSP13	aCt/aAt	T/N
19955	NSP15	aCt/aTt	T/I
21846	Spike	aTt/aCt	I/T
21994	Spike	taC/taT	Y
22578	Spike	gGt/gAt	G/D
22688	Spike	Act/Gct	T/A
25624	NS3	Tac/Cac	Y/H

Примечательно, что сравнение «Ранних вариантов» и «Вариантов омикрон» показало, что общее уменьшение количества сайтов, связывающих микроРНК, не было вызвано какой-либо специфической мутацией в пределах конкретного мотива, связывающего микроРНК. Напротив, с течением времени наблюдалось постепенное уменьшение количества связующих мотивов (рис. 10В).

Для оценки вклада отдельных кодирующих областей вирусной РНК в наблюдаемое снижение числа мотивов связывания количество микроРНК-связывающих мотивов, взвешенных по экспрессии микроРНК на кодирующую область, было рассчитано для «Ранних вариантов» и для «Вариантов Омикрон». При сравнении «Ранних вариантов» с «Вариантами Омикрон» с использованием U-критерия Манна-Уитни оказалось, что области, кодирующие Spike-белок и NSP15, были изменены больше всего. Кроме того, последовательности, классифицированные

как Omicron (BA.2-подобные), характеризовались дополнительной областью с накопленными изменениями, кодирующую NSP4, тогда как в других «омикронах» третьим наиболее отличающимся местоположением была область NSP15.

В этом исследовании была проверена гипотеза о том, что микроРНК клеток-хозяев могли повлиять на эволюцию SARS-CoV-2. Были рассмотрены два набора микроРНК, экспрессирующихся в основных местах размножения вируса – легких и кишечнике. Было обнаружено, что наборы существенно различались по представленности отдельных микроРНК. С одной стороны, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-22-3p и hsa-miR-30a-5p были специфичны для легких, с большим преобладанием экспрессии miR-143p (41,5%). С другой стороны, кишечник характеризовался более однородным профилем микроРНК с присутствием тканеспецифичных let-7b-5p, miR-92a-3p и miR-200c-3p.

Во время пандемий геномы SARS-CoV-2 утратили многие сайты связывания микроРНК, специфичные для экспрессируемых микроРНК в тканях легких и кишечника. Важно отметить, что моделирование методом Монте-Карло показало, что наблюдаемые изменения были значимыми только для набора микроРНК, экспрессируемых в ткани кишечника ($p \leq 2,50 \times 10^{-2}$). Коронавирусы обычно воспринимаются как острые респираторные инфекции, и размножение вируса в легких создает резервуар, способствующий распространению вируса воздушно-капельным путем. Помимо легких, SARS-CoV-2 способен к репликации во многих других органах и тканях (Van Cleemput et al., 2021), основной из которых является кишечник, где вирус может находиться до 3 месяцев (Cha et al., 2020). Длительный период кишечной репликации обеспечивает эволюционным силам достаточно времени, чтобы воздействовать на популяцию вирусов в пределах одного хозяина, причем факторы хозяина служат движущими силами для такой эволюции. Возможно, связывание микроРНК хозяина представляет собой такую силу. Образующиеся в результате этого вирусные популяции могут быть возвращены в циркулирующий пул вирусов либо фекально-оральным путем (Akiyama et al., 2022), либо во время вторичной вирусемии у хозяев с ослабленным иммунитетом, что может способствовать повторному заражению легких изнутри (Schwartz et al., 2023) и последующему воздушно-капельному распространению.

Было показано, что исходная версия варианта Омикрон имела большое сходство с вариантами вируса SARS-CoV-2, обнаруженными у грызунов, в частности, у мышей (Wei et al., 2021). Таким образом, была выдвинута гипотеза, что один из предковых вариантов SARS-CoV-2 примерно с середины 2020 года попал в популяцию грызунов и эволюционировал среди этих животных в течение довольно долгого времени, пока вновь не появился у людей (Mallapaty, 2022). Альтернативная теория предполагает долгосрочную эволюцию вируса у пациента с ослабленным иммунитетом, преимущественно в кишечнике (B. Choi et al., 2020).

Наблюдение, описанное в этом исследовании, подчеркивает важность кишечника в патогенезе COVID-19. Хотя пневмония и респираторные осложнения являются основными симптомами COVID-19, существуют также внелегочные проявления инфекции COVID-19, которые включают в себя диарею, а также тош-

ноту, рвоту, анорексию, боли в животе и изжогу. Эти осложнения наблюдаются у 10-20% пациентов с COVID-19 (Silva et al., 2020), что не исключает возможности бессимптомных желудочно-кишечных инфекций при SARS-CoV-2. Более того, латентная персистенция SARS-CoV-2 в кишечнике может быть одной из причин длительного сохранения последствий COVID-19 у ряда пациентов.

Резкое снижение количества сайтов связывания микроРНК было особенно выражено в вариантах SARS-CoV-2, подобных ВА.2. В значительной степени это снижение было вызвано мутациями в области, кодирующей белок NSP4, который способствует образованию двухмембранных везикул, служащих каркасом для комплексов репликации/транскрипции вируса (Gordon et al., 2020a). Кроме того, присоединение к NSP4 защищает вирусную РНК от внутриклеточного иммунитета.

Наряду с существенными изменениями в S-белке, вызванные микроРНК изменения NSP4, которые были приобретены в ходе длительной репликации в кишечнике, возможно, способствовали нынешнему глобальному доминированию вариантов линии ВА.2. Наши результаты подчеркивают возможность того, что ткань кишечника может существенно влиять на эволюцию генома SARS-CoV-2.

ВЛИЯНИЕ МИКРОРНК НА ЭКСПРЕССИЮ РЕЦЕПТОРА ACE2

Молекулярный механизм проникновения SARS-CoV-2 в клетки человека еще не до конца изучен и остается предметом активных исследований. Очевидно, что ключевыми игроками при проникновении вируса в клетку-хозяина являются ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) и трансмембранная сериновая протеаза 2 (TMPRSS2). В частности, взаимодействие этих мембранных белков с вирусным шиповидным белком (S-белком) имеет решающее значение для эндоцитоза вирусной частицы (Hoffmann, Kleine-Weber, Schroeder, et al., 2020b; Lukassen et al., 2020).

Основной функцией микроРНК является негативная посттранскрипционная и трансляционная регуляция экспрессии генов (Hobert, 2008). Аберрантная экспрессия микроРНК связана с различными патологиями, включая рак (V.V. Galatenko et al., 2018; Maltseva et al., 2014; Reddy, 2015), неврологические (Nelson et al., 2008; Sheinerman & Umansky, 2013) и сердечно-сосудистые заболевания (Carè et al., 2007). Некоторые микроРНК, кодируемые клеткой-хозяином, могут моделировать не только проникновение вируса в клетку-хозяина, но и жизнедеятельность вируса внутри неё. Моделирующая активность может быть реализована путем взаимодействия с мРНК как клетки-хозяина, так и вируса (Bruscella et al., 2017; Veksler-Lublinsky et al., 2010).

МикроРНК представлены в клетке в различных изоформах (изо-микроРНК), которые отличаются друг от друга на 1-3 нуклеотида на 5'- или 3'-концах молекул (Morin et al., 2008). Важно отметить, что многочисленные исследования подтвердили важность анализа профилей экспрессии изо-микроРНК. Так, на основе профиля изо-микроРНК был построен алгоритм машинного обучения, который позволил различать тридцать два различных типа рака. Авторы продемонстрировали, что подобная классификация возможна только на основе анализа изо-микроРНК [22]. Также важно отметить, что две 5'-изо-микроРНК (т.е.

изо-микроРНК, имеющие разные 5'-концы) одной и той же микроРНК имеют разный набор мРНК-мишеней из-за различной последовательности seed-области (Magee et al., 2018; Mercey et al., 2017).

В данном подразделе мы исследовали механизмы регуляции *ACE2* и *TMPRSS2*, опосредованной изо-микроРНК, в различных органах человека. Биоинформационный анализ был проведен с использованием общедоступных парных наборов данных секвенирования микроРНК/мРНК.

Профили экспрессии *ACE2* и *TMPRSS2* в разных органах

Для изучения профиля экспрессии *ACE2* и *TMPRSS2* в тканях человека была использована общедоступная база данных The Cancer Genome Atlas (TCGA; <https://www.cancer.gov/tcga>). Данная база данных содержит информацию об экспрессии мРНК и микроРНК в опухоли и соседних участках условно здоровой ткани различных органов. В частности, были проанализированы данные 541 образца ткани (11 различных органов). Мы обнаружили, что оба фермента были высоко экспрессированы во всех проанализированных тканях (рис. 13). Так, ген *ACE2* показал наибольшую экспрессию в толстой кишке, почках, желудке и печени, в то время как в других органах его средний уровень экспрессии был на 2-5 \log_2 единиц меньше и оставался примерно на одном уровне. Экспрессия гена *TMPRSS2* была выше по сравнению с *ACE2* почти во всех анализируемых тканях (средний \log_2 (кратное изменение) = 3,18), достигая своего пика в простате.

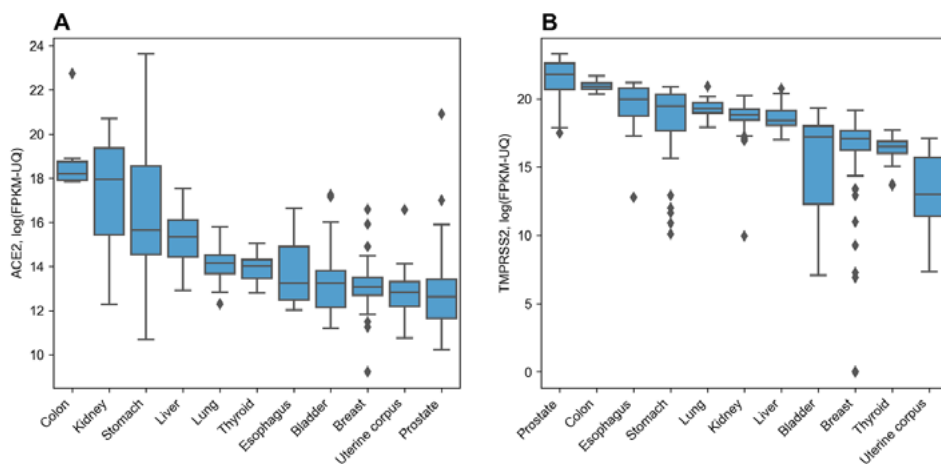


Рис. 13. Распределение экспрессии *ACE2* и *TMPRSS2* в органах человека. А – экспрессия *ACE2*, В – экспрессия *TMPRSS2* (Nersisyan, Shkurnikov, et al., 2020b)

Взаимодействия между изо-микроРНК и *ACE2/TMPRSS2*

Для выявления предполагаемых взаимодействий между изо-микроРНК и генами *ACE2/TMPRSS2* в отдельных тканях была использована двухэтапная процедура. Во-первых, программное обеспечение TargetScan было использовано для создания списка изо-микроРНК, которые потенциально могут свя-

ПАТОГЕНЕЗ COVID-19: микроРНК и главный комплекс гистосовместимости

зываются с 3'-UTR целевых мРНК. Затем был проведен корреляционный анализ для выявления изо-микроРНК, имеющих значительную отрицательную корреляцию с уровнями экспрессии генов *ACE2*/*TMPRSS2* в каждом органе. В результате было выявлено 10 и 23 изо-микроРНК, которые потенциально могут регулировать *ACE2* и *TMPRSS2* соответственно. Наибольшее количество изо-микроРНК, нацеленных на *ACE2*, было обнаружено в ткани почек (6 изо-микроРНК) и легких (3 изо-микроРНК), в то время как в случае *TMPRSS2* наибольшее количество регулирующих изо-микроРНК было экспрессировано в пищеводе (11 изо-микроРНК), желудке (8 изо-микроРНК) и молочной железе (6 изо-микроРНК) (рис. 14).

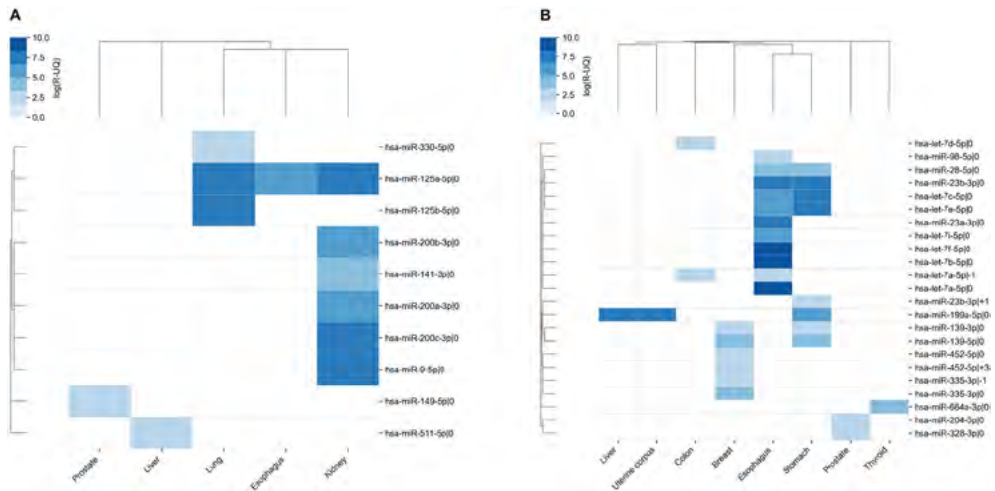


Рис. 14. Изо-микроРНК, регулирующие *ACE2* и *TMPRSS2*. А) *ACE2*, В) *TMPRSS2* (Nersisyan, Shkurnikov, et al., 2020b). Цвет каждой клетки указывает на уровень экспрессии изо-микроРНК. Ячейка пуста (белая), если экспрессия изо-микроРНК не коррелирует с соответствующим геном

Наибольшее пересечение соответствовало изо-микроРНК, регулирующим экспрессию гена *TMPRSS2* в пищеводе и желудке (4 общих изо-микроРНК). Интересно, что некоторые микроРНК (в том числе *hsa-miR-23b-3p*, *hsa-miR-335-3p* и *hsa-miR-452-5p*) экспрессировались как 5'- изо-микроРНК (+1, -1 и +3 нуклеотида соответственно), так и канонических форм. Кроме того, мы идентифицировали две микроРНК, регулирующие *ACE2*/*TMPRSS2*, которые экспрессируются более чем в двух тканях: *hsa-miR-125a-5p* (нацеленная на *ACE2* в пищеводе, почках и легких), а также *hsa-miR-199a-5p* (регулирующая экспрессию *TMPRSS2* в печени, желудке и теле матки, рис. 15).

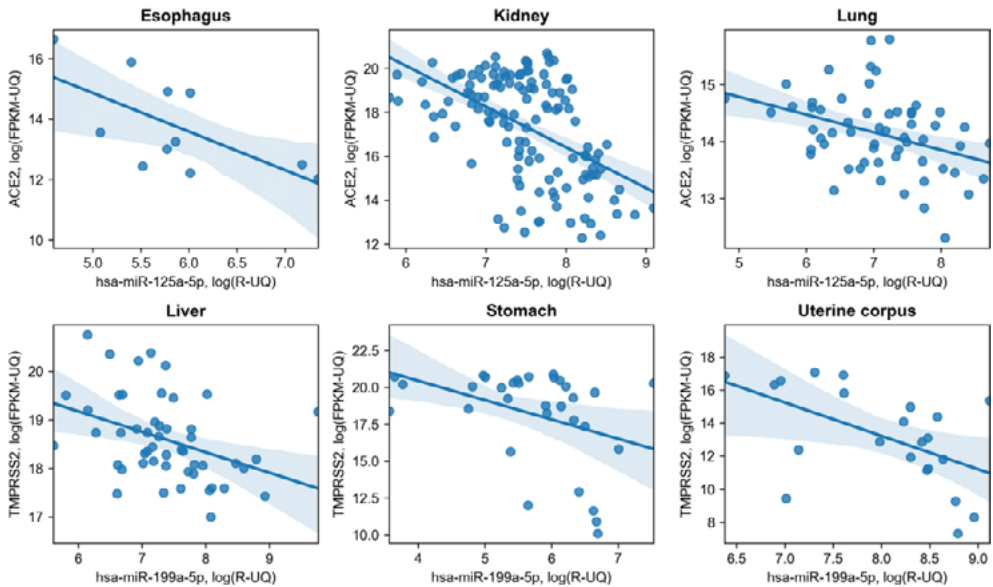


Рис. 15. Значимые корреляции hsa-miR-125a-5p/ACE2 и hsa-miR-199-5p/TMPRSS2 в разных органах (Nersisyan, Shkurnikov, et al., 2020b). Голубые области соответствуют 95% доверительному интервалу

Для дальнейшего изучения взаимодействия между различными изо-микроРНК и соответствующими мРНК мы сосредоточились на генах, несущих микроРНК в своих интронах. Всего мы обнаружили, что 14 из 33 изо-микроРНК кодируются внутри интронов в смысловой ориентации (табл. 8). Интересно, что hsa-miR-125a-5p (нацеленная на ACE2 в легких, почках и пищеводе) и hsa-let-7e-5p (нацеленная на TMPRSS2 в желудке и пищеводе) кодируются в одном и том же интроне гена SPACA6.

Табл. 8. Пре-микроРНК, закодированные в интронах в смысловой ориентации

Пре-микроРНК	Ген-хозяин
hsa-mir-335	MEST
hsa-mir-139	PDE2A
hsa-let-7e, hsa-mir-125a	SPACA6
hsa-mir-23b	AOPEP
hsa-let-7f-2, hsa-mir-98	HUWE1
hsa-mir-28	LPP
hsa-mir-9-1	Clorf6l
hsa-mir-149	GPC1
hsa-mir-204	TRPM3
hsa-mir-664a	RAB3GAP2

Лизин-специфическая деметилаза 5В регулирует ACE2 и TMPRSS2 посредством репрессии активности let-7e/miR-125a и miR-141/miR-200

Для выявления регуляторов взаимодействий между hsa-let-7e-5p/hsa-miR-125a-5p и ACE2/TMPRSS2 был проведен поиск белков, регулирующих транскрипцию данных микроРНК, с использованием литературных баз данных взаимодействий. Так, ранее было показано, что лизин-специфическая деметилаза 5В (JARID1B, кодируемая геном KDM5B) репрессирует транскрипцию микроРНК hsa-let-7e / hsa-miR-125a и семейства miR-200 (включая miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c и miR-429), способствуя деметилированию гистона H3K4me3 в регуляторных областях микроРНК, тем самым облегчая эпигенетическую репрессию их транскрипции. Последнее приводит к увеличению экспрессии генов ACE2 и TMPRSS2, поскольку hsa-miR-125a-5p вместе с микроРНК из семейства miR-200 нацелена на 3'-UTR мРНК ACE2, а hsa-let-7e-5p нацелена на 3'-UTR TMPRSS2. В результате эпигенетическая активность JARID1B может косвенно регулировать экспрессию ACE2 и TMPRSS2. Схема данных взаимодействий представлена на рис. 16.

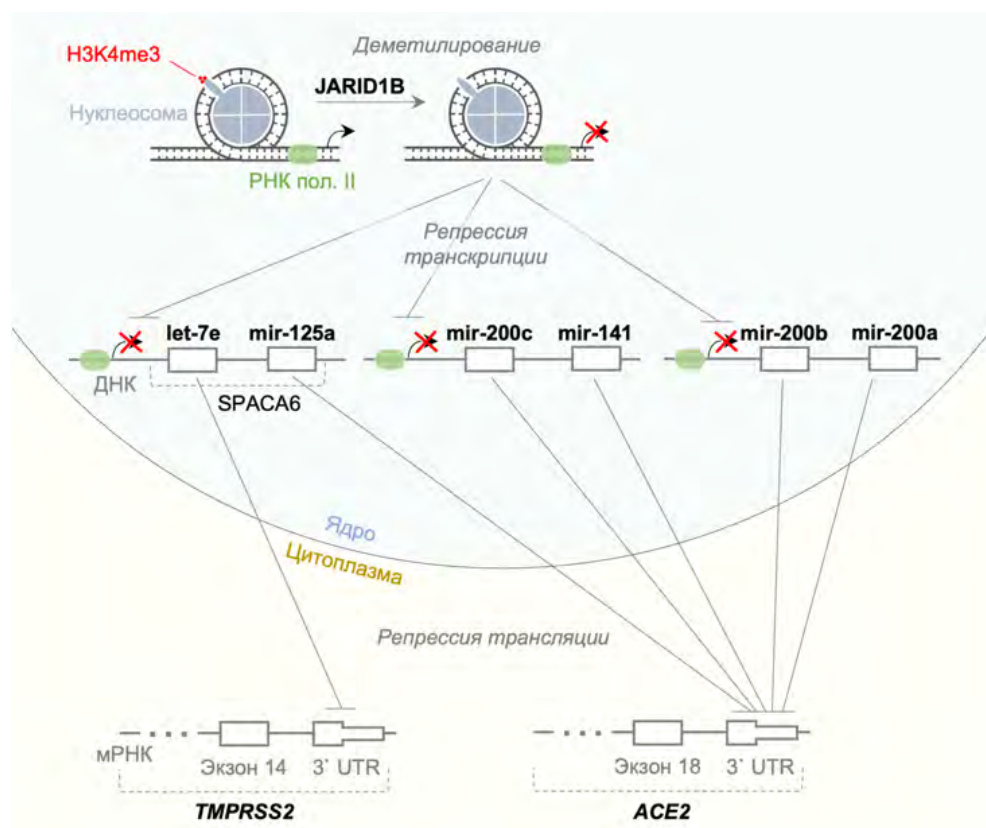


Рис. 16. Схема взаимодействий JARID1B, микроРНК let-7e/miR-125a и miR-141/miR-200 и ферментов ACE2/TMPRSS2 (адаптировано из (Nersisyan, Shkurnikov, et al., 2020b))

Экспрессия JARID1B ассоциирована с экспрессией ACE2 и TMPRSS2 в большинстве клеток человека

Для более глубокого понимания предполагаемых взаимодействий между генами JARID1B и ACE2/TMPRSS2 мы проанализировали общедоступные данные секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq), полученных из отдельных органов человека (Sungnak et al., 2020). В целом экспрессия всех трех генов была относительно низкой в большинстве типов клеток, что приводило к высокому уровню отсева результатов секвенирования. В частности, средний показатель отсева (т.е. отношение количества клеток без прочтений, выровненных на JARID1B, ACE2 или TMPRSS2, к общему количеству клеток) для всех типов клеток составил 87,9% для KDM5B, 99,1% для ACE2 и 93,2% для TMPRSS2. Таким образом, корреляция между экспрессией генов, образующих произвольную пару на уровне одной клетки, сильно смещена из-за большой доли клеток без прочтений.

Чтобы преодолеть проблему, вызванную высокими показателями отсева, мы рассчитали среднюю экспрессию каждого гена для всех типов клеток из исследованных наборов данных. За последним последовала бинаризация полученных профилей экспрессии. В частности, ген считался «экспрессированным» в данном типе клеток, если его средняя экспрессия в этом типе клеток превышала первый квартиль экспрессии во всех типах клеток. В результате ген ACE2 был экспрессирован в 114 из 272 проанализированных клеток, а 100 типов клеток (87,7% от общего числа) также экспрессировали KDM5B. Это наблюдение указывает на то, что экспрессия гена KDM5B может быть необходима для экспрессии ACE2 (биномиальный тест $p = 2,2 \times 10^{-7}$) в большинстве клеток. Аналогичный вывод можно сделать для генов KDM5B и TMPRSS2, поскольку 135 из 159 типов клеток (84,9%), экспрессирующих TMPRSS2, также экспрессируют KDM5B (биномиальный критерий $p = 1,61 \times 10^{-7}$).

Также были определены типы клеток, в которых уровни экспрессии генов KDM5B, ACE2 и TMPRSS2 были выше, чем соответствующие верхние квартили (табл. 9). Интересно, что в список типов клеток с высоким уровнем экспрессии вышеуказанных генов вошли: клетки носового эпителия (реснитчатые и секреторные), бронхиальные клетки (реснитчатые, секреторные и базальные), а также реснитчатые и альвеолярные клетки паренхимы легких.

Табл. 9. Типы клеток с наибольшей экспрессией генов KDM5B, ACE2 и TMPRSS2

Орган	Тип клеток	Экспрессия гена		
		KDM5B	ACE2	TMPRSS2
Эпителий носоглотки	Реснитчатые	0,85 (96,7%)	0,12 (97,1%)	0,74 (95,2%)
Эпителий носоглотки	Бокаловидные	0,92 (97,4%)	0,13 (97,4%)	0,52 (91,5%)
Паренхима лёгких	Альвеоциты 2 типа	0,32 (87,5%)	0,03 (90,1%)	1,02 (97,8%)

Орган	Тип клеток	Экспрессия гена		
		KDM5B	ACE2	TMPRSS2
Предстательная железа	Клетки Клара	0,30 (86,0%)	0,01 (79,0%)	1,00 (97,4%)
Поджелудочная железа	Протоковые	0,52 (92,3%)	0,01 (82,0%)	0,65 (94,5%)
Эпителий бронхов	Секреторные	0,72 (94,5%)	0,07 (95,2%)	0,37 (88,2%)
Эпителий бронхов	Реснитчатые	0,66 (93,8%)	0,03 (90,4%)	0,45 (90,1%)
Прямая кишка	Предшественники	0,26(80,1%)	0,02 (89,7%)	0,69 (94,9%)
Яички	Сперматогониальные стволовые клетки	0,81 (96,3%)	0,04 (92,6%)	0,08 (79,4%)
Паренхима лёгких	Реснитчатые	0,40 (89,3%)	0,03 (91,2%)	0,44 (89,7%)
Эпителий бронхов	Базальные	0,75 (95,2%)	0,04 (92,3%)	0,07 (78,3%)
Предстательная железа	Бугорковые	0,26 (80,5%)	0,01 (77,2%)	0,54 (92,3%)
Прямая кишка	Энтероэндокринные	0,33 (87,9%)	0,04 (93,8%)	0,32 (86,8%)
Почки	Эпителиальные клетки-предшественники	0,24 (77,6%)	0,02 (86,0%)	0,25 (84,6%)

Экспрессия генов представлена в виде \log_2 -преобразованных прочтений гена на десять тысяч картированных прочтений, усредненных по всем клеткам данного типа. Значения в скобках указывают соответствующий процентиль распределения экспрессии по всем типам клеток. Строки таблицы отсортированы по средней экспрессии генов KDM5B, ACE2 и TMPRSS2.

Были исследованы потенциальные взаимодействия между микроРНК и генами ACE2/TMPRSS2 в различных органах человека. Показано, что наряду с ключевой ролью обоих ферментов во время проникновения SARS-CoV/SARS-CoV-2 в клетку, ACE2 и микроРНК, направленных на него, также влияют на развитие острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС). Предыдущие исследования указывали на важную роль ACE2 при ОРДС, поскольку дефицит ACE2 в легких усиливал его степень (Imai et al., 2005). Кроме того, было показано, что экспрессия гена ACE2 подавляется в легких на фоне инфицирования SARS-CoV (Kuba et al., 2005). В то время другая исследовательская группа сообщила о значительном увеличении экспрессии кластера микроРНК hsa-miR-200c-3p/hsa-miR-141-3p при вирусе птичьего гриппа H5N1, обуслов-

ленной белками вируса (Q. Liu et al., 2017). Интересно, что hsa-miR-200c-3p и hsa-miR-141-3p могут непосредственно взаимодействовать с 3'-UTR мРНК ACE2, поскольку трансфекция клеток HEK293T соответствующими миметиками и ингибиторами микроРНК приводила к значительному снижению или увеличению экспрессии ACE2 соответственно (Q. Liu et al., 2017). Эти результаты указывают на предполагаемую связь между вирусной инфекцией и последующим развитием ОРДС, вызванным снижением экспрессии ACE2 в тканях легких. Кроме того, эксперименты по оверэкспрессии и нокдауну микроРНК, проведенные на эпителиальных клетках почечных канальцев HK-2, показали, что hsa-miR-125b (которая принадлежит к тому же семейству микроРНК, что и hsa-miR-125a) непосредственно регулирует ACE2 (Y.-F. Huang et al., 2016).

С использованием курируемой базы данных взаимодействий были обнаружены убедительные признаки того, что ген JARID1B может репрессировать экспрессию семейства микроРНК hsa-let-7e/hsa-miR-125a, а также семейства hsa-miR-200, предположительно посредством эпигенетических механизмов. Ранее Митра и соавт. (Mitra et al., 2011) экспериментально продемонстрировали возможность подавления транскрипции hsa-let-7e и hsa-miR-125a посредством деметилирования H3K4me3 JARID1B. В частности, shРНК-опосредованный нокдаун JARID1B в клетках MCF-7 и T47D приводил к многократному увеличению экспрессии обеих микроРНК, в то время как анализ ChIP подтвердил деметилирование H3K4 соответствующих регуляторных последовательностей ДНК. Группа Enkhbaatar и соавт. (Enkhbaatar et al., 2013) показала, что JARID1B подавляет транскрипцию семейства hsa-miR-200 по сходному механизму. В частности, сверхэкспрессия JARID1B в клеточной линии рака легкого A549 приводила к 3-кратному снижению экспрессии hsa-miR-200a и hsa-miR-200c, в то время как нокдаун JARID1B приводил к 1,5-кратному увеличению их уровней. Последующий анализ ChIP показал предполагаемые изменения в метилировании H3K4me3 соответствующих участков ДНК. Таким образом, полученные результаты согласуются с экспериментальными данными, показывающими существование регуляторной сети, включающей семейства микроРНК hsa-let-7e/hsa-miR-125a/hsa-miR-200, гистондеметилазу JARID1B, а также гены ACE2/TMPRSS2, а также предполагают новый механизм регуляции экспрессии ACE2. Кроме того, анализ данных секвенирования РНК единичных клеток убедительно подтверждает существование таких взаимодействий в других клетках и показывает, что в большинстве клеток человека ACE2 и TMPRSS2 не экспрессируются без JARID1B.

Потенциальные взаимодействия между ACE2 и модификаторами гистонов, такими как NAT1, HDAC2 и JARID1B, в легких ранее были показаны Pinto B. и соавторами (Pinto et al., 2020). Кроме того, Gordon D. et al. предложил использовать ингибирование гистондеацетилазы 2 (HDAC2) для лечения COVID-19 (Gordon et al., 2020a). В частности, авторы описали взаимодействие между белком HDAC2 и основной вирусной протеазой NSP5, предполагая, что NSP5 может ингибировать транспорт HDAC2 в ядро, тем самым изменяя его функциональную активность. Кроме того, они предлагают тестировать определенные репрессоры HDAC2, включая вальпроевую кислоту и апицидин, поскольку их влияние на HDAC2 может подавлять активность вируса. Необходимо отме-

титель, что вальпроевая кислота также напрямую ингибирует JARID1B в эмбриональных клетках почек человека (HEK 293) (Ganai et al., 2015) и эмбриональных стволовых клетках человека H9 (H9 hESC) (Krug et al., 2013). Таким образом, подавление активности модификаторов гистонов может регулировать клеточный ответ на вирусную инфекцию, задействуя сложный регуляторный механизм, включающий гены ACE2 и TMPRSS2.

Ранее сообщалось, что ряд микроРНК, регулирующих экспрессию ACE2 и TMPRSS2, также способствуют процессу вирусной инфекции. Так, было показано, что нуклеокапсидный белок коронавируса человека OC43 (HCoV-OC43) связывается с hsa-miR-9-5p, важным негативным регулятором транскрипционного фактора NF-κB (Lai et al., 2014b). Последнее приводит к активации NF-κB и последующему изменению врожденного иммунного ответа. Mallick B. и соавт. (Mallick et al., 2009) показали, что hsa-miR-98-5p взаимодействует с 3'-UTR шиповидного белка SARS-CoV в бронхоальвеолярных стволовых клетках. Авторы также предположили, что такие взаимодействия могут быть использованы вирусом для уклонения от быстрой элиминации иммунной системой.

Хотя также сообщалось об aberrантной экспрессии нескольких других микроРНК во время коронавирусной инфекции, они не были среди предполагаемых регуляторов генов ACE2 или TMPRSS2, идентифицированных в рамках данного исследования. Например, с помощью глубокого секвенирования микроРНК легкого мыши при заражении SARS-CoV Peng и соавторы (X. Peng et al., 2011b) показали, что непосредственно после заражения в клетках легких возрастает экспрессия hsa-let-7f-5p, hsa-miR-139-3p, hsa-miR-139-5p. Аналогичный эксперимент был проведен на РНК, выделенной из клеток аденокарциномы легких человека Calu-3, инфицированных MERS-CoV (X. Zhang et al., 2020). Четыре другие микроРНК экспрессировались aberrантно, экспрессия микроРНК hsa-miR-98-5p была повышена, а hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p и hsa-miR-141-3p – снижена. Важно отметить, что из-за структурного сходства между MERS-CoV/SARS-CoV и SARS-CoV-2 можно предположить, что описанные взаимодействия мРНК/микроРНК могут способствовать поддержанию уровня экспрессии ACE2/TMPRSS2 во время коронавирусной инфекции, тем самым регулируя инфекционный процесс.

РОЛЬ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ МИКРОРНК MIR-19B В ПРОГНОЗЕ ИСХОДА COVID-19

В данном подразделе мы изучили особенности профиля микроРНК плазмы крови пациентов с различной тяжестью течения новой коронавирусной инфекции COVID-19 и оценили возможность взаимодействия микроРНК с геномом SARS-CoV-2.

Для анализа были использованы первичные данные секвенирования микроРНК (GSE195898), выделенных из плазмы крови из 3 выздоровевших и 8 умерших пациентов (группа сравнения) с крайне тяжелой формой COVID-19, сопоставимых по полу и возрасту, проходивших лечение в отделении интенсивной терапии IRCCS Policlinico San Donato (Милан, Италия). Для каждого

пациента был оценен профиль микроРНК плазмы крови на момент поступления в больницу (Т0) и перед выпиской или смертью (Т1).

Результаты секвенирования показали, что в момент поступления в лечебное учреждение (Т0) в плазме крови пациентов в количестве более 150 гpm присутствовало 932 вида микроРНК и их 5'-изоформ. При этом в момент времени Т1 количество видов молекул составляло 990. Причем 54 вида молекул встречались только в Т0, а 112 – только в Т1. К наиболее высоко представленным в Т0 и Т1 можно отнести следующие микроРНК: hsa-miR-22-3p|0, hsa-miR-339-3p|0, hsa-miR-451a|0.

Анализ различий в профиле микроРНК у выздоровевших и не выздоровевших пациентов показал, что значимо изменилась экспрессия 46 микроРНК. В Т0 у выздоровевших в последствие пациентов была выше экспрессия hsa-miR-19b-3p|0 (в 4,5 раза, $p = 0,017$), hsa-miR-25-3p|+1 (в 4,8 раза, $p = 0,047$). В Т1 значимо различалась представленность 291 микроРНК. Наибольшие различия представленности в плазме между группой выздоровевших пациентов и группой сравнения были отмечены для следующих микроРНК: hsa-miR-451a|0 (в 13 раз, $p = 7,65e-07$), hsa-miR-22-3p|0 (в 4,3 раза, $p = 7,67e-05$), hsa-miR-19b-3p|0 (в 14 раз, $p = 1,23e-06$).

В ряде исследований была продемонстрирована взаимосвязь представленности hsa-miR-451a с уровнем гемолиза в образцах крови (Rasmussen et al., 2010a; M. Yu. Shkurnikov et al., 2016). Была проверена гипотеза о значимости различий в представленности микроРНК, ассоциированных с гемолизом между группами сравнения в Т0 и Т1 (табл. 10). На момент поступления в стационар уровень микроРНК, ассоциированных с гемолизом и эритропозом, не различался между группами сравнения. При этом в Т1 у группы выздоровевших пациентов были значимо повышены все микроРНК, ассоциированные с гемолизом и эритропозом.

Табл. 10. Различия в представленности микроРНК, ассоциированных с гемолизом, между группами сравнения в Т0 и Т1

микроРНК	Представленность микроРНК в плазме в Т0, log2RPM			Представленность микроРНК в плазме в Т1, log2RPM		
	Выздоровевшие	Скончавшиеся	<i>p</i>	Выздоровевшие	Скончавшиеся	<i>p</i>
hsa-miR-451a 0	14,4 ± 2,2	13,2 ± 1,7	0,0959	17,4 ± 1,8	13,9 ± 1,6	1,0e-06
hsa-miR-16-5p 0	11,6 ± 1,5	11,6 ± 1,3	0,9370	13,9 ± 1,3	12,1 ± 0,8	2,0e-04
hsa-miR-486-5p 0	11,2 ± 2,8	10,3 ± 1,5	0,1206	13,7 ± 1,8	10,5 ± 1,3	1,0e-05
hsa-miR-93-5p 0	10,7 ± 1,9	10,1 ± 1,2	0,1771	12,8 ± 1,3	10,1 ± 0,9	4,0e-07
hsa-miR-17-5p 0	9,3 ± 1,4	9 ± 1	0,4637	11 ± 1,1	9,4 ± 0,7	4,0e-04

микроРНК	Представленность микроРНК в плазме в T0, log2RPM			Представленность микроРНК в плазме в T1, log2RPM		
	Выздоровевшие	Скончавшиеся	<i>p</i>	Выздоровевшие	Скончавшиеся	<i>p</i>
hsa-miR-20a-5p 0	8,9 ± 1	8,9 ± 1	0,7719	11,1 ± 1,1	9,4 ± 0,8	2,0e-04
hsa-miR-107 0	8,8 ± 1,2	8,8 ± 0,7	0,7764	10,2 ± 1,1	9,1 ± 0,4	1,4e-03
hsa-miR-106a-5p 0	8,5 ± 1,2	7,9 ± 0,7	0,1640	10,2 ± 1,3	8,2 ± 0,7	2,0e-05
hsa-miR-20b-5p 0	7,8 ± 0,4	7,6 ± 0,3	0,6410	9,1 ± 0,7	7,7 ± 0,5	2,0e-04

Сравнение множеств микроРНК, различающихся между выздоровевшими пациентами и группой сравнения, показал, что только две микроРНК сопоставлено изменялись в T0 и T1 (табл. 11).

Табл. 11. Представленность сопоставлено изменившихся микроРНК в группах сравнения с T0 и T1

микроРНК	Представленность микроРНК в плазме в T0, log2RPM			Представленность микроРНК в плазме в T1, log2RPM			
	Выздоровевшие	Скончавшиеся	<i>p</i>	Выздоровевшие	Скончавшиеся	<i>p</i>	<i>p</i> с поправкой на множественность сравнений
hsa-miR-19b-3p 0	11,7 ± 2,9	10,6 ± 1,5	0,017	14,3 ± 1,8	10,6 ± 1,4	1,23e-06	0,003
hsa-miR-25-3p +1	3,4 ± 1,2	1,9 ± 0,8	0,047	4,7 ± 1,2	2 ± 0,7	2,25e-05	0,046

Были оценены возможные места связывания с геномом SARS-CoV-2 множества микроРНК, различающегося между группой выздоровевших пациентов и группой сравнения в T0 и T1 (рис. 17). Ряд микроРНК не имел мест связывания с геномом вируса: hsa-miR-1225-3p|+3, hsa-miR-4498|+1, hsa-miR-6787-5p|+2, hsa-miR-1538|+1, hsa-miR-1307-5p|+1, hsa-miR-7111-5p|+2. Число мест связывания микроРНК hsa-miR-19b-3p|0 и hsa-miR-25-3p|+1 составляло 12 и 9 соответственно. При этом медиана числа мест связывания остальных микроРНК находилась на уровне 3. Можно сделать вывод о том, что у выздоровевших пациентов был значимо повышен уровень микроРНК, имеющих значительное число мест связывания с геномом SARS-CoV-2 ($p = 0,048$).

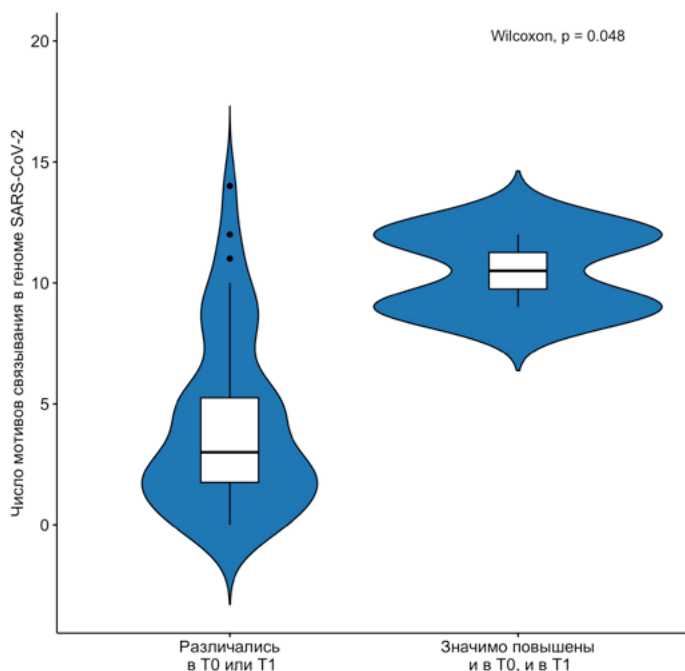


Рис. 17. Число возможных мест связывания микроРНК с геномом SARS-CoV-2

Также было проанализировано расположение возможных мест связывания микроРНК с геномом вируса (рис. 18). Наибольшее число мест связывания было расположено в регионе ORF1ab, кодирующем неструктурные белки. У микроРНК hsa-miR-19b-3p|0 наибольшее число мест связывания пришлось на короткий регион (338 нуклеотидов), кодирующий белок NSP9. При этом обе анализируемые микроРНК имели по два возможных места связывания с протяженным регионом (5834 нуклеотидов), кодирующим белок NSP3. Ни одна из микроРНК не имела мест связывания в 5` и 3`-нетранслируемых областях генома SARS-CoV-2.

1	2	3	0	1	2	1	1	1	hsa-miR-19b-3p 0
1	2	0	2	2	2	0	0	0	hsa-miR-25-3p +1
NSP2	NSP3	NSP9	NSP12	NSP16	Spike	NS3	NS7a	N	

Рис. 18. Расположение возможных мест связывания микроРНК с геномом вируса SARS-CoV-2

Молекулы микроРНК вовлечены во многие процессы, включая развитие, пролиферацию и апоптоз. Кроме того, микроРНК связаны со многими патологическими процессами (Russo et al., 2014). Определение экспрессионных

профилей микроРНК может выступать в роли метода для классификации, диагностирования и прогнозирования течения заболевания (Kunej et al., 2011). МикроРНК обнаруживаются в различных биологических жидкостях и обладают заметной стабильностью, что подчеркивает их возможную роль в качестве перспективных малоинвазивных диагностических и прогностических маркеров (Weber et al., 2010). Кроме того, в ряде исследований молекулы микроРНК рассматриваются в качестве компонента системы врожденного иммунитета (Leon-Icaza et al., 2019; Usuelli et al., 2022; Zou et al., 2022).

Был изучен профиль циркулирующих в плазме крови больных крайне тяжелой формой COVID-19 микроРНК. Представленность hsa-miR-19b-3p|0 и hsa-miR-25-3p|+1 значительно различалась в плазме крови пациентов с различным исходом COVID-19, как в момент поступления в стационар, так и в момент выписки или смерти. МикроРНК могут выступать в качестве компонента внутриклеточного иммунитета, регулируя трансляцию и репликацию (+) РНК-вирусов и изменяя патогенез вирусных инфекций (J. Huang et al., 2007; Ingle et al., 2015). Учитывая, что площадь ткани легких составляет от 75 до 100 м² и то, что она обильно кровоснабжается (Fröhlich et al., 2016), можно предположить, что циркулирующие микроРНК могут проникать в инфицированные альвеоциты и взаимодействовать с вирусом SARS-CoV-2 (Makarova et al., 2021). МикроРНК hsa-miR-19b-3p|0, значительно повышенная в группе выздоровевших пациентов, относится к числу наиболее высоко представленных в плазме крови. На неё приходится более 1,5% всех циркулирующих молекул микроРНК. В рамках данной работы показано, что эта микроРНК обладает значительным числом мест связывания с геномом SARS-CoV-2, причем в наиболее его стабильной части –ORF1ab.

Наибольшее число мест связывания hsa-miR-19b-3p|0 приходится на регион длиной 338 нуклеотидов, кодирующий белок NSP9. Белок NSP9 способен связываться с 7SL РНК, входящей в частицы узнавания сигнала, тем самым нарушая транспорт белков в эндоплазматический ретикулум и на мембрану клетки (А.К. Banerjee et al., 2020b). Одним из семейств белков, созревающих в эндоплазматическом ретикулуме, является семейство молекул главного комплекса гистосовместимости класса 1. Нарушение их созревания может способствовать нарушению противовирусной активности цитотоксических Т-лимфоцитов. Кроме того, hsa-miR-19b-3p|0 способна связываться с регионом, кодирующим белок NSP3. Белок NSP3 совместно с NSP4 отвечает за формирование в зараженной клетке двухмембранных везикул, защищающих вирус от механизмов внутриклеточного врожденного иммунитета (Klatte et al., 2022). Таким образом, высоко представленная в плазме крови выздоровевших пациентов с COVID-19 микроРНК hsa-miR-19b-3p|0 способна связываться с регионами вируса, кодирующими белки, ответственные за подавление механизмов внутриклеточного иммунитета.

Кроме того, hsa-miR-19b-3p|0 способна потенцировать активность цитотоксических Т-лимфоцитов. Было обнаружено, что уровни hsa-miR-19b-3p|0 значительно повышены в мононуклеарных клетках периферической крови па-

циентов с длительной ремиссией ВИЧ. Оверэкспрессия hsa-miR-19b-3p|0 способствует пролиферации CD8+Т-клеток, а также экспрессии интерферона- γ и гранзима В, ингибируя апоптоз CD8+Т-клеток, индуцированный стимуляцией анти-CD3/CD28. Было обнаружено, что мишенью miR-19b является ген PTEN (Yin et al., 2019).

Можно заключить, что у пациентов, выздоровевших после крайне тяжелой формы COVID-19, в плазме крови значимо повышен уровень hsa-miR-19b-3p. Данная микроРНК представлена в плазме крови в значимых количествах, способна связываться с регионами SARS-CoV-2, кодирующими белки подавляющие внутриклеточные механизмы иммунитета. Кроме того, данная микроРНК способна стимулировать функциональную активность и пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов – одного из ключевых компонентов адаптивного клеточного иммунитета против SARS-CoV-2. Результаты исследования могут быть использованы при разработке противовирусных препаратов на основе РНК-интерференции, а также при разработке прогностических тест-систем для оптимизации тактики лечения пациентов с COVID-19.

РАЗРАБОТКА И ПРОВЕРКА КЛИНИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ОБОСНОВАННОГО АЛГОРИТМА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ ДЛЯ ПРОГНОЗА ТЯЖЕЛОГО И КРАЙНЕ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ COVID-19 НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ГЕНОТИПА ГКГС-I

В рамках разработки и проверки клинической значимости патогенетически обоснованного алгоритма диагностических мероприятий для прогноза тяжелого и крайне тяжелого течения COVID-19 на основе анализа генотипа ГКГС-I было проведено исследование, включавшее генотипирование 145 пациентов, переболевших COVID-19 в период с июля по август 2021 года с последующим определением риска развития тяжелой формы COVID-19 и сопоставлением оценок с фактическими исходами заболевания.

В исследование было включено 145 пациентов. При оценке клинической значимости способа оценки риска развития тяжелой формы COVID-19 на основе анализа генотипа ГКГС-I в исследование не включались следующие группы пациентов: беременные, пациенты с сахарным диабетом 1 и 2 типа. Клиническая характеристика пациентов представлена в табл. 12.

Табл. 12. Характеристика выборки пациентов с COVID-19

Показатель	Тяжелое течение	Среднетяжелое течение	p
n	69	76	
Возраст, медиана [25%-75%]	52 [41 – 66]	49 [41 – 57]	0,064
Пол (Муж./Жен.)	37/32	34/42	0,32
Максимальная степень поражения лёгких по КТ			5,8e-05
КТ-0	0	2 (2,6%)	
КТ-1	12 (17,4%)	18 (23,7%)	
КТ-2	12 (17,4%)	32 (42,1%)	
КТ-3	17 (24,6%)	14 (18,4%)	
КТ-4	14 (20,3%)	0	
н.д.	14 (20,3%)	10 (13,2%)	
Летальный исход	15 (21,7%)	0	6,0e-06
Ожирение	11 (16,0%)	0	0,0002
Гипертония	16 (23,2%)	22 (29,0%)	0,45

Данная выборка в значительной степени отличается от выборки, использованной при разработке способа оценки риска. В сформированной выборке подавляющее большинство пациентов выздоровели после COVID-19. Летальный исход был отмечен у 10,3% пациентов. В период формирования выборки в московском регионе преобладал вариант AY.122 (Шкурников et al., 2022), значительно отличающийся от исходного штамма вируса (Klink et al., 2022).

Группы сравнения (табл. 12) были сопоставимы по возрасту и половому составу. Ожидаемо в группе пациентов с тяжелым течением COVID-19 преобладали пациенты с объемным поражением лёгких ($p = 5,8e-05$) и ожирением ($p = 0,0002$). Также в группе с тяжелым течением COVID-19 зафиксирована высокая частота летальных исходов ($p = 6,0e-06$).

Были оценены чувствительность и специфичность «Индекса риска» при прогнозе летального исхода COVID-19 и прогноза тяжелого течения COVID-19 (рис. 19).

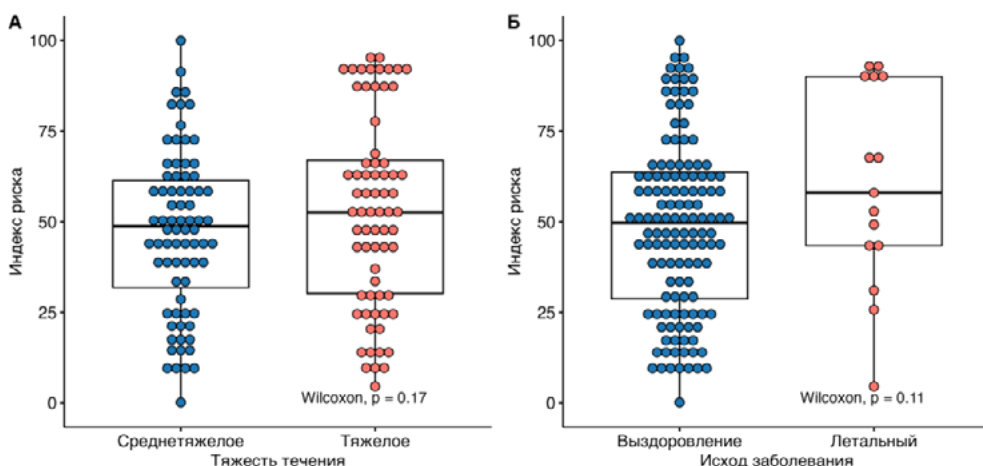


Рис. 19. Результаты оценки «Индекса риска»: А – пациенты с COVID-19 среднетяжелого и тяжелого течения; Б – выздоровевшие пациенты и пациенты с летальным исходом

Нами было предложено два пороговых уровня для оценки риска тяжелого течения COVID-19: значение «Индекса риска» менее 41 – благоприятный прогноз; значение «Индекса риска» более 89 – негативный прогноз (M. Shkurnikov et al., 2021).

Были оценены характеристики прогноза тяжести течения COVID-19 в зависимости от порогового уровня при интерпретации «Индекса риска» (рис. 20). Так, при пороговом уровне не менее 41 чувствительность составила 0,7, специфичность 0,36, FDR – 0,51. ОШ составило 1,25 ($p = 0,6$, 95 % ДИ 0,59 – 2,69), что не позволяет рассматривать данный пороговый уровень в качестве значимого. При пороговом уровне не менее 89 чувствительность составила 0,14, специфичность 0,97, FDR – 0,17 (рис. 21). ОШ составило 6,2 ($p = 0,014$, 95% ДИ 1,25 – 60,4).

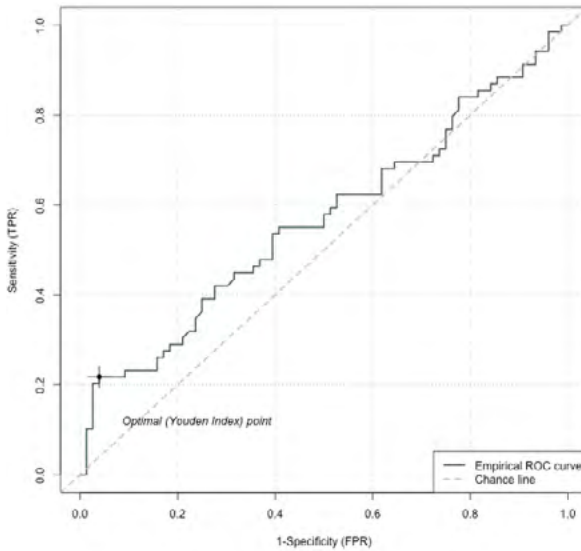


Рис. 20. ROC-кривая прогноза тяжести течения COVID-19 с помощью «Индекса риска». AUC = 0,57

Аналогичные характеристики были оценены для прогноза летального исхода COVID-19 (рис. 22). При пороговом уровне не менее 41 чувствительность составила 0,8, специфичность 0,35, FDR – 0,88. ОШ составило 2,11 ($p = 0,39$, 95% ДИ 0,53 – 12,23), что не позволяет рассматривать данный пороговый уровень в качестве значимого. При пороговом уровне не менее 89 чувствительность составила 0,27, специфичность 0,94, FDR – 0,67 (рис. 23). ОШ составило 5,44 ($p = 0,023$, 95% ДИ 1,03 – 24,7).

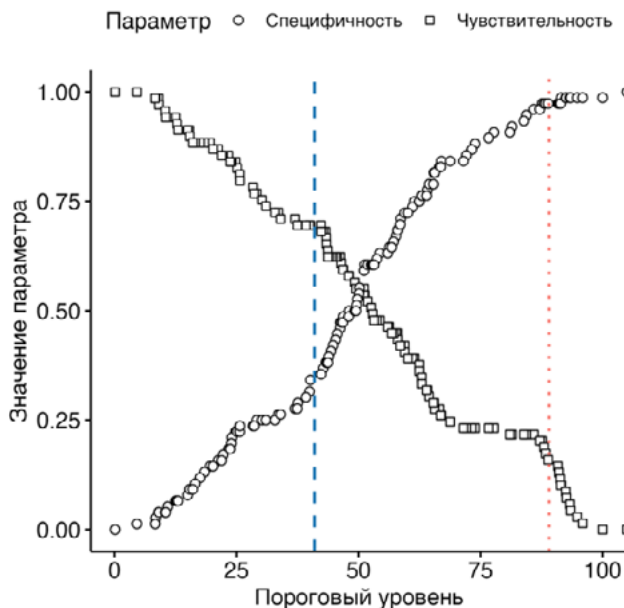


Рис. 21. Зависимость чувствительности и специфичности прогноза тяжести течения COVID-19 в зависимости от порогового уровня при интерпретации «Индекса риска». Пунктирной линией из штрихов обозначен уровень 41. Пунктирной линией из точек обозначен уровень 89

Рис. 22. ROC-кривая прогноза летального исхода COVID-19 с помощью «Индекса риска». AUC = 0,63

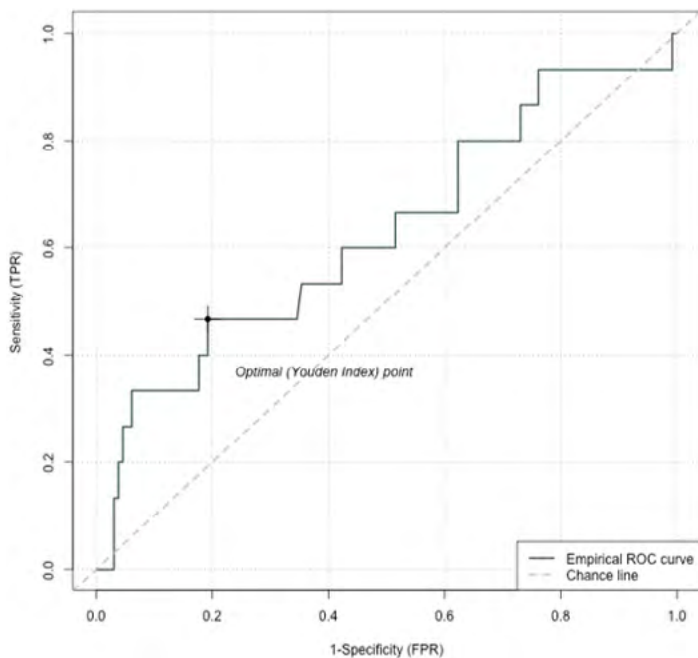
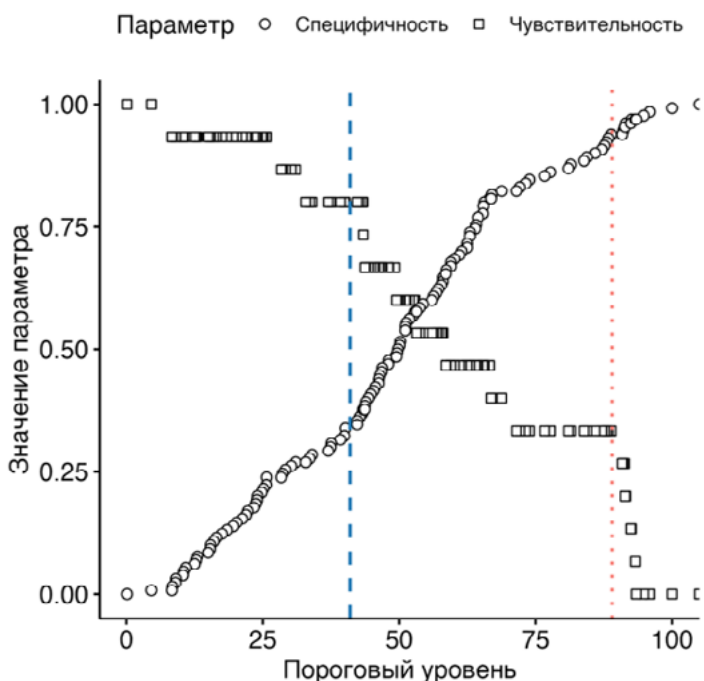


Рис. 23. Зависимость чувствительности и специфичности прогноза летального исхода COVID-19 в зависимости от порогового уровня при интерпретации «Индекса риска». Пунктирной линией из штрихов обозначен уровень 41. Пунктирной линией из точек обозначен уровень 89



Таким образом, была доказана эффективность разработанного на основе полученных в исследовании данных подхода к диагностике и прогнозу тяжести COVID-19.

Исходя из полученных результатов был предложен следующий алгоритм диагностических мероприятий для прогноза тяжелого и крайне тяжелого течения COVID-19 на основе анализа генотипа ГКГС-I:

1) в приемном отделении необходимо провести взятие образца периферической крови или букального соскоба для проведения исследования генов ГКГС-I пациента методом секвенирования следующего поколения;

2) для пациентов, поступивших в приёмные отделения, с подтвержденным COVID-19:

а) выполнить генетическое исследование генов ГКГС-I с целью определения варианта генотипа пациента;

б) в результате обработки ПО результатов генотипирования генов HLA-A, HLA-B, HLA-C пациенту присваивается так называемый «Индекс риска» – число в диапазоне от 0 (нуля) до 100, что пропорционально связано с повышением риска неблагоприятного течения заболевания;

в) если значение «Индекса риска» более 89, пациент относится к группе с высоким риском тяжелого течения COVID-19.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значительные усилия мирового научного сообщества были направлены на решение вопроса о генетических детерминантах тяжести COVID-19. Полногеномное исследование ассоциаций было наиболее очевидным решением данной проблемы. Однако интерпретация выявленных генетических детерминант, связанных с COVID-19, остается сложной задачей, поскольку большинство генетических вариантов расположены в некодирующих регуляторных областях с высоким неравновесным сцеплением (Smemo et al., 2014; V. Kumar et al., 2012; Claussnitzer et al., 2015) и функциональны во временном и пространственном контекстах (The FANTOM Consortium et al., 2014).

Альтернативные подходы к поиску генетических детерминант восприимчивости к COVID-19 базировались на понимании механизмов формирования специфического иммунного ответа на SARS-CoV-2. Интенсивность и характер клеточного иммунного ответа на инфекцию SARS-CoV-2 обусловлены разнообразием как репертуара Т-клеточных рецепторов, так и генотипом ГКГС-I, аллели которого определяют презентацию антигенов при заболевании, а вместе с тем и восприимчивость к заболеванию и исход вирусных инфекций (MacDonald et al., 2000; Ochoa et al., 2020; Zunec, 2020).

В рамках данной работы была разработана и оценена клиническая информативность способа оценки риска развития тяжелого течения COVID-19. Данный способ оценивает способность молекул ГКГС-I, кодируемых генами HLA-A и HLA-C, презентировать пептиды SARS-CoV-2.

Были оценены характеристики прогноза тяжести течения COVID-19 в зависимости от порогового уровня при интерпретации «Индекса риска». При пороговом уровне не менее 41 чувствительность составила 0,7, специфичность 0,36, FDR – 0,51. При пороговом уровне не менее 89 чувствительность составила 0,14, специфичность 0,97, FDR – 0,17. Отношение шансов составило 6,2 ($p = 0,014$, 95% ДИ 1,25 – 60,4).

Аналогичные характеристики были оценены для прогноза летального исхода COVID-19. При пороговом уровне не менее 41 чувствительность составила 0,8, специфичность 0,35, FDR – 0,88. Отношение шансов составило 2,11 ($p = 0,39$, 95% ДИ 0,53 – 12,23). При пороговом уровне не менее 89 чувствительность составила 0,27, специфичность 0,94, FDR – 0,67. Отношение шансов составило 5,44 ($p = 0,023$, 95% ДИ 1,03 – 24,7). Можно заключить, что разработанный на первом этапе работы способ оценки риска развития тяжелого течения COVID-19 на основе анализа генотипа ГКГС-I позволяет прогнозировать тяжелое течение заболевания или летальный исход при пороговом уровне не менее 89.

В рамках исследования была определена штаммовая принадлежность вируса SARS-CoV-2 и изучена взаимосвязь генотипа ГКГС-I с тяжестью течения COVID-19, вызванной распространенными летом 2021 года вариантами штамма Дельта SARS-CoV-2: AY.122 и B.1.617.2. У пациентов в возрасте не

старше 60 лет со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19 генотипирование ГКГС-I показало, что наиболее частыми аллелями в выборке были HLA-A*02:01 (частота 0,26) и HLA-A*01:01 (частота 0,25), что характерно для популяции московского региона. Анализ влияния мутаций на число вирусных пептидов, взаимодействующих с индивидуальным набором молекул ГКГС-I с аффинностью менее 50 нМоль, показал, что различия достоверны для вспомогательных белков вируса. Так, у инфицированных вариантом AY.122 число высокоаффинных пептидов значимо сократилось по сравнению с инфицированным вариантом B.1.617.2 ($p < 0,01$).

Значимое снижение числа высокоаффинных пептидов в варианте AY.122, прежде всего, связано с мутацией G8R в белке NS8. Данная мутация вызывает падение аффинности взаимодействия пептидов FLGIITTV и FLVFLGIITTV с молекулой ГКГС-I, кодируемой наиболее частым для российской популяции аллелем HLA-A*02:01. Особого внимания заслуживает тот факт, что белок NS8 (ORF8) способен подавлять созревание молекул ГКГС-I и их транслокацию на поверхность зараженной клетки (Matsuoka et al., 2022; Y. Zhang et al., 2021). Данные обстоятельства могли внести весомый вклад в превалирование варианта AY.122 в российской популяции и более тяжелое, по сравнению с другими вариантами штамма Дельта, течение вызванной им COVID-19.

Как уже упоминалось ранее, молекулы ГКГС-I являются одним из ключевых медиаторов первых шагов в развитии специфического иммунного ответа на COVID-19. В данном исследовании были проанализированы различия в генотипе ГКГС-I пациентов в возрасте не старше 60 лет, переболевших COVID-19 в первую и третью волну, оценено влияние мутаций в вирусе SARS-CoV-2 на иммуногенные эпитопы CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Выявлено значительное снижение частоты встречаемости носителей аллеля HLA-A*01:01 среди госпитализированных пациентов во время третьей волны пандемии COVID-19. Расчет аффинности взаимодействия между молекулами ГКГС-I и пептидами SARS-CoV-2 выявил возможную причину уменьшения частоты встречаемости носителей аллеля HLA-A*01:01. Разные гены и, следовательно, белки SARS-CoV-2 мутируют с разной скоростью. Ген ORF1ab крайне консервативен по сравнению с другими генами SARS-CoV-2. Носители HLA-A*01:01 имеют значительное количество высокоаффинных эпитопов этого гена.

В когорте выздоровевших пациентов первой волны COVID-19 были подтверждены результаты компьютерного моделирования и продемонстрирована более высокая частота встречаемости иммунодоминантных эпитопов из белков гена ORF1ab вируса SARS-CoV-2 у носителей HLA-A*01:01 по сравнению с эпитопами этого гена у носителей HLA-A*02:01.

Более того, анализ результатов одноклеточного фенотипирования Т-клеток у выздоровевших пациентов показал, что преобладающим фенотипом у носителей HLA-A*01:01 являются Т-клетки центральной памяти. Преобладание Т-лимфоцитов данного фенотипа может способствовать формированию длительного Т-клеточного иммунитета у носителей данного аллеля и, соответственно, снижению заражаемости и тяжести заболевания.

Также в рамках данного исследования было оценено влияние мутаций на 25 иммунодоминантных эпитопов вируса SARS-CoV-2. Оказалось, что мутации, произошедшие с вирусом за более чем два года пандемии, затрагивают только четыре иммунодоминантных эпитопа (16 %).

В рамках данного исследования проверена гипотеза об эволюционном давлении на геном вируса SARS-CoV-2 микроРНК, характерных для ткани лёгких. В результате анализа было установлено, что вирус SARS-CoV-2 практически не имеет регионов связывания в 5p- и 3p-нетранслируемых областях с характерными для ткани лёгких микроРНК. Тем не менее, вирус обладает значительным числом мест связывания с микроРНК в регионе NSP3-NSP5, ответственном за аутопротеолиз вирусных полипептидов и формирование вирионов. В вариантах штамма Омикрон произошло значимое снижение мест связывания с микроРНК клеток хозяина, что могло способствовать снижению патогенности данного штамма.

Нами продемонстрировано, что у пациентов, выздоровевших после крайне тяжелой формы COVID-19, в плазме крови значимо повышен уровень hsa-miR-19b-3p и hsa-miR-25-3p. Данные микроРНК представлены в плазме крови в значимых количествах, способны связываться с регионами SARS-CoV-2, кодирующими белки, подавляющие внутриклеточные механизмы иммунитета. Кроме того, hsa-miR-19b-3p способна стимулировать функциональную активность и пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов – одного из ключевых компонентов адаптивного клеточного иммунитета против SARS-CoV-2.

Можно заключить, что индивидуальные особенности генотипа ГКГС-I, а также микроРНК вносят значимый вклад в патогенез COVID-19 и формирование Т-клеточного иммунитета к нему (рис. 24).

Вклад в тяжелое и крайне тяжелое течение COVID-19 вносят следующие патогенетические факторы: мутации SARS-CoV-2, в том числе и под влиянием микроРНК клеток хозяина, приводящие к исчезновению иммунодоминантных для генотипа ГКГС-I пациента эпитопов, особенности экспрессии микроРНК и генотип ГКГС-I пациента, приводящие к слабому цитотоксическому Т-клеточному ответу на начальных этапах заболевания.

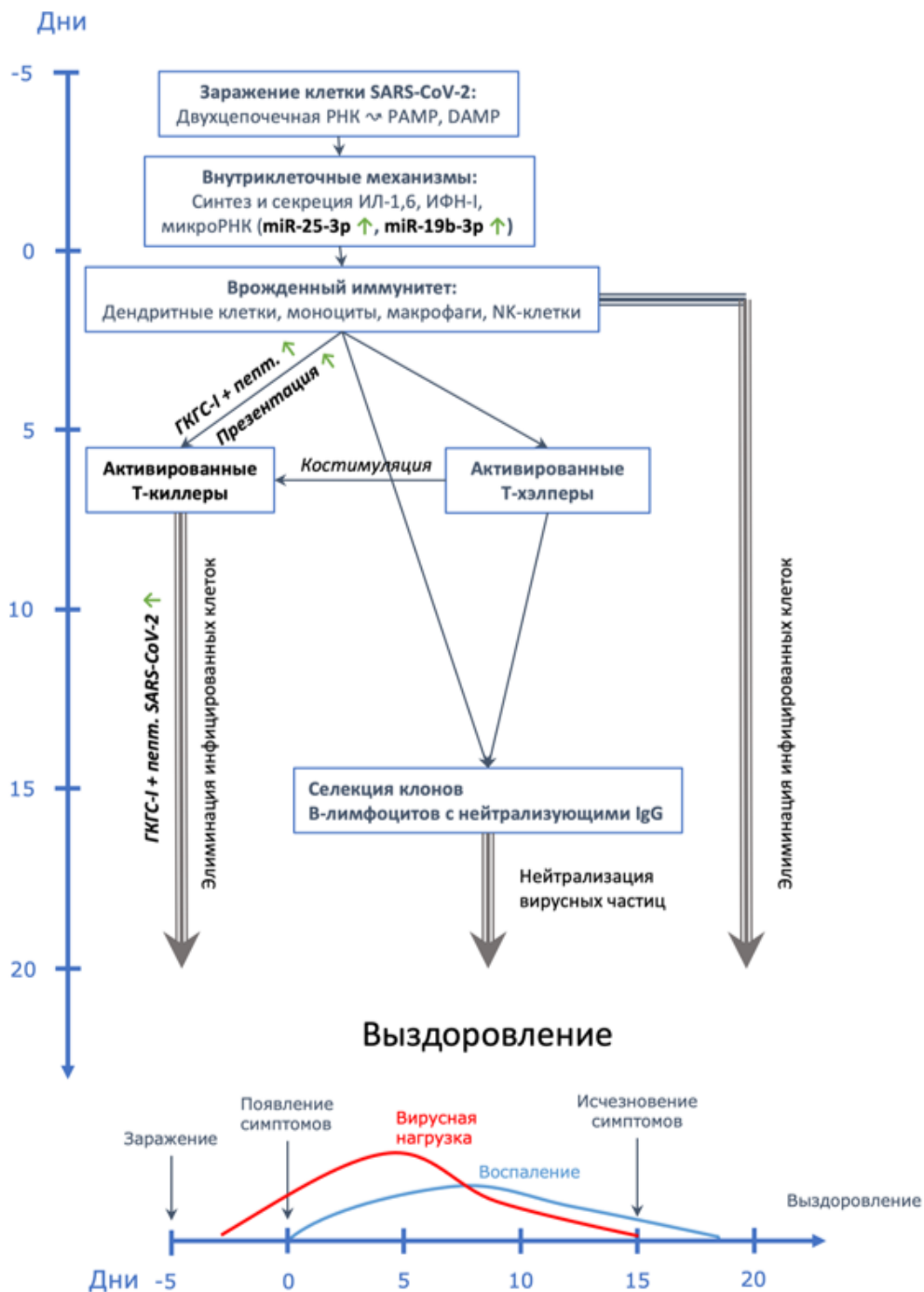


Рис. 24. Патогенетический вклад генотипа ГКГС-I в COVID-19 средней степени тяжести

Совокупность этих факторов приводит к тому, что в промежутке с 3 – 4 до 14 – 16 дня заболевания возникает «иммунологический провал», в котором с SARS-CoV-2 борются только компоненты врожденного иммунитета (рис. 25).

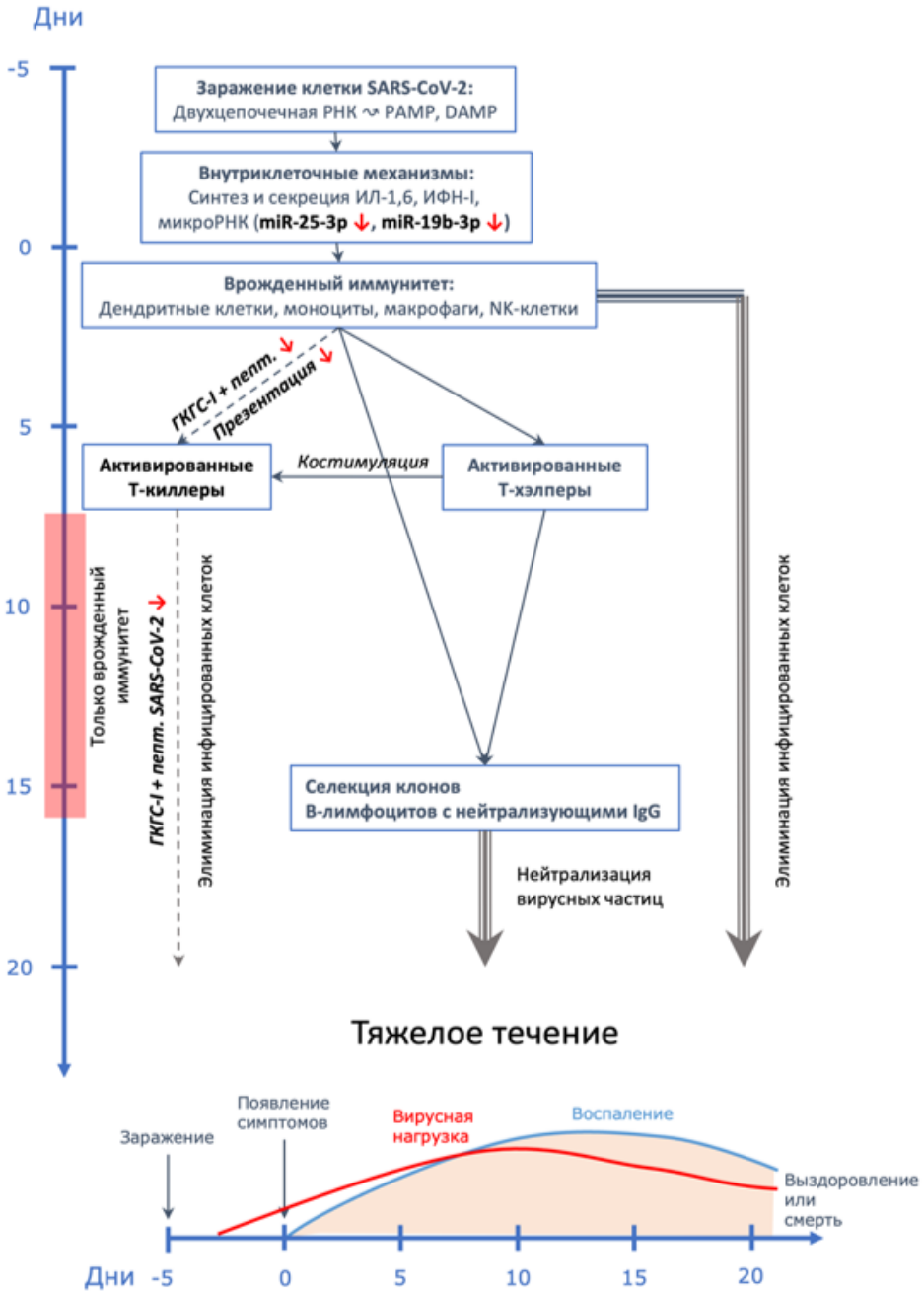


Рис. 25. Патогенетический вклад генотипа ГКГС-I в COVID-19 тяжелой и крайне тяжелой степени тяжести

Обобщая результаты исследования, можно заключить, что индивидуальные особенности генотипа главного комплекса гистосовместимости, а также микроРНК вносят значимый вклад в патогенез COVID-19 и формирование Т-клеточного иммунитета к нему.

Вклад в тяжелое и крайне тяжелое течение COVID-19 вносят следующие патогенетические факторы:

- мутации SARS-CoV-2, в том числе и под влиянием микроРНК клеток хозяина, приводящие к исчезновению иммунодоминантных для генотипа ГКГС-I пациента эпитопов,

- особенности экспрессии микроРНК и генотип ГКГС-I пациента, приводящие к слабому цитотоксическому Т-клеточному ответу на начальных этапах заболевания.

Совокупность этих факторов приводит к тому, что в промежутке с 3 – 4 до 14 – 16 дня заболевания возникает «иммунологический провал», в котором с SARS-CoV-2 борются только компоненты врожденного иммунитета.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Abani, O., Abbas, A., Abbas, F., Abbas, M., Abbasi, S., Abbass, H., Abbott, A., Abdallah, N., Abdelaziz, A., Abdelfattah, M., Abdelqader, B., Abdul, B., Abdul Rasheed, A., Abdulakeem, A., Abdul-Kadir, R., Abdulmumeen, A., Abdul-Raheem, R., Abdulshukoor, N., Abdusamad, K., ... Zuriaga-Alvaro, A. (2021). Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): A randomised, controlled, open-label, platform trial. *The Lancet*, 397(10285), 1637–1645. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00676-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00676-0)
2. Adamo, S., Michler, J., Zurbuchen, Y., Cervia, C., Taeschler, P., Raeber, M.E., Baghai Sain, S., Nilsson, J., Moor, A. E., & Boyman, O. (2022). Signature of long-lived memory CD8+ T cells in acute SARS-CoV-2 infection. *Nature*, 602(7895), 148–155. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04280-x>
3. Aggarwal, G., Cheruiyot, I., Aggarwal, S., Wong, J., Lippi, G., Lavie, C. J., Henry, B. M., & Sanchis-Gomar, F. (2020). Association of Cardiovascular Disease With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Severity: A Meta-Analysis. *Current Problems in Cardiology*, 45(8), 100617. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2020.100617>
4. Akiyama, Y., Kinoshita, N., Sadamasu, K., Nagashima, M., Yoshida, I., Kusaba, Y., Suzuki, T., Nagashima, M., Ishikane, M., Takasaki, J., Yoshimura, K., & Ohmagari, N. (2022). A Pilot Study on Viral Load in Stool Samples of Patients with COVID-19 Suffering from Diarrhea. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 75(1), 36–40. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2021.018>
5. AL Hamrashdi, M., & Brady, G. (2022). Regulation of IRF3 activation in human antiviral signaling pathways. *Biochemical Pharmacology*, 200, 115026. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115026>
6. Alam, T., & Lipovich, L. (2021). miRCOVID-19: Potential Targets of Human miRNAs in SARS-CoV-2 for RNA-Based Drug Discovery. *Non-Coding RNA*, 7(1), 18. <https://doi.org/10.3390/ncrna7010018>
7. Altschul, D. J., Unda, S. R., Benton, J., de la Garza Ramos, R., Cezayirli, P., Mehler, M., & Eskandar, E. N. (2020). A novel severity score to predict inpatient mortality in COVID-19 patients. *Scientific Reports*, 10(1), 16726. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73962-9>
8. Amanat, F., Thapa, M., Lei, T., Ahmed, S. M. S., Adelsberg, D. C., Carreño, J.M., Strohmeier, S., Schmitz, A. J., Zafar, S., Zhou, J. Q., Rijnink, W., Alshammery, H., Borchering, N., Reiche, A. G., Srivastava, K., Sordillo, E. M., van Bakel, H., Personalized Virology Initiative, Turner, J. S., ... Krammer, F. (2021). SARS-CoV-2 mRNA vaccination induces functionally diverse antibodies to NTD, RBD, and S2. *Cell*, 184(15), 3936–3948.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.005>
9. Anderson, J. J., Susser, E., Arbeev, K. G., Yashin, A. I., Levy, D., Verhulst, S., & Aviv, A. (2022). Telomere-length dependent T-cell clonal expansion: A model linking ageing to COVID-19 T-cell lymphopenia and mortality. *eBioMedicine*, 78, 103978. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103978>
10. Arya, R., Kumari, S., Pandey, B., Mistry, H., Bihani, S. C., Das, A., Prashar, V., Gupta, G. D., Panicker, L., & Kumar, M. (2021). Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of Molecular Biology*, 433(2), 166725. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.024>

11. Augusto, D. G., & Hollenbach, J. A. (2022). HLA variation and antigen presentation in COVID-19 and SARS-CoV-2 infection. *Current Opinion in Immunology*, 76, 102178. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2022.102178>
12. Azzouzi, I., Moest, H., Wollscheid, B., Schmutz, M., Eckels, J. J. M., & Speer, O. (2015). Deep sequencing and proteomic analysis of the microRNA-induced silencing complex in human red blood cells. *Experimental Hematology*, 43(5), 382–392. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.01.007>
13. Badua, C. L. D. C., Baldo, K. A. T., & Medina, P. M. B. (2021). Genomic and proteomic mutation landscapes of SARS-CoV-2. *Journal of Medical Virology*, 93(3), 1702–1721. <https://doi.org/10.1002/jmv.26548>
14. Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P., & Bartel, D. P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455(7209), 64–71. <https://doi.org/10.1038/nature07242>
15. Bai, Z., Cao, Y., Liu, W., & Li, J. (2021). The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. *Viruses*, 13(6), 1115. <https://doi.org/10.3390/v13061115>
16. Bandopadhyay, M., & Bharadwaj, M. (2020). Exosomal miRNAs in hepatitis B virus related liver disease: A new hope for biomarker. *Gut Pathogens*, 12, 23. <https://doi.org/10.1186/s13099-020-00353-w>
17. Banerjee, A. K., Blanco, M. R., Bruce, E. A., Honson, D. D., Chen, L. M., Chow, A., Bhat, P., Ollikainen, N., Quinodoz, S. A., Loney, C., Thai, J., Miller, Z. D., Lin, A. E., Schmidt, M. M., Stewart, D. G., Goldfarb, D., De Lorenzo, G., Rihn, S. J., Voorhees, R. M., ... Guttman, M. (2020a). SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses. *Cell*, 183(5), 1325–1339.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.004>
18. Banerjee, A. K., Blanco, M. R., Bruce, E. A., Honson, D. D., Chen, L. M., Chow, A., Bhat, P., Ollikainen, N., Quinodoz, S. A., Loney, C., Thai, J., Miller, Z. D., Lin, A. E., Schmidt, M. M., Stewart, D. G., Goldfarb, D., De Lorenzo, G., Rihn, S. J., Voorhees, R. M., ... Guttman, M. (2020b). SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses. *Cell*, 183(5), 1325–1339.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.004>
19. Banerjee, A., Mossman, K., & Grandvaux, N. (2021). Molecular Determinants of SARS-CoV-2 Variants. *Trends in Microbiology*, 29(10), 871–873. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.07.002>
20. Bartoszewski, R., Dabrowski, M., Jakiela, B., Matalon, S., Harrod, K. S., Sanak, M., & Collawn, J. F. (2020). SARS-CoV-2 may regulate cellular responses through depletion of specific host miRNAs. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 319(3), L444–L455. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00252.2020>
21. Basso, K., Sumazin, P., Morozov, P., Schneider, C., Maute, R. L., Kitagawa, Y., Mandelbaum, J., Haddad, J., Chen, C.-Z., Califano, A., & Dalla-Favera, R. (2009). Identification of the human mature B cell miRNome. *Immunity*, 30(5), 744–752. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.03.017>
22. Bayart, J.-L., Douxfils, J., Gillot, C., David, C., Mullier, F., Elsen, M., Eucher, C., Van Eeckhoudt, S., Roy, T., Gerin, V., Wieers, G., Laurent, C., Closset, M., Do-

gné, J.-M., & Favresse, J. (2021). Waning of IgG, Total and Neutralizing Antibodies 6 Months Post-Vaccination with BNT162b2 in Healthcare Workers. *Vaccines*, 9(10), 1092. <https://doi.org/10.3390/vaccines9101092>

23. Bergamaschi, L., Mescia, F., Turner, L., Hanson, A. L., Kotagiri, P., Dunmore, B. J., Ruffieux, H., De Sa, A., Huhn, O., Morgan, M. D., Gerber, P. P., Wills, M. R., Baker, S., Calero-Nieto, F. J., Doffinger, R., Dougan, G., Elmer, A., Goodfellow, I. G., Gupta, R. K., ... Smith, K. G. C. (2021). Longitudinal analysis reveals that delayed bystander CD8+ T cell activation and early immune pathology distinguish severe COVID-19 from mild disease. *Immunity*, 54(6), 1257-1275.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.05.010>

24. Bieberich, F., Vazquez-Lombardi, R., Yermanos, A., Ehling, R. A., Mason, D. M., Wagner, B., Kapetanovic, E., Di Roberto, R. B., Weber, C. R., Savic, M., Rudolf, F., & Reddy, S. T. (2021). A Single-Cell Atlas of Lymphocyte Adaptive Immune Repertoires and Transcriptomes Reveals Age-Related Differences in Convalescent COVID-19 Patients. *Frontiers in Immunology*, 12, 701085. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.701085>

25. Bilich, T., Nelde, A., Heitmann, J. S., Maringer, Y., Roerden, M., Bauer, J., Rieth, J., Wacker, M., Peter, A., Hörber, S., Rachfalski, D., Märklin, M., Stevanović, S., Rammensee, H.-G., Salih, H. R., & Walz, J. S. (2021). T cell and antibody kinetics delineate SARS-CoV-2 peptides mediating long-term immune responses in COVID-19 convalescent individuals. *Science Translational Medicine*, 13(590), eabf7517. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abf7517>

26. Bissels, U., Wild, S., Tomiuk, S., Holste, A., Hafner, M., Tuschl, T., & Bosio, A. (2009). Absolute quantification of microRNAs by using a universal reference. *RNA*, 15(12), 2375–2384. <https://doi.org/10.1261/rna.1754109>

27. Boni, M. F., Lemey, P., Jiang, X., Lam, T. T.-Y., Perry, B. W., Castoe, T. A., Rambaut, A., & Robertson, D. L. (2020). Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Nature Microbiology*, 5(11), 1408–1417. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0771-4>

28. Boppana, S., Qin, K., Files, J. K., Russell, R. M., Stoltz, R., Bibollet-Ruche, F., Bansal, A., Erdmann, N., Hahn, B. H., & Goepfert, P. A. (2021). SARS-CoV-2-specific circulating T follicular helper cells correlate with neutralizing antibodies and increase during early convalescence. *PLoS Pathogens*, 17(7), e1009761. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009761>

29. Britanova, O. V., Putintseva, E. V., Shugay, M., Merzlyak, E. M., Turchaninova, M. A., Staroverov, D. B., Bolotin, D. A., Lukyanov, S., Bogdanova, E. A., Mamedov, I. Z., Lebedev, Y. B., & Chudakov, D. M. (2014). Age-Related Decrease in TCR Repertoire Diversity Measured with Deep and Normalized Sequence Profiling. *The Journal of Immunology*, 192(6), 2689–2698. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302064>

30. Brown, B. D., & Naldini, L. (2009). Exploiting and antagonizing microRNA regulation for therapeutic and experimental applications. *Nature Reviews. Genetics*, 10(8), 578–585. <https://doi.org/10.1038/nrg2628>

31. Bruscella, P., Bottini, S., Baudesson, C., Pawlotsky, J.-M., Feray, C., & Trabucchi, M. (2017). Viruses and miRNAs: More Friends than Foes. *Frontiers in Microbiology*, 8, 824. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00824>

32. Cai, Y., Zhang, J., Xiao, T., Peng, H., Sterling, S. M., Walsh, R. M., Rawson, S., Rits-Volloch, S., & Chen, B. (2020). Distinct conformational states of SARS-

CoV-2 spike protein. *Science* (New York, N.Y.), 369(6511), 1586–1592. <https://doi.org/10.1126/science.abd4251>

33. Campbell, G. R., To, R. K., Hanna, J., & Spector, S. A. (2021). SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, and HIV-1 derived ssRNA sequences activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages through a non-classical pathway. *iScience*, 24(4), 102295. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102295>

34. Cao, Y., Wang, J., Jian, F., Xiao, T., Song, W., Yisimayi, A., Huang, W., Li, Q., Wang, P., An, R., Wang, J., Wang, Y., Niu, X., Yang, S., Liang, H., Sun, H., Li, T., Yu, Y., Cui, Q., ... Xie, X. S. (2022). Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Nature*, 602(7898), 657–663. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04385-3>

35. Capistrano, K. J., Richner, J., Schwartz, J., Mukherjee, S. K., Shukla, D., & Naqvi, A. R. (2023). Host microRNAs exhibit differential propensity to interact with SARS-CoV-2 and variants of concern. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1869(2), 166612. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2022.166612>

36. Carabelli, A. M., Peacock, T. P., Thorne, L. G., Harvey, W. T., Hughes, J., COVID-19 Genomics UK Consortium, de Silva, T. I., Peacock, S. J., Barclay, W. S., de Silva, T. I., Towers, G. J., & Robertson, D. L. (2023). SARS-CoV-2 variant biology: Immune escape, transmission and fitness. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00841-7>

37. Carè, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M.-L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N. D., Elia, L., Latronico, M. V. G., Høydal, M., Autore, C., Russo, M. A., Dorn, G. W., Ellingsen, O., Ruiz-Lozano, P., Peterson, K. L., ... Condorelli, G. (2007). MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nature Medicine*, 13(5), 613–618. <https://doi.org/10.1038/nm1582>

38. Cele, S., Jackson, L., Houry, D. S., Khan, K., Moyo-Gwete, T., Tegally, H., San, J. E., Cromer, D., Scheepers, C., Amoako, D. G., Karim, F., Bernstein, M., Lustig, G., Archary, D., Smith, M., Ganga, Y., Jule, Z., Reedoy, K., Hwa, S.-H., ... Sigal, A. (2022). Omicron extensively but incompletely escapes Pfizer BNT162b2 neutralization. *Nature*, 602(7898), 654–656. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04387-1>

39. Cha, M. H., Regueiro, M., & Sandhu, D. S. (2020). Gastrointestinal and hepatic manifestations of COVID-19: A comprehensive review. *World Journal of Gastroenterology*, 26(19), 2323–2331. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i19.2323>

40. Chan, J. F.-W., Yuan, S., Kok, K.-H., To, K. K.-W., Chu, H., Yang, J., Xing, F., Liu, J., Yip, C. C.-Y., Poon, R. W.-S., Tsoi, H.-W., Lo, S. K.-F., Chan, K.-H., Poon, V. K.-M., Chan, W.-M., Ip, J. D., Cai, J.-P., Cheng, V. C.-C., Chen, H., ... Yuen, K.-Y. (2020). A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: A study of a family cluster. *The Lancet*, 395(10223), 514–523. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9)

41. Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., Wang, T., Zhang, X., Chen, H., Yu, H., Zhang, X., Zhang, M., Wu, S., Song, J., Chen, T., Han, M., Li, S., Luo, X., Zhao, J., & Ning, Q. (2020). Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(5), 2620–2629. <https://doi.org/10.1172/JCI137244>

42. Chen, R. E., Zhang, X., Case, J. B., Winkler, E. S., Liu, Y., VanBlargan, L. A., Liu, J., Errico, J. M., Xie, X., Suryadevara, N., Gilchuk, P., Zost, S. J., Tahan, S.,

- Droit, L., Turner, J. S., Kim, W., Schmitz, A. J., Thapa, M., Wang, D., ... Diamond, M. S. (2021). Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies. *Nature Medicine*, 27(4), 717–726. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01294-w>
43. Chen, S.-Y., Wang, Y., Telen, M. J., & Chi, J.-T. (2008). The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases. *PLoS One*, 3(6), e2360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002360>
44. Chen, Y.-M. A., Liang, S.-Y., Shih, Y.-P., Chen, C.-Y., Lee, Y.-M., Chang, L., Jung, S.-Y., Ho, M.-S., Liang, K.-Y., Chen, H.-Y., Chan, Y.-J., & Chu, D.-C. (2006). Epidemiological and genetic correlates of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in the hospital with the highest nosocomial infection rate in Taiwan in 2003. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(2), 359–365. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.2.359-365.2006>
45. Cho, A., Muecksch, F., Schaefer-Babajew, D., Wang, Z., Finkin, S., Gaebler, C., Ramos, V., Cipolla, M., Mendoza, P., Agudelo, M., Bednarski, E., DaSilva, J., Shimeliovich, I., Dizon, J., Daga, M., Millard, K. G., Turroja, M., Schmidt, F., Zhang, F., ... Nussenzweig, M. C. (2021). Anti-SARS-CoV-2 receptor-binding domain antibody evolution after mRNA vaccination. *Nature*, 600(7889), 517–522. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04060-7>
46. Choi, B., Choudhary, M. C., Regan, J., Sparks, J. A., Padera, R. F., Qiu, X., Solomon, I. H., Kuo, H.-H., Boucay, J., Bowman, K., Adhikari, U. D., Winkler, M. L., Mueller, A. A., Hsu, T. Y.-T., Desjardins, M., Baden, L. R., Chan, B. T., Walker, B. D., Lichterfeld, M., ... Li, J. Z. (2020). Persistence and Evolution of SARS-CoV-2 in an Immunocompromised Host. *New England Journal of Medicine*, 383(23), 2291–2293. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2031364>
47. Choi, G. J., Kim, H. M., & Kang, H. (2020). The Potential Role of Dyslipidemia in COVID-19 Severity: An Umbrella Review of Systematic Reviews. *Journal of Lipid and Atherosclerosis*, 9(3), 435–448. <https://doi.org/10.12997/jla.2020.9.3.435>
48. Choudhury, A., & Mukherjee, S. (2020). In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. *Journal of Medical Virology*, 92(10), 2105–2113. <https://doi.org/10.1002/jmv.25987>
49. Christgen, S., & Kanneganti, T.-D. (2020). Inflammasomes and the fine line between defense and disease. *Current Opinion in Immunology*, 62, 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.11.007>
50. Claussnitzer, M., Dankel, S. N., Kim, K.-H., Quon, G., Meuleman, W., Haugen, C., Glunk, V., Sousa, I. S., Beaudry, J. L., Puviondran, V., Abdennur, N. A., Liu, J., Svensson, P.-A., Hsu, Y.-H., Drucker, D. J., Mellgren, G., Hui, C.-C., Hauner, H., & Kellis, M. (2015). FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *New England Journal of Medicine*, 373(10), 895–907. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1502214>
51. Cock, P. J. A., Antao, T., Chang, J. T., Chapman, B. A., Cox, C. J., Dalke, A., Friedberg, I., Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B., & de Hoon, M. J. L. (2009). Biopython: Freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*, 25(11), 1422–1423. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp163>

52. Cohen, K. W., Linderman, S. L., Moodie, Z., Czartoski, J., Lai, L., Mantus, G., Norwood, C., Nyhoff, L. E., Edara, V. V., Floyd, K., De Rosa, S. C., Ahmed, H., Whaley, R., Patel, S. N., Prigmore, B., Lemos, M. P., Davis, C. W., Furth, S., O’Keefe, J. B., ... McElrath, M. J. (2021). Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells. *Cell Reports. Medicine*, 2(7), 100354. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100354>
53. Cohen, M. S., Nirula, A., Mulligan, M. J., Novak, R. M., Marovich, M., Yen, C., Stermer, A., Mayer, S. M., Wohl, D., Brengle, B., Montague, B. T., Frank, I., McCulloh, R. J., Fichtenbaum, C. J., Lipson, B., Gabra, N., Ramirez, J. A., Thai, C., Chege, W., ... BLAZE-2 Investigators. (2021). Effect of Bamlanivimab vs Placebo on Incidence of COVID-19 Among Residents and Staff of Skilled Nursing and Assisted Living Facilities: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 326(1), 46–55. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.8828>
54. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: Classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5(4), 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
55. Cortes, C., & Vapnik, V. (1995). Support-Vector Networks. *Machine Learning*, 20(3), 273–297. <https://doi.org/10.1023/A:1022627411411>
56. Corti, D., Purcell, L. A., Snell, G., & Veesler, D. (2021). Tackling COVID-19 with neutralizing monoclonal antibodies. *Cell*, 184(17), 4593–4595. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.07.027>
57. Cottam, E. M., Maier, H. J., Manifava, M., Vaux, L. C., Chandra-Schoenfelder, P., Gerner, W., Britton, P., Ktistakis, N. T., & Wileman, T. (2011). Coronavirus nsp6 proteins generate autophagosomes from the endoplasmic reticulum via an omegasome intermediate. *Autophagy*, 7(11), 1335–1347. <https://doi.org/10.4161/auto.7.11.16642>
58. Courouble, V. V., Dey, S. K., Yadav, R., Timm, J., Harrison, J. J. E. K., Ruiz, F. X., Arnold, E., & Griffin, P. R. (2021). Revealing the Structural Plasticity of SARS-CoV-2 nsp7 and nsp8 Using Structural Proteomics. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 32(7), 1618–1630. <https://doi.org/10.1021/jasms.1c00086>
59. COVID-19 Host Genetics Initiative, COVID-19 Host Genetics Initiative Leadership, Niemi, M. E. K., Karjalainen, J., Liao, R. G., Neale, B. M., Daly, M., Ganna, A., Writing group, Writing group leaders, Pathak, G. A., Andrews, S. J., Kanai, M., Writing group members, Veerapen, K., Fernandez-Cadenas, I., Schulte, E. C., Striano, P., Marttila, M., ... COVID-19 HGI corresponding authors. (2021). Mapping the human genetic architecture of COVID-19. *Nature*, 600(7889), 472–477. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03767-x>
60. Cui, J., You, C., & Chen, X. (2017). The evolution of microRNAs in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 35, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.11.006>
61. Cui, Z., Liu, P., Wang, N., Wang, L., Fan, K., Zhu, Q., Wang, K., Chen, R., Feng, R., Jia, Z., Yang, M., Xu, G., Zhu, B., Fu, W., Chu, T., Feng, L., Wang, Y., Pei, X., Yang, P., ... Wang, X. (2022). Structural and functional characterizations of infectivity and immune evasion of SARS-CoV-2 Omicron. *Cell*, 185(5), 860–871.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.019>

62. Curtis, H. J., Sibley, C. R., & Wood, M. J. A. (2012). Mirtrons, an emerging class of atypical miRNA. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(5), 617–632. <https://doi.org/10.1002/wrna.1122>
63. Dan, J. M., Mateus, J., Kato, Y., Hastie, K. M., Yu, E. D., Faliti, C. E., Grifoni, A., Ramirez, S. I., Haupt, S., Frazier, A., Nakao, C., Rayaprolu, V., Rawlings, S. A., Peters, B., Krammer, F., Simon, V., Saphire, E. O., Smith, D. M., Weiskopf, D., ... Crotty, S. (2021). Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*, 371(6529), eabf4063. <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>
64. Dearlove, B., Lewitus, E., Bai, H., Li, Y., Reeves, D. B., Joyce, M. G., Scott, P. T., Amare, M. F., Vasan, S., Michael, N. L., Modjarrad, K., & Rolland, M. (2020). A SARS-CoV-2 vaccine candidate would likely match all currently circulating variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(38), 23652–23662. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008281117>
65. Deng, G., Yin, M., Chen, X., & Zeng, F. (2020). Clinical determinants for fatality of 44,672 patients with COVID-19. *Critical Care*, 24(1), 179. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-02902-w>
66. Diamond, M. S., & Kanneganti, T.-D. (2022). Innate immunity: The first line of defense against SARS-CoV-2. *Nature Immunology*, 23(2), 165–176. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01091-0>
67. Diao, B., Wang, C., Tan, Y., Chen, X., Liu, Y., Ning, L., Chen, L., Li, M., Liu, Y., Wang, G., Yuan, Z., Feng, Z., Zhang, Y., Wu, Y., & Chen, Y. (2020). Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Frontiers in Immunology*, 11, 827. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00827>
68. Dougan, M., Nirula, A., Azizad, M., Mocherla, B., Gottlieb, R. L., Chen, P., Hebert, C., Perry, R., Boscia, J., Heller, B., Morris, J., Crystal, C., Igbinadolor, A., Huhn, G., Cardona, J., Shawa, I., Kumar, P., Adams, A. C., Van Naarden, J., ... BLAZE-1 Investigators. (2021). Bamlanivimab plus Etesevimab in Mild or Moderate Covid-19. *The New England Journal of Medicine*, 385(15), 1382–1392. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2102685>
69. Elbe, S., & Buckland-Merrett, G. (2017). Data, disease and diplomacy: GISAID's innovative contribution to global health. *Global Challenges*, 1(1), 33–46. <https://doi.org/10.1002/gch2.1018>
70. El-Kamand, S., Du Plessis, M.-D., Breen, N., Johnson, L., Beard, S., Kwan, A. H., Richard, D. J., Cubeddu, L., & Gamsjaeger, R. (2022). A distinct ssDNA/RNA binding interface in the Nsp9 protein from SARS-CoV-2. *Proteins*, 90(1), 176–185. <https://doi.org/10.1002/prot.26205>
71. Enkhbaatar, Z., Terashima, M., Oktyabri, D., Tange, S., Ishimura, A., Yano, S., & Suzuki, T. (2013). KDM5B histone demethylase controls epithelial-mesenchymal transition of cancer cells by regulating the expression of the microRNA-200 family. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(13), 2100–2112. <https://doi.org/10.4161/cc.25142>
72. Ernst, M. D. (2004). Permutation Methods: A Basis for Exact Inference. *Statistical Science*, 19(4), 676–685. <https://doi.org/10.1214/088342304000000396>
73. Fairbanks, V. F., Ziesmer, S. C., & O'Brien, P. C. (1992). Methods for measuring plasma hemoglobin in micromolar concentration compared. *Clinical Chemistry*, 38(1), 132–140.

74. Fan, X., Cao, D., Kong, L., & Zhang, X. (2020). Cryo-EM analysis of the post-fusion structure of the SARS-CoV spike glycoprotein. *Nature Communications*, 11(1), 3618. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17371-6>

75. Fang, Z., Xu, C., Li, Y., Cai, X., Ren, S., Liu, H., Wang, Y., Wang, F., Chen, R., Qu, M., Wang, Y., Zhu, Y., Zhang, W., Shi, X., Yao, J., Gao, X., Hou, J., Xu, C., & Sun, Y. (2016). A feed-forward regulatory loop between androgen receptor and PlncRNA-1 promotes prostate cancer progression. *Cancer Letters*, 374(1), 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.033>

76. Francis, J. M., Leistriz-Edwards, D., Dunn, A., Tarr, C., Lehman, J., Dempsey, C., Hamel, A., Rayon, V., Liu, G., Wang, Y., Wille, M., Durkin, M., Hadley, K., Sheena, A., Roscoe, B., Ng, M., Rockwell, G., Manto, M., Gienger, E., ... Pregibon, D. C. (2022). Allelic variation in class I HLA determines CD8+ T cell repertoire shape and cross-reactive memory responses to SARS-CoV-2. *Science Immunology*, 7(67), eabk3070. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abk3070>

77. Fröhlich, E., Mercuri, A., Wu, S., & Salar-Behzadi, S. (2016). Measurements of Deposition, Lung Surface Area and Lung Fluid for Simulation of Inhaled Compounds. *Frontiers in Pharmacology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00181>

78. Gaebler, C., Wang, Z., Lorenzi, J. C. C., Muecksch, F., Finkin, S., Tokuyama, M., Cho, A., Jankovic, M., Schaefer-Babajew, D., Oliveira, T. Y., Cipolla, M., Viant, C., Barnes, C. O., Bram, Y., Breton, G., Häggglöf, T., Mendoza, P., Hurley, A., Turroja, M., ... Nussenzweig, M. C. (2021). Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature*, 591(7851), 639–644. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03207-w>

79. Gaglia, M. M., Covarrubias, S., Wong, W., & Glaunsinger, B. A. (2012). A Common Strategy for Host RNA Degradation by Divergent Viruses. *Journal of Virology*, 86(17), 9527–9530. <https://doi.org/10.1128/JVI.01230-12>

80. Gagliardi, M. C., Tieri, P., Ortona, E., & Ruggieri, A. (2020). ACE2 expression and sex disparity in COVID-19. *Cell Death Discovery*, 6(1), 37. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0276-1>

81. Gajovic, N., Markovic, S. S., Jurisevic, M., Jovanovic, M., Arsenijevic, N., Mijailovic, Z., Jovanovic, M., & Jovanovic, I. (2023). Galectin-3 as an important prognostic marker for COVID-19 severity. *Scientific Reports*, 13(1), 1460. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28797-5>

82. Galatenko, V. V., Galatenko, A. V., Samatov, T. R., Turchinovich, A. A., Shkurnikov, M. Y., Makarova, J. A., & Tonevitsky, A. G. (2018). Comprehensive network of miRNA-induced intergenic interactions and a biological role of its core in cancer. *Scientific Reports*, 8(1), 2418. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20215-5>

83. Galatenko, V. V., Shkurnikov, M. Yu., Samatov, T. R., Galatenko, A. V., Mityakina, I. A., Kaprin, A. D., Schumacher, U., & Tonevitsky, A. G. (2015). Highly informative marker sets consisting of genes with low individual degree of differential expression. *Scientific Reports*, 5, 14967. <https://doi.org/10.1038/srep14967>

84. Ganai, S. A., Kalladi, S. M., & Mahadevan, V. (2015). HDAC inhibition through valproic acid modulates the methylation profiles in human embryonic kidney cells. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 33(6), 1185–1197. <https://doi.org/10.1080/07391102.2014.938247>

85. Ghosh, N., Nandi, S., & Saha, I. (2022). A review on evolution of emerging SARS-CoV-2 variants based on spike glycoprotein. *International Immunopharmacology*, 105, 108565. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108565>
86. Goh, S.-H., Josleyn, M., Lee, Y. T., Danner, R. L., Gherman, R. B., Cam, M. C., & Miller, J. L. (2007). The human reticulocyte transcriptome. *Physiological Genomics*, 30(2), 172–178. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00247.2006>
87. Gordon, D. E., Jang, G. M., Bouhaddou, M., Xu, J., Obernier, K., O’Meara, M. J., Guo, J. Z., Swaney, D. L., Tummino, T. A., Hüttenhain, R., Kaake, R. M., Richards, A. L., Tutuncuoglu, B., Foussard, H., Batra, J., Haas, K., Modak, M., Kim, M., Haas, P., ... Krogan, N. J. (2020a). A SARS-CoV-2-Human Protein-Protein Interaction Map Reveals Drug Targets and Potential Drug-Repurposing. *bioRxiv: The Preprint Server for Biology*, 2020.03.22.002386. <https://doi.org/10.1101/2020.03.22.002386>
88. Gordon, D. E., Jang, G. M., Bouhaddou, M., Xu, J., Obernier, K., White, K. M., O’Meara, M. J., Rezelj, V. V., Guo, J. Z., Swaney, D. L., Tummino, T. A., Hüttenhain, R., Kaake, R. M., Richards, A. L., Tutuncuoglu, B., Foussard, H., Batra, J., Haas, K., Modak, M., ... Krogan, N. J. (2020b). A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*, 583(7816), 459–468. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9>
89. Goulder, P. J. R., & Watkins, D. I. (2008). Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. *Nature Reviews Immunology*, 8(8), 619–630. <https://doi.org/10.1038/nri2357>
90. Grau-Expósito, J., Sánchez-Gaona, N., Massana, N., Suppi, M., Astorga-Gamaza, A., Perea, D., Rosado, J., Falcó, A., Kirkegaard, C., Torrella, A., Planas, B., Navarro, J., Suanzes, P., Álvarez-Sierra, D., Ayora, A., Sansano, I., Esperalba, J., Andrés, C., Antón, A., ... Genescà, M. (2021). Peripheral and lung resident memory T cell responses against SARS-CoV-2. *Nature Communications*, 12(1), 3010. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23333-3>
91. Grifoni, A., Weiskopf, D., Ramirez, S. I., Mateus, J., Dan, J. M., Moderbacher, C. R., Rawlings, S. A., Sutherland, A., Premkumar, L., Jadi, R. S., Marrama, D., de Silva, A. M., Frazier, A., Carlin, A. F., Greenbaum, J. A., Peters, B., Krammer, F., Smith, D. M., Crotty, S., & Sette, A. (2020). Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*, 181(7), 1489–1501.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>
92. Gudbjartsson, D. F., Norddahl, G. L., Melsted, P., Gunnarsdottir, K., Holm, H., Eythorsson, E., Arnthorsson, A. O., Helgason, D., Bjarnadottir, K., Ingvarsson, R. F., Thorsteinsdottir, B., Kristjansdottir, S., Birgisdottir, K., Kristinsdottir, A. M., Sigurdsson, M. I., Arnadottir, G. A., Ivarsdottir, E. V., Andresdottir, M., Jonsson, F., ... Stefansson, K. (2020). Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *New England Journal of Medicine*, 383(18), 1724–1734. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2026116>
93. Guo, X., Zhang, Q., Gao, L., Li, N., Chen, X., & Feng, W. (2013). Increasing expression of microRNA 181 inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication and has implications for controlling virus infection. *Journal of Virology*, 87(2), 1159–1171. <https://doi.org/10.1128/JVI.02386-12>
94. Gupta, K., Kaur, G., Pathak, T., & Banerjee, I. (2022). Systematic review and meta-analysis of human genetic variants contributing to COVID-19 susceptibility and severity. *Gene*, 844, 146790. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146790>

95. Guterres, A., de Azeredo Lima, C. H., Miranda, R. L., & Gadelha, M. R. (2020). What is the potential function of microRNAs as biomarkers and therapeutic targets in COVID-19? *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 85, 104417. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104417>
96. Haddad, H. & Walid Al-Zyoud. (2020). miRNA target prediction might explain the reduced transmission of SARS-CoV-2 in Jordan, Middle East. *Non-Coding RNA Research*, 5(3), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2020.08.002>
97. Hadjadj, J., Yatim, N., Barnabei, L., Corneau, A., Boussier, J., Smith, N., Péré, H., Charbit, B., Bondet, V., Chenevier-Gobeaux, C., Breillat, P., Carlier, N., Gauzit, R., Morbieu, C., Pène, F., Marin, N., Roche, N., Szwebel, T.-A., Merkling, S. H., ... Terrier, B. (2020). Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6504), 718–724. <https://doi.org/10.1126/science.abc6027>
98. Haldrup, C., Kosaka, N., Ochiya, T., Borre, M., Høyer, S., Orntoft, T. F., & Sorensen, K. D. (2014). Profiling of circulating microRNAs for prostate cancer biomarker discovery. *Drug Delivery and Translational Research*, 4(1), 19–30.
99. Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M., Lely, A., Navis, G., & van Goor, H. (2004). Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *The Journal of Pathology*, 203(2), 631–637. <https://doi.org/10.1002/path.1570>
100. Harmer, A., Mascaretti, L., & Petershofen, E. (2018). Accreditation of histocompatibility and immunogenetics laboratories: Achievements and future prospects from the European Federation for Immunogenetics Accreditation Programme. *HLA*, 92(2), 67–73. <https://doi.org/10.1111/tan.13289>
101. Hartenian, E., Nandakumar, D., Lari, A., Ly, M., Tucker, J. M., & Glaunsinger, B. A. (2020). The molecular virology of coronaviruses. *Journal of Biological Chemistry*, 295(37), 12910–12934. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.013930>
102. Hasenkrug, K. J., Feldmann, F., Myers, L., Santiago, M. L., Guo, K., Barrett, B. S., Mickens, K. L., Carmody, A., Okumura, A., Rao, D., Collins, M. M., Messer, R. J., Lovaglio, J., Shaia, C., Rosenke, R., van Doremalen, N., Clancy, C., Saturday, G., Hanley, P., ... Feldmann, H. (2021). Recovery from Acute SARS-CoV-2 Infection and Development of Anamnestic Immune Responses in T Cell-Depleted Rhesus Macaques. *mBio*, 12(4), e01503-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.01503-21>
103. Hassan, S. S., Choudhury, P. P., Dayhoff, G. W., Aljabali, A. A. A., Uhal, B. D., Lundstrom, K., Rezaei, N., Pizzol, D., Adadi, P., Lal, A., Soares, A., Mohamed Abd El-Aziz, T., Brufsky, A. M., Azad, G. K., Sherchan, S. P., Baetas-da-Cruz, W., Takayama, K., Serrano-Aroca, A., Chauhan, G., ... Uversky, V. N. (2022). The importance of accessory protein variants in the pathogenicity of SARS-CoV-2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 717, 109124. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2022.109124>
104. He, T., Feng, G., Chen, H., Wang, L., & Wang, Y. (2009). Identification of host encoded microRNAs interacting with novel swine-origin influenza A (H1N1) virus and swine influenza virus. *Bioinformatics*, 4(3), 112–118. <https://doi.org/10.6026/97320630004112>

105. He, X., Lau, E. H. Y., Wu, P., Deng, X., Wang, J., Hao, X., Lau, Y. C., Wong, J. Y., Guan, Y., Tan, X., Mo, X., Chen, Y., Liao, B., Chen, W., Hu, F., Zhang, Q., Zhong, M., Wu, Y., Zhao, L., ... Leung, G. M. (2020). Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nature Medicine*, 26(5), 672–675. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>
106. Hobert, O. (2008). Gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5871), 1785–1786. <https://doi.org/10.1126/science.1151651>
107. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., & Pöhlmann, S. (2020). A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Molecular Cell*, 78(4), 779-784.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.022>
108. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N.-H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020a). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
109. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N.-H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020b). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
110. Hosseini Rad SM, A., & McLellan, A. D. (2020). Implications of SARS-CoV-2 Mutations for Genomic RNA Structure and Host microRNA Targeting. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 4807. <https://doi.org/10.3390/ijms21134807>
111. Hovhannisyanyan, A., Madelian, V., Avagyan, S., Nazaretyan, M., Hyussyan, A., Sirunyan, A., Arakelyan, R., Manukyan, Z., Yepiskoposyan, L., Mayilyan, K. R., & Jordan, F. (2022). HLA-C*04:01 Affects HLA Class I Heterozygosity and Predicted Affinity to SARS-CoV-2 Peptides, and in Combination With Age and Sex of Armenian Patients Contributes to COVID-19 Severity. *Frontiers in Immunology*, 13, 769900. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.769900>
112. Hsu, J. C.-C., Laurent-Rolle, M., Pawlak, J. B., Wilen, C. B., & Cresswell, P. (2021). Translational shutdown and evasion of the innate immune response by SARS-CoV-2 NSP14 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(24), e2101161118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2101161118>
113. Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
114. Huang, J., Wang, F., Argyris, E., Chen, K., Liang, Z., Tian, H., Huang, W., Squires, K., Verlinghieri, G., & Zhang, H. (2007). Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nature Medicine*, 13(10), 1241–1247. <https://doi.org/10.1038/nm1639>
115. Huang, Y.-F., Zhang, Y., Liu, C.-X., Huang, J., & Ding, G.-H. (2016). microRNA-125b contributes to high glucose-induced reactive oxygen species generation and apoptosis in HK-2 renal tubular epithelial cells by targeting angiotensin-con-

verting enzyme 2. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20(19), 4055–4062.

116. Hukowska-Szematowicz, B., Maciejak-Jastrzębska, A., Blatkiewicz, M., Maciak, K., Góra, M., Janiszewska, J., & Burzyńska, B. (2020). Changes in MicroRNA Expression during Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV) Infection. *Viruses*, 12(9), 965. <https://doi.org/10.3390/v12090965>

117. Humphries, F., Shmuel-Galia, L., Jiang, Z., Wilson, R., Landis, P., Ng, S.-L., Parsi, K. M., Maehr, R., Cruz, J., Morales, A., Ramanjulu, J. M., Bertin, J., Pesiridis, G. S., & Fitzgerald, K. A. (2021). A diamidobenzimidazole STING agonist protects against SARS-CoV-2 infection. *Science Immunology*, 6(59), eabi9002. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abi9002>

118. Hurley, C. K., Kempenich, J., Wadsworth, K., Sauter, J., Hofmann, J. A., Schefzyk, D., Schmidt, A. H., Galarza, P., Cardozo, M. B. R., Dudkiewicz, M., Houdova, L., Jindra, P., Sorensen, B. S., Jagannathan, L., Mathur, A., Linjama, T., Torosian, T., Freudenberger, R., Manolis, A., ... Dehn, J. (2020). Common, intermediate and well- documented HLA alleles in world populations: CIWD version 3.0.0. *HLA*, 95(6), 516–531. <https://doi.org/10.1111/tan.13811>

119. Ibáñez-Ventoso, C., Vora, M., & Driscoll, M. (2008). Sequence Relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and Human microRNAs Highlight the Extensive Conservation of microRNAs in Biology. *PLoS ONE*, 3(7), e2818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002818>

120. Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., Huan, Y., Guo, F., Guan, B., Yang, P., Sarao, R., Wada, T., Leong-Poi, H., Crackower, M. A., Fukamizu, A., Hui, C.-C., Hein, L., Uhlig, S., Slutsky, A. S., Jiang, C., & Penninger, J. M. (2005). Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*, 436(7047), 112–116. <https://doi.org/10.1038/nature03712>

121. Ingle, H., Kumar, S., Raut, A. A., Mishra, A., Kulkarni, D. D., Kameyama, T., Takaoka, A., Akira, S., & Kumar, H. (2015). The microRNA miR-485 targets host and influenza virus transcripts to regulate antiviral immunity and restrict viral replication. *Science Signaling*, 8(406). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aab3183>

122. Iturrieta-Zuazo, I., Rita, C. G., García-Soidán, A., de Malet Pintos-Fonseca, A., Alonso-Alarcón, N., Pariente-Rodríguez, R., Tejeda-Velarde, A., Serrano-Villar, S., Castañer-Alabau, J. L., & Nieto-Gañán, I. (2020). Possible role of HLA class-I genotype in SARS-CoV-2 infection and progression: A pilot study in a cohort of Covid-19 Spanish patients. *Clinical Immunology*, 219, 108572. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108572>

123. Jaeger, A. M., Stopfer, L. E., Ahn, R., Sanders, E. A., Sandel, D. A., Freed-Pastor, W. A., Rideout, W. M., Naranjo, S., Fessenden, T., Nguyen, K. B., Winter, P. S., Kohn, R. E., Westcott, P. M. K., Schenkel, J. M., Shanahan, S.-L., Shalek, A. K., Spranger, S., White, F. M., & Jacks, T. (2022). Deciphering the immunopeptidome in vivo reveals new tumour antigens. *Nature*, 607(7917), 149–155. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04839-2>

124. Jafarinejad-Farsangi, S., Jazi, M. M., Rostamzadeh, F., & Hadizadeh, M. (2020). High affinity of host human microRNAs to SARS-CoV-2 genome: An in silico analysis. *Non-Coding RNA Research*, 5(4), 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2020.11.005>

125. Jain, R., Mallya, M. V., Amoncar, S., Palyekar, S., Adsul, H. P., Kumar, R., & Chawla, S. (2022). Seroprevalence of SARS-CoV-2 among potential convalescent plasma donors and analysis of their deferral pattern: Experience from tertiary care hospital in western India. *Transfusion Clinique et Biologique*, 29(1), 60–64. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2021.07.004>
126. Jin, L., Chen, M., Xiang, M., & Guo, Z. (2022). RNAi-Based Antiviral Innate Immunity in Plants. *Viruses*, 14(2), 432. <https://doi.org/10.3390/v14020432>
127. Johansson, M. A., Quandelacy, T. M., Kada, S., Prasad, P. V., Steele, M., Brooks, J. T., Slayton, R. B., Biggerstaff, M., & Butler, J. C. (2021). SARS-CoV-2 Transmission From People Without COVID-19 Symptoms. *JAMA Network Open*, 4(1), e2035057. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.35057>
128. Jung, J. H., Rha, M.-S., Sa, M., Choi, H. K., Jeon, J. H., Seok, H., Park, D. W., Park, S.-H., Jeong, H. W., Choi, W. S., & Shin, E.-C. (2021). SARS-CoV-2-specific T cell memory is sustained in COVID-19 convalescent patients for 10 months with successful development of stem cell-like memory T cells. *Nature Communications*, 12(1), 4043. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24377-1>
129. Jungers, C. F., & Djuranovic, S. (2022). Modulation of miRISC-Mediated Gene Silencing in Eukaryotes. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 832916. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.832916>
130. Kalimuddin, S., Tham, C. Y. L., Qui, M., de Alwis, R., Sim, J. X. Y., Lim, J. M. E., Tan, H.-C., Syenina, A., Zhang, S. L., Le Bert, N., Tan, A. T., Leong, Y. S., Yee, J. X., Ong, E. Z., Ooi, E. E., Bertoletti, A., & Low, J. G. (2021). Early T cell and binding antibody responses are associated with COVID-19 RNA vaccine efficacy onset. *Med (New York, N.Y.)*, 2(6), 682–688.e4. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2021.04.003>
131. Kanneganti, T.-D. (2020). Intracellular innate immune receptors: Life inside the cell. *Immunological Reviews*, 297(1), 5–12. <https://doi.org/10.1111/imr.12912>
132. Karki, R., & Kanneganti, T.-D. (2022). Innate immunity, cytokine storm, and inflammatory cell death in COVID-19. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 542. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03767-z>
133. Kaur, T., Kapila, S., Kapila, R., Kumar, S., Upadhyay, D., Kaur, M., & Sharma, C. (2021). Tmprss2 specific miRNAs as promising regulators for SARS-CoV-2 entry checkpoint. *Virus Research*, 294, 198275. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198275>
134. Kemp, S. A., Collier, D. A., Datir, R. P., Ferreira, I. A. T. M., Gayed, S., Jahun, A., Hosmillo, M., Rees-Spear, C., Mlcochova, P., Lumb, I. U., Roberts, D. J., Chandra, A., Temperton, N., CITIID-NIHR BioResource COVID-19 Collaboration, COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, Sharrocks, K., Blane, E., Modis, Y., Leigh, K. E., ... Gupta, R. K. (2021). SARS-CoV-2 evolution during treatment of chronic infection. *Nature*, 592(7853), 277–282. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03291-y>
135. Kemp, V., Laconi, A., Coccio, G., Berends, A. J., Breit, T. M., & Verheije, M. H. (2020). miRNA repertoire and host immune factor regulation upon avian coronavirus infection in eggs. *Archives of Virology*, 165(4), 835–843. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04527-4>
136. Khan, M. A.-A.-K., Sany, M. R. U., Islam, M. S., & Islam, A. B. M. M. K. (2020a). Epigenetic Regulator miRNA Pattern Differences Among SARS-CoV,

SARS-CoV-2, and SARS-CoV-2 World-Wide Isolates Delineated the Mystery Behind the Epic Pathogenicity and Distinct Clinical Characteristics of Pandemic COVID-19. *Frontiers in Genetics*, 11, 765. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00765>

137. Khan, Md. A.-A.-K., Sany, Md. R. U., Islam, Md. S., & Islam, A. B. M. Md. K. (2020b). Epigenetic Regulator miRNA Pattern Differences Among SARS-CoV, SARS-CoV-2, and SARS-CoV-2 World-Wide Isolates Delineated the Mystery Behind the Epic Pathogenicity and Distinct Clinical Characteristics of Pandemic COVID-19. *Frontiers in Genetics*, 11, 765. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00765>

138. Khoury, D. S., Cromer, D., Reynaldi, A., Schlub, T. E., Wheatley, A. K., Juno, J. A., Subbarao, K., Kent, S. J., Triccas, J. A., & Davenport, M. P. (2021). Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nature Medicine*, 27(7), 1205–1211. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01377-8>

139. Kim, D., Lee, J.-Y., Yang, J.-S., Kim, J. W., Kim, V. N., & Chang, H. (2020). The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*, 181(4), 914-921.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>

140. Kirschner, M. B., Kao, S. C., Edelman, J. J., Armstrong, N. J., Vallety, M. P., van Zandwijk, N., & Reid, G. (2011). Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PloS One*, 6(9), e24145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024145>

141. Klatte, N., Shields, D. C., & Agoni, C. (2022). Modelling the Transitioning of SARS-CoV-2 nsp3 and nsp4 Lumenal Regions towards a More Stable State on Complex Formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 720. <https://doi.org/10.3390/ijms24010720>

142. Klink, G., Safina, K., Nabieva, E., Shvyrev, N., Garushyants, S., Alekseeva, E., Komissarov, A., Danilenko, D., Pochtovyi, A., Divisenko, E., Vasilchenko, L., Shidlovskaya, E., Kuznetsova, N., Speranskaya, A., Samoilov, A., Neverov, A., Popova, A., Fedonin, G., Akimkin, V., ... Bazykin, G. (2022). The rise and spread of the SARS-CoV-2 AY.122 lineage in Russia. *Virus Evolution*, 8(1). <https://doi.org/10.1093/ve/veac017>

143. Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S. H. E. van den, Zevenhoven-Dobbe, J. C., van der Meer, Y., Koster, A. J., Mommaas, A. M., & Snijder, E. J. (2008). SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biology*, 6(9), e226. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060226>

144. Komatsu, S., Kitai, H., & Suzuki, H. I. (2023). Network Regulation of microRNA Biogenesis and Target Interaction. *Cells*, 12(2), 306. <https://doi.org/10.3390/cells12020306>

145. Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., Hengartner, N., Giorgi, E. E., Bhattacharya, T., Foley, B., Hastie, K. M., Parker, M. D., Partridge, D. G., Evans, C. M., Freeman, T. M., de Silva, T. I., Sheffield COVID-19 Genomics Group, McDanal, C., Perez, L. G., ... Montefiori, D. C. (2020). Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*, 182(4), 812-827.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043>

146. Kostka, K., Duarte-Salles, T., Prats-Urbe, A., Sena, A. G., Pistillo, A., Khalid, S., Lai, L. Y., Golozar, A., Alshammari, T. M., Dawoud, D. M., Nyberg, F., Wilcox, A. B., Andryc, A., Williams, A., Ostropolets, A., Areia, C., Jung, C. Y., Harle, C. A., Reich, C. G., ... Prieto-Alhambra, D. (2022). Unraveling COVID-19: A Large-

Scale Characterization of 4.5 Million COVID-19 Cases Using CHARYBDIS. *Clinical Epidemiology*, Volume 14, 369–384. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S323292>

147. Kowsar, R., Rahimi, A. M., Sroka, M., Mansouri, A., Sadeghi, K., Bonakdar, E., Kateb, S. F., & Mahdavi, A. H. (2023). Risk of mortality in COVID-19 patients: A meta- and network analysis. *Scientific Reports*, 13(1), 2138. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29364-8>

148. Krafcikova, P., Silhan, J., Nencka, R., & Boura, E. (2020). Structural analysis of the SARS-CoV-2 methyltransferase complex involved in RNA cap creation bound to sinefungin. *Nature Communications*, 11(1), 3717. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17495-9>

149. Krug, A. K., Kolde, R., Gaspar, J. A., Rempel, E., Balmer, N. V., Meganathan, K., Vojnits, K., Baquié, M., Waldmann, T., Ensenat-Waser, R., Jagtap, S., Evans, R. M., Julien, S., Peterson, H., Zagoura, D., Kadereit, S., Gerhard, D., Sotiriadou, I., Heke, M., ... Sachinidis, A. (2013). Human embryonic stem cell-derived test systems for developmental neurotoxicity: A transcriptomics approach. *Archives of Toxicology*, 87(1), 123–143. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0967-3>

150. Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Gao, H., Guo, F., Guan, B., Huan, Y., Yang, P., Zhang, Y., Deng, W., Bao, L., Zhang, B., Liu, G., Wang, Z., Chappell, M., Liu, Y., Zheng, D., Leibbrandt, A., Wada, T., ... Penninger, J. M. (2005). A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nature Medicine*, 11(8), 875–879. <https://doi.org/10.1038/nm1267>

151. Kumar, P., Kumar, A., Garg, N., & Giri, R. (2023). An insight into SARS-CoV-2 membrane protein interaction with spike, envelope, and nucleocapsid proteins. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(3), 1062–1071. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.2016490>

152. Kumar, V., Wijmenga, C., & Withoff, S. (2012). From genome-wide association studies to disease mechanisms: Celiac disease as a model for autoimmune diseases. *Seminars in Immunopathology*, 34(4), 567–580. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0312-1>

153. Kunej, T., Godnic, I., Ferdin, J., Horvat, S., Dovc, P., & Calin, G. A. (2011). Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: An integrated review of literature. *Mutation Research*, 717(1–2), 77–84.

154. Kuri-Cervantes, L., Pampena, M. B., Meng, W., Rosenfeld, A. M., Ittner, C. A. G., Weisman, A. R., Agyekum, R. S., Mathew, D., Baxter, A. E., Vella, L. A., Kuthuru, O., Apostolidis, S. A., Bershaw, L., Dougherty, J., Greenplate, A. R., Pattekar, A., Kim, J., Han, N., Gouma, S., ... Betts, M. R. (2020). Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Science Immunology*, 5(49), eabd7114. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abd7114>

155. Lacasse, É., Gudimard, L., Dubuc, I., Gravel, A., Allaeys, I., Boilard, É., & Flamand, L. (2023). SARS-CoV-2 Nsp2 Contributes to Inflammation by Activating NF-κB. *Viruses*, 15(2), 334. <https://doi.org/10.3390/v15020334>

156. Ladewig, E., Okamura, K., Flynt, A. S., Westholm, J. O., & Lai, E. C. (2012). Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome Research*, 22(9), 1634–1645. <https://doi.org/10.1101/gr.133553.111>

157. Lai, F. W., Stephenson, K. B., Mahony, J., & Lichty, B. D. (2014a). Human coronavirus OC43 nucleocapsid protein binds microRNA 9 and potentiates NF-κB activation. *Journal of Virology*, 88(1), 54–65. <https://doi.org/10.1128/JVI.02678-13>

158. Lai, F. W., Stephenson, K. B., Mahony, J., & Lichty, B. D. (2014b). Human coronavirus OC43 nucleocapsid protein binds microRNA 9 and potentiates NF- κ B activation. *Journal of Virology*, 88(1), 54–65. <https://doi.org/10.1128/JVI.02678-13>
159. Laing, A. G., Lorenc, A., del Molino del Barrio, I., Das, A., Fish, M., Monin, L., Muñoz-Ruiz, M., McKenzie, D. R., Hayday, T. S., Francos-Quijorna, I., Kamdar, S., Joseph, M., Davies, D., Davis, R., Jennings, A., Zlatareva, I., Vantourout, P., Wu, Y., Sofra, V., ... Hayday, A. C. (2020). A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nature Medicine*, 26(10), 1623–1635. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1038-6>
160. Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L., & Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 581(7807), 215–220. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>
161. Langton, D. J., Bourke, S. C., Lie, B. A., Reiff, G., Natu, S., Darlay, R., Burn, J., & Echevarria, C. (2021). The influence of HLA genotype on the severity of COVID-19 infection. *HLA*, 98(1), 14–22. <https://doi.org/10.1111/tan.14284>
162. Laporte, M., & Naesens, L. (2017). Airway proteases: An emerging drug target for influenza and other respiratory virus infections. *Current Opinion in Virology*, 24, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.018>
163. Le Bert, N., Clapham, H. E., Tan, A. T., Chia, W. N., Tham, C. Y. L., Lim, J. M., Kunasegaran, K., Tan, L. W. L., Dutertre, C.-A., Shankar, N., Lim, J. M. E., Sun, L. J., Zahari, M., Tun, Z. M., Kumar, V., Lim, B. L., Lim, S. H., Chia, A., Tan, Y.-J., ... Tam, C. C. (2021). Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 218(5), e20202617. <https://doi.org/10.1084/jem.20202617>
164. Le Bert, N., Tan, A. T., Kunasegaran, K., Tham, C. Y. L., Hafezi, M., Chia, A., Chng, M. H. Y., Lin, M., Tan, N., Linster, M., Chia, W. N., Chen, M. I.-C., Wang, L.-F., Ooi, E. E., Kalimuddin, S., Tambyah, P. A., Low, J. G.-H., Tan, Y.-J., & Bertoletti, A. (2020). SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*, 584(7821), 457–462. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>
165. Lee, S., Channappanavar, R., & Kanneganti, T.-D. (2020). Coronaviruses: Innate Immunity, Inflammasome Activation, Inflammatory Cell Death, and Cytokines. *Trends in Immunology*, 41(12), 1083–1099. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.005>
166. Lei, X., Dong, X., Ma, R., Wang, W., Xiao, X., Tian, Z., Wang, C., Wang, Y., Li, L., Ren, L., Guo, F., Zhao, Z., Zhou, Z., Xiang, Z., & Wang, J. (2020). Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. *Nature Communications*, 11(1), 3810. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17665-9>
167. Leon-Icaza, S. A., Zeng, M., & Rosas-Taraco, A. G. (2019). microRNAs in viral acute respiratory infections: Immune regulation, biomarkers, therapy, and vaccines. *ExRNA*, 1(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s41544-018-0004-7>
168. Letko, M., Marzi, A., & Munster, V. (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nature Microbiology*, 5(4), 562–569. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y>
169. Li, B., Tang, Q., Cheng, D., Qin, C., Xie, F. Y., Wei, Q., Xu, J., Liu, Y., Zheng, B., Woodle, M. C., Zhong, N., & Lu, P. Y. (2005). Using siRNA in prophylac-

tic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nature Medicine*, 11(9), 944–951. <https://doi.org/10.1038/nm1280>

170. Li, C., Hu, X., Li, L., & Li, J.-H. (2020). Differential microRNA expression in the peripheral blood from human patients with COVID-19. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(10), e23590. <https://doi.org/10.1002/jcla.23590>

171. Li, C., Wang, R., Wu, A., Yuan, T., Song, K., Bai, Y., & Liu, X. (2022). SARS-CoV-2 as potential microRNA sponge in COVID-19 patients. *BMC Medical Genomics*, 15(S2), 94. <https://doi.org/10.1186/s12920-022-01243-7>

172. Li, F. (2013). Receptor recognition and cross-species infections of SARS coronavirus. *Antiviral Research*, 100(1), 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.08.014>

173. Li, F. (2016). Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual Review of Virology*, 3(1), 237–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>

174. Li, L., Gao, F., Jiang, Y., Yu, L., Zhou, Y., Zheng, H., Tong, W., Yang, S., Xia, T., Qu, Z., & Tong, G. (2015). Cellular miR-130b inhibits replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, 5, 17010. <https://doi.org/10.1038/srep17010>

175. Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., Ren, R., Leung, K. S. M., Lau, E. H. Y., Wong, J. Y., Xing, X., Xiang, N., Wu, Y., Li, C., Chen, Q., Li, D., Liu, T., Zhao, J., Liu, M., ... Feng, Z. (2020). Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 382(13), 1199–1207. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>

176. Li, Y., Lu, J., Han, Y., Fan, X., & Ding, S.-W. (2013). RNA Interference Functions as an Antiviral Immunity Mechanism in Mammals. *Science*, 342(6155), 231–234. <https://doi.org/10.1126/science.1241911>

177. Lima-Junior, J. da C., & Pratt-Riccio, L. R. (2016). Major histocompatibility complex and malaria: Focus on *Plasmodium vivax* Infection. *Frontiers in Immunology*, 7(JAN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00013>

178. Lin, J., Wang, Z., Wang, J., & Yang, Q. (2019). Microarray analysis of infectious bronchitis virus infection of chicken primary dendritic cells. *BMC Genomics*, 20(1), 557. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5940-6>

179. Lin, M., Tseng, H.-K., Trejaut, J. A., Lee, H.-L., Loo, J.-H., Chu, C.-C., Chen, P.-J., Su, Y.-W., Lim, K. H., Tsai, Z.-U., Lin, R.-Y., Lin, R.-S., & Huang, C.-H. (2003). Association of HLA class I with severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *BMC Medical Genetics*, 4, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-4-9>

180. Littler, D. R., Gully, B. S., Colson, R. N., & Rossjohn, J. (2020). Crystal Structure of the SARS-CoV-2 Non-structural Protein 9, Nsp9. *iScience*, 23(7), 101258. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101258>

181. Liu, L., Wang, P., Nair, M. S., Yu, J., Rapp, M., Wang, Q., Luo, Y., Chan, J. F.-W., Sahi, V., Figueroa, A., Guo, X. V., Cerutti, G., Bimela, J., Gorman, J., Zhou, T., Chen, Z., Yuen, K.-Y., Kwong, P. D., Sodroski, J. G., ... Ho, D. D. (2020). Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*, 584(7821), 450–456. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2571-7>

182. Liu, L., Wei, Q., Lin, Q., Fang, J., Wang, H., Kwok, H., Tang, H., Nishiura, K., Peng, J., Tan, Z., Wu, T., Cheung, K.-W., Chan, K.-H., Alvarez, X., Qin, C., Lack-

- ner, A., Perlman, S., Yuen, K.-Y., & Chen, Z. (2019). Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. *JCI Insight*, 4(4), e123158, 123158. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.123158>
183. Liu, Q., Du, J., Yu, X., Xu, J., Huang, F., Li, X., Zhang, C., Li, X., Chang, J., Shang, D., Zhao, Y., Tian, M., Lu, H., Xu, J., Li, C., Zhu, H., Jin, N., & Jiang, C. (2017). miRNA-200c-3p is crucial in acute respiratory distress syndrome. *Cell Discovery*, 3, 17021. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2017.21>
184. Liu, X., Wang, Y., Sun, Q., Yan, J., Huang, J., Zhu, S., & Yu, J. (2012). Identification of microRNA transcriptome involved in human natural killer cell activation. *Immunology Letters*, 143(2), 208–217.
185. Liu, Y., Liu, J., Plante, K. S., Plante, J. A., Xie, X., Zhang, X., Ku, Z., An, Z., Scharton, D., Schindewolf, C., Widen, S. G., Menachery, V. D., Shi, P.-Y., & Weaver, S. C. (2022). The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 infection and transmission. *Nature*, 602(7896), 294–299. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04245-0>
186. Liu, Z., VanBlargan, L. A., Bloyet, L.-M., Rothlauf, P. W., Chen, R. E., Stumpf, S., Zhao, H., Errico, J. M., Theel, E. S., Liebeskind, M. J., Alford, B., Buchser, W. J., Ellebedy, A. H., Fremont, D. H., Diamond, M. S., & Whelan, S. P. J. (2021). Identification of SARS-CoV-2 spike mutations that attenuate monoclonal and serum antibody neutralization. *Cell Host & Microbe*, 29(3), 477-488.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.01.014>
187. Lok, S.-M. (2021). An NTD supersite of attack. *Cell Host & Microbe*, 29(5), 744–746. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.04.010>
188. Lopez-Gomollon, S., & Baulcombe, D. C. (2022). Roles of RNA silencing in viral and non-viral plant immunity and in the crosstalk between disease resistance systems. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(10), 645–662. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00496-5>
189. Lorente, L., Martín, M. M., Franco, A., Barrios, Y., Cáceres, J. J., Solé-Violán, J., Perez, A., Marcos y Ramos, J. A., Ramos-Gómez, L., Ojeda, N., Jiménez, A., Lorente, L., Franco, A., Barrios, Y., Perez, A., Jiménez, A., Pérez-Cejas, A., Pérez-Llombet, A., Uribe, L., ... Ortiz-López, R. (2021). HLA genetic polymorphisms and prognosis of patients with COVID-19. *Medicina Intensiva*, 45(2), 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2020.08.004>
190. Low, Z. Y., Zabidi, N. Z., Yip, A. J. W., Puniyamurti, A., Chow, V. T. K., & Lal, S. K. (2022). SARS-CoV-2 Non-Structural Proteins and Their Roles in Host Immune Evasion. *Viruses*, 14(9), 1991. <https://doi.org/10.3390/v14091991>
191. Lu, L., Mok, B. W. Y., Chen, L. L., Chan, J. M. C., Tsang, O. T. Y., Lam, B. H. S., Chuang, V. W. M., Chu, A. W. H., Chan, W. M., Ip, J. D., Chan, B. P. C., Zhang, R., Yip, C. C. Y., Cheng, V. C. C., Chan, K. H., Jin, D. Y., Hung, I. F. N., Yuen, K. Y., Chen, H., & To, K. K. W. (2022). Neutralization of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Omicron Variant by Sera From BNT162b2 or CoronaVac Vaccine Recipients. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 75(1), e822–e826. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab1041>
192. Lucas, C., Klein, J., Sundaram, M. E., Liu, F., Wong, P., Silva, J., Mao, T., Oh, J. E., Mohanty, S., Huang, J., Tokuyama, M., Lu, P., Venkataraman, A., Park, A., Israelow, B., Vogels, C. B. F., Muenker, M. C., Chang, C.-H., Casanovas-Masana, A., ... Iwasaki, A. (2021). Delayed production of neutralizing antibodies

correlates with fatal COVID-19. *Nature Medicine*, 27(7), 1178–1186. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01355-0>

193. Lucas, C., Wong, P., Klein, J., Castro, T. B. R., Silva, J., Sundaram, M., El-lingson, M. K., Mao, T., Oh, J. E., Israelow, B., Takahashi, T., Tokuyama, M., Lu, P., Venkataraman, A., Park, A., Mohanty, S., Wang, H., Wyllie, A. L., Vogels, C. B. F., ... Iwasaki, A. (2020). Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*, 584(7821), 463–469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2588-y>

194. Lukassen, S., Chua, R. L., Trefzer, T., Kahn, N. C., Schneider, M. A., Muley, T., Winter, H., Meister, M., Veith, C., Boots, A. W., Hennig, B. P., Kreuter, M., Conrad, C., & Eils, R. (2020). SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *The EMBO Journal*, 39(10), e105114. <https://doi.org/10.15252/embj.20105114>

195. Lukiw, W. J. (2021). microRNA Heterogeneity, Innate-Immune Defense and the Efficacy of SARS-CoV-2 Infection—A Commentary. *Non-Coding RNA*, 7(2), 37. <https://doi.org/10.3390/ncrna7020037>

196. Lumley, S. F., O'Donnell, D., Stoesser, N. E., Matthews, P. C., Howarth, A., Hatch, S. B., Marsden, B. D., Cox, S., James, T., Warren, F., Peck, L. J., Ritter, T. G., de Toledo, Z., Warren, L., Axten, D., Cornall, R. J., Jones, E. Y., Stuart, D. I., Screatton, G., ... Eyre, D. W. (2021). Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers. *New England Journal of Medicine*, 384(6), 533–540. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034545>

197. Ma, X., Zhao, X., Zhang, Z., Guo, J., Guan, L., Li, J., Mi, M., Huang, Y., & Tong, D. (2018). Differentially expressed non-coding RNAs induced by transmissible gastroenteritis virus potentially regulate inflammation and NF- κ B pathway in porcine intestinal epithelial cell line. *BMC Genomics*, 19(1), 747. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5128-5>

198. Ma, Y., Wu, L., Shaw, N., Gao, Y., Wang, J., Sun, Y., Lou, Z., Yan, L., Zhang, R., & Rao, Z. (2015). Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14–nsp10 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(30), 9436–9441. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508686112>

199. MacDonald, K. S., Fowke, K. R., Kimani, J., Dunand, V. A., Nagelkerke, N. J. D., Ball, T. B., Oyugi, J., Njagi, E., Gaur, L. K., Brunham, R. C., Wade, J., Luscher, M. A., Krausa, P., Rowland-Jones, S., Ngugi, E., Bwayo, J. J., & Plummer, F. A. (2000). Influence of HLA Supertypes on Susceptibility and Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1581–1589. <https://doi.org/10.1086/315472>

200. MacLean, O. A., Lytras, S., Weaver, S., Singer, J. B., Boni, M. F., Lemey, P., Kosakovsky Pond, S. L., & Robertson, D. L. (2021). Natural selection in the evolution of SARS-CoV-2 in bats created a generalist virus and highly capable human pathogen. *PLoS Biology*, 19(3), e3001115. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001115>

201. Magee, R. G., Telonis, A. G., Loher, P., Londin, E., & Rigoutsos, I. (2018). Profiles of miRNA Isoforms and tRNA Fragments in Prostate Cancer. *Scientific Reports*, 8(1), 5314. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22488-2>

202. Mahapatra, S. R., Sahoo, S., Dehury, B., Raina, V., Patro, S., Misra, N., & Suar, M. (2020). Designing an efficient multi-epitope vaccine displaying interactions

with diverse HLA molecules for an efficient humoral and cellular immune response to prevent COVID-19 infection. *Expert Review of Vaccines*, 19(9), 871–885. <https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1811091>

203. Makarova, J., Turchinovich, A., Shkurnikov, M., & Tonevitsky, A. (2021). Extracellular miRNAs and Cell–Cell Communication: Problems and Prospects. *Trends in Biochemical Sciences*, 46(8), 640–651. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.01.007>

204. Mallapaty, S. (2022). Where did Omicron come from? Three key theories. *Nature*, 602(7895), 26–28. <https://doi.org/10.1038/d41586-022-00215-2>

205. Mallick, B., Ghosh, Z., & Chakrabarti, J. (2009). MicroRNome Analysis Unravels the Molecular Basis of SARS Infection in Bronchoalveolar Stem Cells. *PLoS ONE*, 4(11), e7837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007837>

206. Maltseva, D. V., Galatenko, V. V., Samatov, T. R., Zhikrivetskaya, S. O., Khaustova, N. A., Nechaev, I. N., Shkurnikov, M. U., Lebedev, A. E., Mityakina, I. A., Kaprin, A. D., Schumacher, U., & Tonevitsky, A. G. (2014). miRNome of inflammatory breast cancer. *BMC Research Notes*, 7, 871. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-871>

207. Manik, M., & Singh, R. K. (2022). Role of toll- like receptors in modulation of cytokine storm signaling in SARS- CoV- 2- induced COVID- 19. *Journal of Medical Virology*, 94(3), 869–877. <https://doi.org/10.1002/jmv.27405>

208. Mannar, D., Saville, J. W., Zhu, X., Srivastava, S. S., Berezuk, A. M., Tuttle, K. S., Marquez, A. C., Sekirov, I., & Subramaniam, S. (2022). SARS-CoV-2 Omicron variant: Antibody evasion and cryo-EM structure of spike protein-ACE2 complex. *Science (New York, N.Y.)*, 375(6582), 760–764. <https://doi.org/10.1126/science.abn7760>

209. Martin-Sancho, L., Lewinski, M. K., Pache, L., Stoneham, C. A., Yin, X., Becker, M. E., Pratt, D., Churas, C., Rosenthal, S. B., Liu, S., Weston, S., De Jesus, P. D., O'Neill, A. M., Gounder, A. P., Nguyen, C., Pu, Y., Curry, H. M., Oom, A. L., Miorin, L., ... Chanda, S. K. (2021). Functional landscape of SARS-CoV-2 cellular restriction. *Molecular Cell*, 81(12), 2656–2668.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.04.008>

210. Mathew, D., Giles, J. R., Baxter, A. E., Oldridge, D. A., Greenplate, A. R., Wu, J. E., Alanio, C., Kuri-Cervantes, L., Pampena, M. B., D'Andrea, K., Manne, S., Chen, Z., Huang, Y. J., Reilly, J. P., Weisman, A. R., Ittner, C. A. G., Kuthuru, O., Dougherty, J., Nzingha, K., ... Wherry, E. J. (2020). Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6508), eabc8511. <https://doi.org/10.1126/science.abc8511>

211. Matsuoka, K., Imahashi, N., Ohno, M., Ode, H., Nakata, Y., Kubota, M., Sugimoto, A., Imahashi, M., Yokomaku, Y., & Iwatani, Y. (2022). SARS-CoV-2 accessory protein ORF8 is secreted extracellularly as a glycoprotein homodimer. *Journal of Biological Chemistry*, 298(3), 101724. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101724>

212. Maurice, N. J., Taber, A. K., & Prlic, M. (2021). The Ugly Duckling Turned to Swan: A Change in Perception of Bystander-Activated Memory CD8 T Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 206(3), 455–462. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000937>

213. Mazzaccaro, R. J., Gedde, M., Jensen, E. R., Van Santen, H. M., Ploegh, H. L., Rock, K. L., & Bloom, B. R. (1996). Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by *Mycobacterium tuberculosis* infection.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93(21), 11786–11791. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11786>

214. McCallum, M., Czudnochowski, N., Rosen, L. E., Zepeda, S. K., Bowen, J. E., Walls, A. C., Hauser, K., Joshi, A., Stewart, C., Dillen, J. R., Powell, A. E., Croll, T. I., Nix, J., Virgin, H. W., Corti, D., Snell, G., & Veesler, D. (2022). Structural basis of SARS-CoV-2 Omicron immune evasion and receptor engagement. *Science (New York, N.Y.)*, 375(6583), 864–868. <https://doi.org/10.1126/science.abn8652>

215. McGroder, C. F., Zhang, D., Choudhury, M. A., Salvatore, M. M., D'Souza, B. M., Hoffman, E. A., Wei, Y., Baldwin, M. R., & Garcia, C. K. (2021). Pulmonary fibrosis 4 months after COVID-19 is associated with severity of illness and blood leucocyte telomere length. *Thorax*, 76(12), 1242–1245. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2021-217031>

216. McMahan, K., Yu, J., Mercado, N. B., Loos, C., Tostanoski, L. H., Chandrashekar, A., Liu, J., Peter, L., Atyeo, C., Zhu, A., Bondzie, E. A., Dagotto, G., Gebre, M. S., Jacob-Dolan, C., Li, Z., Nampanya, F., Patel, S., Pessaint, L., Van Ry, A., ... Barouch, D. H. (2021). Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*, 590(7847), 630–634. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03041-6>

217. Mercey, O., Popa, A., Cavard, A., Paquet, A., Chevalier, B., Pons, N., Magnone, V., Zangari, J., Brest, P., Zaragosi, L.-E., Ponzio, G., Lebrigand, K., Barbry, P., & Marcet, B. (2017). Characterizing isomiR variants within the microRNA-34/449 family. *FEBS Letters*, 591(5), 693–705. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12595>

218. Migliorini, F., Torsiello, E., Spiezia, F., Oliva, F., Tingart, M., & Maffulli, N. (2021). Association between HLA genotypes and COVID-19 susceptibility, severity and progression: A comprehensive review of the literature. *European Journal of Medical Research*, 26(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s40001-021-00563-1>

219. Mitra, D., Das, P. M., Huynh, F. C., & Jones, F. E. (2011). Jumonji/ARID1 B (JARID1B) protein promotes breast tumor cell cycle progression through epigenetic repression of microRNA let-7e. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(47), 40531–40535. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.304865>

220. Mohan, J., & Wollert, T. (2021). Membrane remodeling by SARS-CoV-2—Double-enveloped viral replication. *Faculty Reviews*, 10, 17. <https://doi.org/10.12703/r/10-17>

221. Molodtsov, I. A., Kegeles, E., Mitin, A. N., Mityaeva, O., Musatova, O. E., Panova, A. E., Pashenkov, M. V., Peshkova, I. O., Alsalloum, A., Asaad, W., Budikhina, A. S., Deryabin, A. S., Dolzhikova, I. V., Filimonova, I. N., Gracheva, A. N., Ivanova, O. I., Kizilova, A., Komogorova, V. V., Komova, A., ... Vasilieva, E. (2022). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)—Specific T Cells and Antibodies in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Protection: A Prospective Study. *Clinical Infectious Diseases*, 75(1), e1–e9. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac278>

222. Morin, R. D., O'Connor, M. D., Griffith, M., Kuchenbauer, F., Delaney, A., Prabhu, A.-L., Zhao, Y., McDonald, H., Zeng, T., Hirst, M., Eaves, C. J., & Marra, M. A. (2008). Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Research*, 18(4), 610–621. <https://doi.org/10.1101/gr.7179508>

223. Naidu, S. A. G., Tripathi, Y. B., Shree, P., Clemens, R. A., & Naidu, A. S. (2021). Phytonutrient Inhibitors of SARS-CoV-2/NSP5-Encoded Main Protease (M

pro) Autocleavage Enzyme Critical for COVID-19 Pathogenesis. *Journal of Dietary Supplements*, 1–28. <https://doi.org/10.1080/19390211.2021.2006388>

224. Nelson, P. T., Wang, W.-X., & Rajeev, B. W. (2008). MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 18(1), 130–138. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00120.x>

225. Nersisyan, S., Engibaryan, N., Gorbonos, A., Kirdey, K., Makhonin, A., & Tonevitsky, A. (2020). Potential role of cellular miRNAs in coronavirus-host interplay. *PeerJ*, 8, e9994. <https://doi.org/10.7717/peerj.9994>

226. Nersisyan, S., Shkurnikov, M., Turchinovich, A., Knyazev, E., & Tonevitsky, A. (2020a). Integrative analysis of miRNA and mRNA sequencing data reveals potential regulatory mechanisms of ACE2 and TMPRSS2. *PloS One*, 15(7), e0235987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235987>

227. Nersisyan, S., Shkurnikov, M., Turchinovich, A., Knyazev, E., & Tonevitsky, A. (2020b). Integrative analysis of miRNA and mRNA sequencing data reveals potential regulatory mechanisms of ACE2 and TMPRSS2. *PLOS ONE*, 15(7), e0235987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235987>

228. Nersisyan, S., Zhiyanov, A., Shkurnikov, M., & Tonevitsky, A. (2022). T-CoV: a comprehensive portal of HLA-peptide interactions affected by SARS-CoV-2 mutations. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D883–D887. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab701>

229. Newman, J. A., Douangamath, A., Yadzani, S., Yosaatmadja, Y., Aimon, A., Brandão-Neto, J., Dunnett, L., Gorrie-stone, T., Skyner, R., Fearon, D., Schapira, M., von Delft, F., & Gileadi, O. (2021). Structure, mechanism and crystallographic fragment screening of the SARS-CoV-2 NSP13 helicase. *Nature Communications*, 12(1), 4848. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25166-6>

230. Ng, M. H. L., Lau, K.-M., Li, L., Cheng, S.-H., Chan, W. Y., Hui, P. K., Zee, B., Leung, C.-B., & Sung, J. J. Y. (2004). Association of human-leukocyte-antigen class I (B*0703) and class II (DRB1*0301) genotypes with susceptibility and resistance to the development of severe acute respiratory syndrome. *The Journal of Infectious Diseases*, 190(3), 515–518. <https://doi.org/10.1086/421523>

231. Nielsen, S. S., Vibholm, L. K., Monrad, I., Olesen, R., Frattari, G. S., Pahun, M. H., Højen, J. F., Gunst, J. D., Erikstrup, C., Holleufer, A., Hartmann, R., Østergaard, L., Søgaard, O. S., Schleimann, M. H., & Tolstrup, M. (2021). SARS-CoV-2 elicits robust adaptive immune responses regardless of disease severity. *EBioMedicine*, 68, 103410. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103410>

232. Notarbartolo, S., Ranzani, V., Bandera, A., Gruarin, P., Bevilacqua, V., Putignano, A. R., Gobbini, A., Galeota, E., Manara, C., Bombaci, M., Pesce, E., Zagato, E., Favalli, A., Sarnicola, M. L., Curti, S., Crosti, M., Martinovic, M., Fabbris, T., Marini, F., ... Abrignani, S. (2021). Integrated longitudinal immunophenotypic, transcriptional and repertoire analyses delineate immune responses in COVID-19 patients. *Science Immunology*, 6(62), eabg5021. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abg5021>

233. Ochoa, E. E., Huda, R., Scheibel, S. F., Nichols, J. E., Mock, D. J., El-Daher, N., Domurat, F. M., & Roberts, N. J. (2020). HLA-associated protection of lymphocytes during influenza virus infection. *Virology Journal*, 17(1), 128. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01406-x>

234. O'Donnell, T. J., Rubinsteyn, A., Bonsack, M., Riemer, A. B., Laserson, U., & Hammerbacher, J. (2018). MHCflurry: Open-Source Class I MHC Binding Affinity Prediction. *Cell Systems*, 7(1), 129-132.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.05.014>
235. Olafsdottir, T. A., Bjarnadottir, K., Norddahl, G. L., Halldorsson, G. H., Melsted, P., Gunnarsdottir, K., Ivarsdottir, E., Olafsdottir, T., Arnthorsson, A. O., Theodors, F., Eythorsson, E., Helgason, D., Eggertsson, H. P., Masson, G., Bjarnadottir, S., Saevarsdottir, S., Runolfsson, H. L., Olafsson, I., Saemundsdottir, J., ... Stefansson, K. (2022). HLA alleles, disease severity, and age associate with T-cell responses following infection with SARS-CoV-2. *Communications Biology*, 5(1), 914. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03893-w>
236. Otsuka, M., Jing, Q., Georgel, P., New, L., Chen, J., Mols, J., Kang, Y. J., Jiang, Z., Du, X., Cook, R., Das, S. C., Pattnaik, A. K., Beutler, B., & Han, J. (2007). Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity*, 27(1), 123-134. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.014>
237. Ou, B. S., Saouaf, O. M., Baillet, J., & Appel, E. A. (2022). Sustained delivery approaches to improving adaptive immune responses. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 187, 114401. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114401>
238. Ozono, S., Zhang, Y., Ode, H., Sano, K., Tan, T. S., Imai, K., Miyoshi, K., Kishigami, S., Ueno, T., Iwatani, Y., Suzuki, T., & Tokunaga, K. (2021). SARS-CoV-2 D614G spike mutation increases entry efficiency with enhanced ACE2-binding affinity. *Nature Communications*, 12(1), 848. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21118-2>
239. Pachetti, M., Marini, B., Benedetti, F., Giudici, F., Mauro, E., Storici, P., Masciovecchio, C., Angeletti, S., Ciccozzi, M., Gallo, R. C., Zella, D., & Ippodri-no, R. (2020). Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *Journal of Translational Medicine*, 18(1), 179. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02344-6>
240. Painter, M. M., Mathew, D., Goel, R. R., Apostolidis, S. A., Pattekar, A., Kuthuru, O., Baxter, A. E., Herati, R. S., Oldridge, D. A., Gouma, S., Hicks, P., Dysinger, S., Lundgreen, K. A., Kuri-Cervantes, L., Adamski, S., Hicks, A., Korte, S., Giles, J. R., Weirick, M. E., ... Wherry, E. J. (2021). Rapid induction of antigen-specific CD4+ T cells is associated with coordinated humoral and cellular immunity to SARS-CoV-2 mRNA vaccination. *Immunity*, 54(9), 2133-2142.e3. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.08.001>
241. Pantoja-Torres, B., Toro-Huamanchumo, C. J., Urrunaga-Pastor, D., Guarnizo-Poma, M., Lazaro-Alcantara, H., Paico-Palacios, S., del Carmen Ranilla-Seguín, V., & Benites-Zapata, V. A. (2019). High triglycerides to HDL-cholesterol ratio is associated with insulin resistance in normal-weight healthy adults. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 13(1), 382-388. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.10.006>
242. Peiris, J. S. M., Guan, Y., & Yuen, K. Y. (2004). Severe acute respiratory syndrome. *Nature Medicine*, 10(S12), S88-S97. <https://doi.org/10.1038/nm1143>
243. Peng, S., Wang, J., Wei, S., Li, C., Zhou, K., Hu, J., Ye, X., Yan, J., Liu, W., Gao, G. F., Fang, M., & Meng, S. (2018). Endogenous Cellular MicroRNAs Mediate Antiviral Defense against Influenza A Virus. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 10, 361-375. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.12.016>

244. Peng, X., Gralinski, L., Ferris, M. T., Frieman, M. B., Thomas, M. J., Proll, S., Korth, M. J., Tisoncik, J. R., Heise, M., Luo, S., Schroth, G. P., Tumpey, T. M., Li, C., Kawaoka, Y., Baric, R. S., & Katze, M. G. (2011a). Integrative deep sequencing of the mouse lung transcriptome reveals differential expression of diverse classes of small RNAs in response to respiratory virus infection. *mBio*, 2(6), e00198-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00198-11>

245. Peng, X., Gralinski, L., Ferris, M. T., Frieman, M. B., Thomas, M. J., Proll, S., Korth, M. J., Tisoncik, J. R., Heise, M., Luo, S., Schroth, G. P., Tumpey, T. M., Li, C., Kawaoka, Y., Baric, R. S., & Katze, M. G. (2011b). Integrative deep sequencing of the mouse lung transcriptome reveals differential expression of diverse classes of small RNAs in response to respiratory virus infection. *mBio*, 2(6), e00198-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00198-11>

246. Peng, Y., Felce, S. L., Dong, D., Penkava, F., Mentzer, A. J., Yao, X., Liu, G., Yin, Z., Chen, J.-L., Lu, Y., Wellington, D., Wing, P. A. C., Dominey-Foy, D. C. C., Jin, C., Wang, W., Hamid, M. A., Fernandes, R. A., Wang, B., Fries, A., ... Dong, T. (2022). An immunodominant NP105-113-B*07:02 cytotoxic T cell response controls viral replication and is associated with less severe COVID-19 disease. *Nature Immunology*, 23(1), 50–61. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01084-z>

247. Peng, Y., Mentzer, A. J., Liu, G., Yao, X., Yin, Z., Dong, D., Dejnirattisai, W., Rostron, T., Supasa, P., Liu, C., López-Camacho, C., Slon-Campos, J., Zhao, Y., Stuart, D. I., Paesen, G. C., Grimes, J. M., Antson, A. A., Bayfield, O. W., Hawkins, D. E. D. P., ... Dong, T. (2020). Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nature Immunology*, 21(11), 1336–1345. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6>

248. Perlman, S., & Netland, J. (2009). Coronaviruses post-SARS: Update on replication and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 7(6), 439–450. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2147>

249. Petersen, J., Purcell, A. W., & Rossjohn, J. (2009). Post-translationally modified T cell epitopes: Immune recognition and immunotherapy. *Journal of Molecular Medicine*, 87(11), 1045. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0526-4>

250. Pfaender, S., Mar, K. B., Michailidis, E., Kratzel, A., Boys, I. N., V'kovski, P., Fan, W., Kelly, J. N., Hirt, D., Ebert, N., Stalder, H., Kleine-Weber, H., Hoffmann, M., Hoffmann, H.-H., Saeed, M., Dijkman, R., Steinmann, E., Wight-Carter, M., McDougal, M. B., ... Thiel, V. (2020). LY6E impairs coronavirus fusion and confers immune control of viral disease. *Nature Microbiology*, 5(11), 1330–1339. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0769-y>

251. Pierce, J. B., Simion, V., Icli, B., Pérez-Cremades, D., Cheng, H. S., & Feinberg, M. W. (2020). Computational Analysis of Targeting SARS-CoV-2, Viral Entry Proteins ACE2 and TMPRSS2, and Interferon Genes by Host MicroRNAs. *Genes*, 11(11), 1354. <https://doi.org/10.3390/genes11111354>

252. Pinto, B. G. G., Oliveira, A. E. R., Singh, Y., Jimenez, L., Gonçalves, A. N. A., Ogawa, R. L. T., Creighton, R., Schatzmann Peron, J. P., & Nakaya, H. I. (2020). ACE2 Expression Is Increased in the Lungs of Patients With Comorbidities Associated With Severe COVID-19. *The Journal of Infectious Diseases*, 222(4), 556–563. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa332>

253. Pisanti, S., Deelen, J., Gallina, A. M., Caputo, M., Citro, M., Abate, M., Sacchi, N., Vecchione, C., & Martinelli, R. (2020). Correlation of the two most frequent HLA haplotypes in the Italian population to the differential regional incidence of Covid-19. *Journal of Translational Medicine*, 18(1). <https://doi.org/Reynolds>
254. Planas, D., Veyer, D., Baidaliuk, A., Staropoli, I., Guivel-Benhassine, F., Rajah, M. M., Planchais, C., Porrot, F., Robillard, N., Puech, J., Prot, M., Gallais, F., Gantner, P., Velay, A., Le Guen, J., Kassis-Chikhani, N., Edriss, D., Belec, L., Seve, A., ... Schwartz, O. (2021). Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*, 596(7871), 276–280. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03777-9>
255. Pollett, S., Conte, M. A., Sanborn, M., Jarman, R. G., Lidl, G. M., Modjarrad, K., & Maljkovic Berry, I. (2021). A comparative recombination analysis of human coronaviruses and implications for the SARS-CoV-2 pandemic. *Scientific Reports*, 11(1), 17365. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96626-8>
256. Potapov, I., Kanneganti, T.-D., & Del Sol, A. (2022). Fostering experimental and computational synergy to modulate hyperinflammation. *Trends in Immunology*, 43(1), 4–7. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.11.004>
257. Promislow, D. E. L. (2020). A Geroscience Perspective on COVID-19 Mortality. *The Journals of Gerontology: Series A*, 75(9), e30–e33. <https://doi.org/10.1093/gerona/glaa094>
258. Quadeer, A. A., Ahmed, S. F., & McKay, M. R. (2021). Landscape of epitopes targeted by T cells in 852 individuals recovered from COVID-19: Meta-analysis, immunoprevalence, and web platform. *Cell Reports. Medicine*, 2(6), 100312. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100312>
259. Rambaut, A., Holmes, E. C., O’Toole, Á., Hill, V., McCrone, J. T., Ruis, C., du Plessis, L., & Pybus, O. G. (2020). A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nature Microbiology*, 5(11), 1403–1407. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>
260. Rasmussen, K. D., Simmini, S., Abreu-Goodger, C., Bartonicek, N., Di Giacomo, M., Bilbao-Cortes, D., Horos, R., Von Lindern, M., Enright, A. J., & O’Carroll, D. (2010a). The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis. *Journal of Experimental Medicine*, 207(7), 1351–1358. <https://doi.org/10.1084/jem.20100458>
261. Rasmussen, K. D., Simmini, S., Abreu-Goodger, C., Bartonicek, N., Di Giacomo, M., Bilbao-Cortes, D., Horos, R., Von Lindern, M., Enright, A. J., & O’Carroll, D. (2010b). The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(7), 1351–1358. <https://doi.org/10.1084/jem.20100458>
262. Reddy, K. B. (2015). MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell International*, 15, 38. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0185-1>
263. Redondo, N., Zaldívar-López, S., Garrido, J. J., & Montoya, M. (2021). SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Frontiers in Immunology*, 12, 708264. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708264>
264. Rees-Spear, C., Muir, L., Griffith, S. A., Heaney, J., Aldon, Y., Snitselaar, J. L., Thomas, P., Graham, C., Seow, J., Lee, N., Rosa, A., Roustan, C., Houlihan, C. F., Sanders, R. W., Gupta, R. K., Cherepanov, P., Stauss, H. J., Nastouli, E., SAFER Investigators, ... McCoy, L. E. (2021). The effect of spike mutations on SARS-CoV-2 neutralization. *Cell Reports*, 34(12), 108890. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108890>

265. Reis, G., Moreira Silva, E. A. D. S., Medeiros Silva, D. C., Thabane, L., Singh, G., Park, J. J. H., Forrest, J. I., Harari, O., Quirino Dos Santos, C. V., Guimarães de Almeida, A. P. F., Figueiredo Neto, A. D. de, Savassi, L. C. M., Milagres, A. C., Teixeira, M. M., Simplicio, M. I. C., Ribeiro, L. B., Oliveira, R., Mills, E. J., & TOGETHER Investigators. (2021). Effect of Early Treatment With Hydroxychloroquine or Lopinavir and Ritonavir on Risk of Hospitalization Among Patients With COVID-19: The TOGETHER Randomized Clinical Trial. *JAMA Network Open*, 4(4), e216468. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.6468>

266. Reynisson, B., Alvarez, B., Paul, S., Peters, B., & Nielsen, M. (2020). NetMH-Cpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: Improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), W449–W454. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa379>

267. Rha, M.-S., Jeong, H. W., Ko, J.-H., Choi, S. J., Seo, I.-H., Lee, J. S., Sa, M., Kim, A. R., Joo, E.-J., Ahn, J. Y., Kim, J. H., Song, K.-H., Kim, E. S., Oh, D. H., Ahn, M. Y., Choi, H. K., Jeon, J. H., Choi, J.-P., Kim, H. B., ... Shin, E.-C. (2021). PD-1-Expressing SARS-CoV-2-Specific CD8+ T Cells Are Not Exhausted, but Functional in Patients with COVID-19. *Immunity*, 54(1), 44-52.e3. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.12.002>

268. Rico-Caballero, V., Fernández, M., Hurtado, J. C., Marcos, M. A., Cardozo, C., Albiach, L., Agüero, D., Ambrosioni, J., Bodro, M., Chumbita, M., De la Mora, L., Garcia-Pouton, N., Gonzalez-Cordón, A., Dueñas, G., Hernandez-Meneses, M., Inciarte, A., Laguno, M., Leal, L., Macaya, I., ... Tuset, M. (2022). Impact of SARS-CoV-2 viral load and duration of symptoms before hospital admission on the mortality of hospitalized COVID-19 patients. *Infection*, 50(5), 1321–1328. <https://doi.org/10.1007/s15010-022-01833-8>

269. Robinson, J., Barker, D. J., Georgiou, X., Cooper, M. A., Flicek, P., & Marsh, S. G. E. (2020). IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D948–D955. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz950>

270. Robinson, J., Halliwell, J. A., Hayhurst, J. D., Flicek, P., Parham, P., & Marsh, S. G. E. (2015). The IPD and IMGT/HLA database: Allele variant databases. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D423–D431. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1161>

271. Rogstam, A., Nyblom, M., Christensen, S., Sele, C., Talibov, V. O., Lindvall, T., Rasmussen, A. A., André, I., Fisher, Z., Knecht, W., & Kozielski, F. (2020). Crystal Structure of Non-Structural Protein 10 from Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7375. <https://doi.org/10.3390/ijms21197375>

272. Rothe, C., Schunk, M., Sothmann, P., Bretzel, G., Froeschl, G., Wallrauch, C., Zimmer, T., Thiel, V., Janke, C., Guggemos, W., Seilmaier, M., Drosten, C., Vollmar, P., Zwirgmaier, K., Zange, S., Wölfel, R., & Hoelscher, M. (2020). Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *New England Journal of Medicine*, 382(10), 970–971. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2001468>

273. Routhu, N. K., Cheedarla, N., Gangadhara, S., Bollimpelli, V. S., Boddapati, A. K., Shiferaw, A., Rahman, S. A., Sahoo, A., Edara, V. V., Lai, L., Floyd, K., Wang, S., Fischinger, S., Atyeo, C., Shin, S. A., Gumber, S., Kirejczyk, S., Cohen, J., Jean, S.

- M., ... Amara, R. R. (2021). A modified vaccinia Ankara vector-based vaccine protects macaques from SARS-CoV-2 infection, immune pathology, and dysfunction in the lungs. *Immunity*, 54(3), 542-556.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.02.001>
274. Rui, Y., Su, J., Shen, S., Hu, Y., Huang, D., Zheng, W., Lou, M., Shi, Y., Wang, M., Chen, S., Zhao, N., Dong, Q., Cai, Y., Xu, R., Zheng, S., & Yu, X.-F. (2021). Unique and complementary suppression of cGAS-STING and RNA sensing-triggered innate immune responses by SARS-CoV-2 proteins. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 123. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00515-5>
275. Russell, C. D., Lone, N. I., & Baillie, J. K. (2023). Comorbidities, multimorbidity and COVID-19. *Nature Medicine*, 29(2), 334–343. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02156-9>
276. Russo, F., Di Bella, S., Bonnici, V., Laganà, A., Rainaldi, G., Pellegrini, M., Pulvirenti, A., Giugno, R., & Ferro, A. (2014). A knowledge base for the discovery of function, diagnostic potential and drug effects on cellular and extracellular miRNAs. *BMC Genomics*, 15 Suppl 3, S4.
277. Saçar Demirci, M. D., & Adan, A. (2020). Computational analysis of microRNA-mediated interactions in SARS-CoV-2 infection. *PeerJ*, 8, e9369. <https://doi.org/10.7717/peerj.9369>
278. Saito, A., Irie, T., Suzuki, R., Maemura, T., Nasser, H., Uriu, K., Kosugi, Y., Shirakawa, K., Sadamasu, K., Kimura, I., Ito, J., Wu, J., Iwatsuki-Horimoto, K., Ito, M., Yamayoshi, S., Loeber, S., Tsuda, M., Wang, L., Ozono, S., ... Sato, K. (2022). Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. *Nature*, 602(7896), 300–306. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04266-9>
279. Sanchez-Vazquez, R., Guío-Carrión, A., Zapatero-Gaviria, A., Martínez, P., & Blasco, M. A. (2021). Shorter telomere lengths in patients with severe COVID-19 disease. *Aging*, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.18632/aging.202463>
280. Santhakumar, D., Forster, T., Laqtom, N. N., Fragkoudis, R., Dickinson, P., Abreu-Goodger, C., Manakov, S. A., Choudhury, N. R., Griffiths, S. J., Vermeulen, A., Enright, A. J., Dutia, B., Kohl, A., Ghazal, P., & Buck, A. H. (2010). Combined agonist-antagonist genome-wide functional screening identifies broadly active antiviral microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(31), 13830–13835. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008861107>
281. Satish, D., Mukherjee, S. K., & Gupta, D. (2019). PAmiRDB: A web resource for plant miRNAs targeting viruses. *Scientific Reports*, 9(1), 4627. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41027-1>
282. Satish, D., Mukherjee, S. K., & Gupta, D. (2021). The landscape of microRNAs in plant viral infections. *Plant Gene*, 26, 100293. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2021.100293>
283. Scheel, T. K. H., Luna, J. M., Liniger, M., Nishiuchi, E., Rozen-Gagnon, K., Shlomai, A., Auray, G., Gerber, M., Fak, J., Keller, I., Bruggmann, R., Darnell, R. B., Ruggli, N., & Rice, C. M. (2016a). A Broad RNA Virus Survey Reveals Both miRNA Dependence and Functional Sequestration. *Cell Host & Microbe*, 19(3), 409–423. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.007>

284. Scheel, T. K. H., Luna, J. M., Liniger, M., Nishiuchi, E., Rozen-Gagnon, K., Shlomai, A., Auray, G., Gerber, M., Fak, J., Keller, I., Bruggmann, R., Darnell, R. B., Ruggli, N., & Rice, C. M. (2016b). A Broad RNA Virus Survey Reveals Both miRNA Dependence and Functional Sequestration. *Cell Host & Microbe*, 19(3), 409–423. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.007>
285. Schoggins, J. W. (2019). Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annual Review of Virology*, 6(1), 567–584. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015756>
286. Schubert, K., Karousis, E. D., Jomaa, A., Scaiola, A., Echeverria, B., Gurzeler, L.-A., Leibundgut, M., Thiel, V., Mühlemann, O., & Ban, N. (2020). SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(10), 959–966. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0511-8>
287. Schwartz, D. A., Mulkey, S. B., & Roberts, D. J. (2023). SARS-CoV-2 placentitis, stillbirth, and maternal COVID-19 vaccination: Clinical–pathologic correlations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 228(3), 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2022.10.001>
288. Sekine, T., Perez-Potti, A., Rivera-Ballesteros, O., Strålin, K., Gorin, J.-B., Olsson, A., Llewellyn-Lacey, S., Kamal, H., Bogdanovic, G., Muschiol, S., Wullmann, D. J., Kammann, T., Emgård, J., Parrot, T., Folkesson, E., Rooyackers, O., Eriksson, L. I., Henter, J.-I., Sönnnerborg, A., ... Unge, C. (2020). Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*, 183(1), 158–168.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.017>
289. Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., & Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455(7209), 58–63. <https://doi.org/10.1038/nature07228>
290. Sette, A., & Crotty, S. (2021). Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, 184(4), 861–880. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.007>
291. Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(21), 11727–11734. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003138117>
292. Sheinerman, K. S., & Umansky, S. R. (2013). Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 150. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00150>
293. Sherina, N., Piralla, A., Du, L., Wan, H., Kumagai-Braesch, M., Andréll, J., Braesch-Andersen, S., Cassaniti, I., Percivalle, E., Sarasini, A., Bergami, F., Di Martino, R., Colaneri, M., Vecchia, M., Sambo, M., Zuccaro, V., Bruno, R., Sachs, M., Oggionni, T., ... Pan-Hammarström, Q. (2021). Persistence of SARS-CoV-2-specific B and T cell responses in convalescent COVID-19 patients 6–8 months after the infection. *Med (New York, N.Y.)*, 2(3), 281–295.e4. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2021.02.001>
294. Shimakami, T., Yamane, D., Jangra, R. K., Kempf, B. J., Spaniel, C., Barton, D. J., & Lemon, S. M. (2012). Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2–miR-122 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(3), 941–946. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112263109>

295. Shin, D., Mukherjee, R., Grewe, D., Bojkova, D., Baek, K., Bhattacharya, A., Schulz, L., Widera, M., Mehdipour, A. R., Tascher, G., Geurink, P. P., Wilhelm, A., van der Heden van Noort, G. J., Ovaa, H., Müller, S., Knobloch, K.-P., Rajalingam, K., Schulman, B. A., Cinatl, J., ... Dikic, I. (2020). Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity. *Nature*, 587(7835), 657–662. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2601-5>
296. Shkurnikov, M., Nersisyan, S., Jankevic, T., Galatenko, A., Gordeev, I., Vechorko, V., & Tonevitsky, A. (2021). Association of HLA Class I Genotypes With Severity of Coronavirus Disease-19. *Frontiers in Immunology*, 12, 641900. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.641900>
297. Shkurnikov, M. Yu., Knyazev, E. N., Fomicheva, K. A., Mikhailenko, D. S., Nyushko, K. M., Saribekyan, E. K., Samatov, T. R., & Alekseev, B. Ya. (2016). Analysis of Plasma microRNA Associated with Hemolysis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 160(6), 748–750. <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3300-y>
298. Shomuradova, A. S., Vagida, M. S., Sheetikov, S. A., Zornikova, K. V., Kiryukhin, D., Titov, A., Peshkova, I. O., Khmelevskaya, A., Dianov, D. V., Malasheva, M., Shmelev, A., Serdyuk, Y., Bagaev, D. V., Pivnyuk, A., Shcherbinin, D. S., Maleeva, A. V., Shakirova, N. T., Pilunov, A., Malko, D. B., ... Efimov, G. A. (2020). SARS-CoV-2 Epitopes Are Recognized by a Public and Diverse Repertoire of Human T Cell Receptors. *Immunity*, 53(6), 1245-1257.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.11.004>
299. Silva, F. A. F. D., Brito, B. B. D., Santos, M. L. C., Marques, H. S., Silva Júnior, R. T. D., Carvalho, L. S. D., Vieira, E. S., Oliveira, M. V., & Melo, F. F. D. (2020). COVID-19 gastrointestinal manifestations: A systematic review. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, e20200714. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0714-2020>
300. Simmons, G., Zmora, P., Gierer, S., Heurich, A., & Pöhlmann, S. (2013). Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: Cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research. *Antiviral Research*, 100(3), 605–614. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.028>
301. Simón-Mateo, C., & García, J. A. (2006). MicroRNA-guided processing impairs Plum pox virus replication, but the virus readily evolves to escape this silencing mechanism. *Journal of Virology*, 80(5), 2429–2436. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.5.2429-2436.2006>
302. Siniscalchi, C., Di Palo, A., Russo, A., & Potenza, N. (2021). Human MicroRNAs Interacting With SARS-CoV-2 RNA Sequences: Computational Analysis and Experimental Target Validation. *Frontiers in Genetics*, 12, 678994. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.678994>
303. Skovgaard, K., Cirera, S., Vasby, D., Podolska, A., Breum, S. Ø., Dürrwald, R., Schlegel, M., & Heegaard, P. M. (2013). Expression of innate immune genes, proteins and microRNAs in lung tissue of pigs infected experimentally with influenza virus (H1N2). *Innate Immunity*, 19(5), 531–544. <https://doi.org/10.1177/1753425912473668>
304. Smemo, S., Tena, J. J., Kim, K.-H., Gamazon, E. R., Sakabe, N. J., Gómez-Marín, C., Aneas, I., Credidio, F. L., Sobreira, D. R., Wasserman, N. F., Lee, J. H., Puviondran, V., Tam, D., Shen, M., Son, J. E., Vakili, N. A., Sung, H.-K.,

Naranjo, S., Acemel, R. D., ... Nóbrega, M. A. (2014). Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature*, 507(7492), 371–375. <https://doi.org/10.1038/nature13138>

305. Smith, J. L., Jeng, S., McWeeney, S. K., & Hirsch, A. J. (2017). A MicroRNA Screen Identifies the Wnt Signaling Pathway as a Regulator of the Interferon Response during Flavivirus Infection. *Journal of Virology*, 91(8), e02388-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02388-16>

306. Song, L., Liu, H., Gao, S., Jiang, W., & Huang, W. (2010). Cellular microRNAs inhibit replication of the H1N1 influenza A virus in infected cells. *Journal of Virology*, 84(17), 8849–8860. <https://doi.org/10.1128/JVI.00456-10>

307. Sonnweber, T., Grubwieser, P., Pizzini, A., Boehm, A., Sahanic, S., Luger, A., Schwabl, C., Widmann, G., Egger, A., Hoermann, G., Wöll, E., Puchner, B., Kaser, S., Theurl, I., Nairz, M., Tymoszuk, P., Weiss, G., Joannidis, M., Löffler-Ragg, J., & Tancevski, I. (2023). Pulmonary recovery from COVID-19 in patients with metabolic diseases: A longitudinal prospective cohort study. *Scientific Reports*, 13(1), 2599. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29654-1>

308. Stadler, K., & Rappuoli, R. (2005). SARS: Understanding the Virus and Development of Rational Therapy. *Current Molecular Medicine*, 5(7), 677–697. <https://doi.org/10.2174/156652405774641124>

309. Su, Y., Chen, D., Yuan, D., Lausted, C., Choi, J., Dai, C. L., Voillet, V., Duvvuri, V. R., Scherler, K., Troisch, P., Baloni, P., Qin, G., Smith, B., Kornilov, S. A., Rostomily, C., Xu, A., Li, J., Dong, S., Rothchild, A., ... Heath, J. R. (2020). Multi-Omics Resolves a Sharp Disease-State Shift between Mild and Moderate COVID-19. *Cell*, 183(6), 1479-1495.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.037>

310. Subramanian, R., He, Q., & Pascual, M. (2021). Quantifying asymptomatic infection and transmission of COVID-19 in New York City using observed cases, serology, and testing capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(9), e2019716118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2019716118>

311. Sun, C., Xie, C., Bu, G.-L., Zhong, L.-Y., & Zeng, M.-S. (2022). Molecular characteristics, immune evasion, and impact of SARS-CoV-2 variants. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 202. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01039-2>

312. Sun, L., Middleton, D. R., Wantuch, P. L., Ozdilek, A., & Avci, F. Y. (2016). Carbohydrates as T-cell antigens with implications in health and disease. *Glycobiology*, 26(10), 1029–1040. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww062>

313. Sungnak, W., Huang, N., Bécavin, C., Berg, M., Queen, R., Litvinukova, M., Talavera-López, C., Maatz, H., Reichart, D., Sampaziotis, F., Worlock, K. B., Yoshida, M., Barnes, J. L., & HCA Lung Biological Network. (2020). SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nature Medicine*, 26(5), 681–687. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0868-6>

314. Suzuki, R., Yamasoba, D., Kimura, I., Wang, L., Kishimoto, M., Ito, J., Morioka, Y., Nao, N., Nasser, H., Uriu, K., Kosugi, Y., Tsuda, M., Orba, Y., Sasaki, M., Shimizu, R., Kawabata, R., Yoshimatsu, K., Asakura, H., Nagashima, M., ... Sato, K. (2022). Attenuated fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron variant. *Nature*, 603(7902), 700–705. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04462-1>

315. Syed, A. M., Taha, T. Y., Tabata, T., Chen, I. P., Ciling, A., Khalid, M. M., Sreekumar, B., Chen, P.-Y., Hayashi, J. M., Soczek, K. M., Ott, M., & Doudna, J. A. (2021). Rapid assessment of SARS-CoV-2-evolved variants using virus-like particles. *Science (New York, N.Y.)*, 374(6575), 1626–1632. <https://doi.org/10.1126/science.abl6184>
316. Szabo, P. A., Dogra, P., Gray, J. I., Wells, S. B., Connors, T. J., Weisberg, S. P., Krupska, I., Matsumoto, R., Poon, M. M. L., Idzikowski, E., Morris, S. E., Pasin, C., Yates, A. J., Ku, A., Chait, M., Davis-Porada, J., Guo, X. V., Zhou, J., Steinle, M., ... Farber, D. L. (2021). Longitudinal profiling of respiratory and systemic immune responses reveals myeloid cell-driven lung inflammation in severe COVID-19. *Immunity*, 54(4), 797–814.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.03.005>
317. Takahashi, T., Ellingson, M. K., Wong, P., Israelow, B., Lucas, C., Klein, J., Silva, J., Mao, T., Oh, J. E., Tokuyama, M., Lu, P., Venkataraman, A., Park, A., Liu, F., Meir, A., Sun, J., Wang, E. Y., Casanovas-Massana, A., Wyllie, A. L., ... Iwasaki, A. (2020). Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature*, 588(7837), 315–320. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2700-3>
318. Tall, A. R., & Yvan-Charvet, L. (2015). Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 15(2), 104–116. <https://doi.org/10.1038/nri3793>
319. Tang, H., Gao, Y., Li, Z., Miao, Y., Huang, Z., Liu, X., Xie, L., Li, H., Wen, W., Zheng, Y., & Su, W. (2020). The noncoding and coding transcriptional landscape of the peripheral immune response in patients with COVID-19. *Clinical and Translational Medicine*, 10(6), e200. <https://doi.org/10.1002/ctm2.200>
320. Tarke, A., Sidney, J., Kidd, C. K., Dan, J. M., Ramirez, S. I., Yu, E. D., Mateus, J., da Silva Antunes, R., Moore, E., Rubiro, P., Methot, N., Phillips, E., Mallal, S., Frazier, A., Rawlings, S. A., Greenbaum, J. A., Peters, B., Smith, D. M., Crotty, S., ... Sette, A. (2021). Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases. *Cell Reports. Medicine*, 2(2), 100204. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100204>
321. Tavasolian, F., Rashidi, M., Hatam, G. R., Jeddi, M., Hosseini, A. Z., Mosaawi, S. H., Abdollahi, E., & Inman, R. D. (2021). HLA, Immune Response, and Susceptibility to COVID-19. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.601886>
322. Teodori, L., Sestili, P., Madiari, V., Coppari, S., Fraternali, D., Rocchi, M. B. L., Ramakrishna, S., & Albertini, M. C. (2020). MicroRNAs Bioinformatics Analyses Identifying HDAC Pathway as a Putative Target for Existing Anti-COVID-19 Therapeutics. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 582003. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.582003>
323. The FANTOM Consortium, Andersson, R., Gebhard, C., Miguel-Escalada, I., Hoof, I., Bornholdt, J., Boyd, M., Chen, Y., Zhao, X., Schmidl, C., Suzuki, T., Ntini, E., Arner, E., Valen, E., Li, K., Schwarzfischer, L., Glatz, D., Raithel, J., Lilje, B., ... Sandelin, A. (2014). An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature*, 507(7493), 455–461. <https://doi.org/10.1038/nature12787>
324. The Severe Covid-19 GWAS Group. (2020). Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *New England Journal of Medicine*, 383(16), 1522–1534. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2020283>

325. Tian, W., Jiang, W., Yao, J., Nicholson, C. J., Li, R. H., Sigurslid, H. H., Wooster, L., Rotter, J. I., Guo, X., & Malhotra, R. (2020). Predictors of mortality in hospitalized COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Medical Virology*, 92(10), 1875–1883. <https://doi.org/10.1002/jmv.26050>

326. Titov, A., Shaykhutdinova, R., Shcherbakova, O. V., Serdyuk, Y. V., Sheetikov, S. A., Zornikova, K. V., Maleeva, A. V., Khmelevskaya, A., Dianov, D. V., Shakhirova, N. T., Malko, D. B., Shkurnikov, M., Nersisyan, S., Tonevitsky, A., Khama-ganova, E., Ershov, A. V., Osipova, E. Y., Nikolaev, R. V., Pershin, D. E., ... Efimov, G. A. (2022). Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2. *JCI Insight*, 7(9), e157699. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.157699>

327. Tong, A., Yuan, Q., Wang, S., Peng, J., Lu, Y., Zheng, H., Lin, L., Chen, H., Gong, Y., Chen, J., & Yan, F. (2017). Altered accumulation of osa-miR171b contributes to rice stripe virus infection by regulating disease symptoms. *Journal of Experimental Botany*, 68(15), 4357–4367. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx230>

328. Tregoning, J. S., Flight, K. E., Higham, S. L., Wang, Z., & Pierce, B. F. (2021). Progress of the COVID-19 vaccine effort: Viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. *Nature Reviews. Immunology*, 21(10), 626–636. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00592-1>

329. Trobaugh, D. W., Gardner, C. L., Sun, C., Haddow, A. D., Wang, E., Chapnik, E., Mildner, A., Weaver, S. C., Ryman, K. D., & Klimstra, W. B. (2014a). RNA viruses can hijack vertebrate microRNAs to suppress innate immunity. *Nature*, 506(7487), 245–248. <https://doi.org/10.1038/nature12869>

330. Trobaugh, D. W., Gardner, C. L., Sun, C., Haddow, A. D., Wang, E., Chapnik, E., Mildner, A., Weaver, S. C., Ryman, K. D., & Klimstra, W. B. (2014b). RNA viruses can hijack vertebrate microRNAs to suppress innate immunity. *Nature*, 506(7487), 245–248. <https://doi.org/10.1038/nature12869>

331. Tso, F. Y., Lidenge, S. J., Poppe, L. K., Peña, P. B., Privatt, S. R., Bennett, S. J., Ngowi, J. R., Mwaeselange, J., Belshan, M., Siedlik, J. A., Raine, M. A., Ochoa, J. B., Garcia-Diaz, J., Nossaman, B., Buckner, L., Roberts, W. M., Dean, M. J., Ochoa, A. C., West, J. T., & Wood, C. (2021). Presence of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against SARS-CoV-2 in COVID-19 plasma. *PLOS ONE*, 16(3), e0247640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247640>

332. Turchinovich, A., Samatov, T. R., Tonevitsky, A. G., & Burwinkel, B. (2013). Circulating miRNAs: Cell-cell communication function? *Frontiers in Genetics*, 4, 119. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00119>

333. Uselli, V., Loretelli, C., Seelam, A. J., Pastore, I., D'Addio, F., Ben Nasr, M., & Fiorina, P. (2022). Novel Soluble Mediators of Innate Immune System Activation in Solid Allograft Rejection. *Transplantation*, 106(3), 500–509. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003834>

334. Van Cleemput, J., Van Snippenberg, W., Lambrechts, L., Dendooven, A., D'Onofrio, V., Couck, L., Trypsteen, W., Vanrusselt, J., Theuns, S., Vereecke, N., Van Den Bosch, T. P. P., Lammens, M., Driessen, A., Achten, R., Bracke, K. R., Van Den Broeck, W., Von Der Thüsen, J., Nauwynck, H., Van Dorpe, J., ... Vandekerckhove,

- L. (2021). Organ-specific genome diversity of replication-competent SARS-CoV-2. *Nature Communications*, 12(1), 6612. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26884-7>
335. van der Made, C. I., Simons, A., Schuurs-Hoeijmakers, J., van den Heuvel, G., Mantere, T., Kersten, S., van Deuren, R. C., Steehouwer, M., van Reijmersdal, S. V., Jaeger, M., Hofste, T., Astuti, G., Corominas Galbany, J., van der Schoot, V., van der Hoeven, H., Haggmolen of ten Have, W., Klijn, E., van den Meer, C., Fiddelaers, J., ... Hoischen, A. (2020). Presence of Genetic Variants Among Young Men With Severe COVID-19. *JAMA*, 324(7), 663. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.13719>
336. Veksler-Lublinsky, I., Shemer-Avni, Y., Kedem, K., & Ziv-Ukelson, M. (2010). Gene bi-targeting by viral and human miRNAs. *BMC Bioinformatics*, 11, 249. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-249>
337. Venet, F., Gossez, M., Bidar, F., Bodinier, M., Coudereau, R., Lukaszewicz, A.-C., Tardiveau, C., Brengel-Pesce, K., Cheynet, V., Cazalis, M.-A., Pescarmona, R., Garnier, L., Orillon, M., Buisson, M., Bouscambert-Duchamp, M., Morfin-Sherpa, F., Casalegno, J.-S., Conti, F., Rimmelé, T., ... Monneret, G. (2022). T cell response against SARS-CoV-2 persists after one year in patients surviving severe COVID-19. *eBioMedicine*, 78, 103967. <https://doi.org/vilar>
338. Vita, R., Mahajan, S., Overton, J. A., Dhanda, S. K., Martini, S., Cantrell, J. R., Wheeler, D. K., Sette, A., & Peters, B. (2019). The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D339–D343. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1006>
339. Vithani, N., Ward, M. D., Zimmerman, M. I., Novak, B., Borowsky, J. H., Singh, S., & Bowman, G. R. (2021). SARS-CoV-2 Nsp16 activation mechanism and a cryptic pocket with pan-coronavirus antiviral potential. *Biophysical Journal*, 120(14), 2880–2889. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.03.024>
340. Viveiros, A., Rasmuson, J., Vu, J., Mulvagh, S. L., Yip, C. Y. Y., Norris, C. M., & Oudit, G. Y. (2021). Sex differences in COVID-19: Candidate pathways, genetics of ACE2, and sex hormones. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 320(1), H296–H304. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00755.2020>
341. Wajnberg, A., Amanat, F., Firpo, A., Altman, D. R., Bailey, M. J., Mansour, M., McMahan, M., Meade, P., Mendu, D. R., Muellers, K., Stadlbauer, D., Stone, K., Strohmeier, S., Simon, V., Aberg, J., Reich, D. L., Krammer, F., & Cordon-Cardo, C. (2020). Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science*, 370(6521), 1227–1230. <https://doi.org/10.1126/science.abd7728>
342. Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S., & Li, F. (2020). Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: An Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *Journal of Virology*, 94(7), e00127-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00127-20>
343. Wang, D., Jiang, A., Feng, J., Li, G., Guo, D., Sajid, M., Wu, K., Zhang, Q., Ponty, Y., Will, S., Liu, F., Yu, X., Li, S., Liu, Q., Yang, X.-L., Guo, M., Li, X., Chen, M., Shi, Z.-L., ... Zhou, Y. (2021). The SARS-CoV-2 subgenome landscape and its novel regulatory features. *Molecular Cell*, 81(10), 2135-2147.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.02.036>

344. Wang, F., Huang, S., Gao, R., Zhou, Y., Lai, C., Li, Z., Xian, W., Qian, X., Li, Z., Huang, Y., Tang, Q., Liu, P., Chen, R., Liu, R., Li, X., Tong, X., Zhou, X., Bai, Y., Duan, G., ... Liu, L. (2020). Initial whole-genome sequencing and analysis of the host genetic contribution to COVID-19 severity and susceptibility. *Cell Discovery*, 6(1), 83. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00231-4>
345. Wang, H., Jiao, X., Kong, X., Hamera, S., Wu, Y., Chen, X., Fang, R., & Yan, Y. (2016). A Signaling Cascade from miR444 to RDR1 in Rice Antiviral RNA Silencing Pathway. *Plant Physiology*, 170(4), 2365–2377. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01283>
346. Wang, J. H., Zheng, X., Ke, X., Dorak, M. T., Shen, J., Boodram, B., O’Gorman, M., Beaman, K., Cotler, S. J., Hershov, R., & Rong, L. (2009). Ethnic and geographical differences in HLA associations with the outcome of hepatitis C virus infection. *Virology Journal*, 6. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-46>
347. Wang, P., Nair, M. S., Liu, L., Iketani, S., Luo, Y., Guo, Y., Wang, M., Yu, J., Zhang, B., Kwong, P. D., Graham, B. S., Mascola, J. R., Chang, J. Y., Yin, M. T., Sobieszczyk, M., Kyratsous, C. A., Shapiro, L., Sheng, Z., Huang, Y., & Ho, D. D. (2021). Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. *Nature*, 593(7857), 130–135. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03398-2>
348. Wang, S.-F., Chen, K.-H., Chen, M., Li, W.-Y., Chen, Y.-J., Tsao, C.-H., Yen, M., Huang, J. C., & Chen, Y.-M. A. (2011). Human-leukocyte antigen class I Cw 1502 and class II DR 0301 genotypes are associated with resistance to severe acute respiratory syndrome (SARS) infection. *Viral Immunology*, 24(5), 421–426. <https://doi.org/10.1089/vim.2011.0024>
349. Wang, T., Du, Z., Zhu, F., Cao, Z., An, Y., Gao, Y., & Jiang, B. (2020). Comorbidities and multi-organ injuries in the treatment of COVID-19. *The Lancet*, 395(10228), e52. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30558-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30558-4)
350. Wang, W., Zhang, W., Zhang, J., He, J., & Zhu, F. (2020). Distribution of HLA allele frequencies in 82 Chinese individuals with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Hla*, 96(2), 194–196. <https://doi.org/10.1111/tan.13941>
351. Wang, Y., Cao, Y.-L., Yang, F., Zhang, Y., Wang, S.-H., & Liu, L. (2010). Small Interfering RNA Effectively Inhibits the Expression of SARS Coronavirus Membrane Gene at Two Novel Targeting Sites. *Molecules*, 15(10), 7197–7207. <https://doi.org/10.3390/molecules15107197>
352. Ward, J. R., Heath, P. R., Catto, J. W., Whyte, M. K. B., Milo, M., & Renshaw, S. A. (2011). Regulation of neutrophil senescence by microRNAs. *PloS One*, 6(1), e15810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015810>
353. Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S., & Crispin, M. (2020). Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6501), 330–333. <https://doi.org/10.1126/science.abb9983>
354. Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., Galas, D. J., & Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*, 56(11), 1733–1741.
355. Wehinger, A., Tancevski, I., Schgoer, W., Eller, P., Hochegger, K., Morak, M., Hermetter, A., Ritsch, A., Patsch, J. R., & Foeger, B. (2007). Phospholipid Transfer Protein Augments Apoptosis in THP-1-Derived Macrophages Induced by

Lipolyzed Hypertriglyceridemic Plasma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(4), 908–915. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000259361.91267.8c>

356. Wei, C., Shan, K.-J., Wang, W., Zhang, S., Huan, Q., & Qian, W. (2021). Evidence for a mouse origin of the SARS-CoV-2 Omicron variant. *Journal of Genetics and Genomics*, 48(12), 1111–1121. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.12.003>

357. Wells, H. L., Letko, M., Lasso, G., Ssebide, B., Nziza, J., Byarugaba, D. K., Navarrete-Macias, I., Liang, E., Cranfield, M., Han, B. A., Tingley, M. W., Duk-Wasser, M., Goldstein, T., Johnson, C. K., Mazet, J. a. K., Chandran, K., Munster, V. J., Gilardi, K., & Anthony, S. J. (2021). The evolutionary history of ACE2 usage within the coronavirus subgenus Sarbecovirus. *Virus Evolution*, 7(1), veab007. <https://doi.org/10.1093/ve/veab007>

358. Wheatley, A. K., Juno, J. A., Wang, J. J., Selva, K. J., Reynaldi, A., Tan, H.-X., Lee, W. S., Wragg, K. M., Kelly, H. G., Esterbauer, R., Davis, S. K., Kent, H. E., Mordant, F. L., Schlub, T. E., Gordon, D. L., Khoury, D. S., Subbarao, K., Cromer, D., Gordon, T. P., ... Kent, S. J. (2021). Evolution of immune responses to SARS-CoV-2 in mild-moderate COVID-19. *Nature Communications*, 12(1), 1162. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21444-5>

359. Wherry, E. J., & Ahmed, R. (2004). Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection. *Journal of Virology*, 78(11), 5535–5545. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.11.5535-5545.2004>

360. Wilson, J. G., Simpson, L. J., Ferreira, A.-M., Rustagi, A., Roque, J., Asuni, A., Ranganath, T., Grant, P. M., Subramanian, A., Rosenberg-Hasson, Y., Maecker, H. T., Holmes, S. P., Levitt, J. E., Blish, C. A., & Rogers, A. J. (2020). Cytokine profile in plasma of severe COVID-19 does not differ from ARDS and sepsis. *JCI Insight*, 5(17), e140289. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.140289>

361. Woods, P. S., Doolittle, L. M., Rosas, L. E., Nana-Sinkam, S. P., Tili, E., & Davis, I. C. (2020). Increased expression of microRNA-155-5p by alveolar type II cells contributes to development of lethal ARDS in H1N1 influenza A virus-infected mice. *Virology*, 545, 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.03.005>

362. World Health Organization. (2023a). COVID-19 vaccine tracker and landscape. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>

363. World Health Organization. (2023b). Tracking SARS-CoV-2 variants. <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>

364. Wu, C., Chen, X., Cai, Y., Xia, J., Zhou, X., Xu, S., Huang, H., Zhang, L., Zhou, X., Du, C., Zhang, Y., Song, J., Wang, S., Chao, Y., Yang, Z., Xu, J., Zhou, X., Chen, D., Xiong, W., ... Song, Y. (2020). Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Internal Medicine*, 180(7), 934. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.0994>

365. Wu, D., Kolesnikov, A., Yin, R., Guest, J. D., Gowthaman, R., Shmelev, A., Serdyuk, Y., Dianov, D. V., Efimov, G. A., Pierce, B. G., & Mariuzza, R. A. (2022). Structural assessment of HLA-A2-restricted SARS-CoV-2 spike epitopes recognized by public and private T-cell receptors. *Nature Communications*, 13(1), 19. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27669-8>

366. Wu, H., Xing, N., Meng, K., Fu, B., Xue, W., Dong, P., Tang, W., Xiao, Y., Liu, G., Luo, H., Zhu, W., Lin, X., Meng, G., & Zhu, Z. (2021). Nucleocapsid mutations R203K/G204R increase the infectivity, fitness, and virulence of SARS-CoV-2. *Cell Host & Microbe*, 29(12), 1788-1801.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.11.005>
367. Wu, J. T., Leung, K., Bushman, M., Kishore, N., Niehus, R., de Salazar, P. M., Cowling, B. J., Lipsitch, M., & Leung, G. M. (2020). Estimating clinical severity of COVID-19 from the transmission dynamics in Wuhan, China. *Nature Medicine*, 26(4), 506–510. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0822-7>
368. Wu, J., Yang, R., Yang, Z., Yao, S., Zhao, S., Wang, Y., Li, P., Song, X., Jin, L., Zhou, T., Lan, Y., Xie, L., Zhou, X., Chu, C., Qi, Y., Cao, X., & Li, Y. (2017). ROS accumulation and antiviral defence control by microRNA528 in rice. *Nature Plants*, 3(1), 16203. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.203>
369. Wu, Y., Ma, L., Zhuang, Z., Cai, S., Zhao, Z., Zhou, L., Zhang, J., Wang, P.-H., Zhao, J., & Cui, J. (2020). Main protease of SARS-CoV-2 serves as a bifunctional molecule in restricting type I interferon antiviral signaling. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 221. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00332-2>
370. Wyllie, D., Jones, H. E., Mulchandani, R., Trickey, A., Taylor-Phillips, S., Brooks, T., Charlett, A., Ades, A., EDSAB-HOME investigators, Moore, P., Boyes, J., Hormis, A., Todd, N., Reckless, I., Makin, A., & Oliver, I. (2020). SARS-CoV-2 responsive T cell numbers and anti-Spike IgG levels are both associated with protection from COVID-19: A prospective cohort study in keyworkers [Preprint]. *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*. <https://doi.org/10.1101/2020.11.02.20222778>
371. Xia, H., Cao, Z., Xie, X., Zhang, X., Chen, J. Y.-C., Wang, H., Menachery, V. D., Rajsbaum, R., & Shi, P.-Y. (2020). Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. *Cell Reports*, 33(1), 108234. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108234>
372. Yamane, D., Selitsky, S. R., Shimakami, T., Li, Y., Zhou, M., Honda, M., Sethupathy, P., & Lemon, S. M. (2017). Differential hepatitis C virus RNA target site selection and host factor activities of naturally occurring miR-122 3' variants. *Nucleic Acids Research*, 45(8), 4743–4755. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1332>
373. Yan, L., Ge, J., Zheng, L., Zhang, Y., Gao, Y., Wang, T., Huang, Y., Yang, Y., Gao, S., Li, M., Liu, Z., Wang, H., Li, Y., Chen, Y., Guddat, L. W., Wang, Q., Rao, Z., & Lou, Z. (2021). Cryo-EM Structure of an Extended SARS-CoV-2 Replication and Transcription Complex Reveals an Intermediate State in Cap Synthesis. *Cell*, 184(1), 184-193.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.016>
374. Yan, W., Zheng, Y., Zeng, X., He, B., & Cheng, W. (2022). Structural biology of SARS-CoV-2: Open the door for novel therapies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 26. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00884-5>
375. Yang, D.-M., Geng, T.-T., Harrison, A. G., & Wang, P.-H. (2021). Differential roles of RIG-I like receptors in SARS-CoV-2 infection. *Military Medical Research*, 8(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00340-5>
376. Yang, J.-R., Deng, D.-T., Wu, N., Yang, B., Li, H.-J., & Pan, X.-B. (2020). Persistent viral RNA positivity during the recovery period of a patient with SARS-CoV-2 infection. *Journal of Medical Virology*, 92(9), 1681–1683. <https://doi.org/10.1002/jmv.25940>

377. Yang, Q., Saldi, T. K., Gonzales, P. K., Lasda, E., Decker, C. J., Tat, K. L., Fink, M. R., Hager, C. R., Davis, J. C., Ozeroff, C. D., Muhrad, D., Clark, S. K., Faktor, W. T., Meyerson, N. R., Paige, C. L., Gilchrist, A. R., Barbachano-Guerrero, A., Worden-Sapper, E. R., Wu, S. S., ... Sawyer, S. L. (2021). Just 2% of SARS-CoV-2-positive individuals carry 90% of the virus circulating in communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(21), e2104547118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2104547118>
378. Yang, Z., Zhang, X., Wang, F., Wang, P., Kuang, E., & Li, X. (2020). Suppression of MDA5-mediated antiviral immune responses by NSP8 of SARS-CoV-2 [Preprint]. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/2020.08.12.247767>
379. Yekta, S., Shih, I., & Bartel, D. P. (2004). MicroRNA-Directed Cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, 304(5670), 594–596. <https://doi.org/10.1126/science.1097434>
380. Yildirim, Z., Sahin, O. S., Yazar, S., & Bozok Cetintas, V. (2021). Genetic and epigenetic factors associated with increased severity of Covid-19. *Cell Biology International*, 45(6), 1158–1174. <https://doi.org/10.1002/cbin.11572>
381. Yin, L.-B., Song, C.-B., Zheng, J.-F., Fu, Y.-J., Qian, S., Jiang, Y.-J., Xu, J.-J., Ding, H.-B., Shang, H., & Zhang, Z.-N. (2019). Elevated Expression of miR-19b Enhances CD8+ T Cell Function by Targeting PTEN in HIV Infected Long Term Non-progressors With Sustained Viral Suppression. *Frontiers in Immunology*, 9, 3140. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03140>
382. Yoshimoto, F. K. (2021). A Biochemical Perspective of the Nonstructural Proteins (NSPs) and the Spike Protein of SARS CoV-2. *The Protein Journal*, 40(3), 260–295. <https://doi.org/10.1007/s10930-021-09967-8>
383. Yuen, C.-K., Lam, J.-Y., Wong, W.-M., Mak, L.-F., Wang, X., Chu, H., Cai, J.-P., Jin, D.-Y., To, K. K.-W., Chan, J. F.-W., Yuen, K.-Y., & Kok, K.-H. (2020). SARS-CoV-2 nsp13, nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 1418–1428. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1780953>
384. Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2012). Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*, 367(19), 1814–1820. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211721>
385. Zandi, M., Shafaati, M., Kalantar-Neyestanaki, D., Pourghadamyari, H., Fani, M., Soltani, S., Kaleji, H., & Abbasi, S. (2022). The role of SARS-CoV-2 accessory proteins in immune evasion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 156, 113889. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113889>
386. Zeltyn-Abramov, E. M., Lysenko, M. A., Frolova, N. F., Markova, T. N., Belavina, N. I., Klochkova, N. N., Kondrashkina, S. V., Iskhakov, R. T., & Ushakova, A. I. (2021). Risk factors of adverse outcome of COVID-19 and experience of Tocilizumab administration in patients on maintenance hemodialysis due to diabetic kidney disease. *Diabetes Mellitus*, 24(1), 17–31. <https://doi.org/10.14341/DM12688>
387. Zhang, F., Sun, X., Zhu, Y., & Qin, W. (2019). Downregulation of miR-146a inhibits influenza A virus replication by enhancing the type I interferon response in vitro and in vivo. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 740–750. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.103>

388. Zhang, J., Cai, Y., Xiao, T., Lu, J., Peng, H., Sterling, S. M., Walsh, R. M., Rits-Volloch, S., Zhu, H., Woosley, A. N., Yang, W., Sliz, P., & Chen, B. (2021). Structural impact on SARS-CoV-2 spike protein by D614G substitution. *Science* (New York, N.Y.), 372(6541), 525–530. <https://doi.org/10.1126/science.abf2303>
389. Zhang, K., Miorin, L., Makio, T., Dehghan, I., Gao, S., Xie, Y., Zhong, H., Esparza, M., Kehrer, T., Kumar, A., Hobman, T. C., Ptak, C., Gao, B., Minna, J. D., Chen, Z., García-Sastre, A., Ren, Y., Wozniak, R. W., & Fontoura, B. M. A. (2021). Nsp1 protein of SARS-CoV-2 disrupts the mRNA export machinery to inhibit host gene expression. *Science Advances*, 7(6), eabe7386. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe7386>
390. Zhang, S., Amahong, K., Zhang, C., Li, F., Gao, J., Qiu, Y., & Zhu, F. (2022). RNA–RNA interactions between SARS-CoV-2 and host benefit viral development and evolution during COVID-19 infection. *Briefings in Bioinformatics*, 23(1), bbab397. <https://doi.org/10.1093/bib/bbab397>
391. Zhang, X., Chu, H., Wen, L., Shuai, H., Yang, D., Wang, Y., Hou, Y., Zhu, Z., Yuan, S., Yin, F., Chan, J. F.-W., & Yuen, K.-Y. (2020). Competing endogenous RNA network profiling reveals novel host dependency factors required for MERS-CoV propagation. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 733–746. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1738277>
392. Zhang, Y., Chen, Y., Li, Y., Huang, F., Luo, B., Yuan, Y., Xia, B., Ma, X., Yang, T., Yu, F., Liu, J., Liu, B., Song, Z., Chen, J., Yan, S., Wu, L., Pan, T., Zhang, X., Li, R., ... Zhang, H. (2021). The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(23). <https://doi.org/10.1073/pnas.2024202118>
393. Zhao, J., Alshukairi, A. N., Baharoon, S. A., Ahmed, W. A., Bokhari, A. A., Nehdi, A. M., Layqah, L. A., Alghamdi, M. G., Al Gethamy, M. M., Dada, A. M., Khalid, I., Boujelal, M., Al Johani, S. M., Vogel, L., Subbarao, K., Mangalam, A., Wu, C., Ten Eyck, P., Perlman, S., & Zhao, J. (2017). Recovery from the Middle East respiratory syndrome is associated with antibody and T-cell responses. *Science Immunology*, 2(14), eaan5393. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aan5393>
394. Zhao, Q., Xiong, Y., Xu, J., Chen, S., Li, P., Huang, Y., Wang, Y., Chen, W.-X., & Wang, B. (2018). Host MicroRNA hsa-miR-494-3p Promotes EV71 Replication by Directly Targeting PTEN. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 278. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00278>
395. Zheng, M., Karki, R., Williams, E. P., Yang, D., Fitzpatrick, E., Vogel, P., Jonsson, C. B., & Kanneganti, T.-D. (2021). TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nature Immunology*, 22(7), 829–838. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00937-x>
396. Zheng, Z., Ke, X., Wang, M., He, S., Li, Q., Zheng, C., Zhang, Z., Liu, Y., & Wang, H. (2013). Human microRNA hsa-miR-296-5p suppresses enterovirus 71 replication by targeting the viral genome. *Journal of Virology*, 87(10), 5645–5656. <https://doi.org/10.1128/JVI.02655-12>
397. Zhiyanov, A., Shkurnikov, M., Nersisyan, A., Hui, C., Baranova, A., & Tonevitsky, A. (2023). The signature of SARS-CoV-2 evolution reflects selective pressures within human guts. *Journal of Medical Virology*, 95(8), e28996. <https://doi.org/10.1002/jmv.28996>

398. Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., Xiang, J., Wang, Y., Song, B., Gu, X., Guan, L., Wei, Y., Li, H., Wu, X., Xu, J., Tu, S., Zhang, Y., Chen, H., & Cao, B. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A retrospective cohort study. *The Lancet*, 395(10229), 1054–1062. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
399. Zhou, J., Liu, G., Huang, X., & Gan, H. (2022). The importance of fecal nucleic acid detection in patients with coronavirus disease (COVID- 19): A systematic review and meta- analysis. *Journal of Medical Virology*, 94(6), 2317–2330. <https://doi.org/10.1002/jmv.27652>
400. Zhou, L., Yuan, Q., Ai, X., Chen, J., Lu, Y., & Yan, F. (2022). Transgenic Rice Plants Expressing Artificial miRNA Targeting the Rice Stripe Virus MP Gene Are Highly Resistant to the Virus. *Biology*, 11(2), 332. <https://doi.org/10.3390/biology11020332>
401. Zhou, P., Ma, L., Zhou, J., Jiang, M., Rao, E., Zhao, Y., & Guo, F. (2016). miR-17-92 plays an oncogenic role and conveys chemo-resistance to cisplatin in human prostate cancer cells. *International Journal of Oncology*, 48(4), 1737–1748. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3392>
402. Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., ... Shi, Z.-L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
403. Zhou, S., Lv, P., Li, M., Chen, Z., Xin, H., Reilly, S., & Zhang, X. (2023). SARS-CoV-2 E protein: Pathogenesis and potential therapeutic development. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 159, 114242. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114242>
404. Zollner, A., Koch, R., Jukic, A., Pfister, A., Meyer, M., Rössler, A., Kimpel, J., Adolph, T. E., & Tilg, H. (2022). Postacute COVID-19 is Characterized by Gut Viral Antigen Persistence in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 163(2), 495-506.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.04.037>
405. Zou, L., He, J., Gu, L., Shahrer, R. A., Li, Y., Cao, T., Wang, S., Zhu, J., Huang, H., Chen, F., Fan, X., Wu, J., & Chao, W. (2022). Brain innate immune response via miRNA-TLR7 sensing in polymicrobial sepsis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 100, 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.11.007>
406. Zou, L., Ruan, F., Huang, M., Liang, L., Huang, H., Hong, Z., Yu, J., Kang, M., Song, Y., Xia, J., Guo, Q., Song, T., He, J., Yen, H.-L., Peiris, M., & Wu, J. (2020). SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *New England Journal of Medicine*, 382(12), 1177–1179. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2001737>
407. Zunec, R. (2020). A review of HLA and COVID-19 association studies. *Molecular and Experimental Biology in Medicine*, 3(2), 25–30. <https://doi.org/10.33602/mebm.3.2.3>
408. Zuo, J., Dowell, A. C., Pearce, H., Verma, K., Long, H. M., Begum, J., Aiano, F., Amin-Chowdhury, Z., Hoschler, K., Brooks, T., Taylor, S., Hewson, J., Hallis, B., Stapley, L., Borrow, R., Linley, E., Ahmad, S., Parker, B., Horsley, A., ... Moss, P. (2021). Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. *Nature Immunology*, 22(5), 620–626. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00902-8>

409. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» (Версия 17). (2022). Минздрав России.

410. Косенок, А. (2024, November 17). Пятилетие COVID-19: Как навредила пандемия и борьба с ней. Ведомости. <https://www.vedomosti.ru/society/articles/2024/11/17/1075417-kak-navredila-pandemiya-i-borba-s-nei>

411. Шкурников М.Ю., Аверинская Д.А., Комаров А.Г., Карбышев И.А., Спешилов Г.И., Штинова И.А., Дорошенко Д.А., & Вечорко В. И. (2022). Взаимосвязь прогноза течения Covid-19 с мутациями белка Ns8 Sars-Cov-2 в зависимости от штаммовой принадлежности вируса. Доклады Российской академии наук// Науки о жизни, 507(1). <https://doi.org/10.31857/S2686738922060312>

412. Шкурников М.Ю., Макарова Ю.А., Князев Е.Н., Фомичева К.А., Ньюшко К.М., Сарибекян Э.К., Алексеев Б.Я., & Каприн А.Д. (2015). Профиль микроРНК плазмы крови здоровых доноров. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 160(11), 577–579.

ПРИЛОЖЕНИЕ А.

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ, КЛИНИЧЕСКИЕ ГРУППЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

В настоящем исследовании применен комплексный подход к решению проблемы стратификации пациентов по группам риска тяжести течения острой коронавирусной инфекции COVID-19 в зависимости от генетических особенностей пациента и вызвавшего заболевание варианта вируса SARS-CoV-2.

За время пандемии в мировом научном сообществе был накоплен огромный массив информации об эволюции генома SARS-CoV-2, были оптимизированы и разработаны подходы к классификации вируса, предприняты попытки выявить генетические детерминанты восприимчивости человека к вирусу SARS-CoV-2, установлены закономерности формирования иммунитета к нему. Однако оценка полученных знаний базировалась на научном аппарате «докомпьютерной эры».

Поэтому возникла потребность в разработке методик получения и обработки генетической информации о пациентах и огромных массивов данных о геноме вируса для прогноза тяжести течения COVID-19, продолжительности иммунитета у переболевших и вакцинированных пациентов, с применением современных методов компьютерного моделирования и математического анализа.

Период проведения исследования затронул первую, третью и четвертую волны пандемии, пришедшиеся на период с марта 2020 года по декабрь 2022 года. Потребовалось применение междисциплинарного подхода на базе молекулярной биологии, математического анализа и патофизиологии.

В этой связи в рамках настоящего исследования была разработана комплексная методика, позволившая изучить особенности течения COVID-19 в зависимости от генотипа ГКГС-I, выявить иммунодоминантные эпитопы вируса, оценить их стабильность, продемонстрировать влияние микроРНК альвеоцитов человека на геном SARS-CoV-2, разработать программное обеспечение для прогноза тяжести течения COVID-19 и клинические рекомендации по его применению.

Объектом исследования на разных этапах явились: пациенты с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 и её основным осложнением – вирусной пневмонией; генотипы их ГКГС-I; законченные случаи лечения; последовательности генома SARS-CoV-2; профиль микроРНК ткани лёгких и плазмы крови.

Предметом исследования явились:

- генотипы ГКГС-I и клиническая характеристика пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, и наличие у них конкурирующей патологии;
- исходы госпитализации при вирусной пневмонии, вызванной SARS-CoV-2;

- результаты компьютерного моделирования взаимодействия пептидов вируса SARS-CoV-2 с различными аллельными вариантами молекул ГКГС-I;
- интенсивность Т-клеточного ответа в ответ на стимуляцию различными пептидами SARS-CoV-2;
- геном различных вариантов вируса SARS-CoV-2;
- экспрессия микроРНК в ткани лёгких, представленность микроРНК в плазме крови.

В исследовании были использованы сплошной и выборочный способы проведения наблюдения, методы статистического анализа, математического моделирования, клинического обследования, секвенирования следующего поколения, генотипирования ГКГС-I, оценки Т-клеточного ответа.

Обработка собранного первичного материала, а также математико-статистический анализ полученных результатов осуществлялись в среде для математического анализа R версий 3.6.3 – 4.2.2 с использованием следующих пакетов: readr, dplyr, reshape2, ggpubr, stringr, ComplexHeatmap, pheatmap, ROCit и иных связанных пакетов.

Протоколы клинического исследования одобрены этическим комитетом РНИМУ им. Н.И.Пирогова (протокол от 16.03.2020 № 2020/07), этическим комитетом ГКБ №15 им. Филатова ДЗМ (протокол от 25.06.2021 № 237), а также комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «НЦ ПЗСРЧ». Программа настоящего исследования представлена в табл. А.1.

Табл. А.1 Программа исследования

Этап исследования	Задачи этапа	Единица наблюдения	Методы сбора первичных материалов и их объем	Источник информации	Метод исследования
I этап	Анализ отечественных и зарубежных литературных источников по теме исследования, обобщение материала, разработка программы исследования	Литературный источник	Отбор 299 литературных источников, в том числе 23 отечественных и 276 зарубежных источников	РИНЦ, PubMed	Изучения и обобщения опыта. Аналитический
II этап	Изучение взаимосвязи генотипа ГКГС-I с тяжестью COVID-19 Оценка клинической	Законченный случай госпитализации	Выборочный метод. 111 законченных случаев госпитализации	Карта выкопировки данных из формы № 003/у «Медицинская карта стационарного больного»,	Статистический Секвенирование генов ГКГС-I Сравнительного

Этап исследования	Задачи этапа	Единица наблюдения	Методы сбора первичных материалов и их объем	Источник информации	Метод исследования
	значимости генотипа ГКГС-I при прогнозе тяжести течения COVID-19	Законченный случай госпитализации	Выборочный метод. 111 законченных случаев госпитализации	образцы периферической крови пациентов	анализа Аналитический
III этап	Изучение взаимосвязи прогноза течения COVID-19 с мутациями белка NS8 SARS-CoV-2 в зависимости от штаммовой принадлежности вируса	Законченный случай госпитализации	Выборочный метод. 45 законченных случаев госпитализации	Карта выкопировки данных из формы № 003/у «Медицинская карта стационарного больного», образцы периферической крови пациентов, мазки из носо- и ротоглотки	Статистический Секвенирование генов ГКГС-I Секвенирование SARS-CoV-2 Сравнительного анализа Аналитический
IV этап	Изучение особенностей генотипа ГКГС-I пациентов в первую и третью волну COVID-19	Законченный случай госпитализации	Выборочный метод. 147 пациентов первой волны COVID-19. 219 пациентов третьей волны COVID-19 428 здоровых добровольцев (контрольная группа)	Карта выкопировки данных из формы № 003/у «Медицинская карта стационарного больного», образцы периферической крови пациентов	Статистический Секвенирование генов ГКГС-I Сравнительного анализа Аналитический
V этап	Изучение особенностей презентации пептидов вариантов Омикрон BA.1–BA.5 вируса SARS-CoV-2 молекулами ГКГС	Первичная последовательность белков варианта SARS-CoV-2	Выборочный метод. 6 первичных последовательностей	База данных GISAID	Статистический Сравнительного анализа Аналитический

Этап исследования	Задачи этапа	Единица наблюдения	Методы сбора первичных материалов и их объем	Источник информации	Метод исследования
VI этап	Оценка влияния мутаций на иммунодоминантные эпитопы вируса SARS-CoV-2	Первичная последовательность белков варианта SARS-CoV-2 Законченный случай COVID-19	Выборочный метод. 47 пептидов SARS-CoV-2. Т-лимфоциты 133 пациентов, переболевших COVID-19	Клинический анамнез, результаты ELISpot, образцы периферической крови пациентов	Статистический Секвенирование генов ГКГС-I ИФА Сравнительного анализа Аналитический
VII этап	Изучение взаимосвязи эволюции генома SARS-CoV-2 и микроРНК ткани лёгких	Первичная последовательность генома варианта SARS-CoV-2, профиль микроРНК ткани лёгких	Выборочный метод. Профиль экспрессии микроРНК 46 образцов ткани легкого, 219 геномов SARS-CoV-2	База данных GISAID, база данных Genomic Data Commons Data Portal	Статистический Сравнительного анализа Аналитический
VIII этап	Изучение влияния микроРНК на экспрессию рецептора ACE2	Результаты парных секвенирований мРНК и микроРНК	Выборочный метод. 541 парных секвенирований	База данных TCGA База данных TCGA	Статистический Сравнительного анализа Аналитический
IX этап	Изучение влияния микроРНК на тяжесть течения COVID-19	Результаты секвенирования, циркулирующих в плазме крови микроРНК	Выборочный метод. 11 секвенирований профиля микроРНК	Публично доступные данные	Статистический Сравнительного анализа Аналитический
X этап	Разработка и проверка клинической значимости па-	Законченный случай госпита-	Выборочный метод. 145 законченных случаев	Карта выкопировки данных из формы № 003/у	Статистический Секвенирование генов

Этап исследования	Задачи этапа	Единица наблюдения	Методы сбора первичных материалов и их объем	Источник информации	Метод исследования
Х этап	тогенетически обоснованного алгоритма диагностических мероприятий для прогноза тяжелого и крайне тяжелого течения COVID-19 на основе анализа генотипа ГКГС-I	лизации	госпитализации	«Медицинская карта стационарного больного», образцы периферической крови пациентов	ГКГС-I Сравнительного анализа Аналитический

Пациенты

В исследовании были использованы данные о генотипе 428 добровольцев из Федерального регистра доноров костного мозга (РНИМУ им. Н.И. Пирогова) (M. Shkurnikov et al., 2021). Группа пациентов первой волны была сформирована в период с мая по август 2020 года. Группа пациентов третьей волны была сформирована в период с июня по июль 2021. Все пациенты, участвовавшие в исследовании, были госпитализированы с COVID-19 в ГБУЗ «ГКБ № 15 ДЗМ».

Выделение ДНК

ДНК из образцов крови выделялась набором реагентов QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия). Набор предназначен для выделения геномной, митохондриальной, бактериальной или вирусной ДНК из тканей, мазков, клеток, крови, спинномозговой и других биологических жидкостей. Принцип действия набора основан на применении миниколонок с силикагелевой мембраной (спин-колонка). Силикатная мембрана имеет положительный заряд, а отрицательно заряженная ДНК обладает высокой аффинностью к такой мембране. При центрифугировании исходного клеточного лизата ДНК задерживается на мембране, а остальные компоненты проходят через неё в раствор, который затем удаляется. Преимущества такого метода заключаются в повышенной чистоте и хорошем качестве выделенных нуклеиновых кислот, высокой воспроизводимости и простоте по сравнению с другими методами выделения ДНК.

После выделения качество ДНК было проверено спектрофотометрически на NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific, США) в 1 мкл полученной жидкости.

Подготовка библиотек для секвенирования генов ГКГС

Подготовку библиотек осуществляли с помощью набора реагентов для подготовки библиотек фрагментов ДНК генов ГКГС I и II классов для генотипирования высокопроизводительным секвенированием (NGS) «HLA-Эксперт» (регистрационное удостоверение № РЗН 2019/9208 от 08.11.2019, ДНК-Технология, Россия).

Типирование генов ГКГС-I подразумевает определение всех аллелей генов HLA-A, HLA-B и HLA-C, кодирующих одинаковую последовательность белка в антигенсвязывающем домене, и исключение нулевых аллелей, имеющих полиморфизмы при отсутствии экспрессии кодируемого белка на клетке (Harmer et al., 2018). Для решения этой задачи использовано генотипирование 2 и 3 экзона. Для решения задачи определения истинных гомозигот и других неопределенностей использовано генотипирование дополнительных экзонов и интронов.

Секвенирование

Секвенирование библиотек фрагментов ДНК генов ГКГС I и II классов осуществляли с помощью секвенатора Illumina MiSeq (Illumina, США) на стандартной проточной ячейке набора реагентов MiSeq Reagent Kit v2 500-cycles (Illumina, США) в режиме парных прочтений 2x250.

Определение генотипа ГКГС- I по данным секвенирования

Типирование генов ГКГС-I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) на уровне высокого разрешения методом высокопроизводительного секвенирования осуществляли с помощью программного обеспечения «HLA-Эксперт» согласно Руководству пользователя к программному обеспечению с использованием базы данных IPD-IMGT/HLA версии 3.41.0 (Robinson et al., 2020). Минимальная глубина прочтения каждого экзона составила 130x.

Определение профиля микроРНК ткани лёгких

Данные секвенирования микроРНК лёгких были загружены из коллекции LUAD портала GDC (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). В соответствии с прилагавшейся клинической аннотацией среди данных о секвенировании 510 образцов было отобрано 46, классифицируемых как «прилежащие здоровые ткани». Нормализация библиотек секвенирования с последующим удалением низкоэкспрессированных фрагментов была выполнена с помощью алгоритма edgeR-TMM. Из полученных 316 видов микроРНК отобрали наиболее представленные, на которые суммарно приходится 95% всех микроРНК в ткани лёгких. В качестве экспрессии микроРНК рассматривалось усреднение количества ридов на миллион (CPM-шкала), взятое по ранее отобраным 46 образцам.

Забор образцов для генотипирования вируса SARS-CoV-2

Использовали образцы биологического материала из верхних дыхательных путей пациентов с подозрением на COVID-19.

Для исследования образцов на наличие РНК SARS-CoV-2 применяли различные наборы реагентов для ОТ-ПЦР и комплектные к ним наборы для выделения РНК: ПОЛИВИР SARS-CoV-2 Express (ЛИТЕХ, Россия), АмплиПрайм SARS-CoV-2 DUO / МагноПрайм ФАКТ-Р (НекстБио, Россия) и SARS-CoV-2 «СоV-2-Тест» (ТестГен, Россия).

Пригодными к секвенированию считали образцы, в которых концентрация РНК SARS-CoV-2 при постановке ОТ-ПЦР соответствовала пороговому числу циклов менее 28–31.

Подготовка библиотек и секвенирование РНК SARS-CoV-2

На первом этапе подготовки библиотек проводилось обогащение образца последовательностями генома SARS-CoV-2 методом обратной транскрипции и мультиплексной амплификацией со специфичными праймерами. Синтез кДНК с матрицы РНК вируса и последующая ее амплификация производились последовательно в одной пробирке, содержащей смесь ферментов для обратной транскрипции и амплификации. Для мультиплексной амплификации использовали набор специфических праймеров (ДиаСистемс, Россия).

Первый этап выполняли на амплификаторах T100 (Bio-Rad, США): при температуре 55°C проводили реакцию обратной транскрипции с образованием первой цепи кДНК, после чего смесь нагревали до 95°C и проводили этап амплификации полученной кДНК.

Наборы, использовавшиеся для мультиплексной амплификации праймеров (производитель «ДиаСистемс», Россия), содержали ген-специфические части из базы данных международного консорциума исследователей ARTIC network (Advancing Real Time Infection Control).

После данного этапа осуществляли баркодирование продуктов ОТ-ПЦР без промежуточной очистки, с использованием набора адаптерных олигонуклеотидов (ДиаСистемс, Россия), совместимых с платформой секвенирования MiSeq (Illumina, США).

Секвенирование готовых библиотек осуществлялось на секвенаторе Illumina MiSeq, с использованием набора реактивов MiSeq 600 cycles v3, запускаемого в режиме чтения 2x250 п.о. Среднее число прочтений на один образец составляло примерно 64000.

Определение варианта SARS-CoV-2

Первичный контроль качества данных, получаемых в ходе биоинформатического анализа, выполняли следующим образом: полученные сырые данные прочтений в формате fastq с прибора Illumina MiSeq Dx (Illumina, США) фильтровали по качеству с помощью ПО Trimmomatic (v.0.39) с качеством более Q20.

Прочтения выравнивались на референсный геном SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (GenBank: MN908947.3), с использованием ПО Minimap2 (2.24). Из выровненных прочтений удалялись последовательности праймеров мультиплексной панели для ОТ-ПЦР, не несущие геномной информации. После чего следовала процедура поиска вариантов, с помощью ПО GATK (4.2.6.1), т.е. сравнение картированных прочтений с геномом сравнения и выявления отличий анализируемого образца по отношению к референсному геному, при наличии покрытия более 5. На основе найденных вариантов собирались итоговые последовательности геномов SARS-CoV-2 в формате fasta с помощью программы BsfTools.

Последовательности аннотировались с применением баз данных Pangolineage и NextStain. В процессе аннотации каждой найденной вариации в геноме присваивалось соответствующее белковое изменение и определялся штамм и подштамм генома нового коронавируса, присутствующего в образце, взятом у пациента с подозрением на COVID-19.

Оценка количества клеток, секретирующих IFN- γ

Выделение мононуклеаров периферической крови (РВМС). 30 мл венозной крови собирали в пробирки с ЭДТА (Sarstedt, Германия) и подвергали центрифугированию в градиенте плотности фиколла (ПанЭко, Россия) (400 g, 30 мин). Изолированные РВМС промывали ФСБ, содержащим 2 мМоль ЭДТА, и использовали для анализов или замораживали в эмбриональной бычьей сыворотке, содержащей 7% ДМСО.

Экспансия Т-лимфоцитов

При экспансии Т-клеток использовали методику, описанную ранее Титовым и соавторами (Titov et al., 2022). Выделенные РВМС размножали в течение 12 дней со смесью 94 пептидов SARS-CoV-2 (конечная концентрация каждого = 10 мкМоль). На 10-й и 11-й дни аликвоту клеточной суспензии использовали для иммуноферментного анализа анти-IFN- γ с целью оценки ответов на отдельные пептиды.

Стимуляция Т-лимфоцитов отдельными пептидами

После 10 дней экспансии аликвоту Т-лимфоцитов дважды промывали в 1,5 мл ФСБ, затем переносили в среду AIM-V (Thermo Fisher Scientific, США), рассеивали по 1×10^5 клеток на лунку 96-луночного планшета и инкубировали в течение ночи (12–16 часов) с частичными пулами пептидов (подмножествами исходного набора пептидов). На следующий день культуральную среду собирали и тестировали на IFN- γ , как описано ниже. Если клетки положительно реагировали на один или несколько пулов, снова отбирали аликвоту клеточной культуры на 11–12-й день и стимулировали ее, как описано выше,

индивидуально каждым пептидом (2 мкМоль) из соответствующего пула пептидов. Были протестированы только те пептиды, для которых была предсказана высокая аффинность с набором молекул ГКГС-I каждого человека.

Анти-IFN- γ ИФА

96-луночные культуральные планшеты с клетками, инкубированными с пептидными пулами или отдельными пептидами, центрифугировали в течение 3 минут при 700 g, 100 мкл среды переносили на планшеты для ИФА и проводили определение IFN- γ (Titov et al., 2022). ОП измеряли при 450 нм на планшетном фотометре Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) – ОП₄₅₀.

Тестовые лунки (среда из клеток, инкубированных с пептидами) сравнивали с лунками отрицательного контроля (клетки, инкубированные с растворителем для пептидов). Тестовые лунки с соотношением ОП_{450_тест_лунка}/ОП_{450_отрицательный_контроль} $\geq 1,25$ и разницей ОП_{450_тест_лунка} – ОП_{450_отрицательный_контроль} $\geq 0,08$ считали положительными. Пептиды с соотношением между 1,25 и 1,5 снова тестировали до 3 раз в качестве биологических повторов, чтобы убедиться в точности их ответа, и пептиды с 2 или 3 положительными результатами считались положительными.

Пептиды

Пептиды с чистотой не менее 95% были синтезированы Peptide 2.0 Inc. или в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (табл. А.2).

Табл. А.2 Панель высокоаффинных пептидов для аллелей HLA-A*01:01 и HLA-A*02:01 из ORF1ab

Пептид	Оценка аффинности взаимодействия, нМоль	
	HLA-A*01:01	HLA-A*02:01
CTDDNALAYY	3	19896
TTDPSFLGRY	5	27903
DTDFVNEFY	6	33483
GTDLEGNFY	9	33917
PTDNYITTY	12	35372
NTCDGTTFTY	14	25394
HTTDPSFLGRY	42	33468
YLDAYNMMI	221	2
FTYASALWEI	5189	17
FLLNKEMYL	13747	2
YLFDESGEFKL	18838	6

Пептид	Оценка аффинности взаимодействия, нМоль	
	HLA-A*01:01	HLA-A*02:01
ALWEIQQVV	27002	5
NMLRIMASL	29822	46
RQLLFVVEV	31003	17
KLWAQCVQL	33067	8

Прогноз аффинности взаимодействия молекула ГКГС-I – пептид

Создание набора последовательностей пептидов SARS-CoV-2. Протеомы вариантов SARS-CoV-2 (27 вирусных белков) были получены из базы данных GISAID (Elbe & Buckland-Merrett, 2017). В качестве эталонного вируса был использован вариант Wuhan-Hu-1 (EPI_ISL_402125).

Набор вирусных пептидов был создан путем рассмотрения всех возможных фрагментов белков SARS-CoV-2 длиной от 8 до 14 аминокислотных остатков (потенциальные эпитопы CD8+ Т-лимфоцитов).

Учет мутаций SARS-CoV-2, связанных с конкретным вариантом вируса, осуществляли по следующей методике:

– построили попарное глобальное выравнивание эталонных и мутантных белков с помощью Biopython (Cock et al., 2009). Это позволило определить соответствие между эталонными и мутантными пептидами, взяв пары пептидов с одинаковыми координатами начала/конца при выравнивании (пропуски были удалены из последовательностей пептидов). Если эталонный и мутированный пептиды были одинаковыми, то такая пара исключалась из последующего анализа. Проанализировали два частных случая:

3) либо эталонный, либо мутантный пептид был слишком коротким, чтобы его можно было рассматривать как эпитоп CD8+ Т-лимфоцитов. Например, делеция внутри эталонного 8-мерного пептида привела к 7-меру, который не подходит для презентации на ГКГС-I. В этом случае эталонный пептид считался не имеющим пары;

4) мутированный пептид относился к набору эталонных пептидов (после исключения пробелов). В качестве примера рассмотрим пептид FKLKDCVMY из белка NSP6 эталонного протеома. Делеция SGF 106–108 в штамме UK привела к делеции первой аминокислоты пептида, поэтому рассматриваемый пептид после мутации принимает вид KLKDCVMY. Поскольку эта последовательность принадлежала эталонному пептиду, считали пептид FKLKDCVMY не имеющим пары;

– выбор аллельных вариантов генов ГКГС-I: HLA-A, -B, -C. Стремясь составить список наиболее частых аллелей ГКГС-I, использовали базу данных CIWD v3.0.0 (Hurley et al., 2020). Были проанализированы частоты аллелей HLA для разных групп населения, таких как AFA (африканцы/афроамериканцы), API (азиатские/тихоокеанские острова), EURO (европейцы), MENA (Ближний Восток/северное побережье Африки), HIS (Южная или Центральная Америка/лати-

ноамериканцы), NAM (индейские популяции) и UNK (множество предков/другое). Затем из объединения 10 наиболее распространенных аллелей для каждой группы населения был составлен окончательный список аллелей.

МЕТОДИЧЕСКИЙ ОПЫТ ОЦЕНКИ РОЛИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МИКРОРНК

Профиль микроРНК плазмы

МикроРНК плазмы крови вовлечены в межклеточную коммуникацию, а их содержание в плазме может быть использовано для диагностики различных физиологических и патологических состояний организма (Turchinovich et al., 2013). Поэтому описание полного спектра микроРНК плазмы представляет собой чрезвычайно важную задачу. В настоящее время широкое применение получили три экспериментальных подхода: скрининг микроРНК с помощью ПЦР, гибридизация на чипах и секвенирование. Количество микроРНК, детектируемых первыми двумя методами, ограничено числом зондов и составляет, как правило, ~80–800 для ПЦР (например, Serum & plasma miScript miRNA PCR Array производства Qiagen и microRNA Ready-to-Use PCR panels производства Exiqon) и 800–1500 для чипов (например, miRCURY LNA microRNA Arrays производства Exiqon, США и miRNA 2.0–3.0 arrays производства Affymetrix, США). Поэтому профили микроРНК плазмы, полученные с использованием разных наборов зондов, будут существенно различаться. Так, к настоящему времени большинство работ выполнено с использованием систем, позволяющих детектировать несколько десятков-сотен микроРНК, и именно на основании этих данных сложились существующие представления о профилях микроРНК плазмы. Для оценки профиля микроРНК здоровых доноров были использованы чипы нового поколения, содержащие зонды к 2500 микроРНК (GeneChip miRNA 4.0 arrays, Affymetrix, США, созданы на основе MirBase, версия 20).

Чипы GeneChip miRNA 4.0, помимо зондов к микроРНК человека, содержат зонды к микроРНК дрозофилы, в частности, *D. melanogaster*. Некоторые микроРНК *D. melanogaster* имеют гомологов у человека (Ibáñez-Ventoso et al., 2008) и поэтому при гибридизации с препаратами РНК человека давали интенсивный гибридизационный сигнал. Однако большинство микроРНК не имеют гомологов у человека (Ibáñez-Ventoso et al., 2008), в связи с чем уровень их гибридизационного сигнала соответствует фоновым значениям. Поэтому фоновым сигналом считали гибридизационный сигнал микроРНК *D. melanogaster*, не имеющих гомологов у человека. В качестве порогового выбрали значение 1,49 относительных единиц. Определенный таким образом порог соответствовал 95 перцентили, т.е. гибридизационный сигнал 95% микроРНК *D. melanogaster* оказался ниже порогового значения.

Уровень экспрессии, превышающий фоновые значения, обнаружен для 262 микроРНК. Таким образом, в плазме обнаружено ~ 10% известных микроРНК. Сходные данные получены при изучении профилей экспрессии различных типов клеток, в частности, клеток крови (Basso et al., 2009; X. Liu et al., 2012; Ward et

al., 2011). Среди 20 микроРНК с наиболее высоким уровнем экспрессии в плазме здоровых людей можно выделить hsa-miR-486-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-16-5p.

Оказалось, что среди обнаруженных нами микроРНК плазмы значительную часть (69 микроРНК; ~30%) составляют микроРНК, кодируемые миртронами. Миртроны – это гены микроРНК, локализованные в коротких интронах, так что в их процессинге роль Drosha выполняет сплайсосома (Curtis et al., 2012). Миртронами кодируется ~15% микроРНК человека (Ladewig et al., 2012). Таким образом, в плазме крови доля транскриптов этих необычных генов в два раза выше ожидаемой ($p < 0,01$). Следует отметить, что уровень экспрессии миртронов, как правило, ниже, чем у «канонических» микроРНК (Ladewig et al., 2012). Поэтому высокое содержание транскриптов миртронов в плазме может свидетельствовать о существовании механизмов их специфической секреции, возможно, основанных на разнице в механизмах процессинга миртронов и «канонических» микроРНК.

Профиль микроРНК плазмы, ассоциированных с гемолизом

Несмотря на то, что микроРНК в плазме довольно стабильны и выдерживают несколько циклов замораживания-размораживания, разработка диагностических критериев на их основе осложнена отсутствием общепринятых критериев контроля качества преаналитических стадий работы с образцами. К основным причинам преаналитической погрешности в оценке профиля микроРНК можно отнести контаминацию плазмы клеточными компонентами (прежде всего, тромбоцитами) и эритроцитарной микроРНК вследствие гемолиза. Предложено несколько подходов к контролю качества плазмы для последующего анализа профиля микроРНК. Самым простым и высокоэффективным является спектрофотометрическое определение концентрации гемоглобина в плазме крови. Этот метод позволяет на преаналитическом этапе исключить из исследования образцы с высоким уровнем гемолиза (более 0,22 г/л) (Kirschner et al., 2011). В то же время, необходимо понимать, что эритроциты могут влиять на концентрацию в плазме ограниченного перечня микроРНК. Известно, что преобладающими микроРНК в эритроцитах являются несколько членов семейства let-7, микроРНК, ассоциированные с регуляцией гемопоэза (miR-181A, miR-223, miR-15, miR-16, miR-451, miR-144) (S.-Y. Chen et al., 2008; Rasmussen et al., 2010b). Уровень экспрессии характерных для эритроцитов микроРНК может быть использован в качестве критерия контроля качества аналогично уровню гемоглобина. Данный подход может быть полезен в случаях, когда исследователи работают с уже выделенной из плазмы микроРНК и не имеют информации об уровне гемоглобина. Несмотря на свою простоту и эффективность, данные подходы не лишены недостатков, в частности, они исключают из исследования значительное число образцов при том, что гемолиз затронул лишь незначительный спектр микроРНК.

Была сформирована коллекция плазмы крови, состоящая из 39 образцов. Забор крови производился с использованием вакуумно-аспирационных пробирок S-Monovette EDTA-KE 8 мл (Sarstedt, Германия).

Выделение плазмы производилось с помощью центрифуги 5810 R (Eppendorf, Германия) в два этапа по 10 минут каждый: первый – при $2000 \times g$, с последующим переносом верхней фазы в новую пробирку, второй этап проводился при $4000 \times g$. Все этапы проводились при комнатной температуре, скорость разгона и торможения центрифуги устанавливалась на средний уровень.

В каждом образце плазмы определялось содержание гемоглобина. Определение концентрации гемоглобина производилось спектрофотометрически с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США) по формуле $C_{\text{Hb}} = 1,58A_{415} - 0,95A_{450} - 2,91A_{700}$ с пределом чувствительности 0,01 г/л (Fairbanks et al., 1992).

Выделение РНК осуществляли из 200 мкл плазмы с помощью набора реагентов miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия). Принцип действия набора основан на гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции с последующей сорбцией РНК на кремниевой мембране.

Анализ некодирующих РНК в образцах проводили с помощью микрочипов GeneChip miRNA 4.0 (Affymetrix, США) по протоколу производителя. Анализируемые данные микрочиповых исследований были совместно преобразованы, после чего была осуществлена оценка экспрессии для входящих в микрочипы наборов проб. Преобразование и оценка экспрессии с использованием метода RMA проводились в Affymetrix Expression Console (версия 1.4.1.46).

Корреляционный анализ по методу Спирмена проводили в среде статистических вычислений R для микроРНК с экспрессией выше 1,49 (Шкурников et al., 2015) в не менее чем 10% образцов. Для коррекции *p*-значения, связанной с учетом множественности проверки гипотез, использовался метод Бенджамини-Хохберга. МикроРНК считали статистически значимо коррелирующей с уровнем гемоглобина при коэффициенте корреляции Спирмена не менее 0 и $p < 0,05$ (после поправки Бенджамини-Хохберга).

Концентрация гемоглобина в образцах плазмы составила от 0,1 г/л до 0,64 г/л (интерквартильный размах 0,30 – 0,37 г/л, медиана 0,30 г/л), что свидетельствует о гемолизе в ряде образцов. Один эритроцит содержит около $2-3 \times 10^{-4}$ пг РНК (S.-Y. Chen et al., 2008) и около 30 пг гемоглобина. Интерквартильный размах концентрации гемоглобина в 0,07 г/л соответствует гемолизу около 0,04% ($1,87 \times 10^7$) эритроцитов.

В процессе эритропоэза эритробласт теряет ядро, последовательно переходя в ретикулоцит, а затем в зрелый эритроцит. Несмотря на потерю ядра, эритроцит содержит около 600 молекул РНК, а также некоторое количество микроРНК (Goh et al., 2007). Микрочиповый анализ микроРНК плазмы крови выявил 494 малых некодирующих РНК с уровнем экспрессии в более чем в 10% образцов выше 1,49. Уровень 9 микроРНК значимо коррелировал с концентрацией гемоглобина: hsa-miR-486-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-107, hsa-miR-20b-5p. Полученные нами данные согласуются с результатами секвенирования. По результатам глубокого секвенирования транскриптома зрелых эритроцитов около 60% эритроцитарной микроРНК приходится на hsa-miR-451a (Azzouzi et al., 2015). Необходимо отметить, что интерквартильный размах представленности микроРНК, коррелирую-

щих с концентрацией гемоглобина, составил всего около единицы в \log_2 -шкале (примерно соответствует одному циклу ПЦР), что не исключает возможности использования уровня этих микроРНК для диагностики даже в частично гемолизированных образцах.

Нами впервые обнаружена связь между представленностью в плазме hsa-miR-107, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p и hsa-miR-20b-5p и концентрацией гемоглобина, что может свидетельствовать о наличии этих микроРНК в эритроцитах.

Результаты исследования свидетельствуют о корреляции ограниченного спектра микроРНК плазмы крови с уровнем гемолиза.

Взаимосвязь уровня циркулирующих в плазме крови микроРНК с их экспрессией в ткани

В рамках предварительных исследований была проверена гипотеза о взаимосвязи циркулирующих в плазме крови микроРНК и поражения определенного типа ткани организма. Была сформирована коллекция образцов плазмы крови. Цельная кровь получена от 18 пациентов с метастатической формой рака предстательной железы (РПЖ) и 18 пациентов с неметастатической формой РПЖ после подписания информированного согласия. Выделение плазмы осуществлялось согласно разработанному ранее протоколу, минимизирующему гемолиз и выход микроРНК из форменных элементов крови (M. Yu. Shkurnikov et al., 2016). Уровень гемолиза оценивался спектрофотометрически (Шкурников et al., 2015).

Выделение тотальной РНК производилось из 200 мкл плазмы крови путём гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции с последующей сорбцией на кремниевой мембране с помощью набора реагентов miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя.

Образцы РНК анализировались с помощью микрочипов GeneChip miRNA 4.0 (Affymetrix, США), детектирующих все некодирующие и малые РНК, входящие в базу данных miRBase v. 20, включая зрелые и незрелые микроРНК. Совместная предобработка CEL-файлов и оценка экспрессий индивидуальных наборов проб осуществлялась с помощью Affymetrix Expression Console (сборка 1.4.1.46) в режиме «RMA+DAGB-Human_only». Оценка характеристик дифференциальной представленности индивидуальных наборов проб в группах образцов, соответствующих метастатической и неметастатической формам РПЖ, осуществлялась с помощью Affymetrix Transcriptome Analysis Console (сборка 3.0.0.466).

Для анализа были оставлены только те наборы проб, для которых уровень представленности в логарифмической шкале находился выше уровня фона, то есть составлял не менее 1,49 (M. Yu. Shkurnikov et al., 2016). Для коррекции уровней статистической значимости (p -value) с учетом множественности одновременно проверяемых гипотез использовалась поправка Бенжамини-Хохберга.

Поиск пар микроРНК, разделяющих группы образцов, соответствующих метастатической и неметастатической формам РПЖ, осуществлялся на основе переборной стратегии (V. V. Galatenko et al., 2015). Последовательно рассматри-

вались все пары, в которых обе микроРНК имели хотя бы в одной из групп представленность выше уровня фона. Для каждой пары методом опорных векторов с линейным ядром строились классификаторы и оценивались их характеристики (Cortes & Vapnik, 1995). При построении использовалась логарифмическая шкала представленности. Штрафы за ошибки для групп брались обратно пропорциональными размерам групп образцов. Рассматривалось три значения штрафной константы C : 1, 16 и 256. Пара микроРНК считалась обеспечивающей удовлетворительную классификацию, если хотя бы для одного из значений штрафной константы характеристики качества классификации удовлетворяли предустановленным порогам. В качестве значений порогов были выбраны 20% для общего числа ошибок и 70% для чувствительности и специфичности (дополнительный контроль чувствительности и специфичности при основном контроле общего числа ошибок позволяет обеспечить сбалансированность классификации).

Оценка уровня статистической достоверности гипотезы о том, что разделение сравниваемых групп идентифицированной парой микроРНК не является случайным, осуществлялась с использованием перестановочной техники (Monte Carlo permutation testing) (Ernst, 2004). Выбирался миллион случайных перестановок меток групп (все перестановки полагались равновероятными), для каждой перестановки описанным выше способом строились линейные классификаторы и вычислялась доля перестановок меток, для которых классификация удовлетворяла описанным выше порогам (не более 20% для общего числа решений и не менее 70% для чувствительности и специфичности). Оценка p -value полагалась равной этой доле.

После совместной предобработки CEL-файлов и исключения из рассмотрения микроРНК с уровнем представленности не выше фонового в каждой из двух сравниваемых групп (группы образцов, соответствующих метастатической и неметастатической формам РПЖ), в рассмотрении остался 231 набор проб, соответствующий в совокупности 230 видам микроРНК.

Ни одна из микроРНК не была дифференциально представлена в сравниваемых группах образцов (наименьшее нескорректированное $p = 2,2 \times 10^{-4}$, что соответствует скорректированному $p = 0,999$ при поправке на общее число наборов проб и 0,052 при коррекции на наборы проб, имеющих хотя бы в одной из групп образцов экспрессию выше фоновой). Однако в силу того, что транскрипты со сравнительно низким уровнем индивидуальной дифференциальной представленности могут в совокупности обеспечивать высокую информативность (V. V. Galatenko et al., 2015), был осуществлен поиск пар микроРНК, обеспечивающих качественное разделение сравниваемых групп. Метод опорных векторов при настройке классификатора минимизирует не число ошибок, а функционал, одновременно учитывающий ширину разделяющего коридора и суммарный штраф за попадание в разделяющий коридор и далее в неверную полуплоскость. Среди пар, состоящих из микроРНК с представленностью хотя бы в одной из групп на уровне выше фонового, были отобраны все те пары, которые обеспечили совокупное число ошибок не более 20%, а также чувствительность и специфичность не менее 70%.

Выявлено три пары, удовлетворяющие данным критериям: hsa-miR-320c, hsa-miR-5680; hsa-miR-328-5p, hsa-miR-6805-5p; hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-297. Первые две пары обеспечили сходное качество классификации: чувствитель-

ность 72,2%, специфичность 83,3% (совокупная доля ошибок 19,4%), третья пара позволила достичь чувствительности 72,2% при специфичности 88,9% (совокупная доля ошибок также 19,4%). С учетом максимальной чувствительности и специфичности наиболее перспективной для изучения и практического применения представляется третья пара (hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-297). В данной паре обе микроРНК имеют более высокую представленность в плазме крови пациентов с метастатической формой РПЖ. Статистическая значимость разделяющей способности этой пары микроРНК, оцененная с использованием традиционной перестановочной техники, оказалась достаточно высокой ($p < 5,0 \times 10^{-5}$).

Ранее было показано, что уровень miR-297 более чем в 2 раза повышен в сыворотке больных РПЖ по сравнению с больными с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (Haldrup et al., 2014). При этом в андроген-независимых линиях РПЖ, таких как PC3 и DU145, hsa-miR-297 экспрессируется на высоком уровне и является необходимой для проявления эффектов прогрессии РПЖ, связанных с онкогенной длиной некодирующей РНК PlncRNA-1 (Fang et al., 2016).

Hsa-miR-19b-3p относится к кластеру miR-17-92, который характеризуется онкогенными свойствами благодаря регуляции клеточной выживаемости, пролиферации, дифференцировки и клеточного цикла. Было показано, что стимуляция гиперэкспрессии данного кластера в клеточной линии РПЖ DU-145 приводит к повышению пролиферативной, миграционной и инвазивной активности (P. Zhou et al., 2016).

Таким образом, в ряде предварительных экспериментов был охарактеризован профиль микроРНК плазмы доноров, продемонстрирована возможность работы с образцами плазмы контаминированными гемолизом, показана взаимосвязь профиля микроРНК и поражения определенной ткани организма человека. Данные исследования заложили методические основы для оценки роли микроРНК в патогенезе COVID-19.

Статистическая обработка данных

Частоты аллелей в рассматриваемых когортах оценивали путем деления числа встречаемости данного аллеля на удвоенное число пациентов в когорте (т.е. идентичные аллели учитывали как две встречаемости). Для статистического анализа использовали следующие функции из библиотеки stats в R: fisher.test для точного критерия Фишера, wilcox.test для U-критерия Манна-Уитни. Кроме того, была использована поправка на множественность сравнений Бенджамини-Хохберга. Графики были построены с помощью библиотек ComplexHeatmap, pheatmap и ROCit.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б.

РУКОВОДСТВО ПО РАСЧЕТУ «ИНДЕКСА РИСКА» С ПОМОЩЬЮ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ «АФФИСЕНС»

При разработке способа оценки риска развития тяжелой формы течения коронавирусной инфекции COVID-19 (патент RU 2 751 410), реализованного в виде программного обеспечения «Аффисенс» по ТУ 58.29.32-001-16992475-2021, было проведено HLA-генотипирование 111 умерших пациентов с COVID-19, а также 428 человек из контрольной группы (Shkurnikov et al., 2021). Валидация способа оценки риска была проведена на выборке 45 пациентов с коронавирусной инфекцией COVID-19 (Iturrieta-Zuazo et al., 2020).

Состав функций

1) Проверки целостности базы данных интегральных оценок аффинности взаимодействия вариантов аллелей генов HLA-A, HLA-B, HLA-C с пептидами белков вируса SARS-CoV-2 (штамм Wuhan-Hu-1, NCBI Reference Sequence: NC_045512.2) перед каждым анализом.

2) Ручной ввод генотипа аллелей генов HLA-A, HLA-B, HLA-C.

3) Автоматическая проверка соответствия введенной информации требованиям программного обеспечения «Аффисенс».

4) Инвариантное определение индекса риска развития тяжелой формы течения коронавирусной инфекции COVID-19.

5) Оценка принадлежности носителя генотипа аллелей генов HLA-A, HLA-B, HLA-C к одной из трех категорий риска развития тяжелой формы течения коронавирусной инфекции COVID-19: «низкий риск», «средний риск», «высокий риск».

УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ

Минимальный состав аппаратных средств

Для работы программного обеспечения «Аффисенс» требуется IBM-совместимый персональный компьютер (ноутбук), включающий в себя:

- процессор семейства x86 с тактовой частотой 1 ГГц или выше;
- оперативную память объемом 2 Гб или выше;
- жесткий диск объемом 40 Гб и выше;
- графический адаптер: графическое устройство Microsoft DirectX 9;
- монитор с разрешением экрана не менее 1024 x 768 пикселей.

Системные программные средства, используемые программным обеспечением «Аффисенс», должны быть представлены локализованной версией операционной системы Windows 10 или выше и средой разработки и исполнения Python 3.6 или выше.

Скачать и установить среду разработки и исполнения Python версии не ниже 3.6 рекомендуется с официального сайта <https://www.python.org>.

Требования к персоналу (пользователю)

Конечный пользователь программы (оператор) должен обладать практическими навыками работы с графическим пользовательским интерфейсом операционной системы, должен быть аттестован минимум на II квалификационную группу по электробезопасности, иметь квалификацию «Пользователь ЭВМ».

Недопустимо использование программного обеспечения для нового способа медицинского применения, не заявленного в данном руководстве оператора.

Требования к данным о генотипе аллелей генов HLA-A, HLA-B, HLA-C

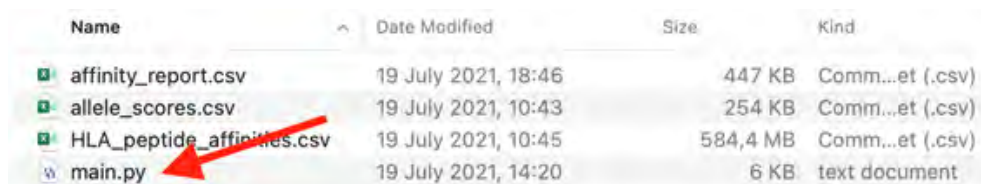
Данные о генотипе аллелей генов HLA-A, HLA-B, HLA-C должны содержать достоверную информацию с точностью до второй группы знаков.

Следует использовать результаты генотипирования аллелей генов HLA-A, HLA-B, HLA-C с помощью высокопроизводительного секвенирования (NGS).

ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОГРАММЫ

Загрузка и запуск программы

Запустить программное обеспечение «Аффисенс» двойным нажатием на ярлыке «main.py» (рис. Б.1),



Name	Date Modified	Size	Kind
affinity_report.csv	19 July 2021, 18:46	447 KB	Comm...et (.csv)
allele_scores.csv	19 July 2021, 10:43	254 KB	Comm...et (.csv)
HLA_peptide_affinities.csv	19 July 2021, 10:45	584,4 MB	Comm...et (.csv)
main.py	19 July 2021, 14:20	6 KB	text document

Рис. Б.1

После запуска программного обеспечения «Аффисенс» откроется диалоговое окно (рис. Б.2).

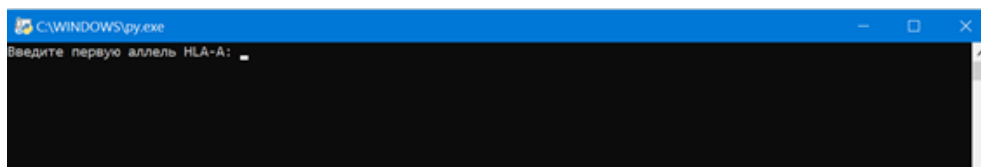


Рис. Б.2

ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОГРАММЫ

1) Перед началом ввода данных генотипа необходимо вписать в протокол (лабораторный журнал) уникальный идентификатор пациента и данные о генотипе аллелей генов HLA-A, HLA-B, HLA-C.

2) Диалоговое окно содержит запрос программы на ввод генотипа первой аллели гена HLA-A (рис. Б.3).

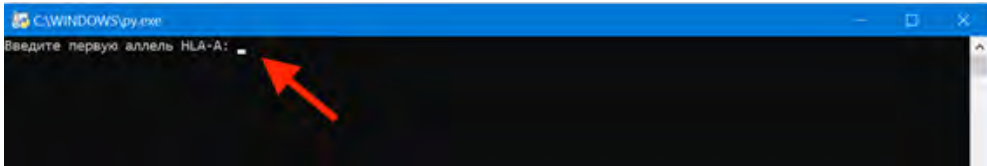


Рис. Б.3

3) Оператору необходимо ввести генотип аллели в формате HLA-X*YY:ZZ, где X -- название гена, YY -- серотип аллели, а ZZ -- вариант серотипа аллели (рис. Б.4).

Допустим ввод генотипа аллели в формате HLA-XY:ZZ, где X -- название гена, YY -- серотип аллели, а ZZ -- вариант серотипа аллели.

вариант серотипа

HLA-A*01:01

ген серотип

Рис. Б.4

4) После корректного ввода генотипа первой аллели программа выдаст запрос на ввод генотипа второй аллели (рис. Б.5). Его необходимо ввести в соответствии с требованиями формата ввода, указанными в п.п. 3.

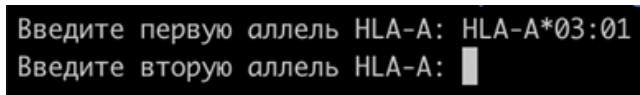


Рис. Б.5

5) После корректного ввода генотипов шести аллелей программа выдаст значение «Индекса риска» (рис. Б.6).

```
Введите первую аллель HLA-A: HLA-A*03:01
Введите вторую аллель HLA-A: HLA-A*25:01
Введите первую аллель HLA-B: HLA-B*07:02
Введите вторую аллель HLA-B: HLA-B*18:01
Введите первую аллель HLA-C: HLA-C*07:02
Введите вторую аллель HLA-C: HLA-C*12:03
Индекс риска: 54.30309406196886
```

Рис. Б.6

Завершение работы программы

После корректного ввода генотипов шести аллелей и вывода значения «Индекса риска» программное обеспечение «Аффисенс» ожидает нажатия любой клавиши для завершения работы программы.

Интерпретация результатов

В математическую модель передается генотип аллелей генов HLA-A, HLA-B, HLA-C. Математическая модель возвращает «Индекс риска», отражающий интегральную оценку способности пациента сформировать популяцию CD8+ Т-лимфоцитов, направленную против вируса SARS-CoV-2.

Врач, пользуясь данной информацией, формирует заключение по прогнозу течения COVID-19 у пациента, принимая данные по «Индексу риска» или формирует собственную оценку риска тяжелого течения COVID-19, основываясь на результатах анализа аффинности взаимодействия молекул ГКГС класса I с пептидами вируса SARS-CoV-2, содержащуюся в файле affinity_report.csv.



**ПАТОГЕНЕЗ COVID-19:
микроРНК И ГЛАВНЫЙ КОМПЛЕКС
ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ**

М.Ю. Шкурников,
А.Г. Тоневицкий,
С.И. Колесников

Формат 70x100 1/16
Гарнитура Times
Усл.-п. л. 11,7 Уч.-изд. л. 10,15
Тираж 300 экз.

Издатель – Российская академия наук

Верстка и печать – УНИД РАН
Отпечатано в экспериментальной цифровой типографии РАН

Издается по решению Научно-издательского совета
Российской академии наук (НИСО РАН) от 13.02.2025 № 19
и распространяется бесплатно