

HORROR W NAUCE: Białko kolce szczepionki wnika do jąder komórkowych, tłumi mechanizm naprawy DNA ludzkiego ciała, wyzwała eksplozję raka, niedobór odporności, zaburzenia autoimmunologiczne i przyspieszone starzenie

([Natural News](#)) To odkrycie można opisać jedynie jako prawdziwy „horror” w jego implikacjach. [Oszalamiające nowe badania opublikowane w Viruses](#), część edycji SARS-CoV-2 Host Cell Interactions **MDPI** (Open Access Journals) ujawniają, że białka kolców szczepionkowych wnikają do jąder komórkowych i sieją spustoszenie w mechanizmach naprawy DNA komórek, hamując naprawę DNA w równym stopniu jako 90%.

Artykuł badawczy nosi tytuł „SARS–CoV–2 Spike Impairs DNA Damage Repair and Inhibits V(D)J Recombination In Vitro” i jest autorstwa Hui Jianga i Ya-Fang Mei z Departamentu Biologii Molekularnej, The Wenner–Gren Institute, Stockholm University, SE-10691 Stockholm, Szwecja, oraz Department of Clinical Microbiology, Virology, Umeå University, SE-90185 Umeå, Sweden.

Zapisałiśmy kopię artykułu badawczego w dokumencie PDF na serwerach NN pod tym adresem URL:

<https://www.naturalnews.com/files/viruses-13-02056-v2.pdf>

W podsumowaniu artykułu autorzy piszą: „Odkryliśmy, że białko kolce znacznie hamuje tworzenie się ognisk BRCA1 i 53BP1 (ryc. 3D-G). Razem dane te pokazują, że pełnej długości białko wypustek SARS-CoV-2 hamuje naprawę uszkodzeń DNA , utrudniając rekrutację białek naprawczych.”

Mechanizm naprawy DNA, znany jako NHEJ (Non-Homologous End Joining) jest rodzajem wewnątrzkomórkowego systemu „odpowiedzi awaryjnej”, który naprawia pęknięcia dwuniciowego DNA. Bez mechanizmu NHEJ całe zaawansowane życie wielokomórkowe przestałoby istnieć. **Żadna istota ludzka, zwierzę czy roślina nie może przetrwać, jeśli integralność kodu genetycznego jest chroniona i stale naprawiana za pomocą wielu mechanizmów.**

Uszkodzenie DNA może być spowodowane przez narażenie na promieniowanie, chemikalia znajdujące się w żywności i produktach higieny osobistej, a nawet narażenie na sprzęt do mammografii. Nadmierna ekspozycja na światło słoneczne może również powodować przerwy w DNA, a drobne mutacje DNA występują spontanicznie we wszystkich żywych organizmach. Na przykład piloci linii lotniczych są rutynowo narażeni na promieniowanie jonizujące podczas lotu na dużej wysokości.

U normalnej, zdrowej osoby mechanizm NHEJ naprawia DNA i zapobiega występowaniu patogennej mutacji. Ale w obecności białka szczytowego szczepionki, skuteczność NHEJ jest tłumiona aż o 90% , co oznacza, że nie jest w stanie wykonać swojej pracy ze względu na tłumioną zdolność rekrutacji białek do naprawy.

W rezultacie do chromosomów wewnątrz jąder ludzkich komórek wprowadzane są następujące „błędy”, a wszystko to z powodu obecności białka kolczastego ze szczepionek mRNA:

- Mutacje lub „błędy” w sekwencji genetycznej.
- USUNIĘCIE całych segmentów kodu genetycznego.
- WSTAWIENIE nieprawidłowych segmentów.
- Mieszanie i dopasowywanie / permutacje kodu genetycznego.

Błędy te, wyrażone poprzez podział i replikację komórek, powodują:

- Eksplozja raka i guzów nowotworowych w całym ciele
- Utrata produkcji limfocytów B i T układu odpornościowego (tj. wywołany niedobór odporności)
- Zaburzenia autoimmunologiczne
- Przyspieszone starzenie i skrócona długość telomerów
- Utrata funkcjonowania złożonych układów narządów, takich jak krążeniowy, neurologiczny, hormonalny, mięśniowo-szkieletowy itp.
- Uszkodzenie komórek przypominające zatrucie promieniowaniem, ponieważ komórki niszczą się od wewnątrz

Wiele z tych efektów jest oczywiście śmiertelnych. Inni będą obciążać ofiary szczepionek straszliwymi wyniszczającymi urazami i wadami narządów, które będą wymagały interwencji medycznej przez całe życie.

Białko kolczaste trafia do jądra komórki

Z artykułu, do którego link znajduje się powyżej:

Mechanicznie stwierdziliśmy, że białko kolczaste lokalizuje się w jądrze i hamuje naprawę uszkodzeń DNA, utrudniając rekrutację kluczowych białek naprawczych DNA BRCA1 i 53BP1 do miejsca uszkodzenia.

Oznacza to, że białko kolczaste, które jest wytwarzane w rybosomach komórek po tym, jak komórki zostały porwane przez szczepionki mRNA, nie zawsze opuszcza komórkę i dostaje się do krwioobiegu, jak mówią zwolennicy szczepionek mRNA. W niektórych przypadkach białko kolczaste wchodzi do jądra komórkowego. Tam zakłóca mechanizm naprawy DNA, jak opisano w tym artykule.

„Co zaskakujące, odkryliśmy obfitość białka kolczastego w jądrze (ryc. 1A)” – podsumowali autorzy badania.

Oznacza to, że bez wątplenia szczepionki mRNA powodują zmiany chromosomalne w komórkach organizmu. Jest to potwierdzenie, że takie szczepionki rzeczywiście sięją spustoszenie w integralności genetycznej i wykazują skutki uboczne, których nie przewidywali ani nie opisywali zwolennicy szczepionek mRNA.

Dr Thomas Levy pisze o toksyczności białka kolczastego na [Orthomolecular.org](https://orthomolecular.org) :

Pojawiły się obawy dotyczące rozprzestrzeniania się białka kolczastego w organizmie po szczepieniu. Zamiast pozostawać w miejscu wstrzyknięcia w celu wywołania odpowiedzi immunologicznej i nic więcej, **obecność białka kolczastego została wykryta w całym ciele niektórych zaszczepionych osób.** Ponadto wydaje się, że niektóre z krążących białek wypustek po prostu wiążą receptory ACE2 bez wchodzenia do komórki, indukując odpowiedź autoimmunologiczną na całą komórkę-białko kolca. W zależności od typu komórki, która wiąże białko kolce, może wystąpić dowolny z wielu autoimmunologicznych stanów medycznych.

Co bardziej niepokojące, dr Levy wyjaśnia, **że obecne dowody wskazują, że białko kolce nadal jest wytwarzane w organizmie po wstępnym wstrzyknięciu mRNA**. On tłumaczy:

Chociaż leżąca u podstaw patologia pozostaje nie do końca zdefiniowana, jedno z wyjaśnień problemów związanych ze skłonnościami do zakrzepicy i innymi objawami obserwowanymi u pacjentów z przewlekłym COVID i po szczepieniu wiąże się bezpośrednio z utrzymującą się obecnością białka kolczastego w koronawirusie. Niektóre doniesienia twierdzą, że białko kolczaste może być nadal wytwarzane po początkowym związaniu z receptorami ACE2 i wejściu do niektórych komórek, do których początkowo

daży. Obraz kliniczny przewlekłej toksyczności COVID i toksyczności po szczepieniu wydaje się bardzo podobny i oba są prawdopodobnie spowodowane ciągłą obecnością i rozprzestrzenianiem się białka kolczastego w całym ciele (Mendelson i wsp., 2020; Aucott i Rebman, 2021; Levy, 2021; Raveendran, 2021).

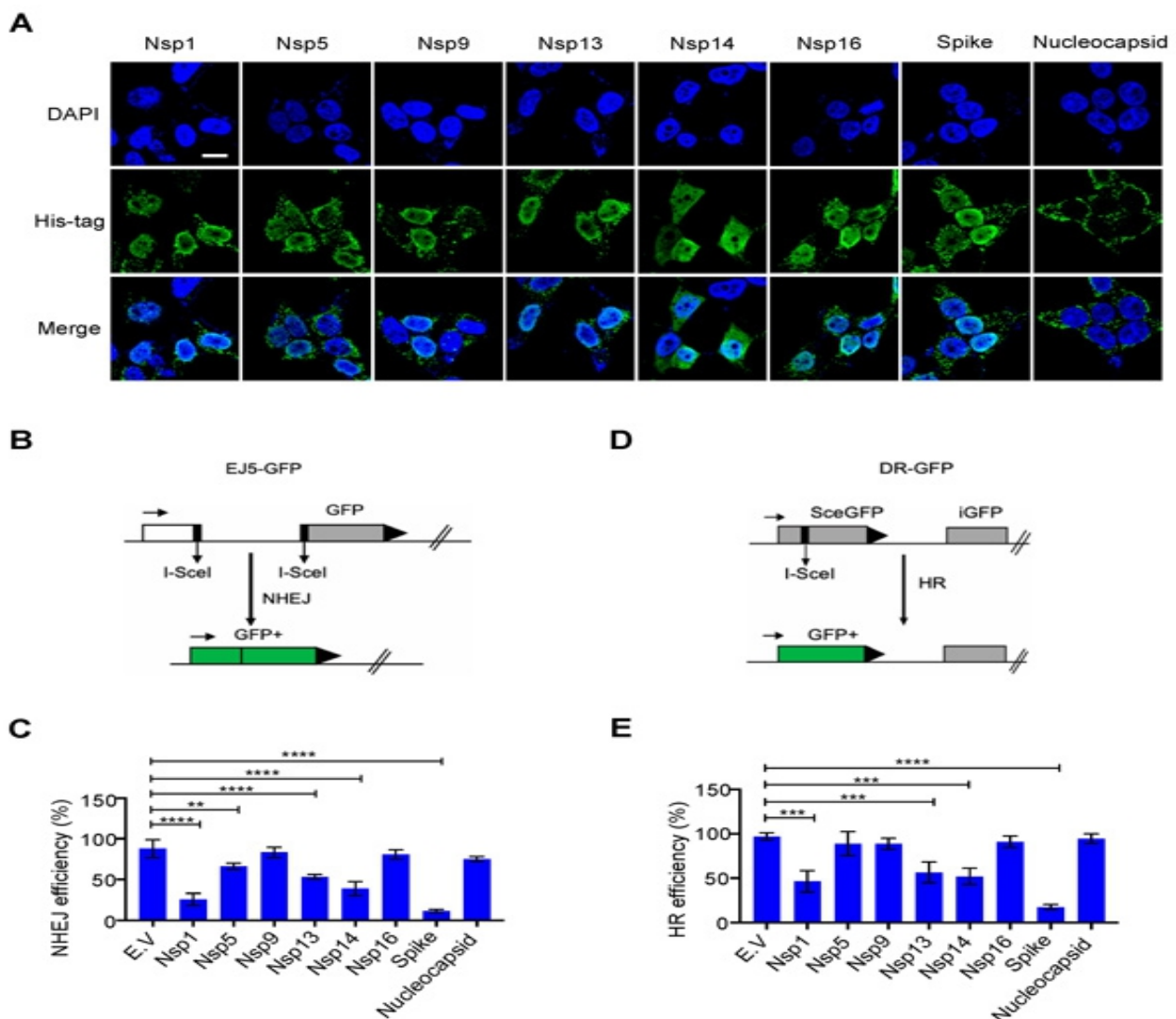
Białko wypustek o pełnej długości spowodowało największe zahamowanie mechanizmu naprawy DNA NHEJ

Zobacz poniższe rysunki. Fragmenty wirusa SARS-CoV-2 są nazywane „Nsp1, Nsp5” i tak dalej. Pełnowymiarowy kołec nazywa się „Spike”, a nukleokapsyd — kolejna strukturalna część patogenu białka kolca — jest identyfikowany oddzielnie.

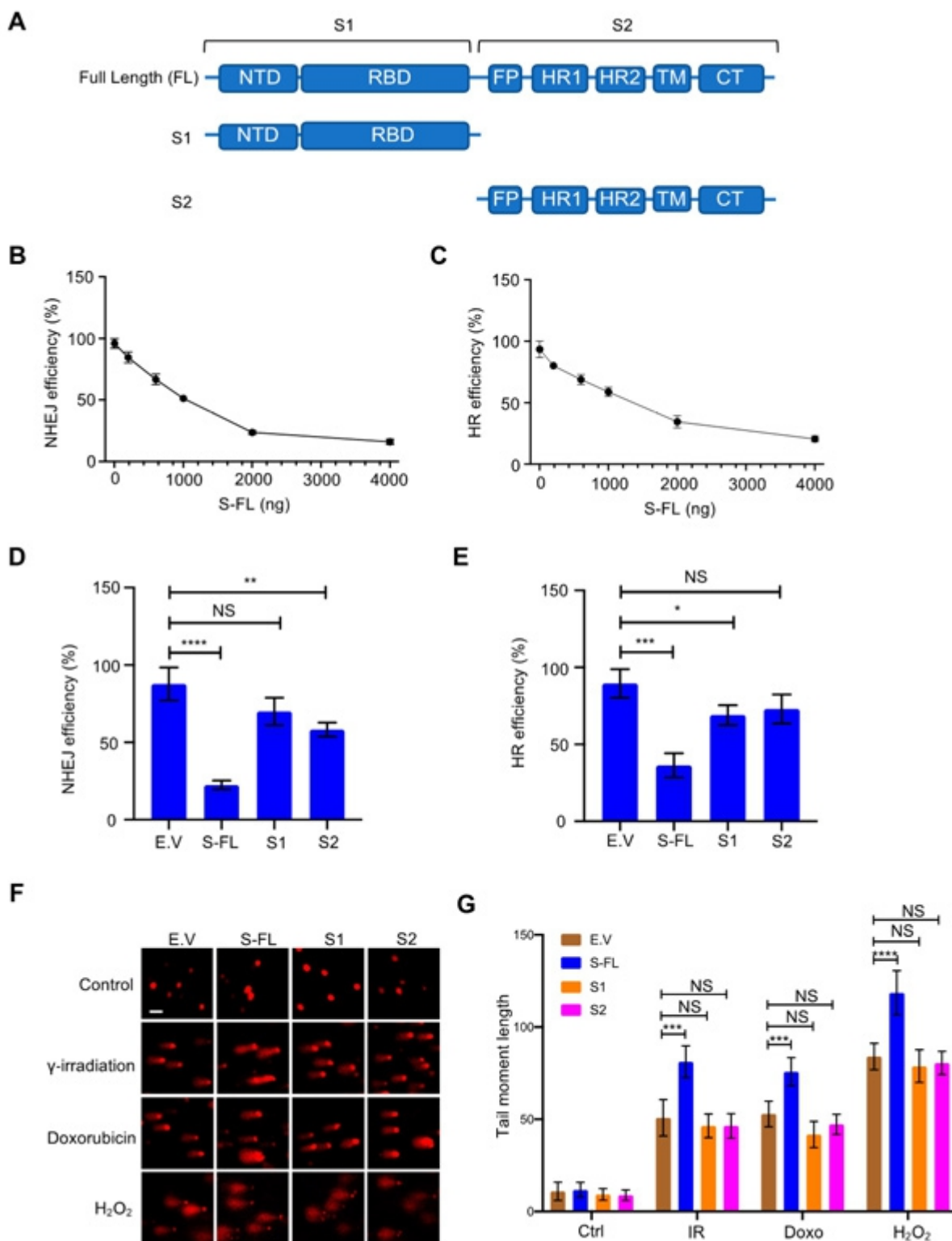
Z badania:

Nadekspresja białek Nsp1, Nsp5, Nsp13, Nsp14 i kolców zmniejszyła wydajność naprawy zarówno HR, jak i NHEJ (ryc. 1B-E i ryc. S2A, B).

Figury C i E przedstawiają supresję naprawy NHEJ przez te różne części fragmentów wirusowych. (Patrz niebieskie pionowe linie wykresu przedstawiające poziomy aktywności/wydajności mechanizmu naprawy DNA).



Na figurze 2 poniżej widzimy, że **tłumienie aktywności NHEJ wykazuje odpowiedź zależną od dawki na obecność białka wypustkowego** (figury 2B i 2C). Wskazuje to, że im więcej białek kolczastych jest obecnych, tym większe tłumienie naprawy DNA:



Dolny prawy rysunek, 2G, pokazuje, w jaki sposób obecność białka kolczastego hamuje naprawę DNA po różnych uszkodzeniach DNA, takich jak promieniowanie, ekspozycja chemiczna lub utlenianie. Co ważne, jak wyjaśniają autorzy badania:

Po różnych terapiach uszkodzeń DNA, takich jak napromienianie γ , traktowanie doksorubicyną i traktowanie H₂O₂, w obecności białka wypustkowego występuje mniejsza

naprawa (Figura 2F, G). Łącznie dane te pokazują, że białko kolce bezpośrednio wpływa na naprawę DNA w jądrze.

Ekspozycja 5G, ekspozycja na chemtrail, ekspozycja na chemikalia żywności, mammografia, a nawet ekspozycja na światło słoneczne będą siłą spustoszenia u osób, które przyjęły szczepionki mRNA

Prerażającym rezultatem tego odkrycia jest to, że ludzie, którzy wzięli szczepionki mRNA, doświadczają zahamowanej naprawy DNA, eskalując ekspozycję, która kiedyś uważana była za drobny problem z poważnymi zagrożeniami dla ich zdrowia.

Innymi słowy, osoby narażone na promieniowanie 5G, badania mammograficzne, plastyfikatory chemiczne w produktach spożywczych i substancje rakotwórcze w produktach higieny osobistej (detergenty do prania, perfumy, szampony, balsamy do skóry itp.) nie będą w stanie naprawić uszkodzeń DNA spowodowanych przez te ekspozycje. Po stosunkowo niewielkich ekspozycjach zaczną mutować i rozwijać nowotwory w całym swoim ciele.

Nie zapominaj, że ekspozycja na 5G powoduje wytwarzanie we krwi peroksyazotynów, niezwykle niebezpiecznego wolnego rodnika, który powoduje uszkodzenia DNA w komórkach mózgowych i komórkach tkanek w całym ciele.

Można to nawet opisać jako rodzaj binarnego systemu broni, **w którym szczepionki mRNA osłabiają naprawę DNA**, a ekspozycja na 5G (lub ekspozycja chemiczna w żywności) zapewnia broń, która łamie nici DNA i prowadzi do tego, że organizm nie jest w stanie zachować integralności genetycznej podczas replikacji komórek. Nie trzeba wiele czasu, by wyrazić to w przerażający sposób fizyczny, taki jak próba wyhodowania tkanek narządów wewnętrznych na powierzchni skóry lub twarzy, dlatego zatytułowałem dzisiejszy podcast dotyczący aktualizacji sytuacji: „**Potwory, zombie i mutanty.**”

Obecność białka kolczastego zakłóca normalną funkcję odpornościową i prowadzi do niedoboru odporności (stan podobny do AIDS)

Badanie to wykazało również, że białka kolczaste ze szczepionek mRNA mogą prowadzić do stanów niedoboru odporności, podobnych do AIDS. Jest to zgodne z tym, co wcześniej informowaliśmy o spadku funkcji odpornościowej o około 5% tygodniowo u osób, które przyjmowały szczepionki przeciw krowim. Z badania:

...[L] utrata funkcji kluczowych białek naprawczych DNA, takich jak ATM, DNA-PKcs, 53BP1, i wsp., prowadzi do defektów naprawy NHEJ, które hamują wytwarzanie funkcjonalnych limfocytów B i T, prowadząc do niedoboru odporności.

Na funkcję immunologiczną ma również krytyczny wpływ obecność białka kolczastego, potencjalnie prowadząc do mutacji nowotworowych w komórkach organizmu. Jak wyjaśnia badanie:

Naprawa uszkodzeń DNA, zwłaszcza naprawa NHEJ, jest niezbędna dla rekombinacji V(D)J, która leży u podstaw odporności komórek B i T.

[Jak wyjaśnia również Science Direct:](#)

Zachowanie integralności genomu jest niezbędne dla przetrwania organizmu. Wśród różnych uszkodzeń DNA, **pęknięcia dwuniciowe (DSB) są uważane za najbardziej**

szkodliwe, ponieważ mogą prowadzić do śmierci komórki, jeśli nie zostaną naprawione, lub rearanżacji chromosomów, gdy zostaną źle naprawione, **co prowadzi do raka**.

Co więcej, mutacje w genach NHEJ, w tym Ku70 i Ku80, powiązano ze skróceniem życia myszy [54]. Ponadto defekty w DNA-PKc (kinaza białkowa zależna od DNA) powodowały upośledzenie utrzymania telomerów i **skrócenie czasu życia u myszy** [55]. Podsumowując, te linie dowodowe sugerują, że NHEJ odgrywa ważną rolę w zapobieganiu związanemu z wiekiem wzrostowi niestabilności genomowej i pogorszeniu funkcji.

W efekcie oznacza to, że hamowanie mechanizmu naprawy DNA NHEJ przez białko kolczaste prowadzi również do skrócenia długości życia i przyspieszonego starzenia.

Według niektórych szacunków 50% osób, którym wstrzyknięto szczepionki zawierające mRNA, **umrze w ciągu pięciu lat**. Teraz mamy głębsze zrozumienie mechanizmów, dzięki którym mogą wystąpić te zgony wywołane szczepionką.

Posłuchaj słownego wyjaśnienia tego wszystkiego w dzisiejszym podcaście Aktualizacji Sytuacji:

[Brighteon.com/cb351cd3-6c94-4f2b-a05d-bbda757d4472](https://brighteon.com/cb351cd3-6c94-4f2b-a05d-bbda757d4472)

Skok SARS-CoV-2 zaburza naprawę uszkodzeń DNA i hamuje rekombinację V(D)J in vitro

1 Department of Molecular Biosciences, The Wenner-Gren Institute, Stockholm University, SE-10691 Sztokholm, Szwecja

2 Department of Clinical Microbiology, Virology, Umeå University, SE-90185 Umeå, Sweden

* Autorzy, do których należy kierować korespondencję.

Redaktor akademicki: Oliver Schildgen

Wirusy 2021, 13 (10), 2056; <https://doi.org/10.3390/v13102056>

Otrzymano: 20 sierpnia 2021 r. / Poprawiono: 8 września 2021 r. / Przyjęto: 8 października 2021 r. /

Opublikowano: 13 października 2021 r.

(Ten artykuł należy do specjalnego wydania **SARS-CoV-2 Host Cell Interactions**)

Abstrakcyjny

Koronawirus zespołu ostrej niewydolności oddechowej 2 (SARS-CoV-2) doprowadził do pandemii choroby koronawirusowej 2019 (COVID-19), poważnie wpływając na zdrowie publiczne i gospodarkę światową. Odporność adaptacyjna odgrywa kluczową rolę w walce z zakażeniem SARS-CoV-2 i bezpośrednio wpływa na wyniki kliniczne pacjentów. Badania kliniczne wykazały, że pacjenci z ciężkim COVID-19 wykazują opóźnioną i słabą adaptacyjną odpowiedź immunologiczną; jednak mechanizm, za pomocą którego SARS-CoV-2 hamuje odporność nabytą, pozostaje niejasny. Tutaj, używając linii komórkowej in vitro, donosimy, że białko wypustek SARS-CoV-2 znacząco hamuje naprawę uszkodzeń DNA, co jest wymagane do skutecznej rekombinacji V(D)J w odporności nabytej. Mechanicznie, odkryliśmy, że białko kolczaste lokalizuje się w jądrze i hamuje naprawę uszkodzeń DNA, utrudniając rekrutację kluczowych białek naprawczych DNA BRCA1 i 53BP1 do miejsca uszkodzenia. **Nasze odkrycia ujawniają potencjalny mechanizm molekularny, dzięki któremu białko wypustek może utrudniać odporność adaptacyjną i podkreślać potencjalne skutki uboczne szczepionek opartych na wypustkach o pełnej długości.**

Słowa kluczowe: **SARS-CoV-2** ; **kolec** ; **naprawa uszkodzeń DNA** ; **rekombinacja V(D)J** ; **szczepionka**

1. Wstęp

Koronawirus zespołu ostrej niewydolności oddechowej 2 (SARS-CoV-2) jest odpowiedzialny za trwającą pandemię choroby koronawirusowej 2019 (COVID-19), która doprowadziła do ponad 2,3 miliona zgonów. SARS-CoV-2 jest wirusem otoczkowym o pojedynczym dodatnim RNA, który składa się z białek

strukturalnych i niestrukturalnych [1]. Po zakażeniu te białka wirusowe przejmują i rozregulowują maszynę komórkową gospodarza, aby replikować, składać i rozprzestrzeniać wirusy potomne [2]. Ostatnie badania kliniczne wykazały, że zakażenie SARS-CoV-2 wyjątkowo wpływa na liczbę i funkcję limfocytów [3 , 4 , 5 , 6]. W porównaniu z łagodnymi i umiarkowanymi osobami, które przeżyły, pacjenci z ciężkim COVID-19 wykazują znacznie mniejszą liczbę limfocytów T całkowitych, limfocytów T pomocniczych i limfocytów T supresorowych [3 , 4]. Dodatkowo COVID-19 opóźnia stężenie IgG i IgM po wystąpieniu objawów [5 , 6]. Łącznie te obserwacje kliniczne sugerują, że SARS-CoV-2 wpływa na adaptacyjny układ odpornościowy. Jednak mechanizm, za pomocą którego SARS-CoV-2 tłumi odporność nabytą, pozostaje niejasny.

Jako dwa krytyczne systemy nadzoru gospodarza, systemy naprawy odporności i DNA są podstawowymi systemami, na których opierają się organizmy wyższe w celu obrony przed różnymi zagrożeniami i homeostazą tkanek. Pojawiające się dowody wskazują, że te dwa układy są współzależne, zwłaszcza podczas rozwoju i dojrzewania limfocytów [7]. Jako jeden z głównych szlaków naprawy pęknięć dwuniciowego DNA (DSB), naprawa niehomologicznego łączenia końców (NHEJ) odgrywa kluczową rolę w rekombinacji V(D)J, w której pośredniczy endonukleaza genu aktywująca limfocyty (RAG), co skutkuje wysoce zróżnicowanym repertuarem przeciwciał w limfocytach B i receptorach limfocytów T (TCR) w limfocytach T [8]. Na przykład utrata funkcji kluczowych białek naprawczych DNA, takich jak ATM, DNA-PKcs, 53BP1 i wsp., prowadzi do defektów naprawy NHEJ, które hamują wytwarzanie funkcjonalnych limfocytów B i T, prowadząc do niedoboru odporności [7 , 9], 10 , 11]. W przeciwieństwie do tego, infekcja wirusowa zwykle indukuje uszkodzenie DNA poprzez różne mechanizmy, takie jak indukowanie wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS) i stres replikacyjny komórki gospodarza [1 , 13 , 14]. Jeśli uszkodzenie DNA nie może być prawidłowo naprawione, przyczyni się to do nasilenia patologii wywołanej infekcją wirusową. Dlatego postanowiliśmy zbadać, czy białka SARS-CoV-2 przejmują kontrolę nad systemem naprawy uszkodzeń DNA, wpływając w ten sposób na odporność adaptacyjną in vitro.

2. Materiały i metody

2.1. Przeciwciała i Odczynniki

DAPI (Cat # MBD0015), doksorubicyna (Kat # D1515) H₂O₂ (Kat # H1009) i przeciwciała β -tubuliny (Cat # T4026) zakupiono od firmy Sigma-Aldrich. Przeciwciała przeciwko znacznikowi His (nr kat. 2698), H2A (nr kat. 12349), H2A.X (nr kat. 7631), γ -H2A.X (nr kat. 2577), Ku80 (nr kat. 2753) i Rad51 (nr kat. 8875)) zakupiono w firmie Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Przeciwciała 53BP1 (nr kat. NB100-304) i RNF168 (nr kat. H00165918-M01) otrzymano z firmy Novus Biologicals (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA). Lamina B (nr kat. sc-374015), ATM (nr kat. sc-135663), przeciwciała DNA-PK (nr kat. sc-5282) i BRCA1 (nr kat. sc-28383) zakupiono od Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Kalifornia, USA). Przeciwciało XRCC4 (nr kat. PA5-82264) zakupiono od Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

2.2. Plazmidy

pHPRT-DRGFP i pCBAScel zostały uprzejmie podarowane przez Marię Jasin (plazmidy Addgene #26476 i #26477) [15]. pimeJ5GFP był prezentem od Jeremy'ego Starka (plazmid Addgene #44026) [16]. Białka NSP1, NSP9, NSP13, NSP14, NSP16, wypustki i nukleokapsyd najpierw zsyntetyzowano z optymalizacją kodonów, a następnie wklonowano do ssaczego wektora ekspresyjnego pUC57 z C-końcowym znacznikiem 6xHis. Dla wektora reporterowego V(D)J zsyntetyzowano 12-przerywnik RSS-GFP odwróconą komplementarną sekwencję – 23-przerywnik RSS. Następnie sekwencję sklonowano do wektora pBabe-IRES-mRFP, aby wygenerować wektor reporterowy pBabe-12RSS-GFPi-23RSS-IRES-mRFP. 12-przerywnikowa sekwencja RSS: 5'-CACAGTGCTACAGACTGGAACAAAAACC-3'. 23-przerywnik sekwencja RSS: 5'-CACAGTGGTAGTACTCCACTGTCTGGCTGTACAAAAAACCC-3'. Konstrukty ekspresyjne RAG1 i RAG2 zostały hojnie obdarzone przez Martina Gellerta (plazmid Addgene #13328 i #13329) [17].

2.3. Komórki i kultura komórkowa

HEK293T, jak i HEK293 otrzymano z American Type Culture Collection (ATCC) hodowano w 5% CO₂ w temperaturze 37 ° C w pożywce Dulbecco Eagle (DMEM o wysokiej zawartości glukozy, Glutamax) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), zawierającej 10 % (v / v) płodowej surowicy cielęcej (FCS, Gibco), 1% (v / v) penicyliny (100 IU/ml) i streptomycyny (100 μ g/ml). Komórki HEK293T reporterowe GFP-DR i HEK293T-EJ5-GFP wytworzono jak wcześniej opisano i hodowano w obecności 5% CO₂ w temperaturze 37 ° C, w wyżej wymienionej pożywce.

2.4. Testy reporterów HR i NHEJ

Naprawę HR i NHEJ w komórkach HEK293T mierzono zgodnie z wcześniejszym opisem przy użyciu stabilnych komórek DR-GFP i EJ5-GFP. W skrócie, 0,5 x 10⁶ HEK293T Stabilne komórki reporterowe wysiano na 6-studzienkowych płytkach i transfekowano 2 μ g I-Scel plazmidu ekspresyjnego (pCBAScel) wraz z plazmidami SARS CoV-2 białek ekspresyjnych. Czterdzieści osiem godzin po transfekcji i potraktowaniu aspiryną komórki zebrano i przeanalizowano metodą cytometrii przepływowej pod kątem ekspresji GFP. Średnie uzyskano z trzech niezależnych eksperymentów.

2.5. Frakcjonowanie komórkowe i immunoblotting

Do testu frakcji komórkowej zastosowano zestaw do frakcjonowania białek subkomórkowych (Thermo Fisher) zgodnie z instrukcjami producenta. Lizaty białkowe oznaczono ilościowo przy użyciu odczynnika BCA (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Białka rozdzielono metodą elektroforezy w żelu dodecylsulfianu sodu-poliakrylamid (SDS-PAGE), przeniesiono na błony nitrocelulozowe (Amersham protran, 0,45 µm NC) i poddano immunoblottingowi ze specyficznymi przeciwciałami pierwszorzędowymi, a następnie przeciwciałami drugorzędowymi skoniugowanymi z HRP. Prążki białka wykrywano przy użyciu zestawu SuperSignal West Pico lub Femto Chemiluminescencji (Thermo Fisher Scientific).

2.6. Test komet

Komórki traktowano różnymi odczynnikami uszkodzającymi DNA, a następnie zbierano we wskazanych punktach czasowych do analizy. Komórki (1×10^5 komórek/ml w zimnej soli fizjologicznej buforowanej fosforanem [PBS]) ponownie zawieszono w 1% agarozie o niskiej temperaturze topnienia w 40 °C w stosunku 1:3 obj./obj. i pipetowano na CometSlide. Szkiełka zanurzono następnie we wstępnie schłodzonej buforze do lizy (1,2 M NaCl, 100 mM EDTA, 0,1% laurylosarkozynianu sodu, 0,26 M NaOH pH > 13) na noc (18–20 godz.) lizy w temperaturze 4°C w ciemności. Szkiełka następnie ostrożnie usunięto i zanurzono w buforze do płukania (0,03 M NaOH i 2 mM EDTA, pH > 12) w temperaturze pokojowej (RT) na 20 min w ciemności. Ten etap mycia powtórzono dwukrotnie. Szkiełka przeniesiono do poziomej komory do elektroforezy zawierającej bufor do płukania i rozdzielano przez 25 min przy napięciu 0,6 V/cm. Na koniec szkiełka zostały przemyte wodą destylowaną, wybarwione 10 µg/ml jodku propidyny i poddane analizie pod mikroskopem fluorescencyjnym.

2.7. Immunofluorescencja

Komórki wysiano na szklanych szkiełkach nakrywkowych w płytce 12-studzienkowej i transfekowano wskazanym plazmidem przez 24 godziny. Następnie komórki traktowano odczynnikami uszkodzającymi DNA lub bez nich, zgodnie z układem doświadczalnym. Komórki utrwalano w 4% paraformaldehydzie (PFA) w PBS przez 20 min w RT, a następnie permeabilizowano w 0,5% Triton X-100 przez 10 min. Szkiełka blokowano w 5% normalnej surowicy koziej (NGS) i inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi rozcieńczonymi w 1% NGS przez noc w 4°C. Próbkę następnie inkubowano ze wskazanymi drugorzędowymi przeciwciałami wyznakowanymi Alexa Fluor 488 lub 555 (Invitrogen) rozcieńczonymi w 1% NGS w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Następnie barwiono je DAPI przez 15 min w RT. Szkiełka nakrywkowe zamocowano przy użyciu środka Dako Fluorescence Mounting Medium (Agilent) i zobrazowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Nikon (Eclipse C1 Plus).

2.8. Analiza rekombinacji V(D)J

Pokrótkie, plazmid reporterowy V(D)J zawiera odwrócone GFP i IRES kierujące ciągłą ekspresją RFP. Ciągłe wyrażanie RFP jest wewnętrzną kontrolą transfekcji. Po kotransfekcji genu 1/2 (RAG1/2) aktywacji rekombinacji do komórek, RAG1/2 przetnie RSS i pośredniczoną indukację DSB, jeśli wystąpi rekombinacja V(D)J, odwrócone GFP są ligowane w kolejności pozytywnej przez NHEJ naprawić. Wtedy komórka będzie wyrażać funkcjonalny GFP. Zatem podwójnie dodatnie komórki GFP i RFP są odczytem testu reporterowego V(D)J [18]. Komórki 293T przy konfluencji 70% transfekowano samym reporterem V(D)J GFP (tło) lub w połączeniu z konstrukcjami ekspresyjnymi RAG1 i RAG2, w stosunku 1 µg reporter V(D)J GFP: 0,5 µg RAG1:0,5 µg RAG2. Następnego dnia pożywkę zmieniono i po dodatkowych 48 godzinach komórki zebrano i analizowano metodą cytometrii przepływowej pod kątem ekspresji GFP i RFP.

2.9. Analiza statystyczna

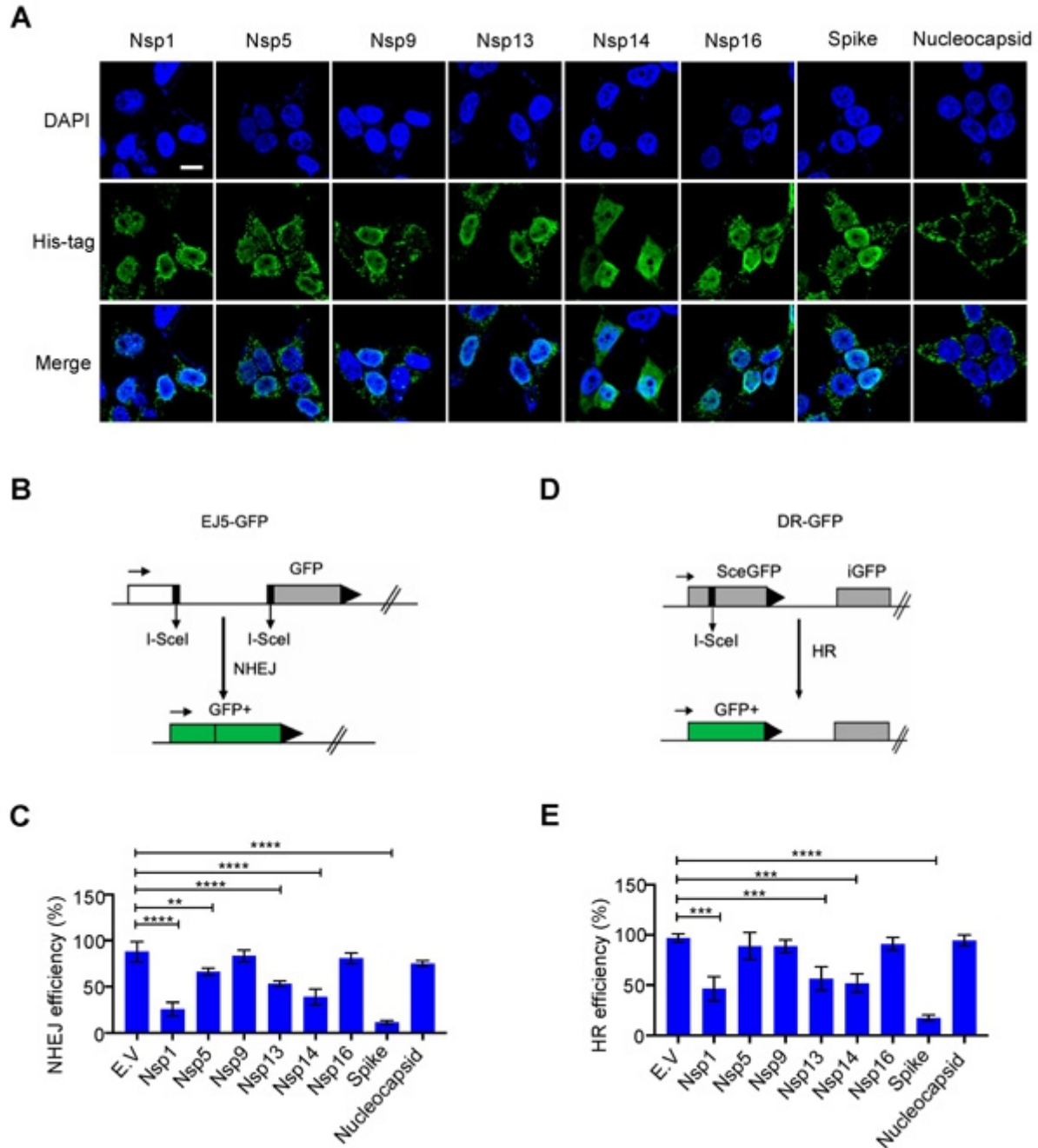
Wszystkie eksperymenty powtórzono co najmniej trzykrotnie z wykorzystaniem niezależnie zebranych lub przygotowanych próbek. Dane analizowano testem t-Studenta lub ANOVA, a następnie testami wielokrotnego porównania Tukeya przy użyciu GraphPad 8.

3. Wyniki

3.1. Wpływ białek wirusowych SARS-CoV-2 zlokalizowanych w jądrze jądrowym na naprawę uszkodzeń DNA

Naprawa uszkodzeń DNA zachodzi głównie w jądrze, aby zapewnić stabilność genomu. Chociaż białka SARS-CoV-2 są syntetyzowane w cytozolu [1], niektóre białka wirusowe są również wykrywalne w jądrze, w tym Nsp1, Nsp5, Nsp9, Nsp13, Nsp14 i Nsp16 [19]. Zbadaliśmy, czy te zlokalizowane w jądrze białka SARS-CoV-2 wpływają na system naprawy uszkodzeń DNA komórki gospodarza. W tym celu skonstruowaliśmy plazmidy ekspresyjne białek wirusowych wraz z plazmidami ekspresyjnymi kolców i nukleoprotein, które ogólnie uważa się za białka zlokalizowane w cytozolu. Potwierdziliśmy ich ekspresję i lokalizację za pomocą immunoblottingu i immunofluorescencji (Figura 1A i Figura S1A). Nasze wyniki były zgodne z wynikami z poprzednich badań [19]; Białka Nsp1, Nsp5, Nsp9, Nsp13, Nsp14 i Nsp16 są rzeczywiście zlokalizowane w jądrze, a nukleoproteiny są zlokalizowane głównie w cytozolu. Co zaskakujące, odkryliśmy obfitość białka kolczastego w jądrze (Rysunek 1 A). Naprawa NHEJ i naprawa rekombinacji homologicznej (HR) to dwa główne szlaki naprawy DNA, które nie tylko stale monitorują i zapewniają integralność genomu, ale są również niezbędne dla adaptacyjnych funkcji komórek odpornościowych [9]. Aby ocenić, czy te białka wirusowe utrudniają szlak naprawy DSB, zbadaliśmy naprawę miejscowo-specyficznego DSB indukowanego przez endonukleazę I-SceI

przy użyciu białka bezpośredniej fluorescencji z zielonym powtórzeniem (DR-GFP) i całkowitego NHEJ-GFP (EJ5-GFP) systemy reporterowe odpowiednio dla HR i NHEJ [15, 16]. Nadekspresja białek Nsp1, Nsp5, Nsp13, Nsp14 i wypustek zmniejszyła wydajność naprawy zarówno HR, jak i NHEJ (Figura 1 B-E i Figura S2A, B). Ponadto stwierdziliśmy również, że nadekspresja Nsp1, Nsp5, Nsp13 i Nsp14 radykalnie hamowała proliferację w porównaniu z innymi badanymi białkami (Figura S3A,B). Zatem hamujący wpływ Nsp1, Nsp5, Nsp13 i Nsp14 na naprawę uszkodzeń DNA może wynikać z efektów wtórnych, takich jak zatrzymanie wzrostu i śmierć komórek. Co ciekawe, nadmiernie ekspresowane białko wypustek nie wpływało na morfologię komórek ani proliferację, ale znacząco hamowało naprawę HR i NHEJ (ryc. 1 B-E, ryc. S2A, B i S3A, B).



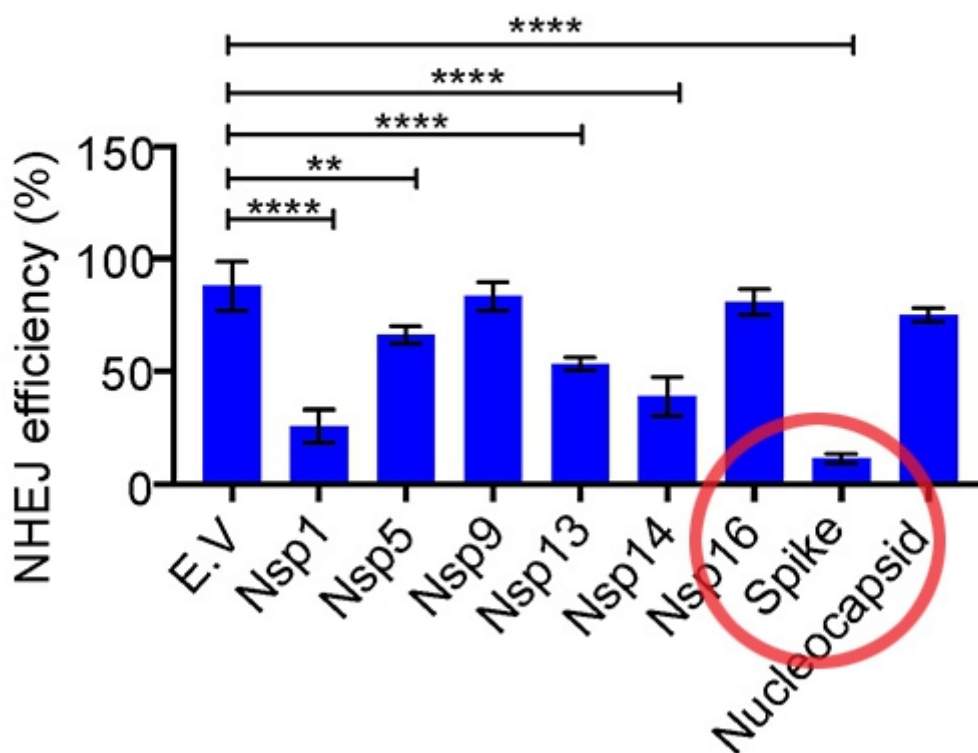
Rycina 1. Wpływ białek zlokalizowanych w jądrze ciężkiego ostrego zespołu oddechowego koronawirusa 2 (SARS-CoV-2) na naprawę uszkodzeń DNA. (A) Subkomórkowa dystrybucja białek SARS-CoV-2. Immunofluorescencję przeprowadzono w 24 godziny po transfekcji plazmidu ekspresyjnego białka wirusowego do komórek HEK293T. Skala: 10 μ m. (B) Schemat reportera EJ5-GFP stosowanego do monitorowania łączenia niehomologicznych końców (NHEJ). (C) Wpływ pustego wektora (EV) i białek SARS-CoV-2 na naprawę DNA NHEJ. Wartości reprezentują średnią \pm odchylenie standardowe (SD) z trzech niezależnych eksperymentów (patrz reprezentatywne wykresy FACS na Figurze S2A). (D) Schemat reportera DR-GFP stosowanego do monitorowania rekombinacji homologicznej (HR). (E) Wpływ białek EV i SARS-CoV-2 na naprawę HR DNA. Wartości reprezentują średnią \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów (patrz

reprezentatywne wykresy FACS na **Figurze S2B**). Wartości reprezentują średnią \pm SD, $n = 3$. Istotność statystyczną określono stosując jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA) w (**C** , **E**). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

3.2. Białko kolce SARS-CoV-2 hamuje naprawę uszkodzeń DNA

Ponieważ białka kolców mają kluczowe znaczenie dla pośredniczenia w wejściu wirusa do komórek gospodarza i są przedmiotem większości strategii szczepień [**20** , **21**], dalej badaliśmy rolę białek kolców w naprawie uszkodzeń DNA i związanej z tym rekombinacji V(D)J. Uważa się, że białka kolczaste są zwykle syntetyzowane na szorstkiej retikulum endoplazmatycznym (ER) [**1**]. Po modyfikacjach potranslacyjnych, takich jak glikozylacja, białka kolczaste przemieszczają się przez aparat błony komórkowej razem z innymi białkami wirusowymi, tworząc dojrzały wirion [**1**]. Białko kolczaste zawiera dwie główne podjednostki, S1 i S2, a także kilka domen funkcjonalnych lub powtórzeń [**22**] (**Rysunek 2A**). W stanie natywnym białka kolczaste istnieją jako nieaktywne białka pełnej długości. Podczas infekcji wirusowej proteazy komórek gospodarza, takie jak proteaza furynowa, aktywują białko S, rozszczepiając je na podjednostki S1 i S2, co jest niezbędne do wnikięcia wirusa do komórki docelowej [**23**]. Następnie zbadaliśmy różne podjednostki białka wypustkowego, aby wyjaśnić cechy funkcjonalne wymagane do hamowania naprawy DNA. Tylko białko wypustek o pełnej długości silnie hamowało naprawę zarówno NHEJ, jak i HR (**ryc. 2 B-E** i **ryc. S4A, B**). Następnie staraliśmy się ustalić, czy białko wypustek bezpośrednio przyczynia się do niestabilności genomowej poprzez hamowanie naprawy DSB. Monitorowaliśmy poziomy DSB za pomocą testów kometowych. W wyniku różnych zabiegów uszkodzenie DNA, takie jak γ -napromieniowania, dokсорubicyna leczenia i H_2O_2 leczenia, tym mniej naprawy w obecności białka kolca (**fig 2** , F, G). Razem dane te pokazują, że białko kolce bezpośrednio wpływa na naprawę DNA w jądrze.

C

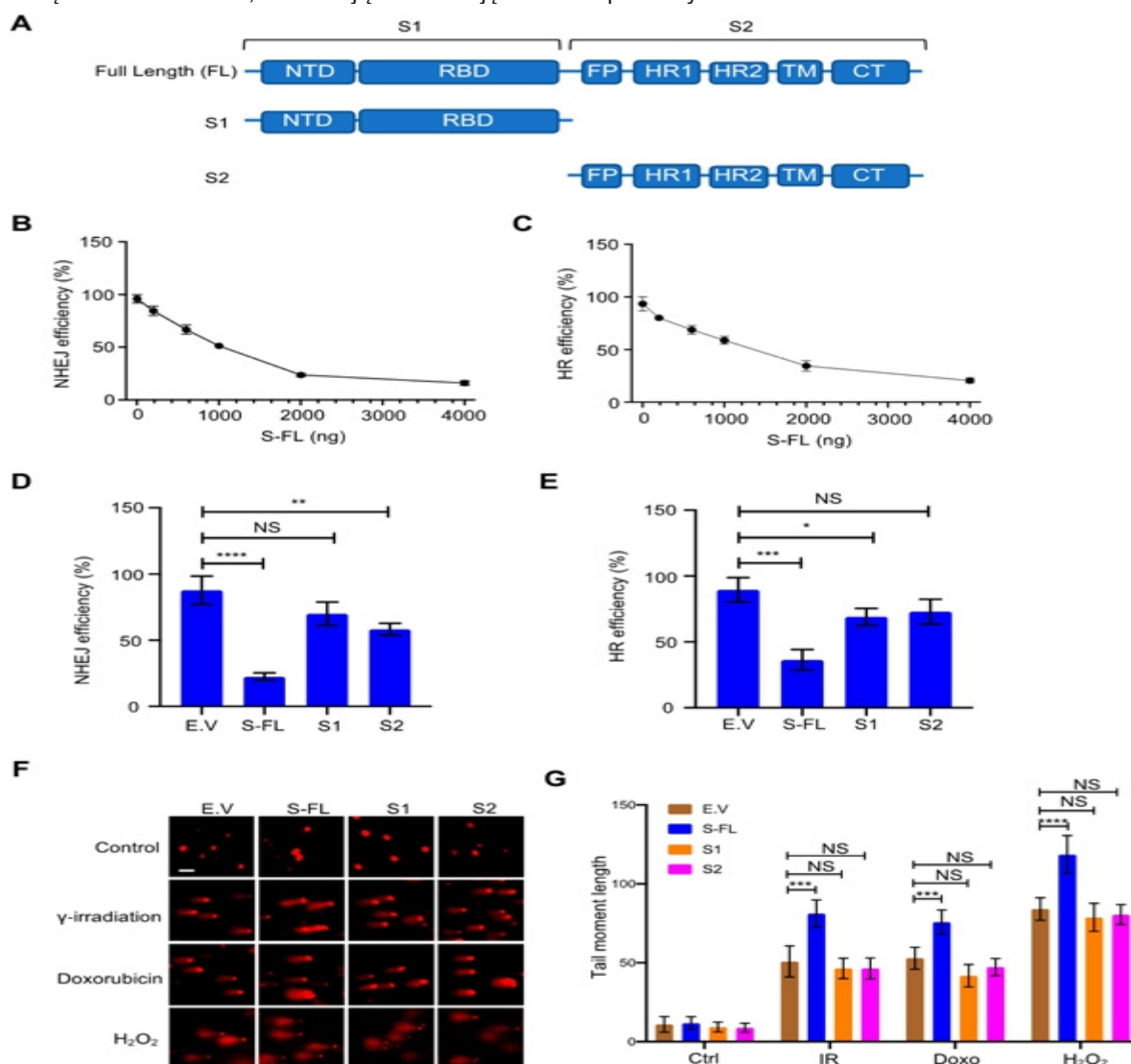


Rycina 2. Białko kolce koronawirusa 2 ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-2) hamuje naprawę uszkodzeń DNA. (**A**) Schemat struktury pierwszorzędowej białka wypustkowego SARS-CoV-2. Podjednostka S1 zawiera domenę N-końcową (NTD, 14-305 reszt) i domenę wiążącą receptor (RBD, 319-541 reszt). Podjednostka S2 składa się z peptydu fuzyjnego (FP, 788-806 reszt), sekwencji powtórzenia heptapeptydu 1 (HR1, 912-984 reszt), HR2 (1163-1213 reszt), domeny TM (TM, 1213-1237 reszt) i domena cytoplazmatyczna (reszty CT, 1237-1273). (**B** , **C**) Wpływ miareczkowanej ekspresji białka wypustek na naprawę DNA w komórkach HEK-293T. (**D** , **E**) Tylko białko wypustek o pełnej długości hamuje naprawę DNA niehomologicznego łączenia końców (NHEJ) i rekombinacji homologicznej (HR). Wartości reprezentują średnią

± SD z trzech niezależnych eksperymentów (patrz reprezentatywne wykresy FACS na [Rysunku S4A,B](#)). (F) Komórki HEK293T transfekowane białkiem pełnej długości wypustek (S-FL) wykazywały więcej uszkodzeń DNA niż komórki transfekowane pustym wektorem, S1 i S2 w różnych warunkach uszkodzenia DNA. Dla doksorubicyny: 4 µg/ml, 2 godz. Dla promieniowania γ: 10 Gy, 30 min. Dla H₂O₂: 100 µM, 1 godz. Skala: 50 µm. (G) Odpowiednia kwantyfikacja momentów warkocza komety z 20 różnych pól z $n > 200$ komety z trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczną oceniono za pomocą dwukierunkowej analizy wariancji (ANOVA). NS (nieistotne): * $p > 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

3.3. Białka kolczaste utrudniają rekrutację białek punktów kontrolnych naprawy uszkodzeń DNA

Aby potwierdzić istnienie białka wypustek w jądrze, przeprowadziliśmy analizę frakcji subkomórkowej i stwierdziliśmy, że białka wypustek są nie tylko wzbogacone we frakcję błony komórkowej, ale są również obfite we frakcję jądrową, z wykrywalną ekspresją nawet we frakcji związanej z chromatyną ([Rysunek 3A](#)). Zaobserwowaliśmy również, że kołec ma trzy różne formy, wyższe pasmo to kołec o wysokim stopniu glikozylacji, środkowy kołec o pełnej długości, a dolny to podjednostka odciętego kolca. Zgodnie z testem kometowym, odkryliśmy również regulację w górę markera uszkodzenia DNA, γ-H2A.X, w komórkach z nadekspresją białka kolczastego w warunkach uszkodzenia DNA ([Rysunek 3B](#)). Ostatnie badania sugerują, że białka kolczaste wywołują stres ER i degradację białek związanych z ER [24]. Aby wykluczyć możliwość, że białko kolczaste hamuje naprawę DNA poprzez promowanie degradacji białka naprawczego DNA, sprawdziliśmy ekspresję niektórych niezbędnych białek naprawczych DNA w szlakach naprawy NHEJ i HR i stwierdziliśmy, że te białka naprawcze DNA były stabilne po nadekspresji białka kolczastego ([Rysunek 3C](#)). Aby określić, w jaki sposób białko kolczaste hamuje szlaki naprawy zarówno NHEJ, jak i HR, przeanalizowaliśmy rekrutację BRCA1 i 53BP1, które są kluczowymi białkami punktu kontrolnego odpowiednio dla naprawy HR i NHEJ. Odkryliśmy, że białko wypustek znacznie hamowało tworzenie się ognisk BRCA1 i 53BP1 ([ryc. 3 D-G](#)). Razem dane te pokazują, że pełnej długości białko wypustek SARS-CoV-2 hamuje naprawę uszkodzeń DNA, utrudniając rekrutację białek naprawczych.





Rycina 3. Białko kolce koronawirusa 2 ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-2) utrudnia rekrutację białek punktów kontrolnych naprawy uszkodzeń DNA. (**A**) Frakcja błonowa (MF), frakcja cytozolowa (CF), rozpuszczalna frakcja jądrowa (SNF) i frakcja związana z chromatyną (CBF) z komórek HEK293T transfekowanych białkiem wypustek SARS-CoV-2 poddano immunoblottingowi pod kątem wypustek His-tag i wskazane białka. (**B**) Po lewej: Immunoblotty markera uszkodzenia DNA γ H2AX w komórkach HEK293T z ekspresją pustego wektora (EV) i białka wypustek po napromieniowaniu 10 Gy γ . Po prawej: odpowiednia ocena ilościowa immunoblotów po lewej. Wartości reprezentują średnią \pm SD ($n = 3$). Istotność statystyczną określono za pomocą testu *t*-Studenta. **** $P < 0,0001$. (**C**) Immunoblotty białek związanych z naprawą uszkodzeń DNA w komórkach HEK293T wykazujących ekspresję białka kolczastego. (**D**) Reprezentatywne obrazy tworzenia ognisk 53BP1 w komórkach HEK293 z ekspresją EV- i białka kolczastego poddanych napromieniowaniu 10 Gy γ . Skala: 10 μ m. (**E**) Analiza ilościowa ognisk 53BP1 na jądro. Wartości reprezentują średnią \pm SEM, $n = 50$. (**F**) Tworzenie ognisk BRCA1 w komórkach HEK293 z ekspresją pustego wektora i białka wypustek ekspozycyjnych na promieniowanie 10 Gy γ . Skala: 10 μ m. (**G**). Analiza ilościowa ognisk BRCA1 na jądro. Wartości reprezentują średnią \pm SEM, $n = 50$. Istotność statystyczną określono za pomocą *t*-Studenta-test. **** $p < 0,0001$.

3.4. Białko kolczaste zaburza rekombinację V(D)J in vitro

Naprawa uszkodzeń DNA, a zwłaszcza naprawa NHEJ, jest niezbędna do rekombinacji V(D)J, która stanowi podstawę odporności komórek B i T [9]. Do tej pory wiele zatwierdzonych szczepionek SARS-CoV-2, takich jak szczepionki mRNA i szczepionki adenowirusowe-COVID-19, zostało opracowanych w oparciu o białko wypustek pełnej długości [25]. Chociaż jest dyskusyjne, czy SARS-CoV-2 bezpośrednio infekuje prekursorzy limfocytów [26 , 27], niektóre doniesienia wykazały, że zakażone komórki wydzielają egzosomy, które mogą dostarczać RNA lub białko SARS-CoV-2 do komórek docelowych [28 , 29]. Następnie zbadaliśmy, czy białko wypustek zmniejszyło rekombinację V(D)J za pośrednictwem NHEJ. W tym celu zaprojektowaliśmy system reporterowy rekombinacji V(D)J in vitro zgodnie z poprzednim badaniem [18] (**Figura S5**). W porównaniu z pustym wektorem, nadekspresja białka wypustkowego hamowała rekombinację V(D)J za pośrednictwem RAG w tym układzie reporterowym in vitro (**Figura 4**).



Rysunek 4. Białko kolce upośledza rekombinację V(D)J in vitro. (**A**) Schemat systemu reporterowego V(D)J. (**B**) Reprezentatywne wykresy cytometrii przepływowej pokazują, że białko wypustek SARS-CoV-2 utrudnia rekombinację V(D)J in vitro. (**C**) Analiza ilościowa względnej rekombinacji V(D)J. Wartości reprezentują średnią \pm SD, $n = 3$. Istotność statystyczną określono za pomocą testu *t*-Studenta. **** $p < 0,0001$.

4. Dyskusja

Nasze odkrycia dostarczają dowodów na to, że białko kolce porywa maszynę naprawy uszkodzeń DNA i adaptacyjną maszynę immunologiczną in vitro. Proponujemy potencjalny mechanizm, dzięki któremu białka kolczaste mogą osłabiać odporność nabytą poprzez hamowanie naprawy uszkodzeń DNA. **Chociaż nie opublikowano żadnych dowodów na to, że SARS-CoV-2 może infekować tymocyty lub komórki limfoidalne szpiku kostnego, nasz test reporterowy V(D)J in vitro pokazuje, że białko wypustek intensywnie utrudnia rekombinację V(D)J. Zgodnie z naszymi wynikami, obserwacje kliniczne pokazują również, że ryzyko ciężkiej choroby lub zgonu z powodu COVID-19 wzrasta wraz z wiekiem, zwłaszcza osób starszych, które są najbardziej zagrożone [22].** Może to wynikać z tego, że białka kolczaste SARS-CoV-2 mogą osłabiać system naprawy DNA osób starszych, a w konsekwencji utrudniać rekombinację V(D)J i odporność nabytą. W przeciwieństwie do tego, nasze dane dostarczają cennych szczegółów na temat udziału podjednostek białka wypustek w naprawie uszkodzeń DNA, wskazując, że szczepionki oparte na wypustkach o pełnej długości mogą hamować rekombinację V(D)J w komórkach B, co jest również zgodne z niedawnym badaniem, że szczepionka o pełnej długości oparta na kolcach indukowała niższe miana przeciwciał w porównaniu ze szczepionką opartą na RBD [28]. Sugeruje to, że zastosowanie antygenowych epitopów kolca jako szczepionki SARS-CoV-2 może być bezpieczniejsze i skuteczniejsze niż kolce o pełnej długości. Podsumowując, zidentyfikowaliśmy jeden z potencjalnie ważnych mechanizmów supresji SARS-CoV-2 w adaptacyjnej maszynie odpornościowej gospodarza. Co więcej, nasze odkrycia sugerują również potencjalny efekt uboczny pełnej długości szczepionki opartej na kolcach. Prace te przyczynią się do lepszego zrozumienia patogenyzy COVID-19 i zapewnią nowe strategie projektowania skuteczniejszych i bezpieczniejszych szczepionek.

Materiały uzupełniające

Poniższe informacje są dostępne online pod [adresem <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v13102056/s1>](https://www.mdpi.com/article/10.3390/v13102056/s1), Rysunek S1: Ekspresja białek SARS-CoV-2 zlokalizowanych w jądrze w komórkach ludzkich, Rysunek S2: Wpływ jądrowego SARS- Białka CoV-2 na szlaku naprawy NHEJ- i HR-DNA, Rysunek S3: Nsp1, Nsp5, Nsp13, Nsp14, ale nie kolce hamują proliferację komórek, Rysunek S4: Wpływ mutantów wypustek SARS-CoV-2 na DNA NHEJ- i HR- szlak naprawy, Figura S5: Test rekombinacji V(D)J in vitro.

Autorskie Wkłady

HJ wymyślił i zaprojektował badanie. HJ i Y.-FM nadzorowali badanie, przeprowadzali eksperymenty i interpretowali dane. Pisanie – przygotowanie oryginalnego projektu, HJ; Pisanie – recenzja i edycja, HJ i Y.-FM; finansowanie pozyskania, Y.-FM Wszyscy autorzy przeczytali i wyrazili zgodę na opublikowaną wersję manuskryptu.

Finansowanie

Praca ta była wspierana przez granty Planowania Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Umeå dla COVID-19 (numer projektu badawczego: 3453 16032 dla YFM); Lion's Cancer Research Foundation na Uniwersytecie w Umeå (dotacje: LP 17–2153, AMP 19–982 i LP 20–2256 dla YFM) oraz fundusze ALF jednostki bazowej na badania w akademickich jednostkach opieki zdrowotnej i jednostkach uniwersyteckich w północnej służbie zdrowia region (ALF-Basenheten: 2019, 2020, 2021 do YFM).

Oświadczenie instytucjonalnej komisji rewizyjnej

Nie dotyczy, ponieważ to badanie nie obejmuje ludzi ani zwierząt.

Oświadczenie o świadomej zgodzie

Nie dotyczy, ponieważ badanie nie obejmuje ludzi.

Oświadczenie o dostępności danych

Dane przedstawione w niniejszym opracowaniu są dostępne w tekście głównym i [materiałach uzupełniających](#).

Konflikt interesów

Autorzy oświadczyli, że nie istnieją sprzeczne interesy. Fundatorzy nie brali udziału w projektowaniu badań, gromadzeniu i analizie danych, podejmowaniu decyzji o publikacji czy przygotowaniu rękopisu.

Bibliografia

1. V'Kovski, P.; Kratzel, A.; Steiner, S.; Stalder, H.; Thiel, V. Biologia i replikacja koronawirusa: Implikacje dla SARS-CoV-2. *Nat. Ks. Microbiol.* **2021**, *19*, 155-170. [[Google Scholar](#)] [[Odsyłacz](#)]
2. Suryawanshi, RK; Koganti, R.; Agelidis, A.; Patil, CD; Shukla, D. Dysregulacja sygnalizacji komórkowej przez SARS-CoV-2. *Trendy Mikrobiol.* **2021**, *29*, 224-237. [[Google Scholar](#)] [[Odsyłacz](#)]
3. Qin, C.; Zhou, L.; Hu, Z.; Zhang S.; Yang, S.; Tao, Y.; Xie, C.; Ma, K.; Shang, K.; Wang, W.; i in. Rozregulowanie odpowiedzi immunologicznej u pacjentów z koronawirusem 2019 (COVID-19) w Wuhan w Chinach. *Clin. Infekowac. Dis.* **2020**, *71*, 762-768. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Wang, F.; Nie, J.; Wang, H.; Zhao, Q.; Xiong, Y.; Deng, L.; Song, S.; Ma, Z.; Mo, P.; Zhang, Y. Charakterystyka zmian podzbioru limfocytów obwodowych w zapaleniu płuc COVID-19. *J. Zainfekować. Dis.* **2020** , 221 , 1762-1769. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Zhang, G.; Nie, S.; Zhang Z.; Zhang, Z. Podłużna zmiana przeciwciał koronawirusa 2 zespołu ciężkiego ostrego układu oddechowego u pacjentów z chorobą koronawirusową 2019. *J. Infect. Dis.* **2020** , 222 , 183-188. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Długie, QX; Liu, BZ; Deng, HJ; Wu, GC; Deng, K.; Chen, YK; Liao, P.; Qiu, JF; Lin, Y.; Cai, XF; i in. Odpowiedzi przeciwciał na SARS-CoV-2 u pacjentów z COVID-19. *Nat. Med.* **2020** , 26 , 845-848. [[Google Scholar](#)] [[Odsyłacz](#)]
7. Bednarskiego, JJ; Sleckman, BP Rozwój limfocytów: Integracja sygnalizacji odpowiedzi na uszkodzenie DNA. *Przysł. Immunol.* **2012** , 116 , 175-204. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
8. Malu, S.; Malshetty, V.; Franciszka, D.; Cortes, P. Rola łączenia niehomologicznych końców w rekombinacji V(D)J. *Immunol. Res.* **2012** , 54 , 233-246. [[Google Scholar](#)] [[Odsyłacz](#)]
9. Bednarskiego, JJ; Sleckman, BP Na przecięciu uszkodzeń DNA i odpowiedzi immunologicznych. *Nat. Wielebny Immunol.* **2019** , 19 , 231-242. [[Google Scholar](#)] [[Odsyłacz](#)]
10. Gapud, EJ; Sleckman, BP Unikalne i redundantne funkcje ATM i DNA-PKc podczas rekombinacji V(D)J. *Komórka. Cykl* **2011** , 10 , 1928-1935. [[Google Scholar](#)] [[Odsyłacz](#)]
11. Difilippantonio, S.; Gapud, E.; Wong, N.; Huang, Cypr; Mahowald, G.; Chen, HT; Kruhlak, MJ; Callen, E.; Livak, F.; Nussenzweig, MC; i in. 53BP1 ułatwia łączenie końców DNA dalekiego zasięgu podczas rekombinacji V(D)J. *Natura* **2008** , 456 , 529-533. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Schwarz, KB Stres oksydacyjny podczas infekcji wirusowej: przegląd. *Wolna Rada. Biol. Med.* **1996** , 21 , 641-649. [[Google Scholar](#)] [[Odsyłacz](#)]
13. Xu, LH; Huang, M.; Kieł, SG; Liu, DX Zakażenie koronawirusem indukuje stres replikacyjny DNA częściowo poprzez interakcję jego niestrukturalnego białka 13 z podjednostką p125 polimerazy delta DNA. *J. Biol. Chem.* **2011** , 286 , 39546-39559. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Delgado-Roche, L.; Mesta, F. Stres oksydacyjny jako kluczowy gracz w zakażeniu koronawirusem ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV). *Łuk. Med. Res.* **2020** , 51 , 384-387. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Pierce, AJ; Hu, P.; Han, M.; Ellis, N.; Białko wiążące końce DNA Jasin, M. Ku moduluje homologiczną naprawę pęknięć dwuniciowych w komórkach ssaków. *Geny Dev.* **2001** , 15 , 3237-3242. [[Google Scholar](#)] [[Odsyłacz](#)]
16. Bennardo, N.; Cheng, A.; Huang, N.; Stark, JM Alternative-NHEJ jest mechanistycznie odrębnym szlakiem naprawy pęknięć chromosomów ssaków. *PLoS Genet.* **2008** , 4 , e1000110. [[Google Scholar](#)] [[Odsyłacz](#)]
17. Sadofsky, MJ; Hesja, JE; McBlane'a, JF; Gellert, M. Ekspresja i aktywność rekombinacyjna V(D)J zmutowanych białek RAG-1. *Kwasy nukleinowe Res.* **1993** , 21 , 5644-5650. [[Google Scholar](#)] [[Odsyłacz](#)]
18. Trancoso, I.; Maska, M.; Gardner, R.; Carneiro, J.; Barreto, V.; Demengeot, J.; Sarmiento, L. Nowatorski ilościowy test reportera fluorescencyjnego dla celów RAG i aktywności RAG. *Z przodu. Immunol.* **2013** , 4 , 110. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
19. Zhang, J.; Cruz-cosme, R.; Zhuang, M.-W.; Liu, D.; Liu, Y.; Teng, S.; Wang, P.-H.; Tang, Q. Systemowe i molekularne badanie lokalizacji subkomórkowej białek SARS-CoV-2. *Transdukt sygnału. Cel. Tam.* **2020** , 5 , 269. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
20. Shang, J.; Wan, Y.; Luo, C.; Tak, G.; Geng, Q.; Auerbach, A.; Li, F. Mechanizmy wnikania do komórek SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Nauka. USA* **2020** , 117 , 11727-11734. [[Google Scholar](#)] [[Odsyłacz](#)]
21. Du, L.; Hej.; Zhou, Y.; Liu, S.; Zheng, BJ; Jiang, S. Białko kolce SARS-CoV — cel rozwoju szczepionek i terapii. *Nat. Ks. Microbiol.* **2009** , 7 , 226-236. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Huang, Y.; Yang, C.; Xu, XF; Xu, W.; Liu, SW Właściwości strukturalne i funkcjonalne białka szczytowego SARS-CoV-2: Potencjalny rozwój leku antywirusowego na COVID-19. *Acta Pharmacol. Grzech.* **2020** , 41 , 1141-1149. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Schröder, S.; Kruger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, TS; Herrler, G.; Wu, NH; Nitsche, A.; i in. Wejście do komórki SARS-CoV-2 zależy od ACE2 i TMPRSS2 i jest blokowane przez klinicznie sprawdzony inhibitor proteazy. *Komórka* **2020** , 181 , 271-280.e8. [[Google Scholar](#)] [[Odsyłacz](#)]
24. Hsu, AC-Y.; Wang, G.; Reid, AT; Veerati, PC; Pathinayake, PS; Daly, K.; Mayall, JR; Hansbro, premier; Horvat, JC; Wang, F.; i in. Białko kolca SARS-CoV-2 promuje odpowiedź hiperzapalną, którą można złagodzić przez peptyd antagonistyczny do kolców oraz zatwierdzone przez FDA inhibitory stresu ER i kinazy MAP in vitro. *bioRxiv* **2020** , 2020 , 317818. [[Google Scholar](#)]
25. Polska, GA; Owsiannikowa, IG; Kennedy, RB Odporność na SARS-CoV-2: Przegląd i wnioski do kandydatów na szczepionki fazy 3. *Lancet* **2020** , 396 , 1595-1606. [[Google Scholar](#)] [[Odsyłacz](#)]
26. Davanzo, GG; Kodo, AC; Brunetti, NS; Boldrini, V.; Dzianina, TL; Monterio, LB; de Moraes, D.; Ferrari, AJR; de Souza, GF; Muraro, SP; i in. SARS-CoV-2 wykorzystuje CD4 do infekowania limfocytów pomocniczych T. *medRxiv* **2020** , 2020 , 20200329. [[Google Scholar](#)]
27. Borsa, M.; Mazet, JM Atakowanie obrony: SARS-CoV-2 może infekować komórki odpornościowe. *Nat. Wielebny Immunol.* **2020** , 20 , 592. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
28. Barberis, E.; Vanella, VV; Falasca, M.; Caneapero, V.; Cappellano, G.; Raineri, D.; Ghirimoldi, M.; De Giorgis, V.; Puricelli, C.; Vaschetto, R.; i in. Krążące egzosomy są silnie zaangażowane w zakażenie SARS-CoV-2. *Z przodu. Mol. Biosci.* **2021** , 8 , 632290. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
29. Sur, S.; Khatun, M.; Steele, R.; Isbell, TS; Ray, R.; Ray, RB Egzosomy od pacjentów z COVID-19 niosą tenascynę-C i fibrynogen- β w wyzwaniu sygnałów zapalnych w komórkach odległych narządów. *bioRxiv* **2021** , 2021 , 430369. [[Google Scholar](#)]