

# Immunoregulacja ekspresji receptorów AP-N, DDP4 i ACE2, a podatność na infekcje koronawirusami 229E, MERS-CoV i SARS-CoV2

## Immune regulation of AP-N, DDP4 and ACE2 receptors and the susceptibility to infections with coronavirus 229E, MERS-CoV and SARS-CoV2

IZABELA GULBAS, MACIEJ CHAŁUBIŃSKI

Klinika Immunologii i Alergii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Publikacja przygotowana w ramach aktywności Sekcji Polskiego Towarzystwa Alergologicznego (PTA): „Mikrobiom, infekcje a alergia”

### Streszczenie

Podrodzina wirusów oddechowych Coronavirinae obejmuje siedem ludzkich szczepów koronawirusów (HCoV, *human coronavirus*), które wywołują łagodne przeziębienia (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1) oraz ostre zapalenie płuc prowadzące często do niewydolności oddechowej, a nawet śmierci (MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV2). Ciężkie infekcje indukują silną reakcję zapalną, nasilaną przez adaptacyjny układ odpornościowy. Cztery główne szczepy koronawirusów wykorzystują metalopeptydazy powierzchniowe, jako białka receptorowe, za pośrednictwem których wnikają do komórki docelowej. Receptory wejścia dla poszczególnych koronawirusów to aminopeptydaza N (AP-N), dipeptydylopeptydaza 4 (DPP4) oraz konwertaza angiotensyny 2 (ACE2) odpowiednio dla HCoV-229E, MERS-CoV, SARS-CoV i SARS-CoV2. Ponadto pełnią one szereg fizjologicznych funkcji m.in w regulacji układu krwionośnego czy odpornościowego. U ludzi ulegają wysokiej ekspresji powierzchniowej w różnych tkankach i narządach (jelita, nerki, serce, płuca). Dodatkowo na modulację ekspresji receptorów koronawirusowych mają wpływ różne cytokiny, chemokiny oraz inne białka, a także komórki immunokompetentne. Celem pracy jest wyjaśnienie biologicznej roli białek receptorowych w regulacji układów fizjologicznych człowieka, wpływ elementów/mechanizmów układu odpornościowego, a także potencjalny wpływ glikokortykosteroidów i swoistej immunoterapii alergenowej stosowanych w leczeniu astmy i alergii na podatność na infekcje koronawirusami.

**Słowa kluczowe:** koronawirusy, receptory wejścia, cytokiny, astma, układ odpornościowy

### Summary

The Coronaviridae family includes the seven known human coronaviruses (HCoV) that cause mild to moderate respiratory infections (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1) as well as severe illness and death (MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2). Severe infections induce inflammatory responses that are often intensified by host adaptive immune pathways. Proinflammatory responses are triggered by CoV entry mediated by host cell surface receptors. Interestingly, four of the seven strains use cell surface metalloproteinases as receptors. The entry receptors for specific coronaviruses are: aminopeptidase N (AP-N), dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) and angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) for HCoV-229E, MERS-CoV, SARS-CoV and SARS-CoV2, respectively. In addition, these receptors perform many physiological functions, including the regulation of the circulatory and immune systems. Coronavirus receptors are also highly expressed in human tissues and organs (intestines, kidneys, heart, lungs). Additionally, some cytokines, chemokines, and other proteins and immune cells influence the modulation of the expression of coronavirus receptors. This review presents the biological role of receptor proteins in the regulation of human physiological systems, the impact of the immune response on susceptibility to coronavirus infections, and the potential effects of glucocorticosteroids (GCS) and specific allergen immunotherapy (AIT) used in the treatment of asthma and allergy on the susceptibility to coronaviral infections.

**Keywords:** coronaviruses, entry receptors, cytokines, asthma, immune system

© *Alergia Astma Immunologia* 2022, 27 (3): 68-74

www.alergia-astma-immunologia.pl



Adres do korespondencji / Address for correspondence

Dr hab. n. med. Maciej Chałubiński,

Klinika Immunologii i Alergii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Ul. Pomorska 251,

92-213 Łódź tel.

42 675 73 09.

## Wykaz skrótów:

**SARS** – *severe acute respiratory syndrom*, zespół ostrej ciężkiej niewydolności oddechowej

**MERS** – *middle east respiratory syndrom*, zespół oddechowy bliskiego wschodu

**ACE2** – *angiotensin-converting enzyme 2*, konwertaza angiotensyny 2

**DPP4** – *dipeptidyl peptidase 4*, dipeptydylopeptydaza 4

**AP-N** – *aminopeptidase N*, aminopeptydaza N

**HRV** – *human rhinovirus*, ludzki rinowirus

**RSV** – *respiratory syncytial virus*, syncytialny wirus oddechowy

**TGEV** – *transmissible gastroenteritis virus*, wirusa zakaźnego zapalenia żołądka i jelit

**FCoV** – *feline coronavirus*, koronawirus kotów

**CCoV** – *canine coronavirus*, koronawirus psów

**HUVEC** – *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, ludzkie komórki śródbłonka żyły pępowinowej

**HAEC** – *human aortic endothelial cells*, ludzkie komórki śródbłonka aorty

**HMVEC-L** – *human lung microvascular endothelial cells*, ludzkie mikrowaskularne komórki śródbłonka naczyń płucnych

**GKS** – glikokortykosteroidy

**GIP** – *gastric inhibitory peptide*, glukozozależny peptyd insulintropowy

**ADA** – *adenosine deaminase activity*, deaminaza adenozyne

**AIT** – *allergen immunotherapy*, immunoterapia alergenna

**TLR** – *toll-like receptors*, receptory toll-podobne

**RIG-1** – *retinoic acid-inducible gene-1*, gen indukowany kwasem retinowym 1

**MDA-5** – *melanoma differentiation-associated protein 5*, białko różnicowania czerniaka 5

**IRF** – *interferon regulatory factor*, czynnik regulacyjny interferonu

**NF-κB** – *nuclear factor kappa B*, jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B

**TNF** – *tumor necrosis factor*, czynnik martwicy guza

**MCP-1** – *monocyte chemoattractant protein-1*, białko chemotaktyczne monocytów

**IP-10** – *interferon-gamma-inducible protein*, białko indukowane przez interferon gamma

**TMPS2** – *transmembrane serine protease 2*, transbłonowa proteaza serynowa typu 2

**SDF-1** – *stromal cell-derived factor-1*, czynnik pochodzenia stromalnego

**RANTES** – *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*, chemokina syntetyzowana przez limfocyty T

**MDC** – *macrophage-derived chemokine*, chemokina wydzielana przez makrofagi

**GM-CSF** – *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

**G-CSF** – *granulocyte colony stimulating factor*, czynnik stymulujący kolonie granulocytytarne

**MIP** – *macrophage inflammatory proteins*, białko zapalne makrofagów

**LPS** – lipopolisacharyd

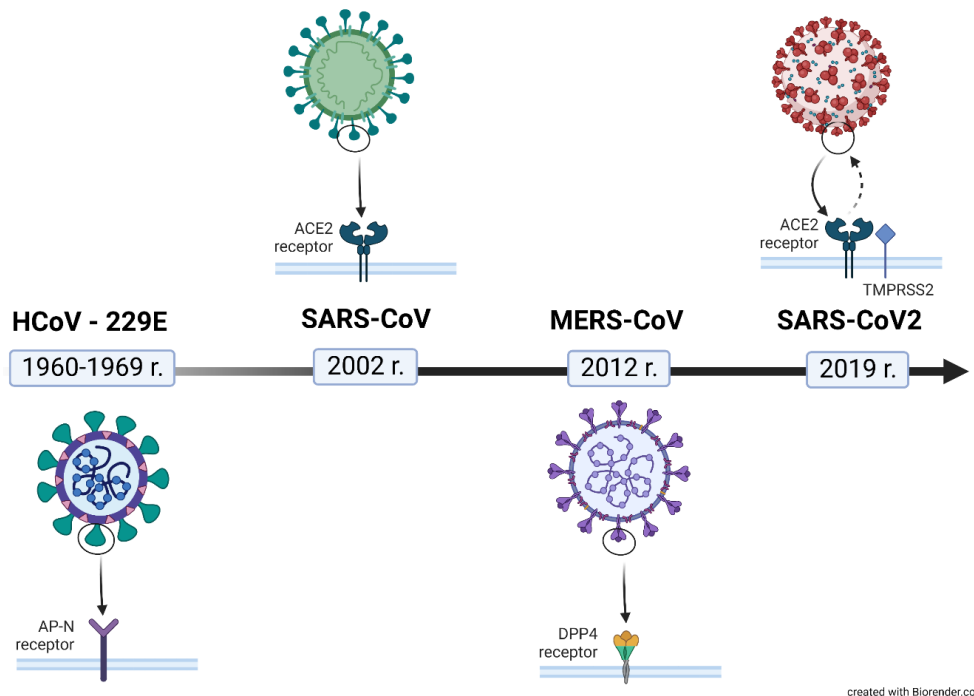
## Wstęp

Koronawirusy to duża rodzina wirusów, w obrębie której zostały sklasyfikowane dwie podrodziny: *Coronavirinae* i *Torovirinae*. Podrodzina *Coronavirinae*, ze względu na cechy genetyczne poszczególnych gatunków została podzielona na cztery rodzaje: alfa-, beta-, delta- oraz gamma-koronawirusy. Najbardziej interesujące z medycznego punktu widzenia są wirusy grup alfa oraz beta, do których należą wszystkie szczepy zakażające ludzi [1]. Ludzkie koronawirusy (HCoV, *human coronavirus*) takie jak: 229E, OC43, NL63 i HKU1 to nisko patogenne mikroorganizmy wywołujące łagodne infekcje górnych dróg oddechowych, które są powszechne na całym świecie. Pozostałe trzy szczepy to wysoce zakaźne koronawirusy, do których należą: SARS-CoV, MERS-CoV oraz SARS-CoV2. Pierwsze przypadki zespołu ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej (SARS, *severe acute respiratory syndrom*) wywołane wirusem SARS-CoV wystąpiły w prowincji Guangdong, w Chinach w 2002 roku. Wirus ten rozprzestrzenił się w 26 krajach na świecie, a śmiertelność w wyniku zakażeń wynosiła 11%. Bliskowschodni zespół niewydolności oddechowej (MERS, *middle east respiratory syndrom*) spowodowany przez wirus MERS-CoV po raz pierwszy wystąpił w Arabii Saudyjskiej w 2012 r. Wirus SARS-CoV2, którego wykryto w Wuhan, prowincja Hubei w Chinach w 2019 r., jest odpowiedzialny za obecnie trwającą na całym świecie pandemię COVID-19.

Koronawirusy MERS-CoV i SARS-CoV2 najczęściej atakują dolne drogi oddechowe, wywołują ostre zapalenie płuc i ciężką niewydolność oddechową, przy śmiertelności sięgającej odpowiednio 36% i 5,2% (Ryc.1) [2].

## Immunopatologia infekcji koronawirusami

Koronawirusy są jednymi z największych wirusów RNA pod względem długości genomu (~ 30 000 nukleotydów), który stanowi jednoniciowa cząsteczka RNA o dodatniej polaryzacji, oraz rozmiaru wirionu o kształcie sferycznym i średnicy około 80-180 nm [1]. W mikroskopie elektronowym wirusy te, dzięki obecności charakterystycznych struktur białkowych w postaci powierzchniowych wypustek wystających z dwuwarstwowej osłonki lipidowej, przypominają kształtem koronę, stąd ich nazwa – koronawirusy [3]. Nukleokapsyd koronawirusów pokryty jest lipidową osłonką, w skład której wchodzi białka: S (*spike protein*) – białko kolca, glikoproteina odpowiedzialna za interakcję z receptorem na powierzchni komórek docelowych, kształtem przypominająca kolce; E (*envelope protein*) – białko osłonkowe, inaczej białko płaszczka nadające kształt wirionu; M (*membrane protein*) – białko błonowe, będące głównym białkiem macierzy wirusa; N (*nucleocapsid protein*) – białko nukleokapsydu, jedno z głównych białek wirusowych, pełniące zarówno funkcję ochronną dla dużej cząsteczki



created with Biorender.com

Ryc. 1. Koronawirusy: pierwsze przypadki zakażeń, budowa wirionu oraz struktura receptorów koronawirusowych przytwierdzonych do błony komórkowej.

RNA, jak i aktywnie uczestniczące w modyfikacji procesów komórkowych i w replikacji wirusa [4].

Koronawirusy, podobnie jak inne wirusy RNA mające powinowactwo do układu oddechowego takie jak ludzkie rinowirusy (HRV, *human rhinovirus*), wirusy syncytialne (RSV, *respiratory syncytial virus*), czy wirusy grypy indukują zarówno wrodzone mechanizmy odpornościowe w zakażonym nabłonku oddechowym, jak i elementy odpowiedzi adaptacyjnej. Infekcja koronawirusowa inicjowana jest przez wiązanie się cząstek wirusa z receptorami obecnymi w błonie komórek docelowych, co prowadzi do fuzji wirusa i komórek gospodarza, a następnie do uwolnienia materiału genetycznego z wirionu do cytoplazmy komórek [4]. Po internalizacji do komórki, wirusowe RNA może być wykryte przez receptory rozpoznające wzorce molekularne (PRRs, *pattern recognition receptors*), takie jak: TLR3 (*toll-like receptors*) – lokalizacja endosomalna, TLR7/8, RIG-I (*retinoic acid-inducible gene-1*) czy MDA-5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) o lokalizacji cytoplazmatycznej, aktywując następnie czynniki regulujące geny dla interferonów: IRF3 i IRF7 (*interferon regulatory factor 3/7*). Sygnał przekazany z tych czynników indukuje cytozolową translokację jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, aktywując ekspresję białek ostrej fazy (CRP, *C reactive protein*), produkcję prozapalnych cytokin i chemokin (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-8, IP-10) oraz transkrypcję genów odpowiedzi na interferony [5]. Stopień aktywacji odpowiedzi przeciwwirusowej i zapalnej zależy od patogenności poszczególnych koronawirusów. Wysoce patogenne koronawirusy (SARS, MERS, SARS-CoV2) wywołują silną odpowiedź układu odpornościowego, prowadząc czasem do nadmiernego uwalniania cytokin i chemokin, zwanego „burzą cytokinową” (*cytokine storm*). Burzy cytokinowej towarzyszy zwykle niska odpowiedź interferonowa, ale wysoka odpowiedź prozapalna, przejawiająca się bardzo dużą produkcją zapalnych cytokin, m.in.: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, IP-10, MCP-1 i IL-8.

### Receptory dla koronawirusów – lokalizacja tkankowa oraz fizjologiczna rola białek w ustroju i układzie odpornościowym

Poszczególne koronawirusy wykorzystują różne białka receptorowe, które umożliwiają im wiązanie się z błoną komórek gospodarza. Receptorem wejścia dla wysoce patogennych SARS i SARS-CoV2 jest konwertaza angiotensyny 2 (ACE2), dla MERS-CoV – dipeptydylopeptydaza 4 (DPP4), natomiast aminopeptydaza N (AP-N) to receptor dla nisko patogenego koronawirusa 229E. Wykazanie zdolności do rozpoznawania poszczególnych receptorów komórkowych nie jest jednoznaczne z określeniem patogenności właściwości badanego wirusa [1]. SARS-CoV i SARS-CoV2 wykazują powinowactwo do tego samego receptora komórkowego, jednak zdolność wiązania białka S wirusa SARS-CoV do receptora jest mniejsza, niż w przypadku SARS-CoV2, co może tłumaczyć różnice w ilości oraz intensywności zakażeń [6].

### Konwertaza angiotensyny 2 (ACE2)

Konwertaza angiotensyny 2 (ACE2) to białko błonowe typu I, które ulega najwyższej ekspresji w tkankach płuc i nerek. Fizjologiczną rolą ACE2 jest przekształcenie angiotensyny I w angiotensynę II, czyli hormon peptydowy, który reguluje skurcz naczyń krwionośnych i ciśnienie krwi. ACE2 jest integralnym składnikiem układu Renina-Angiotensyna-Aldosteron (RAA) [7]. Układ RAA odgrywa podstawową rolę w utrzymaniu homeostazy układu sercowo-naczyniowego poprzez wpływ na objętość przestrzeni międzykomórkowej, gospodarkę sodową i napięcie mięśni gładkich ścian tętnic. Nadmierna aktywacja układu RAA ma istotne znaczenie w patogenezie nadciśnienia tętniczego, przerostu lewej komory mięśnia sercowego, przebudowy tętnic, nefropatii i miażdżycy, co w konsekwencji prowadzi do powikłań sercowo-naczyniowych pod postacią m.in.: zawału mięśnia sercowego, niewydolności serca czy udaru mózgu [8]. ACE2 wywołuje przeciwny efekt działania leków z grupy IKA (inhibitory konwertazy angiotensyny)

stosowanych w nadciśnieniu, niewydolności serca, chorobie cukrzycowej nerek. Ponadto, katalizuje hydrolizę peptydów takich jak: apelina-13 i apelina-36, które zwiększają kurczliwość mięśnia sercowego. Poza głównym receptorem ACE2, istotne dla wniknięcia SARS-CoV-2 do komórki jest również jego białko pomocnicze, czyli TMPRSS2 (*transmembrane serine protease 2*) (Ryc.1) [9]. To proteaza serynowa odpowiedzialna za cięcie enzymatyczne białka powierzchniowego S wirusa w dwóch miejscach. TMPRSS2 rozszczepia białko S na podjednostkę S1 i S2, co prowadzi do uwolnienia peptydu fuzyjnego, który ułatwia wirusowi przedostanie się do wnętrza komórki gospodarza na drodze endocytozy [10].

### Dipitydylopeptydaza 4 (DPP4)

Receptorem błonowym dla MERS-CoV jest dipitydylopeptydaza 4 (DPP4) – proteaza serynowa, znana również jako białko różnicowania dopełniacza (CD26) oraz białko wiążące deaminazę adenozyiny (Ryc.1) [11]. DPP4 ulega ekspresji na powierzchni większości komórek ssaków, bakterii, grzybów i roślin, natomiast w organizmie człowieka obecne jest w komórkach nabłonkowych wątroby, przewodu pokarmowego oraz w nerkach [12]. Ekspresja DPP4 podlega regulacji m.in. przez limfocyty B i T oraz komórki NK, co podkreśla szczególną rolę tego białka w układzie odpornościowym [13]. Ze względu na możliwość wiązania na swej powierzchni dodatkowych białek, DPP4 wykazuje wiele fizjologicznych funkcji w organizmie człowieka. Reguluje stężenie glukozy ze względu na zdolność do rozszczepiania, inaktywacji i degradacji glukozozależnych peptydów insulinotropowych (GIP, *gastric inhibitory peptide*), które zwiększają wydzielanie insuliny w komórkach beta trzustki [14]. Odgrywa też istotną rolę w funkcjonowaniu układu odpornościowego. Dzięki katalitycznej aktywności hydrolizuje bioaktywne peptydy i białka takie jak: SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*), RANTES (*regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*), MDC (*melanoma differentiation-associated protein 5*) czy eotaksyna. Ponadto wykazuje zdolność wiązania deaminazy adenozyiny (ADA, *adenosine deaminase activity*), przyczyniając się do nasilenia proliferacji limfocytów [15]. Jednak główną funkcją tego enzymu w stymulowaniu odpowiedzi obronnej organizmu wobec patogenów jest indukcja sygnału kostymulującego aktywację dziewiczych limfocytów T (*naive T cells*), a także wzmocnienie sygnałów aktywujących lim-

focyty B i limfocyty T cytotoksyczne. Indukcja sygnału kostymulującego przez DPP4 wymaga utworzenia kompleksu TCR-antygen-MHC [16].

W organizmie ludzkim istnieje wiele substratów z grupy chemokin, które ulegają enzymatycznym modyfikacjom katalizowanym przez DPP4. Chemokiną wobec której enzym ten wykazuje najwyższą selektywność, jest czynnik pochodzenia stromalnego 1 (SDF-1). SDF-1 w wyniku hydrolizy katalizowanej przez DPP4 traci biologiczną aktywność oddziaływania z białkiem CXCR4, zwiększając możliwość zainfekowania komórek układu odpornościowego wirusem HIV-1, który na etapie wnikania do komórki gospodarza wykorzystuje CXCR4 jako koreceptor. Kolejnym białkiem modyfikowanym przez DPP4 jest chemokina RANTES, której hydroliza znacznie osłabia wpływ tego białka na limfocyty, monocyty, komórki dendrytyczne, eozynofile, bazofile oraz komórki NK. DPP4 oddziałuje również na chemokinę wydzielaną przez makrofagi (MDC), eotaksynę oraz IP-10, prowadząc do zaniku ich aktywności biologicznych [17]. DPP4 poza udziałem w patogenezie cukrzycy jest również zaangażowane w patofizjologię m.in.: zapalenia stawów, miażdżycy, nieswoistego zapalenia jelit, stwardnienia rozsianego, astmy czy atopowego zapalenia skóry.

W układzie odpornościowym najwyższą ekspresją DPP4 charakteryzują się ludzkie komórki pomocnicze T typu 17 (Th17) oraz limfocyty T związane z błoną śluzową (MALT). Komórki NK wykazują niewielką ekspresję powierzchniową DPP4, jednak wzrasta ona znacząco nawet o 30% po stymulacji IL-2, IL-12 lub IL-15 [18].

### Aminopeptydaza N (AP-N)

Aminopeptydaza N (AP-N) to glikoproteina błonowa o aktywności zależnej od cynku, która odgrywa kluczową rolę w wielu procesach fizjologicznych człowieka oraz stanowi receptor wejścia dla koronawirusa 229E (Ryc.1) [19]. AP-N funkcjonuje w różnych szlakach metabolizmu peptydów, uczestnicząc m.in.: w procesach odczuwania bólu i regulacji nastroju poprzez katalizowanie metabolizmu neuropeptydów przetwarzających informację sensoryczną [20]. Jednym z takich neuropeptydów jest enkafeina, która ulega degradacji przez AP-N, co wzmacnia odczuwanie bólu. AP-N bierze udział w regulacji ciśnienia krwi, ponieważ rozkłada zwężający naczynia peptyd - angiotensynę III, przyczyniając się tym samym drogą pośrednią do rozszerze-

Tabela 1. Cytokiny regulujące ekspresję receptorów dla HCoV.

Receptory HCoV	Zwiększenie ekspresji ↑	Zmniejszenie ekspresji ↓	Brak wpływu na ekspresję
AP-N (HCoV-229E)	IL-4	IL-2	IL-1
	IL-13	IL-7	IL-15
		IL-4	
		IL-13	
DPP4 (MERS-CoV)	IL-4		IL-1
	IL-2		IL-7
	IL-13	TGF-β	IL-15
	IL-12	TNF-α	IL-12
	IL-15		
ACE2 (SARS-CoV, SARS-CoV2)	IFN-α	IL-2	
	IFN-β	IL-7	
	IFN-γ	IL-4	IL-5
		IL-13	

nia naczyń i obniżenia ciśnienia tętniczego krwi [21]. Katalizując proces hydrolizy niektórych peptydów, wpływa na aktywność chemokin i cytokin takich jak: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 czy G-CSF [22]. Ponadto, AP-N służy nie tylko jako receptor wejścia dla ludzkiego koronawirusa 229E, ale także jako receptor dla wirusa zapalenia żołądka i jelit świń (TGEV, *transmissible gastroenteritis virus*), koronawirusa kotów (FCoV, *feline coronavirus*) i koronawirusa psów (CCoV, *canine coronavirus*) [23]. AP-N wykazuje również wysoką ekspresję powierzchniową na komórkach nabłonkowych dróg oddechowych, nabłonkach proksymalnych kanalików nerek, a także ludzkich komórkach śródbłonka żyły pępowinowej (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*), ludzkich komórkach śródbłonka aorty (HAEC, *human aortic endothelial cells*) oraz ludzkich mikrowaskularnych komórkach śródbłonka naczyń płucnych (HMVEC-L, *human lung microvascular endothelial cells*) [24].

### Immunoregulacja ekspresji ACE2, DPP4 i AP-N i podatność na zakażenie koronawirusami

Niewiele jest badań wykazujących regulację syntezy i ekspresji powierzchniowej receptorów wejścia dla koronawirusów przez układ odpornościowy. Kilka z nich koncentruje się przede wszystkim na wpływie poszczególnych cytokin i ich rodzin uwalnianych przez komórki immunokompetentne, a także komórki tkanek, w których toczy się proces zapalny (Tab.1).

#### Wpływ cytokin na ekspresję ACE2

Według danych literaturowych IL-4 i IL-13 – cytokiny charakterystyczne dla zapalenia typu Th2 obserwowanego w immunopatologii astmy oskrzelowej – mogą zmniejszać ekspresję ACE2 w komórkach nabłonka błony śluzowej nosa (Tab.1). Dodatkowo wykazano, że IL-13 może hamować ekspresję ACE2 w górnych i dolnych drogach oddechowych u chorych na astmę i alergiczny nieżyt nosa. W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na komórkach nabłonka dróg oddechowych pochodzących zarówno od chorych na astmę, jak i osób zdrowych, zaobserwowano, że IL-13 hamuje ekspresję genu kodującego receptor ACE2, natomiast zwiększa ekspresję białka pomocniczego – TMPRSS2 [25]. Takie wyniki zaobserwowano również u dzieci i dorosłych z astmą oraz z nieżytem nosa. Według Jacksona i wsp. obecność zapalenia alergicznego w drogach oddechowych oraz kontrolowana ekspozycja na alergeny są związane ze znacznym zmniejszeniem ekspresji ACE2 [26]. Na podstawie tych danych można postawić tezę, że ACE2 i TMPRSS2 podlegają modulacji przez zapalenie typu 2 w górnych i dolnych drogach oddechowych.

Obserwacje sytuacji epidemiologicznej na świecie dostarczyły ponadto wielu ważnych danych o podatności chorych na astmę na zakażenie i ciężkość przebiegu COVID-19. Badania przeprowadzone przez brytyjski Biobank wykazały, że pacjenci z astmą niealergiczną mieli wyższe ryzyko ciężkiego przebiegu COVID-19 niż pacjenci z astmą alergiczną. Astma Th2-zależna charakteryzuje się zwiększoną ekspresją IL-4, IL-13 i IL-5 oraz eozynofilią [27]. Co więcej, pacjenci z astmą i COVID-19, którzy wykazywali mniej ciężki przebieg choroby, mieli zwiększoną liczbę i poziom aktywacji limfocytów T, zarówno CD4<sup>+</sup> jak i CD8<sup>+</sup>, podczas gdy limfopenia, to szczególnie zmniejszeniem liczby limfocytów T jest uznany markerem ciężkości COVID-19

[28]. Dodatkowo IL-13 oraz stosowane w leczeniu astmy glikokortykosteroidy zmniejszają ekspresję genu ACE2 zarówno w nabłonku nosa, jak i oskrzeli, co również może mieć wpływ na łżejszy przebieg COVID-19 u pacjentów z astmą [26].

Kolejne badania donoszą, że IFN typu I mogą zwiększać ekspresję ACE2 w nabłonku oskrzeli i górnych dróg oddechowych (Tab.1) [29]. Może to nieść za sobą konsekwencje biologiczne. Ponieważ wirus SARS-CoV2 wykorzystuje ACE2 jako receptor wejścia, odpowiedź interferonowa gospodarza może promować zdolność wnikania wirusa do komórek nabłonka dróg oddechowych. W naszym ośrodku wykazaliśmy, iż dynamika ekspresji mRNA dla ACE2 w komórkach śródbłonka naczyń płucnych jest porównywalna z dynamiką ekspresji mRNA dla IFN- $\beta$  po infekcji rinowirusem HRV, co sugeruje aktywację szlaków sygnałowych dla ACE2 i IFN- $\beta$  [24]. Wyniki innych badań na nabłonku oddechowym wykazały podobną zależność wobec INF typu I i II [29].

#### Wpływ cytokin na ekspresję DPP4

Jedną z cytokin, która indukuje ekspresję mRNA dla DPP4 jest IL-13. W badaniach wykorzystujących model zwierzęcy astmy, z niedoborem DPP4 stwierdzono, że migracja limfocytów T CD4<sup>+</sup> uległa zmniejszeniu przy stymulacji IL-13. Innymi cytokinami Th2, które mają wpływ na regulację ekspresji DPP4, są IL-4 i IL-5 (Tab.1) [11]. Ich niedobór prowadzi do obniżenia ekspresji genu dla DPP4. Inn i wsp. zaobserwowali, że poziom DPP4 w osoczu pacjentów chorujących na MERS jest znacznie niższy niż u ludzi zdrowych. Ponadto, poziom immunosupresyjnej IL-10 oraz naskórkowego czynnika wzrostu (EGF, *epidermal growth factor*) wykazują dodatnią korelację ze stężeniem DPP4 w osoczu. W innych badaniach zaobserwowano, że długotrwałe hamowanie DPP4 obniża poziom IL-1 $\beta$  oraz IL-12, co może wiązać się z działaniem przeciwzapalnym [30]. Wpływ regulacyjny na DPP4 może wykazywać również IL-33, która zmniejsza ekspresję powierzchniową tego białka na komórkach śródbłonka naczyń płucnych [24]. Wiele badań wykazuje, że DPP4 może być regulowane zarówno przez wrodzoną, jak i nabytą odpowiedź odpornościową. DPP4 ulega ekspresji na powierzchni limfocytów T prowadząc do wzrostu odpowiedzi Th1-zależnej. Zaobserwowano, również że TGF- $\beta$  i TNF- $\alpha$  obniżają ekspresję receptora dla koronawirusa MERS szczególnie na limfocytach CD4<sup>+</sup> (Tab.1) [31].

#### Wpływ cytokin na ekspresję AP-N

Ekspresja AP-N jest regulowana przez kilka cytokin w różnych typach komórek. Dane literaturowe wskazują, że IL-4 zwiększa ekspresję aminopeptydazy N m.in. na monocytach oraz komórkach śródbłonka [32]. Aminopeptydaza N jest zaangażowana w aktywację i różnicowanie makrofagów. Wzrost ekspresji tego białka jest również regulowany przez IFN- $\gamma$ , lipopolisacharyd (LPS), białko układu dopełniacza o działaniu chemotaktycznym (C5a) oraz transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- $\beta$ ), natomiast poziom ekspresji AP-N obniżany jest w środowisku bogatym w IL-10 (Tab.1). Wykazano, że do wzrostu ekspresji AP-N dochodzi podczas różnicowania się monocytów w makrofagi. Ponadto, AP-N oddziałuje z receptorem Fc $\gamma$ R na błonie komórkowej monocytów i reguluje fagocytozę [33].

AP-N ulega silnej ekspresji na komórkach dendrytycznych i uczestniczy w obróbce antygeny poprzez przycinanie peptydów wiążących się z cząsteczką MHC klasy I lub II na komórkach prezentujących antygen. Aminopeptydaza N jest obecna również na neutrofilach i jej ekspresja na powierzchni tych komórek może być zwiększana przez cytokiny prozapalne takie jak IL-8 oraz TNF- $\alpha$  [34]. Wykazano, że zastosowanie przeciwciał anti-AP-N zaburza migrację mediowaną przez IL-8 i prowadzi do agregacji neutrofilii zależnej od sieciowania białka AP-N [35]. Apoptoza neutrofilii ma kluczowe znaczenie dla ustąpienia ostrego stanu zapalnego i przeciwdziałania uszkodzeniom tkanek, w których pośredniczą granulocyty. Stwierdzono, że TNF- $\alpha$  jest głównym agonistą zwiększającym tempo apoptozy neutrofilii, podczas gdy AP-N może regulować apoptozę indukowaną przez TNF- $\alpha$  w ludzkich neutrofilach [35]. Götze i wsp. wykazali, że zastosowanie przeciwciał przeciwko AP-N hamują wydzielanie cytokin prozapalnych takich jak: IL-6, IL-8 i MCP-1 [33]. Aminopeptydaza N działa poprzez mechanizmy zależne i niezależne od enzymów. Może nie tylko modulować rozwój i aktywność komórek układu odpornościowego, ale także być regulowana przez szereg cytokin będących mediatorami stanu zapalnego, mogąc mieć tym samym potencjalny wpływ na podatność na zakażenie koronawirusem 229E.

### Ekspresja ACE2, DPP4 i AP-N na komórkach śródbłonka naczyń płucnych

Na podstawie analizy wyników badań prowadzonych w naszym ośrodku potwierdzono, że ACE2, DPP4 i AP-N występują nie tylko na komórkach nabłonka oddechowego, ale również na komórkach śródbłonka naczyń płucnych. Obecność tych receptorów sugeruje, że śródbłonek naczyniowy może podlegać zakażeniu podczas infekcji układu oddechowego koronawirusami, co obserwuje się również w warunkach *in vivo* u chorych o ciężkim przebiegu tych infekcji [36]. Wykazano, że ekspresja zarówno ACE2, jak i DPP4 oraz AP-N wzrasta po zakażeniu komórek śródbłonka rinowirusem HRV16. Co więcej, wpływ HRV na ekspresję tych receptorów może podlegać regulacji IL-33, która – jak wykazano w naszych badaniach – hamuje wzrost ich ekspresji na powierzchni komórek indukowany infekcją HRV16 [24]. Potwierdzenie znaczenia klinicznego niniejszych obserwacji wymaga szerszych i dalszych badań.

### Wpływ leczenia przeciwalergicznego na podatność na zakażenia koronawirusowe

Poważne obawy dotyczą tego czy leki stosowane w leczeniu astmy w tym kortykosteroidy, glikokortykosteroidy (GSK), immunoterapia alergenowa (AIT, *allergen immunotherapy*), przeciwciała monoklonalne, antagoniści leukotrienów oraz leki rozszerzające oskrzela – oddziałują na układ odpornościowy – mogą również wpływać na ryzyko zakażenia wirusem SARS-CoV2. Wcześniejsze badania wykazały, że wziewne glikokortykosteroidy mogą obniżać poziom cytokin prozapalnych (MIP-1 $\alpha$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$  i IL-1 $\alpha$ ) i zwiększać poziom cytokin przeciwzapalnych

(IL-10) u pacjentów z astmą [37]. Ponadto wykazano, że przyjmowanie wziewnych glikokortykosteroidów (GKS), z wyjątkiem triamcynolonu, a także donosowych kortykosteroidów, wiąże się ze zmniejszoną ekspresją proteazy ACE2 i TMPRSS2 [38]. Wyniki te mogą sugerować, że wziewne glikokortykosteroidy mają działanie ochronne dla pacjentów z astmą, zmniejszając zapalenie dróg oddechowych we wczesnym stadium zakażenia SARS-CoV2. Z kolei inne badania *in vitro* wykazały, że substancje czynne takie jak glikopironium, formoterol i kombinacja glikopironium, formoterolu i budesonidu mogą zmniejszać replikację HCoV-229E, częściowo poprzez hamowanie ekspresji AP-N – receptora komórkowego dla tego wirusa [39]. Natomiast GKS stosowane ogólnoustrojowo, w tym hydrokortyzon i deksametazon, mogą zwiększać ekspresję AP-N, wpływając jednocześnie na spadek ekspresji DPP4 – receptora dla MERS-CoV [40].

Istotne znaczenie kliniczne w podatności na zakażenia koronawirusowe może mieć również immunoterapia alergenowa (AIT). Podstawowym procesem AIT jest indukcja alergenowo-swoistych limfocytów T regulatorowych (Treg) i B regulatorowych (Breg) [41]. Komórki Treg wraz z wytwarzanymi przez nie cytokinami takimi jak IL-10 i TGF- $\beta$ , hamują odpowiedź odpornościową Th2-zależną i kontrolują zapalenie alergiczne. Ponadto uznaje się, że limfocyty Treg odgrywają ważną rolę w zapobieganiu burzy cytokinowej i ograniczaniu uszkodzeń tkanek. Biorąc pod uwagę przypuszczalny patomechanizm burzy cytokinowych u pacjentów z ciężkim przebiegiem COVID-19, możliwe jest, że tolerancja immunologiczna indukowana przez AIT może pełnić rolę ochronną [42].

Podsumowując, powyższe obserwacje sugerują potencjalny wpływ glikokortykosteroidów i immunoterapii alergenowej na ekspresję receptorów wejścia dla koronawirusów, a tym samym na podatność na zakażenie. Definitywne określenie zależności wymaga kontynuacji badań.

### Podsumowanie

Koronawirusy jako czynniki łagodnych, samoustępujących zakażeń układu immunologicznego nie były wiodącym tematem badań zdrowia publicznego. Dopiero wybuch pandemii COVID-19 w 2020 roku skłonił wielu badaczy do głębszego pochylenia się nad biologią tych wirusów oraz ich wpływem na funkcjonowanie układu odpornościowego. Poznanie oraz zrozumienie biologii molekularnej koronawirusów ma kluczowe znaczenie dla wyjaśnienia ich pochodzenia, różnorodności, patogenyzy i epidemiologii. Szczególny wgląd w mechanizmy molekularne w tym przede wszystkim funkcjonalność białek receptorowych dla koronawirusów jest kluczowy dla opracowania skutecznej diagnostyki. Ponadto ważną jest również identyfikacja czynników środowiskowych, biologicznych, predyspozycji genetycznych oraz obecności chorób współistniejących, które mogą być przyczyną podatności na zakażenia. Monitorowanie oraz analiza sekwencji genomu koronawirusów jest niezbędna do zrozumienia ich ewolucji genetycznej oraz wpływu na odpowiedź odpornościową.

### Piśmiennictwo

1. Abramczuk E, Pancer K, Gut W i wsp. Non-pandemic human coronaviruses - characteristics and diagnostics. *Postępy Mikrobiologii - Advancements of Microbiology*. 2019;56(2):205–13.
2. Chałubiński M, Gajewski A, Kowalski ML. The relationship between human coronaviruses, asthma and allergy—An unresolved dilemma. *Clin Exp Allergy*. 2020;50(10):1122–6.

3. van der Hoek L, Pyrc K, Berkhout B. Human coronavirus NL63, a new respiratory virus. *FEMS Microbiol Rev.* 2006;30(5):760–73.
4. Artika IM, Dewantari AK, Wiyatno A. Molecular biology of coronaviruses: current knowledge. *Heliyon.* 2020;6(8):e04743.
5. Portela Sousa C, Brites C. Immune response in SARS-CoV-2 infection: the role of interferons type I and type III. *Braz J Infect Dis.* 2020;24(5):428–33.
6. Chen J, Jiang Q, Xia X i wsp. Individual variation of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 gene expression and regulation. *Aging Cell.* 2020;19(7).
7. Vaduganathan M, Vardeny O, Michel T i wsp. Renin–Angiotensin–Aldosterone System Inhibitors in Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2020; 382(17):1653–1659.
8. Turner AJ. ACE2 Cell Biology, Regulation, and Physiological Functions. W: *The Protective Arm of the Renin Angiotensin System (RAS).* 2015:185–9.
9. Devarakonda CKV, Meredith E, Ghosh M i wsp. Coronavirus Receptors as Immune Modulators. *Jl.* 2021;206(5):923–9.
10. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S i wsp. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020;181(2):271–280.e8.
11. Seys LJM, Widagdo W, Verhamme FM i wsp. DPP4, the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Receptor, is Upregulated in Lungs of Smokers and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. *Clinical Infectious Diseases.* 2018;66(1):45–53.
12. Hopsu-Havu VK, Glenner GG. A new dipeptide naphthylamide hydrolyzing glycyL-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie.* 1966;7(3):197–201.
13. Aertgeerts K, Ye S, Tennant MG i wsp. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation. *Protein Sci.* 2004;13(2):412–21.
14. Filipek B. Miejsce inkretynomimetyków i inhibitorów dipeptydylopeptydazy 4 w leczeniu cukrzycy typu 2. *Forum Zaburzeń Metabolicznych.* 2010;1(4):220–229.
15. Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2001;54(3):249–64.
16. Wrenger S, Faust J, Mrestani-Klaus C i wsp. Non-substrate peptides influencing dipeptidyl peptidase IV/CD26 activity and immune cell function. *Front Biosci.* 2008;13:3194–201.
17. Jackiewicz A, Katarzyńska J. Dipeptydylopeptydaza IV – atrakcyjny cel do opracowywania skutecznych strategii terapeutycznych i diagnostycznych. *Postepy Hig Med Dosw.* 2018; 72: 417–441.
18. Choi S,. *Encyclopedia of Signaling Molecules.* Cham: Springer International Publishing; 2018.
19. Chen L, Lin YL, Peng G i wsp. Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012;109(44):17966–71.
20. König M, Zimmer AM, Steiner H i wsp. Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. *Nature.* 1996;383(6600):535–8.
21. Danziger RS. Aminopeptidase N in arterial hypertension. *Heart Fail Rev.* 2008;13(3):293–8.
22. Mina-Osorio P. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends in Molecular Medicine.* 2008;14(8):361–71.
23. Tresnan DB, Levis R, Holmes KV. Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. *J Virol.* 1996;70(12):8669–74.
24. Gulbas I, Gajewski A, Gawrysiak M i wsp. IL-33 prevents the enhancement of AP-N, DPP4, and ACE2 expression induced by rhinovirus HRV16 in the human lung endothelium—potential implications for coronaviral airway infections. *Allergy.* 2022;all.15251.
25. Kimura H, Francisco D, Conway M i wsp. Type 2 inflammation modulates ACE2 and TMPRSS2 in airway epithelial cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2020;146(1):80–88.e8.
26. Jackson DJ, Busse WW, Bacharier LB i wsp. Association of respiratory allergy, asthma, and expression of the SARS-CoV-2 receptor ACE2. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2020;146(1):203–206.e3.
27. Skevaki C, Karsonova A, Karaulov A i wsp. Asthma-associated risk for COVID-19 development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2020;146(6):1295–301.
28. Shi W, Gao Z, Ding Y i wsp. Clinical characteristics of COVID-19 patients combined with allergy. *Allergy.* 2020;75(9):2405–8.
29. Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK i wsp. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell.* 2020;181(5):1016–1035.e19.
30. He X, Li W, Xie Y i wsp. Long-term inhibition of dipeptidyl-peptidase 4 reduces islet infiltration and downregulates IL-1 $\beta$  and IL-12 in NOD mice. *International Immunopharmacology.* 2020;88:106945.
31. Pinheiro MM, Fabbri A, Infante M. Cytokine storm modulation in COVID-19: a proposed role for vitamin D and DPP-4 inhibitor combination therapy (VIDPP-4i). *Immunotherapy.* 2021;13(9):753–65.
32. Wulfänger J, Schneider H, Wild P i wsp. Promoter methylation of aminopeptidase N/CD13 in malignant melanoma. *Carcinogenesis.* 2012;33(4):781–90.
33. Gotze O i wsp. Rapid increase in the membrane expression of neutral endopeptidase (CD10), aminopeptidase n (CD13), tyrosine phosphatase (CD45) and Fc $\gamma$ -RIII (CD16) upon stimulation of human peripheral leukocytes with human C5a. 1991;147(11):3909–14.
34. Fiddler CA, Parfrey H, Cowburn AS i wsp. The Aminopeptidase CD13 Induces Homotypic Aggregation in Neutrophils and Impairs Collagen Invasion. *PLoS ONE.* 2016;11(7):e0160108.
35. Cowburn AS, Sobolewski A, Reed BJ i wsp. Aminopeptidase N (CD13) Regulates Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -induced Apoptosis in Human Neutrophils. *Journal of Biological Chemistry.* 2006;281(18):12458–67.
36. Otifi HM, Adiga BK. Endothelial Dysfunction in Covid-19 Infection. *The American Journal of the Medical Sciences.* 2022;363(4):281–7.
37. John M, Lim S, Seybold J i wsp. Inhaled Corticosteroids Increase Interleukin-10 but Reduce Macrophage Inflammatory Protein-1, Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor, and Interferon-Release from Alveolar Macrophages in Asthma. 1998;157:7.
38. Jackson DJ, Busse WW, Bacharier LB i wsp. Association of respiratory allergy, asthma, and expression of the SARS-CoV-2 receptor ACE2. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2020;146(1):203–206.e3.
39. Yamaya M, Nishimura H, Deng X i wsp. Inhibitory effects of glycopyrronium, formoterol, and budesonide on coronavirus HCoV-229E replication and cytokine production by primary cultures of human nasal and tracheal epithelial cells. *Respiratory Investigation.* 2020;58(3):155–68.
40. Sorrell JM, Brinon L, Baber MA i wsp. Cytokines and glucocorticoids differentially regulate APN/CD13 and DPPIV/CD26 enzyme activities in cultured human dermal fibroblasts. *Archives of Dermatological Research.* 2003;295(4):160–8.
41. Jutel M, Gajdanowicz P. Mechanisms induced by allergen immunotherapy: state of knowledge. *pja.* 2018;5(4):175–9.
42. Palomares O, Martín-Fontecha M, Lauener R i wsp. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- $\beta$ . *Genes Immun.* 2014;15(8):511–20.
43. Figure created with Biorender.com lic. Likońska A.