

BOJ S KORONAVÍRUSOM COVID-19 Z HĽADISKA GLYKOBIOLOGIE

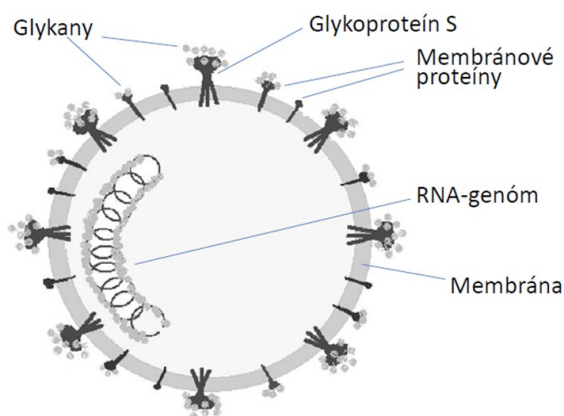
PETER BIELY

Chemický ústav, Centrum glykomiky, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika
chempbsa@savba.sk

Kľúčové slová: koronavírus, COVID-19, SARS-CoV-2, hrotový S-glykoproteín, glykany, glykozylácia, inhibícia, väzbové miesto

Situácia, v ktorej sme sa ocitli kvôli pandémie koronavírusu COVID-19 (SARS CoV-2) je príležitosťou pozrieť sa na tento vírus aj z hľadiska sacharidov, z hľadiska glykobiológie. Vieme, že sacharidy, cukry, sú popri nukleových kyselinách a bielkovinách ďalšie významné zložky živých systémov, ktoré okrem nutričnej a štruktúrnej funkcie plnia aj dôležitú úlohu signálnych a komunikačných molekúl. Interakcie cukrov s bielkovinami sú súčasťou kontroly a spúšťania celého radu biologických procesov, ale žiaľ aj patologických. Nie je tomu inak ani v prípade vírusov a predovšetkým glykozylovaných koronavírusov, medzi ktoré patrí aj COVID-19. Ide o vírus, ktorý sa radí do skupiny veľkých obalených RNA vírusov guľovitého tvaru, s povrchom posiatym výbežkami dlhších a kratších transmembránových proteínov. Najnápadnejšie sú tie najdlhšie výbežky tvorené trimérom vysoko glykozylovaného S-proteínu, anglicky „spike protein“ (obr. 1), o ktorom sa predpokladá, že je zodpovedný za uchytenie a následné infikovanie buniek. Pred fúziou s bunkou vírusové častice interagujú buď s povrchovými bielkovinami alebo sacharidmi buniek hostiteľa. Väčšina úvah o tom, ako zabrániť infekcii týmto mimoriadne nebezpečným vírusom, sa týka prípravy vakcín a vývoja prostriedkov na blokovanie replikácie vírusu a jeho uchytenia prostredníctvom S-proteínu, vrátane monoklonálnych protilátok proti COVID-19 (cit.¹). Uvažuje sa o pomoci infikovaným jedincami podávaním plazmy z vyliečených pacientov bohatej na protilátky, a aj o klónovaní takýchto protilátok. Ako uvediem nižšie, s prípravou vakcín, v tomto prípade najlepšie využitím niektorých bielkovinných častí povrchovej štruktúry patogénu, to vzhľadom na pestrý glykanový povlak S-proteínu nebude asi jednoduchá záležitosť. Našťastie na vývoji vakcíny sa vo svete intenzívne pracuje, a to aj na báze mRNA vírusu², a optimistické správy zaznievajú aj zo slovenskej biotechnologickej spoločnosti AXON Neuroscience³.

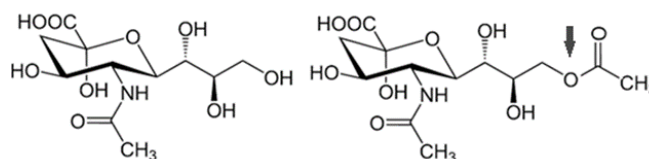
Zaujalo ma, že v najnovších článkoch o COVID-19 sa pozornosť významu sacharidov, či už vírusu alebo hostiteľa, v procese adhézie vírusu nevenuje. Je to možno dôsledok toho, že nový vírus ešte dobre nepoznáme, ale aj sku-



Obr. 1. Schéma znázorňujúca štruktúru koronavírusu

točnosti, že chémia sacharidov je zložitá, a preto aj dosť nepopulárna. Vie sa však, že primárnymi faktormi v adhezii iných koronavírusov zo skupiny beta, kam sa radí aj COVID-19, sú povrchové sacharidy hostiteľskej bunky. Celý rad vírusov a medzi nimi aj koronavírus MERS-CoV sa viaže na koncový 9-uhlíkatý kyselý cukor glykanov, kyselinu sialovú⁴, kým u ľudského koronavírusu HCoV-OC43 a hovädzieho BoCoA bola ako primárny receptor identifikovaná modifikovaná kyselina sialová, ktorá má navyše acetylovú skupinu v polohe 9, a ktorú nazývame 9-acetyl-sialová kyselina alebo 5,9-diacetyl-neuraminová kyselina⁵ (obr. 2). V tomto prípade za primárnu interakciu vírusu s povrchovými sacharidmi hostiteľa nie je zodpovedný S-glykoproteín ale hemagglutinínová esteráza (HE), ktorá je ďalším transmembránovým enzýmom koronavírusov sprostredkujúcim inváziu⁶. HE má tri domény. Jednej sa pripisuje rozpoznanie 9-acetyl-sialovej kyseliny, druhej jej deacetylácia v polohe 9 (obr. 2), čo znamená, že tento cukor už ďalší vírus tohto typu na prienik nemôže použiť. Tretia doména HE sa podieľa na fúzii vírusovej membrány s membránou hostiteľa.

U COVID-19 sa úloha HE v interakcii s vírusom a ani podobné interakcie iných bielkovín so sacharidmi zatiaľ nespomínajú. To je vlastne hlavný dôvod tohto príspevku. Génová sekvencia vírusu dokazuje, že HE sa v obale vírusu nachádza⁷. Na základe poznatkov zo štúdia predchádzajúceho koronavírusu SARS-CoV a molekulového modelovania^{8,9} sa však predpokladá, že vírus COVID-19 sa pred vstupom do bunky viaže S-glykoproteínom na dve membránové bielkoviny hostiteľa vyskytujúce sa na povrchu buniek pľúc i iných orgánov. Jednou z nich je ACE2 peptidáza (EC 3.4.15.1)⁸, ktorej funkcia je modifikovať hormón angiotenzín, ktorý riadi krvný tlak a kontrakciu cievneho systému. Druhou je peptidáza CD26 (cit.⁹), ktorej funkcia



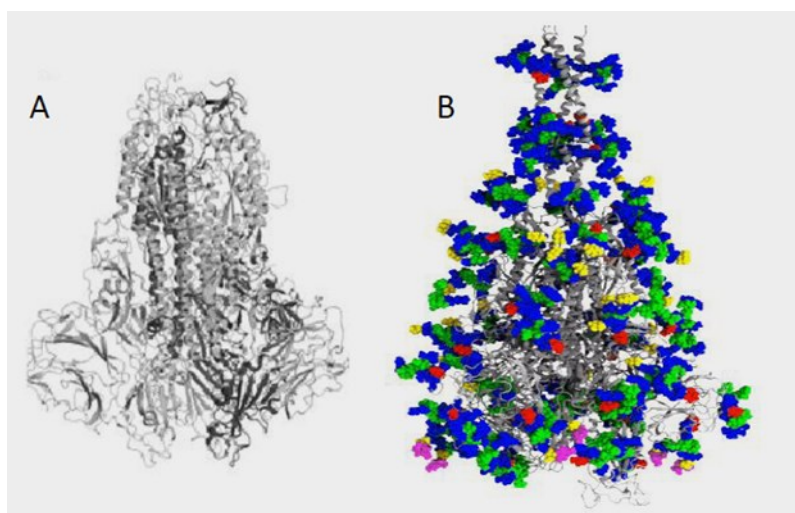
Obr. 2. Vľavo kyselina sialová, vpravo kyselina 5,9-diacetyl-neuraminová, časté koncové sacharidy glykoproteínových glykanov. Šípka označuje miesto deacetylácie polohy 9 hemagglutinínovou esterázou koronavírusov

sa spája s prenosom signálov a reguláciou imunitnej odpovede. Predpoklady potvrdili čínski vedci vyriešením 3D štruktúry komplexu peptidázy ACE2 s väzbovou doménou S-proteínu kryo-elektrónovou mikroskopiou¹⁰.

Spomínané interagujúce zložky, teda S-glykoproteín koronavírusu a obe peptidázy sú do vysokého stupňa glykozylované, čo znamená, že obsahujú kovalentne viazané komplexné zoskupenia sacharidov, ktoré nazývame oligosacharidy alebo glykany. Sú zložené zo 6 až 14 cukorných jednotiek. Trimér S-glykoproteínu COVID-19 má takýchto miest na glykozyláciu 69 (obr. 3), o 16 viac ako S-glykoproteín jeho predchodcu, vírusu SARS-CoV (cit.⁹). Novšia práca v tlači¹¹ udáva až 78 glykozylačných miest, a všetky obsadené glykanmi. V priemere sú kratšie ako glykany glykoproteínov hostiteľa¹¹. Ide o dôležitú informáciu, ktorá naznačuje, že nejaké odlišnosti glykozylácie S-proteínu od glykozylácie proteínov hostiteľských buniek predsa len existujú. Takmer výlučne sa jedná o N-glykozyláciu (66 miest), teda ide o glykany viazané na asparagín, obsahujúce N-acetylglukóзамín, manózu a z dvoch tretín ešte navyše L-fukózu a kyselinu sialovú¹¹. Cukry pokrývajú S-bielkovinu ako krunier alebo kamufláž, čím chránia vírus pred obrannými mechanizmami hostiteľa a proteolýzou. Glykany nie sú uniformné, môžu byť rôzne

aj na rovnakom glykozylačnom mieste, líšia sa dĺžkou reťazca a prítomnosťou L-fukózy a kyseliny sialovej. Ide o veľmi rozmanitú zmes imunochemických epitopov. Ako sa brániť proti takto vybavenému patogénu, akú peptidovú časť S-proteínu vírusu použiť na prípravu vakcíny, aby bola dostupná pre protilátky cez hustý obal sacharidov, alebo či použiť glykozylované peptidy – to sú otázky, ktoré stoja pred vedcami, ktorí majú za cieľ pripraviť vakcíny na báze proteínov vírusu. HE popísaná u iných koronavírusov má 6 glykozylačných miest⁷. Obe ľudské peptidázy, na ktoré sa viaže COVID-19, sú membránové bielkoviny, ktorých extracelulárne domény sú tiež glykozylované. ACE2 má 6 glykozylačných miest¹³ a CD26 deväť¹⁴.

Z uvedeného vyplýva, že k vývoju terapeutík a profylaktík proti COVID-19 by mohli prispieť štúdie, v ktorých by sa objasnili interakcie glykanových sacharidov a bielkovín vírusu a hostiteľa, prípadne jemné rozdiely v štruktúre ich glykanov. Je možné, že interakcie bielkovín a sacharidov sa uplatňujú aj v prvom kontakte tohto vírusu s hostiteľom, a že asociáciu S-proteínu s peptidázami ACE2 a CD26 podmieňujú. Nasvedčuje tomu početnosť a rozmanitosť glykanov na membránových bielkovinách vírusu a hostiteľa, ako i príklady rozoznávania sacharidov ľudských buniek inými koronavírusmi. Je známe, že poru-



Obr. 3. Model štruktúry triméru hrotového S-proteínu COVID-19 bez glykanov (A) a s glykanmi (B). Zobrazené štruktúry sú prebraté s modifikáciou z dvoch prác (cit. ^{9,12})

chy vyvolané v glykozyláci ACE2 neovplyvnili viazanie sa vírusu SARS-CoV (predošlý vírus), ale znížili jeho virulenciu¹⁵. Preto je ťažko uveriť, že by glykany S-glykoproteínu, ktoré sa tvoria biosyntetickou mašinériou hosťiteľskej bunky, nehrali žiadnu úlohu pri adhezii vírusu, ale iba maskovali vírusový S-proteín a miatli imunitný systém hosťiteľa podobnými epitopmi. Rovnako nevieme, akú úlohu v adhezii vírusu COVID-19 na bunku zohráva vírusová HE, ktorá by mala mať doménu viažucu cukor. Niektoré štúdie s predošlými koronavírusmi naznačujú, že glykany vírusov sa viažu najprv na povrchové lektíny hosťiteľa¹⁶. V prípade koronavírusu COVID-19 experimentálne dôkazy pre takýto druh adhézie na bunku neexistujú.

Blokovanie interakcií bielkovín a glykanov vírusu COVID-19 a buniek hosťiteľa protilátkami voči sacharidovým epitopom alebo syntetickými mnohofunkčnými glykomimetikami typu glykodendrimerov a sacharidovými ligandmi derivatizovaných nanočastíc¹⁷, je alternatívnou cestou k chýbajúcim liečivám. Inou stratégiou je inhibícia procesu glykozylácie vírusu inhibítormi glykozyltransferáz alebo tiež cukornými analógmi glykozylových donorov, vrátane nukleotidov cukrov, ktorých štruktúra by po inkorporácii neumožňovala normálny rast glykanových reťazcov v dôsledku absencie akceptorových OH-skupín¹⁸. Príkladom sú nukleotidy 2-deoxy-D-glukózy (je tiež analógom manózy), 3-deoxy-D-manózy a 2-deoxy-2-fluóro-D-manózy, tie však zároveň rušia dôležité glykozylačné procesy hosťiteľa. Citlivejšia odpoveď vírusu na analógy vzhľadom na obrovský rozsah jeho glykozylácie v porovnaní s hosťiteľom sa však nikdy nedá vylúčiť. Zaujímavá správa prichádza z britskej firmy Iceni Diagnostics, ktorá vyvíja jednoduchý test na dôkaz infekcie COVID-19, ktorý využíva umelý glykanový receptor, ktorý v slinách a vo výtere dýchacích ciest odliší koronavírus od vírusu chrípky a iných patogénov¹⁹. Povahu receptora firma neuvádza, avšak na podobnom princípe by sa mohli vyvíjať látky na blokovanie vírusovej infekcie. K vývoju účinných inhibítorov vírusovej infekcie určite prispeje poznanie 3D štruktúr vírusových glykoproteínov a všetkých kľúčových glykozyltransferáz hosťiteľa²⁰, čo umožní racionálny návrh virostatík s vysokou afinitou. Pokrok v tejto oblasti sa dá samozrejme dosiahnuť spoluprácou virológov, imunológov, štruktúrnych biológov a mimoriadne vzácných organických chemikov špecializovaných na štruktúru a syntézu sacharidov.

LITERATÚRA

1. Kruse R. L.: *F1000Research* 9, 72 (2020).
2. Wang F. Z., Cream R. M., Stefano G. B.: *Med. Sci. Monitor* 26, e924700 (2020).
3. http://www.axonneuroscience.eu/docs/press_release_Axon_Neuroscience_has_a_promising_peptide_vaccine_against_COVID-19_in_development_April-9-2020.pdf, stiahnuté 9. 4. 2020.
4. Li W. a 16 spoluautorov: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, e8508 (2017).
5. Schulze B., Herrler G.: *Adv. Exp. Med. Biol.* 342, 299 (1993).
6. Zeng Q., Langereis M. A., van Vliet A. L. W., Huizinga E. G., Raoul J., de Groot R. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9065 (2008).
7. Mousavizadeha L., Ghasemib S.: *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, v tlači. doi: 10.1016/j.jmii.2020.03.022.
8. Xu X., Chen P., Wang J., Feng J., Zhou H., Li X., Zhong W., Hao P.: *Sci. China: Life Sci.* 63, 457 (2020).
9. Vankadari N., Wilce J. A.: *Emerging Microbes Infect.* 9, 601 (2020).
10. Yan R., Zhang Y., Li Y., Xia L., Guo Y., Zhou Q.: *Science* 367, 1444 (2020).
11. Watanabe Y., Allen J. D., Wrapp D., McLellan J. S.: *bioRxiv*, v tlači. doi.org/10.1101/2020.03.26.010322.
12. Baraniuk C.: *The Scientist. Exploring Life, Inspiring Innovation*, 2020, www.the-scientist.com/news-opinion/scientists-scan-for-weaknesses-in-the-sars-cov-2-spike-protein-67404, stiahnuté 9. 4. 2020.
13. Prabakaran P., Xiao X., Dimitrov D. S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 235 (2004).
14. Aertgeerts K., Ye S., Shi L., Prasad S. G., Witmer D., Chi E., Sang B.-C., Wijnands R. A., Webb D. R., Swanson R. V.: *Protein Sci.* 13, 145 (2004).
15. Zhao X. a 10 spoluautorov: *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 206 (2015).
16. Lozach P. Y., Burleigh L., Staropoli I., Amara A.: *Methods Mol. Biol.* 379, 51 (2007).
17. Chabre Z. M., Roy R., v knihe: *Dendrimer-based drug delivery systems: From Theory to Practice* (Cheng Y., ed.), 1. vyd., kap. 11, str. 407. J. Wiley, Hoboken 2012.
18. Esko J. D., Bertozzi C., Schnaar R. L., v knihe: *Essentials of Glycobiology* (Varki A. a 11 spoluautorov), 3. vyd., kap. 55, str. 701. Cold Spring Harbor Laboratory Press, La Jolla 2017.
19. <https://www.selectscience.net/industry-news/coronavirus-detection-with-iceni-diagnostics-technology-offers-potential-for-home-test/?artID=51030>, stiahnuté 26. 3. 2020.
20. Nagae M., Yamaguchi Y., Taniguchi N., Kizuka Y.: *Int. J. Mol. Sci.* 21, 437 (2020).