

نقش گروه‌های قندی در ساختار و عملکرد پروتئین اسپایک در سارس کرونا ویروس ۲

حمید اصغری^۱، صدیقه اسد^{۲*}

۱-حمید اصغری، دانش آموخته کارشناسی ارشد زیست‌فناوری، دانشکده زیست‌فناوری، دانشکده‌گان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲-صدیقه اسد، دانشیار دانشکده زیست‌فناوری، دانشکده‌گان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

* صندوق پستی ۱۴۱۷۸۳۳۱۸۱، شهر تهران، ایران
Asad@ut.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۴

دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۹

چکیده

در آخرین ماه سال ۲۰۱۹ در شهر ووهان در کشور چین یک ویروس ناشناخته پدیدار شد. مطالعات توالی‌یابی نشان داد این ویروس عضو جدیدی از خانواده کروناویروس‌هاست که عمدتاً منجر به یک بیماری تنفسی با علائمی شبیه به ذات‌الریه می‌شود. کروناویروس جدید از ۲۵ پروتئین، از جمله ۴ پروتئین ساختاری اصلی و ۱۵ پروتئین غیر ساختاری تشکیل شده است. پروتئین اسپایک یکی از ۴ پروتئین ساختاری مهم است که در سطح ویروس قرار دارد. این پروتئین عامل اتصال ویروس به سلول میزبان بوده و شدیداً گلیکوزیله است. گلیکان‌ها با اتصال به پروتئین‌های ویروسی دو نقش موثر در ساختار و عملکرد آنها ایفا می‌کنند؛ نخست آنکه فرایند تاخوردگی پروتئین‌ها را هدایت و تسهیل می‌کنند و نقش مهمی در برهمکنش‌های پروتئینی ایفا می‌کنند و دیگر آنکه با جلوگیری از شناسایی پروتئین‌ها منجر به فرار ویروس‌ها از حملات سیستم ایمنی می‌شوند. بنابراین همانطور که مشخص است مطالعه ساختارهای قندی در یک پروتئین ویروسی زمانی اهمیت بیشتری پیدا می‌کند که یا احتمال طراحی واکسن در میان باشد، یا آنکه گروه‌های قندی تاثیر ویژه‌ای در تاخوردگی، فعالیت و برهمکنش پروتئین داشته باشند. بنابراین، از آنجا که پروتئین اسپایک یک پروتئین ساختاری بوده و فاقد عملکرد است مطالعات ساختارهای قندی آن به دو هدف طراحی واکسن مناسب و بررسی نقش گلیکان‌ها در اتصالات پروتئینی انجام می‌شود. در این مقاله مروری اهم مطالعات انجام گرفته در این زمینه‌ها مرور شده و با مقایسه میزان گلیکوزیلاسیون در ویروس‌های مختلف، اهمیت گروه‌های قندی در طراحی یک واکسن موثر و نقش این گروه‌ها در اتصالات ویروس و میزبان در بیماری کووید ۱۹ نشان داده می‌شود.

کلید واژگان: سارس کروناویروس ۲، کووید ۱۹، پروتئین اسپایک، گلیکوزیلاسیون، سیستم ایمنی

است که هر مونومر آن از ۱۲۷۳ اسید آمینه شامل دو جزء S1 و S2 تشکیل شده است. جزء S1 متصل به S2، و جزء S2 متصل به غشا می‌باشد [۷] (شکل ۲-الف)؛ بنابراین، یک پروتئین اسپایک از طریق سه جزء S2 به غشا و از طریق هر جزء S1 به گیرنده سلول میزبان متصل می‌شود. در واقع هر جزء S1 شامل یک دمین متصل شونده به گیرنده (RBD) است که به طور مستقیم به گیرنده آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین ۲ (ACE2) متصل می‌شود. ACE2 یک آنزیم و گیرنده غشایی است و در سطح سلول‌های ریه، قلب، کلیه و روده بیان می‌شود و تبدیلات آنژیوتانسین را انجام می‌دهد.

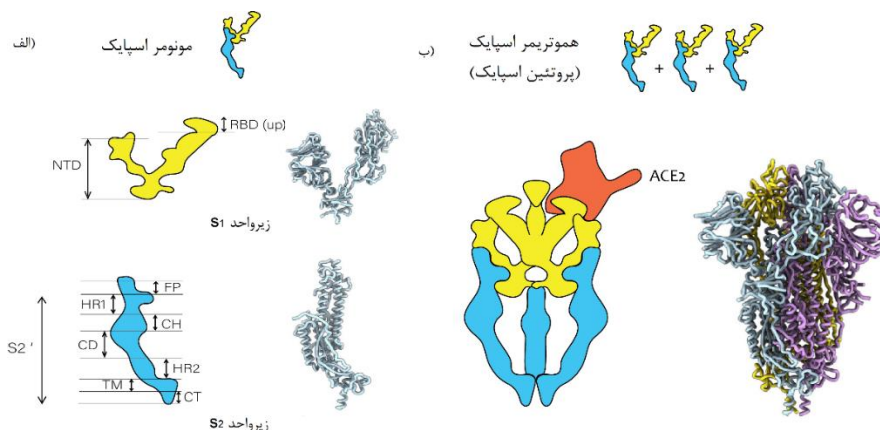
جدول ۱ عملکرد پروتئین‌های غیر ساختاری مشتق از پلی پروتئین ۱ab. هر پلی پروتئین ۱ab پس از ترجمه به ۱۵ پروتئین می‌شکند [۱۶].

سارس کرونا ویروس ۲، از ۲۵ پروتئین از جمله ۴ پروتئین ساختاری مهم و ۱۵ پروتئین غیر ساختاری تشکیل شده است. پروتئین‌های ساختاری مهم شامل، نوکلئوکپسید (Nucleocapsid) چسبیده به ژنوم، و سه تای دیگر به نام های اسپایک (Spike)، غشایی (Membrane) و پوششی (Envelope) که هر سه در سطح قرار دارند می‌باشد (شکل ۱). پروتئین های غیر ساختاری نیز از شکست یک پروتئین غول آسا به نام ۱ab به وجود می‌آیند (جدول ۱). پروتئین اسپایک یکی از پروتئین‌های ساختاری مهم و عامل اتصال ویروس به گیرنده سلول میزبان بوده و باعث ورود ویروس به میزبان می‌شود. پروتئین اسپایک یک هموتریمر

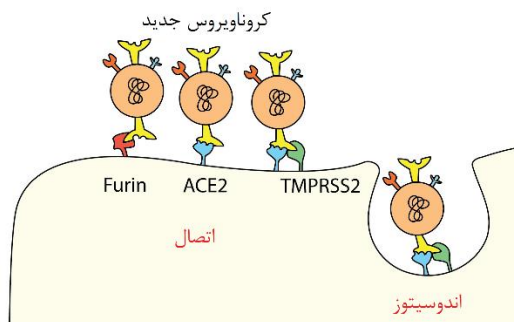
عملکرد	پروتئین
فرایند ترجمه در سلول میزبان را از دو راه جداگانه همکاری و برهمکنش با زیر واحد ۴۰S مهار می‌کند.	Nsp1
ممکن است از طریق برهمکنش با پروهیبین (PHB) بقای سلول را تعدیل کند.	Nsp2
یک پروتئین است که پلی پروتئین را در پایانه N برش می‌زند. همچنین به عنوان یک بلاک کننده مسیر NF-kappa-B در ایمنی ذاتی عمل می‌کند.	Nsp3
در سرهم شدن وزیکول‌های سیتوپلاسمی برای تکثیر ویروس شرکت می‌کند.	Nsp4
یک پروتئین شبه کیموتریپسین است که پلی پروتئین را از ۱۱ مکان در پایانه C برش می‌زند.	Nsp5
به تشکیل اتوفاگوزوم از شبکه آندوپلاسمی میزبان کمک می‌کند.	Nsp6
با استفاده از Nsp8 یک هگزامر تشکیل می‌دهد که به عنوان پرایماز در تکثیر ویروس شرکت می‌کند.	Nsp7
با استفاده از Nsp7 یک هگزامر تشکیل می‌دهد که به عنوان پرایماز در تکثیر ویروس شرکت می‌کند.	Nsp8
ممکن است به عنوان یک پروتئین متصل شونده به ssRNA در تکثیر ویروس نقش داشته باشد.	Nsp9
با تحریک Nsp14 و Nsp16 یک نقش مهم در متیلاسیون mRNA ویروس ایفا می‌کند.	Nsp10
عامل همانندسازی و رونویسی ژنوم ویروس می‌باشد.	Polymerase
یک هلیکاز است که حاوی یک دمین متصل شونده به Zn بوده و برای عملکرد خود به Mg نیازمند است.	Helicase
یک آنزیم تصحیح کننده می‌باشد که روی ssRNA و dsRNA عمل می‌کند. همچنین یک متیل ترانسفراز برای n7-گوانین می‌باشد.	Exoribonuclease
یک آنزیم وابسته به Mn که فسفات ضربدری در یوریدیلالات را می‌شکند.	Endoribonuclease
عامل متیلاسیون کلاهک mRNA ویروسی در cap-1 و cap-2 می‌باشد.	Methyltransferase

توسط سرین پروتئاز غشایی ۲ (TMPRSS2)، که در سطح سلول میزبان واقع شده، برش می‌خورد و امکان نفوذ ویروس به سلول میزبان فراهم می‌شود [۱۰] (شکل ۳).

در بیماری کووید ۱۹ این گیرنده توسط کروناویروس جدید اشغال شده و ACE2 از عملکرد خود باز می‌ماند [۸، ۹] (شکل ۲-ب). پروتئین اسپایک پس از اتصال به ACE2



شکل ۲ ساختار پروتئین اسپایک (تصاویر سه بعدی، اقتباس شده از [۱۷]). الف) در پروتئین اسپایک هر یک از مونومرها از دو جزء S1 و S2 تشکیل شده است. هر جزء S1 از اسیدآمین ۱۳ تا ۶۸۵ شامل: دمین N-ترمینال (NTD:16-291)، دمین متصل شونده به گیرنده (RBD:330-530) و یک جایگاه برش فورین در مرز S2 (S1/S2:685-686) می‌باشد. هر جزء S2 از اسیدآمین ۶۸۶ تا ۱۲۷۳ شامل: پپتید فیوژن (FP:817-834)، هلیکس مرکزی (CH:987-1034)، دمین اتصال دهنده (CD:1080-1135)، دمین تکرار هفتایی ۲ (HR2:1163-1210)، دمین گذرنده از غشا (TM:1214-1234) و دمین سیتوپلاسمی (CT:1235-1273) می‌باشد. همچنین، اسیدآمین ۱ تا ۱۲ نیز تشکیل یک پپتید سیگنال را می‌دهد [۷، ۱۲]. ب) هر دمین RBD به‌طور مستقیم به گیرنده ACE2 متصل می‌شود. بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی از برهمکنش کروناویروس و گیرنده ACE2، پیشنهاد می‌کند که همزمان دو پروتئین هموتریمر اسپایک به یک گیرنده دایمر ACE2 متصل می‌شود [۹].



شکل ۳ ورود کروناویروس جدید به سلول میزبان. الف) اتصال و ورود کروناویروس جدید طی دو مرحله اتفاق می‌افتد. ابتدا پروتئین اسپایک از ناحیه S1/S2 توسط آنزیم غشایی فورین (Furin)، واقع در غشای سلول میزبان، برش می‌خورد. قابل توجه است که حضور این جایگاه برش، پروتئین اسپایک کروناویروس جدید را از پروتئین اسپایک سارس و وابستگان آن متمایز می‌کند [۱۷]. در ادامه اسپایک برش خورده به ACE2 متصل می‌شود. سپس آنزیم غشایی TMPRSS2، واقع در غشای سلول میزبان، برش دیگری بر پروتئین اسپایک از ناحیه S2 وارد می‌کند. در این زمان اندوسیتوز انجام می‌گیرد و ویروس وارد سلول می‌شود.

ایمنی است. ساختارهای قندی به دو روش جالب منجر به فرار ویروس از سیستم ایمنی می‌شوند. نخست آنکه تراکم ساختارهای قندی در مناطق بیرونی و آبدوست پروتئین مانع از شناسایی پروتئین سطحی ویروس توسط آنتی‌بادی‌های میزبان می‌شود. البته چنانچه در مواقع نادر آنتی‌بادی‌ها موفق به شنا سایی اپی‌توپ‌های قندی شوند، ویروس‌ها با رهایش گلیکوپروتئین‌های سطحی قادر به فریب سیستم ایمنی نیز هستند. اما در روش دوم ساختارهای قندی پروتئین‌های ویروسی با تقلید از ساختارهای قندی میزبان، از شناسایی توسط لکتین‌های سیستم ایمنی در امان خواهند بود [۷، ۱۵]. با این وجود حضور قندها در مواقعی می‌تواند منجر به گرفتار شدن پروتئین‌ها و ویروس‌ها در دام سیستم ایمنی نیز شود، اما چنین مواردی نادر بوده و برای حذف ویروس‌ها موثر نمی‌باشند [۱۵].

۳- گلیکوزیلاسیون در پروتئین اسپایک

گلیکوزیلاسیون یک فرایند آنزیمی است که قندها را از طریق پیوند گلیکوزیدی به پروتئین‌ها، لیپیدها و دیگر قندها متصل می‌کند. قندها نقش مهمی در بلوغ و گردش پروتئین‌ها، چسبندگی و ترافیک سلول‌ها و همچنین اتصال پروتئین‌ها به گیرنده‌ها و فعال‌سازی آنها دارند. تقریباً ۳۵ درصد گلیکوپروتئین اسپایک از کربوهیدرات تشکیل شده است (شکل ۴).

مطالعات نشان می‌دهد ترکیب گروه قندی متصل شده به یک اسیدآمینو مشخص، در هر پروتئین اسپایک می‌تواند متفاوت باشد. در واقع بررسی ترکیب گروه‌های قندی در پروتئین‌های اسپایک نشان می‌دهد پروفایل قندی اسپایک‌ها می‌تواند با هم متفاوت باشد [۱۸، ۱۹]. امروزه به خوبی ثابت شده است که ترکیب گروه قندی بر روی یک اسیدآمینو و به دنبال آن پروفایل قندی یک پروتئین به نوع سلول تولیدکننده گلیکوپروتئین وابسته است [۲۰].

پروتئین اسپایک یک پروتئین هایپرگلیکوزیله است که گروه‌های قندی بیشتر سطح آن را پوشانده‌اند. حضور گروه‌های قندی نقش موثری در ساختار و برهمکنش پروتئین اسپایک ایفا می‌کنند. در این مطالعه به‌طور عام به نقش این گروه‌ها در پروتئین‌های ویروسی و به‌طور خاص به نقش آنها در پروتئین اسپایک پرداخته می‌شود.

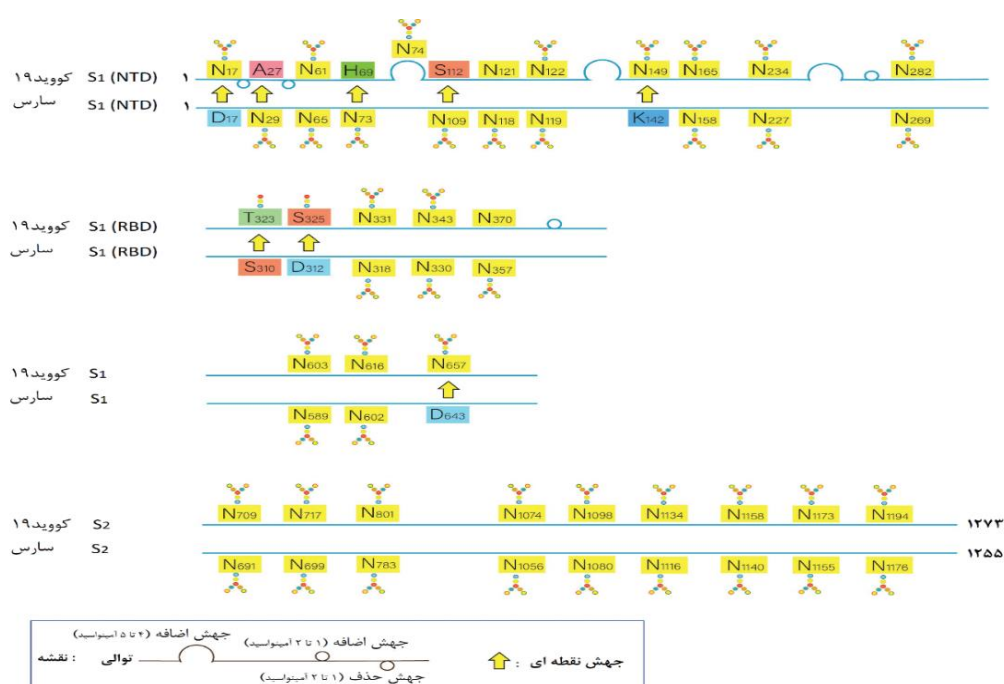
۲- نقش قندها در ساختار و عملکرد پروتئین‌های

ویروسی

قندها با اتصال به پروتئین‌ها و لیپیدها بسیاری از فرایندهای زیستی را هدایت و تسهیل می‌کنند. بررسی اختصاصی نقش گلیکوزیلاسیون در عملکرد ویروس‌ها نشان می‌دهد قندها با اتصال به پروتئین‌های ویروسی دو نقش ساختاری مهم ایفا می‌کنند. نخست نقش کلی قندها به‌طوری که اتصال قندها به پروتئین‌ها فرایند تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها را هدایت و تسهیل می‌کند و به دنبال آن نیز ساختار صحیح نقش مهمی در اتصالات ویروس و میزبان ایفا می‌کند؛ قندها در همکاری با چاپرون‌های شبکه آندوپلاسمی (ER) به تاخوردگی صحیح گلیکوپروتئین‌ها کمک می‌کنند. چاپرون‌های ER، کالکسین و کالتریکولین با اتصال به یک ساختار قندی باعث جدا شدن آنها از پروتئین می‌شوند و سپس حذف گلوکز نهایی توسط آلفاگلوکوزیداز II منجر به تاخوردگی صحیح پروتئین می‌شود. در صورتی که تاخوردگی مناسب حاصل نشود آنزیم UDP-گلوکز: گلیکوپروتئین گلیکوزیل ترانسفراز (UGGT) مجدد یک گلوکز اضافه می‌کند و فرایند جداسازی مجدد تکرار می‌شود. این فرایند به‌عنوان یک روش کنترل عمل می‌کند و از حضور یا عدم حضور قند برای شناسایی صحت تاخوردگی استفاده می‌کند. به دنبال تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها، نقش پررنگ قندها در اتصالات ویروس میزبان دیده می‌شود که در ادامه به آن پرداخته خواهد شد. اما دومین نقش مهم قندها در پروتئین‌های ویروسی، فراری دادن ویروس از خطر سیستم

پروتئین‌های اسپایک سارس کرونا ویروس ۲، بلکه بین پروتئین اسپایک سارس کرونا ویروس ۲ و پروتئین اسپایک سارس نیز قابل توجه است. با وجود شباهت‌های گلیکوزیلاسیون بین هر دو اسپایک، تفاوت‌های مهمی نیز در جایگاه‌های گلیکوزیلاسیون آنها مشاهده می‌شود که می‌تواند برهمکنش‌ها و ایمنی آنها را تحت تاثیر قرار دهد. توالی این دو پروتئین در شکل ۶ با هم مقایسه شده‌اند.

متفاوت بیان پروتئین بوده باشد [۱۸، ۱۹] و نشان می‌دهد حتی شرایط بیان نیز می‌تواند در الگوی گلیکوزیلاسیون موثر باشد. این تجربه‌ها نشان می‌دهد در انتخاب گلیکوفرم‌های آنتی‌ژنی برای تولید یک واکسن ویروسی مطالعه و پژوهش بسیاری لازم است چرا که الگوی گلیکوزیلاسیون می‌تواند بر تحریک اختصاصی تر سیستم ایمنی و در نتیجه میزان موفقیت واکسن اثر بگذارد. با این وجود مقایسه الگوی گلیکوزیلاسیون نه فقط بین تعداد زیادی از



شکل ۶ توالی پروتئین اسپایک سارس کرونا ویروس ۲ و پروتئین اسپایک سارس. این دو پروتئین دارای ۷۶،۰۴٪ یکسانی می‌باشند. اسپایک سارس کرونا ویروس ۲ حاوی N ۲۲-گلیکوزیلاسیون و O ۲-گلیکوزیلاسیون، و اسپایک سارس حاوی N ۲۳-گلیکوزیلاسیون و فاقد O-گلیکوزیلاسیون می‌باشد. گلیکوزیلاسیون در زیر واحد S2 در هر دو پروتئین تقریباً بدون تغییر مانده است، اما در زیر واحد S1 به دلیل جهش‌های نقطه‌ای جایگاه گلیکوزیلاسیون‌ها تغییر کرده است. در ناحیه NTD در هر دو پروتئین، فراوانی گروه‌های قندی تقریباً برابر بوده و تفاوت چندانی وجود ندارد، اما وجود جهش‌های نقطه‌ای موقعیت گروه‌های قندی در دو قطعه را متفاوت کرده است. همچنین در ناحیه RBD اسپایک سارس کرونا ویروس ۲، N ۲-گلیکوزیلاسیون و O ۲-گلیکوزیلاسیون وجود دارد در حالی که در همین ناحیه در اسپایک سارس به جز N ۲-گلیکوزیلاسیون هیچگونه O-گلیکوزیلاسیونی وجود ندارد [۱۲، ۴۰]. با این حال گزارش دیگری وجود دارد که در آن تعداد جایگاه‌های گلیکوزیلاسیون در سارس کرونا ویروس ۲، N ۹-گلیکوزیلاسیون و O ۳-گلیکوزیلاسیون، و در سارس، N ۱۰-گلیکوزیلاسیون و O ۲-گلیکوزیلاسیون معرفی شده است. این تفاوت در تعداد می‌تواند وابسته به میزان مورد استفاده برای بیان پروتئین باشد [۴۱]. با بررسی بیشتر فرایند اتصال ویروس و میزان مشخص شده است که تمایل سارس کرونا ویروس ۲ برای اتصال به ACE2 قوی تر از سارس است [۱۷]. این مسئله می‌تواند با گلیکوزیلاسیون در RBD در ارتباط باشد، اما هنوز اثبات شده نیست.

۴- نقش گروه‌های قندی در ساختار و عملکرد پروتئین

اسپایک

با شیوع کروناویروس جدید پژوهش‌ها بیشتر به روی ساختار اسیدآمینه‌ای پروتئین اسپایک و کمتر به روی گروه‌های قندی این پروتئین متمرکز بوده است. با این حال، با توجه به اهمیت گروه‌های قندی در اتصالات پروتئینی و فرار از حملات سیستم ایمنی و بنابراین لزوم طراحی واکسن موثر، مطالعاتی در زمینه نقش گروه‌های قندی انجام شده است.

۴-۱ نقش قندها در اتصالات اسپایک

در دسته اول مطالعات، تاثیر حضور و عدم حضور گروه‌های قندی مورد بررسی قرار گرفته است. در یک بررسی با استفاده از دینامیک مولکولی آسپارازین‌های ۱۶۵ و ۲۳۴ که متصل به ساختارهای قندی بوده‌اند با جهش از توالی حذف شدند. مقایسه حالت‌های نرمال و جهش یافته نشان داد در حالت جهش یافته RBD گرایش کمتری به باز شدن دارد و تمایل آن به اتصال به ACE2 کاهش یافته است [۷]. مطالعه دیگری نشان داده است که حذف گروه قندی در آسپارازین ۲۳۴ منجر به کاهش جمعیت اسپایک‌های با RBD بالا (مناسب برای اتصال) و در مقابل حذف گروه قندی در آسپارازین ۱۶۵ منجر به افزایش جمعیت اسپایک‌های با RBD بالا می‌شود. [۲۱]. در مطالعات مهندسی پروتئین، گلوتامین ۴۹۳ که در منطقه RBD واقع شده است و جزء نقاط داغ اتصال به ACE2 می‌باشد، به اسیدهای آمینه مختلفی از جمله آسپارازین جهش داده شد. بررسی‌ها نشان داد در تمام حالت‌های جهش، تمایل پروتئین اسپایک به گیرنده ACE2 در *invitro* کاهش پیدا کرده است [۲۲، ۲۳]. مطالعه دیگری پروتئین اسپایک جهش یافته در موقعیت ۵۰۱ (جهش آسپارازین به تیروزین) را مورد بررسی قرار داده است. بررسی میزان سرایت در موش (*mice*) نشان داد افزایش قدرت بیماری‌زایی ویروس می‌تواند با ظهور سریع این

جهش در ارتباط باشد [۲۴]. این پژوهش‌ها علاوه بر آنکه نقش اسیدهای آمینه را در فرایند اتصال نشان می‌دهند، به روشنی بیان می‌کنند که گروه‌های قندی می‌توانند به‌عنوان یک عامل موثر یا بازدارنده برای اتصال به گیرنده میزبان عمل کنند.

۴-۲ قندها و نجات سارس کروناویروس ۲

پوشیده شدن محل اتصال به گیرنده (RBD) با ساختارهای قندی، یک ویژگی مشترک گلیکوپروتئین‌های ویروسی است. در پروتئین اسپایک کروناویروس جدید ساختارهای قندی مستقر در جایگاه‌های ۱۷۴، ۲۳۴ و ۳۴۳ از ناحیه RBD (به ویژه هنگامی که در حالت پایین قرار دارد) محافظت می‌کنند. نرخ کم جهش در این مناطق نشان می‌دهد یک فشار انتخابی در استفاده از ساختارهای قندی برای استتار مناطق حفظ شده و بالقوه آسیب پذیر وجود دارد [۱۹]. بر مبنای مدل‌سازی‌های مولکولی مشخص شده است که گلیکوزیلاسیون گیرنده ACE2 انسانی نیز به‌طور قابل توجهی به اتصال ویروس کمک می‌کند. قندها در آسپارازین‌های ۹۰ و ۳۲۲ در این گیرنده اثرات مخالفی بر اتصال پروتئین اسپایک دارند. گروه قندی در آسپارازین ۹۰ تا حدی سطح اتصال گیرنده به RBD را می‌پوشاند و مانع اتصال قدرتمند ویروس به سلول انسانی می‌شود. در مقابل گروه قندی در آسپارازین ۳۲۲ به شدت با RBD اتصال برقرار می‌کند و ارتباط RBD با گیرنده را تقویت می‌کند. جالب‌تر آنکه این گروه قندی به یک منطقه محافظت شده از پروتئین اسپایک متصل می‌شود که قبلاً به‌عنوان یک اپی‌توپ مخفی برای آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده شناخته شده بود [۲۸].

۴-۳ نقش سیالیک اسیدها در برهمکنش‌های ویروس و

میزبان

در دسته دیگری از مطالعات، نقش انحصاری مولکول‌های قندی بررسی شده است. در بین مولکول‌های قندی، سیالیک اسیدها که خانواده متنوعی از منو ساکاریدهای ۹

نسبت به بیماری داشته باشند. شاید به دلیل آنکه سلول‌های گروه خونی O گیرنده‌های گلیکوپروتئینی کمتر و در نتیجه سیالیک اسید کمتری بر سطح خود دارند، امکان ارتباط موقت ویروس‌ها با سلول‌ها به شدت کاهش می‌یابد. همچنین، گزارشی نشان می‌دهد که این مسئله می‌تواند با فراوانی آنتی‌بادی‌های گروه‌های خونی نیز در ارتباط باشد [۳۳].

۴-۵ الگوی وحشی گلیکوزیلاسیون اسپایک

در رایج‌ترین مطالعات گلیکوزیلاسیون پروتئین اسپایک، بررسی‌ها پیشنهاد می‌کند پروتئین‌های اسپایک بیان شده در سلول‌های مختلف، از سلول حشره تا سلول انسانی، الگوهای گلیکوزیلاسیون متفاوتی را نشان می‌دهند. به طور خاص گلیکوزیلاسیون در سلول‌های انسانی نیز تفاوت‌های قابل توجهی را نشان می‌دهد. این مسئله به آن معنا است که گلیکوزیلاسیون در هر آمینواسید مستعد، ابتدا تابع سلول میزبان و سپس تابع جایگاه آن در توالی است [۳۵]. بررسی‌های بیشتر نشان می‌دهد پروفایل گلیکوزیلاسیون پروتئین اسپایک بین حالت وحشی و حالت نوترکیب کد شده در وکتور بیانی متفاوت خواهد بود. این بررسی‌ها همچنین وابستگی پروفایل گلیکوزیلاسیون به نوع سلول بیان‌کننده را نیز تایید می‌کند [۳۶، ۳۷]. این مسئله نشان می‌دهد تحقق پروفایل گلیکوزیلاسیون اسپایک وحشی تا چه حد دشوار خواهد بود، چرا که تحقق این پروفایل وحشی در طراحی واکسن مناسب از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. همچنین، بررسی‌ها با شگفتی نشان می‌دهد با توجه به حضور احتمالی O-گلیکان‌ها در محل‌های N-گلیکانی، گروه‌های O-گلیکانی نیز می‌توانند در گریز از ایمنی نقش مکملی داشته باشند و شناخت آنها در طراحی واکسن اهمیت دارد [۳۸]. این مطالعات در واقع نشان می‌دهند تغییرات در گلیکوم می‌تواند در پاسخ به محرک‌های

کربنی هستند نقش‌های مهمی در فرایندهای ایمنی بر عهده دارند. موقعیت و فراوانی سیالیک اسیدها در سطح سلولی باعث شده است تا ویروس‌های مختلف و گروهی از باکتری‌ها از این قندها به‌عنوان اهداف شناسایی استفاده کنند. برای مثال گلیکوپروتئین اسپایک در کروناویروس OC43 با سرعت زیادی با سیالیک اسید سطح سلول میزبان واکنش می‌دهد و این برهمکنش برای ورود ویروس به میزبان ضروری است. ضرورت این ارتباط برای بقای ویروس، باعث شده است تا ویروس‌ها استراتژی‌های مناسبی برای درگیر شدن با سیالوگلیکان‌های میزبان را تکامل دهند [۲۹، ۳۰]. بررسی‌ها نشان می‌دهد پروتئین اسپایک در حالت تریمر با ساختارهای قندی از نوع پیچیده، نسبت به زیرواحدهای مونومری با ساختارهای قندی نابالغ همچون مانوزهای زیاد، تمایل بیشتری برای اتصال به گیرنده دارد. در واقع به‌نظر می‌رسد هر چند هر RBD از هر زیرواحد به تنهایی می‌تواند به یک ACE2 متصل شود، اما حضور هر سه زیرواحد در کنار هم منجر به هم‌افزایی در اتصال به ACE2 می‌شود [۳۱].

۴-۴ قندها و تاثیر گروه‌های خونی بر شدت ابتلا به کووید ۱۹

دسته‌ای دیگر از مطالعات مربوط به گزارشاتی است که نشان می‌دهد فراوانی گروه‌های خونی بیماران مبتلا به کووید ۱۹ با فراوانی گروه‌های خونی در جامعه تفاوت دارد. در واقع چنانچه جامعه بیماران مشتق از خروار جامعه باشد فراوانی گروه‌های خونی دو جامعه باید تقریباً برابر باشد. گزارشاتی وجود دارند که ادعا می‌کنند تعداد افراد با گروه خونی O در جامعه بیماران، کمتر از فراوانی همین گروه خونی نسبت به جامعه سالم است [۳۲-۳۴]. در واقع اگر گروه‌های خونی تأثیری در کنترل عفونت ندارند، این میزان می‌بایست حدوداً یکسان می‌بود. این مطالعات نشان می‌دهند گروه‌های خونی O می‌توانند یک مصونیت خفیف

محیطی و ژنتیکی ایجاد شود، و اغلب با فنوتیپ‌های سلولی مبدا همراه است [۳۹].

۵- گلیکوزیلاسیون و طراحی واکسن

پروفایل‌های معرفی شده در مورد گلیکوزیلاسیون پروتئین اسپایک از آزمایشات انجام شده به روی سلول‌های بیانی پرکاربرد به دست آمده است. همچنین، بررسی مطالعات دیگر نشان می‌دهد بیان این پروتئین در سلول‌های مختلف از حشره تا موش، و حتی در یک سلول واحد در شرایط مختلف، به پروفایل‌های مختلفی منتهی شده است. بنابراین، در این صورت آیا می‌توان به پروفایل حاصله از یک میزبان بیانی پرکاربرد مانند HEK293 اعتماد کرد و از نتایج آن برای انواع مطالعات انسانی مانند طراحی واکسن استفاده کرد؟ اساساً شناخت پروفایل قندی و الگوهای گلیکوزیلاسیون یک پروتئین تا چه حد در طراحی واکسن مناسب اهمیت دارد؟ از آنجایی که گروه‌های قندی در تاخوردگی پروتئین و محافظت از آن در برابر سیستم ایمنی نقش مهمی دارند، نوع گروه قندی می‌تواند در کیفیت این عملکردها موثر باشد. بنابراین، پروتئین‌های با گروه‌های قندی متفاوت، می‌توانند تاخوردگی‌های نسبتاً متفاوت و مقاومت‌های متفاوتی در برابر سیستم ایمنی داشته باشند. در این زمینه مقایسه‌ای بین ویروس‌های سارس، HIV و سارس کرونا ویروس ۲ نشان می‌دهد که میزان و نوع گلیکوزیلاسیون چطور می‌تواند در موفقیت واکسن اثر بگذارد.

امروزه در یک بازه زمانی کوتاه گروهی از پژوهشگران توانسته‌اند واکسنی موثر برای سارس کرونا ویروس ۲ تولید کنند در حالیکه تولید چنین واکسنی برای HIV پس از گذشت بیش از ۴۰ سال هنوز بی‌نتیجه مانده است. مطالعات در ساده‌ترین تفاوت بین این ویروس‌ها نشان می‌دهد که میزان الیگومانوز به روی HIV به مراتب بیشتر از سارس کرونا ویروس ۲ می‌باشد [۱۹]. همچنین، یک بررسی مقایسه‌ای دیگر نیز نشان می‌دهد پروتئین سطحی gp160 در ویروس HIV از ۲۷ نقطه گلیکوزیله می‌باشد، در حالی که در ویروس هاری که یک ویروس قابل کنترل بوده و واکسن آن به خوبی عمل می‌کند [۴۲]، گلکوپروتئین سطحی تنها در سه نقطه گلیکوزیله شده است [۴۳، ۴۴]. این یافته‌ها در واقع نشان می‌دهند گروه‌های قندی با پوشاندن اپی‌توپ‌های پروتئینی مانع شناسایی آنها توسط سیستم ایمنی اختصاصی خواهند شد. بنابراین، به نظر می‌رسد بر سی گلیکوزیلاسیون در طراحی واکسن باید از اولویت‌های مطالعه باشد. با این وجود این مسئله زمانی چالش برانگیزتر خواهد بود که واکسن پیشگیری از نوع پروتئین‌های نوترکیب یا ویروس‌های غیرفعال شده باشد، چرا که اسپایک‌هایی که از قبل در یک سلول خاصی تولید شده‌اند پروفایل قندی منحصر به فردی دارند که می‌تواند متفاوت از پروفایل قندی اسپایک‌هایی باشد که در سلول‌های بدن یک انسان تولید می‌شوند. با این حال نکته جالب‌تر آنکه استنتاج می‌شود که پروفایل‌های قندی یک نوع پروتئین که در سلول‌های مختلف بدن تولید شده‌اند نیز کاملاً یکسان نباشند [۳۹]. بنابراین، به نظر می‌رسد در این مورد به‌ویژه، واکسن پروتئینی و واکسن ویروس غیرفعال شده، علاوه بر احتمال جور نشدن صحیح زیرواحدها برای ایجاد یک تریمر با تاخوردگی صحیح در اولی، و احتمال تغییر ساختار تاخوردگی صحیح پروتئین اسپایک حین غیرفعال شدن ویروس در دومی، مشترکاً با چالش عدم تنوع در الگوی گلیکوزیلاسیون نیز مواجه‌اند. بنابراین برای حل این چالش می‌توان از سلول‌های مختلف انسانی برای تولید ترکیبات این نوع واکسن‌ها استفاده کرد، همان کاری که به شکل مستقیم توسط واکسن‌های نوکلئیک اسید انجام می‌شود. در واقع به لحاظ تئوری واکسن‌های نوکلئیک اسید باید موثرتر از واکسن‌های پروتئینی باشند، چرا که پروتئین اسپایک را در سلول‌های مختلف انسانی و با پروفایل‌های گلیکوزیلاسیون متعدد تولید می‌کنند و این دقیقاً همان اتفاقی است که در فرایند

شد سال‌هاست که طراحی یک واکسن موفق علیه HIV شکست خورده است و دانشمندان تغییرات ژنتیکی در گیرنده ویروس را عامل مقاومت و پایداری آن می‌دانند، حال آن‌که علاوه بر این فرضیه، می‌توان فرضیه نقش مولکول‌های قندی در فرار ایمنی ویروس HIV را نیز مورد تامل قرار داد، چرا که نه تنها میزبان این ویروس در طی مدت ۴۰ سال تغییر نکرده است، بلکه مولکول گیرنده آن نیز در این مدت ثابت بوده است؛ بنابراین، به نظر می‌رسد آنچه که بتواند پنجره جدیدی به درمان این بیماری و بیماری‌های مشابه از طریق ساخت واکسن موثر باز کند نگرشی متفاوت و با اهمیتی بیشتر به مولکول‌های قندی باشد. در تایید این نظر، مثال دیگری از ویروس هاری آورده شد که نشان می‌دهد چطور در برابر واکسن، تسلیم و درمان‌پذیر است. پروتئین سطحی این ویروس میزان گلیکوزیلاسیون کمی دارد و بنابراین اپی‌توپ‌های آن به راحتی در دسترس سیستم ایمنی میزبان قرار می‌گیرند. در این مطالعه همچنین نشان داده شد که گروه‌های قندی بر اتصالات اسپایک موثر هستند. این مسئله از آن نظر حائز اهمیت است که می‌توان با بررسی ساختار این گروه‌های قندی، مهارکننده‌های مناسبی طراحی کرد که قطعاً به ویروس اتصال پیدا کنند و همچنین قدرت اتصال ویروس در سویه‌های جهش‌یافته جدید در نواحی گلیکوزیله را بتوان تخمین زد. مطالعات جدید کاربردهای بیشتری از ساختارهای قندی نشان می‌دهند و در آینده ممکن است نقش‌های دیگری به این گروه از مولکول‌ها در گلیکوپروتئین‌ها از جمله اسپایک کروناویروس جدید نسبت داده شود.

۷- منابع

- [1] Huang, C., et al., *Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China*. The lancet, 2020. 395(10223): p. 497-506.
 [2] Song, Z., et al., *From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight*. viruses, 2019. 11(1): p. ۵۹ .

بیماری‌زایی ویروس رقم می‌خورد. متعاقباً نتایج منتشر شده در وبسایت اتحاد جهانی واکسن (Gavi) نیز این نتیجه‌گیری را تایید می‌کند. داده‌های حاصل از مطالعات بالینی واکسن‌ها نشان می‌دهد واکسن‌های مدرنا (Moderna)، آسترازنکا (Astrazeneca) و فایزر-بیون‌تک (Pfizer-Biontech) که از مولکول‌های اسیدنوکله‌یک کدکننده پروتئین اسپایک استفاده کرده‌اند تاثیرات قوی‌تری در ایمنی‌زایی نسبت به سایر واکسن‌های طراحی شده با ویروس‌های غیرفعال شده و پروتئین‌های نوترکیب داشته‌اند [۴۵].

۶- بحث و نتیجه‌گیری

همانطور که مشخص است مطالعه فرایند گلیکوزیلاسیون و ساختارهای قندی در یک پروتئین زمانی اهمیت به سزایی پیدا می‌کند که یا احتمال طراحی واکسن در میان باشد، یا آنکه گروه‌های قندی تاثیر ویژه‌ای در فعالیت و عملکرد یک پروتئین، و یا برهمکنش‌های آن با پروتئین‌های دیگر داشته باشند. بنابراین با توجه به آنکه پروتئین اسپایک یک پروتئین ساختاری بوده و فاقد عملکرد است، بنابراین هدف اصلی مطالعه گلیکوزیلاسیون آن طراحی واکسن مناسب و مطالعه برهمکنش‌های آن با اجزای میزبان می‌باشد. بنابراین، عمده مطالعات و پژوهش‌هایی که در این زمینه انجام شده است نیز بر شناخت پروفایل قندی، تاثیر آن در طراحی واکسن و نقش آن در برهمکنش‌های ویروس-میزبان تاکید می‌کنند. بنابراین، در این مطالعه مروری نتایج این مطالعات گردآوری و تحلیل شدند تا نشان داده شود که طراحی یک واکسن موفق علیه سارس کرونا ویروس ۲ و شناخت ارتباط ویروس-میزبان، چگونه منوط به شناخت میزان و الگوهای پرکاربرد گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های ویروسی خواهد بود. همچنین، در این مطالعه بر نقش پررنگ فرایند گلیکوزیلاسیون در ساخت واکسن با مثال‌هایی از ویروس‌های HIV و هاری تاکید شد. همان‌طور که گفته

- [17] Walls, A.C., et al., *Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein*. Cell, 2020. 181(2): p. 281-292. e6.
- [18] Shajahan, A., et al., *Deducing the N-and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2*. Glycobiology, 2020. 30(12): p. 981-988.
- [19] Watanabe, Y., et al., *Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike*. Science, 2020. 369(6501): p. 330-333.
- [20] Grant, O.C., et al., *Analysis of the SARS-CoV-2 spike protein glycan shield reveals implications for immune recognition*. Scientific reports, 2020. 10(1): p. 1-11.
- [21] Henderson, R., et al., *Glycans on the SARS-CoV-2 spike control the receptor binding domain conformation*. bioRxiv, 2020.
- [22] Shang, J., et al., *Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2*. Nature, 2020. 579(7703): p. 221-224.
- [23] Gámez, G., et al., *Atypical N-glycosylation of SARS-CoV-2 impairs the efficient binding of Spike-RBM to the human-host receptor hACE2*. bioRxiv, 2021.
- [24] Gu, H., et al., *Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy*. Science, 2020. 369(6511): p. 1603-1607.
- [25] Sanda, M., L. Morrison, and R. Goldman, *N-and O-Glycosylation of the SARS-CoV-2 spike protein*. Analytical chemistry, 2021. 93(4): p. 2003-2009.
- [26] Watanabe, Y., et al., *Vulnerabilities in coronavirus glycan shields despite extensive glycosylation*. Nature communications, 2020. 11(1): p. 1-10.
- [27] Zhang, S., et al., *Analysis of glycosylation and disulfide bonding of wild-type SARS-CoV-2 spike glycoprotein*. bioRxiv, 2021.
- [28] Mehdipour, A.R. and G. Hummer, *Dual nature of human ACE2 glycosylation in binding to SARS-CoV-2 spike*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2021. 118(19).
- [29] Tortorici, M.A., et al., *Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors*. Nature structural & molecular biology, 2019. 26(6): p. 481-489.
- [30] Varki, A. and P. Gagneux, *Multifarious roles of sialic acids in immunity*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2012. 1253(1): p. 16.
- [31] Bouwman, K.M., et al., *Multimerization-and glycosylation-dependent receptor binding of SARS-CoV-2 spike proteins*. PLoS Pathogens, 2021. 17(2): p. e1009282.
- [32] Göker, H., et al., *The effects of blood group types on the risk of COVID-19 infection and its*
- [3] World Health Organization. *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. 9 May 2022; Available from: <https://covid19.who.int/>.
- [4] Hu, B., et al., *Bat origin of human coronaviruses*. Virology journal, 2015. 12(1): p. 1-10.
- [5] Nguyena, T.T., et al., *Origin of Novel Coronavirus (COVID-19): A Computational Biology Study using Artificial Intelligence*.
- [6] Menachery, V.D., et al., *A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence*. Nature medicine, 2015. 21(12): p. 1508-1513.
- [7] Casalino, L., et al., *Beyond shielding: the roles of glycans in the SARS-CoV-2 spike protein*. ACS Central Science, 2020. 6(10): p. 1722-1734.
- [8] Yan, R., et al., *Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2*. Science, 2020. 369(6501): p. 1444-1448.
- [9] Yang, J., et al., *Molecular interaction and inhibition of SARS-CoV-2 binding to the ACE2 receptor*. Nature communications, 2020. 11(1): p. 1-10.
- [10] Shang, J., et al., *Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020. 117(21): p. 11727-11734.
- [11] European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), S.S.I.o.B., Protein Information Resource (PIR). *UniProtKB - P0DTC9 (NCAP_SARS2)*. May 9, 2022; Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P0DTC9>.
- [12] European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), S.S.I.o.B., Protein Information Resource (PIR). *UniProtKB - P0DTC2 (SPIKE_SARS2)*. May 9, 2022; Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P0DTC2>.
- [13] European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), S.S.I.o.B., Protein Information Resource (PIR). *UniProtKB - P0DTC5 (VME1_SARS2)*. May 9, 2022; Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P0DTC5>.
- [14] European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), S.S.I.o.B., Protein Information Resource (PIR). *UniProtKB - P0DTC4 (VEMP_SARS2)*. May 9, 2022; Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P0DTC4>.
- [15] Watanabe, Y., et al., *Exploitation of glycosylation in enveloped virus pathobiology*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2019. 1863(10): p. 1480-1497.
- [16] European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), S.S.I.o.B., Protein Information Resource (PIR). *UniProtKB - P0DTD1 (RIAB_SARS2)*. May 9, 2022; Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P0DTD1>.

- [40] European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), S.S.I.o.B., Protein Information Resource (PIR). *UniProtKB - P59594 (SPIKE_SARS)*. April 7, 2021; Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P59594>.
- [41] Xu, W., et al., *Variations in SARS-CoV-2 spike protein cell epitopes and glycosylation profiles during global transmission course of COVID-19*. *Frontiers in Immunology*, 2020. 11: p. 2222.
- [42] TheCommitteeToAdviseOnTropicalMedicineAndTravel(CATMAT). *STATEMENT ON TRAVELLERS AND RABIES VACCINE*. 2002; Available from: <https://publications.gc.ca/collections/Collection/H12-21-2-28-4.pdf>.
- [43] European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), S.S.I.o.B., Protein Information Resource (PIR). *P35961 · ENV_HVIY2*. 2022; Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P35961/entry>.
- [44] European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), S.S.I.o.B., Protein Information Resource (PIR), *P03524 · GLYCO_RABVE*. 2022.
- [45] (Gavi), T.V.A. *How effective are COVID-19 vaccines in the real-world?* 2 July 2021; Available from: <https://www.gavi.org/vaccineswork/how-effective-are-covid-19-vaccines-real-world>.
- clinical outcome*. *Turkish journal of medical sciences*, : (۴)۵۰ .۲۰۲۰ p. 679-683.
- [33] Deleers, M., et al., *Covid-19 and blood groups: ABO antibody levels may also matter*. *International Journal of Infectious Diseases*, 2021. 104: p. 242-249.
- [34] Solmaz, İ. and S. Araç, *ABO blood groups in COVID-19 patients; Cross-sectional study*. *International journal of clinical practice*, 2021. 75(4): p. e13927.
- [35] Zhang, Y., et al., *Site-specific N-glycosylation characterization of recombinant SARS-CoV-2 spike proteins*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2021. 20: p. 100058.
- [36] Klein, J.A. and J. Zaia, *Assignment of coronavirus spike protein site-specific glycosylation using GlycReSoft*. *bioRxiv*, 2020.
- [37] Watanabe, Y., et al., *Native-like SARS-CoV-2 spike glycoprotein expressed by ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 vaccine*. *ACS Central Science*, 2021.
- [38] Bagdonaite, I., et al., *Site-specific O-glycosylation analysis of SARS-CoV-2 spike protein produced in insect and human cells*. *Viruses*, 2021. 13(4): p. 551.
- [39] Marth, J.D. and P.K. Grewal, *Mammalian glycosylation in immunity*. *Nature Reviews Immunology*, 2008. 8(11): p. 874-887.

The role of glycans in the structure and function of the SARS-Cov-2 spike protein

Hamid Asghari¹, Sedigheh Asad^{2*}

1. Hamid Asghari, MSc in Biotechnology, Faculty of Biotechnology, College of science, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Sedigheh Asad, Associate Professor, Faculty of Biotechnology, College of science, University of Tehran, Tehran, Iran

Asad@ut.ac.ir

Receipt: 2022/06/09

Accepted: 2023/04/24

Abstract.

In the last month of 2019, an unknown virus appeared in Wuhan, China. Sequencing studies have shown that the virus is a new member of the coronavirus family, which mostly causes a respiratory disease with pneumonia-like symptoms. The new coronavirus consists of 25 proteins, including 4 important structural proteins and 15 non-structural proteins. Spike protein is one of the most important structural proteins on the surface of the virus; It is highly glycosylated and plays a key role in the virus binding to the host cells. The binding of glycans to proteins affects their structure and function in two ways; They lead to proper protein folding, and can play an important role in protein interactions, and also, by covering the surface of the protein, it causes the virus to escape from the immune system. So it is obvious that the study of glycan structures becomes more important when either a vaccine is going to be designed or glycan structures have important roles in the folding, activity, and interaction of a protein. Therefore, since the spike protein is a non-functional structural protein, the study of glycan structures is important for two goals of vaccine design and investigating the role of glycans in protein interactions. In this article, we are going to review the most important findings on spike protein glycosylation and compare the amount of glycosylation in different viruses, indicating the importance of glycan structures in designing an effective vaccine.

Keywords.

SARS-Cov-2, Covid19, Spike protein, Glycan structures, Immune system, Vaccine