

УДК 571.27

РЕКОМБИНАНТНЫЙ S-БЕЛОК SARS-CoV-2 *in vitro* СПОСОБЕН СВЯЗЫВАТЬ ГЛИКАНЫ СЕМЕЙСТВА ЛАКТОЗАМИНА

© 2021 А.Б. Рыжиков¹, Г.С. Онхонова¹, И.Р. Иматдинов¹, Е.В. Гаврилова¹,
Р.А. Максюттов¹, Е.А. Гордеева², Г.В. Пазынина²,
И.М. Рыжов², Н.В. Шилова^{2,3}, Н.В. Бовин^{2*}

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «ВЕКТОР» Роспотребнадзора, 630559 р.п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия; электронная почта: professorbovin@yandex.ru

³ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 07.11.2020

После доработки 11.11.2020

Принята к публикации 11.11.2020

Для многих вирусов, кроме основной, находят дополнительную клеточную мишень, способствующую адгезии вируса к клетке; часто эту роль играют гликаны. Для SARS-CoV-2 основным рецептором является пептидный мотив белка ACE2. Мы изучили взаимодействие рекомбинантного белка S SARS-CoV-2 с широким набором гликоконъюгатов, который включал различные сиалилированные, сульфатированные и другие гликаны, и обнаружили, что этот белок способен связывать некоторые (но не все) гликаны семейства лактозаминов. Так как действие нейраминидазы вируса гриппа приводит к демаскировке лактозаминовых цепей, мы предполагаем, что параллельное инфицирование вирусом гриппа усилит адгезию SARS-CoV-2 к респираторному эпителию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: SARS-CoV-2, S-гликопротеин, гликоконъюгаты, N-ацетилглюкозамин.

DOI: 10.31857/S0320972521030015

ВВЕДЕНИЕ

Ключевая роль в адгезии коронавирусов (CoV) к клетке-хозяину приписывается вирусному S-белку, который представляет собой гомомер, каждый из мономеров которого состоит из двух субъединиц, S1 и S2. Субъединица S2 заякорена в вирусной мембране и отвечает за слияние с клеткой-хозяином [1, 2]. Эктодомен S1 состоит из четырех субдоменов (S1A–S1D), каждый из которых может играть рецептор-связывающую роль, но до сих пор не ясно, действуют ли они совместно или по отдельности [3]. В вирусе MERS-CoV субдомен S1B отвечает за взаимодействие с дипептидилпептидазой-4 и имеет решающее значение для проникновения в хозяйскую клетку, в то

время как лектиноподобный субдомен S1A связывает O-ацетилованный сиалогликан [4, 5]. В случае SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 субдомен S1B распознает ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) [6]; в литературе не встречается информации о специфичности других субдоменов, хотя ACE2 не является единственной возможной мишенью для белка S из SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2; в частности, это гликопротеин CD147 [7, 8]. S-Белок других коронавирусов человека, таких как HKU1 и OC43, а также бычий BCoV имеют лектиноподобный домен S1A, который связывает 9-O-ацетилованную сиаловую кислоту (Sia); это взаимодействие не является высокоаффинным, но тем не менее способствует процессу проникновения вируса ближе к его основной мишени [9]. Что касается сиало-связывающей активности S-белка из SARS-CoV-2, данные противоречивы: в работе Hao et al. [10] приводится отрицательный вывод, однако есть и другие исследования, указывающие на возможность связывания с ганглиозидами [11]. Следует отметить, что все поверхностные белки SARS-CoV-2 сиалилированы, особенно S-белок с его 22 сайтами гликозилиро-

Принятые сокращения: ТФА – твердофазный метод анализа; ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2; biot – биотин; CoV – коронавирус; Gluc – гликан; LN – Galβ1-4GlcNAcβ; PAA – полиакриламид; PBS – фосфатный буферный раствор; PBS-T – PBS, содержащий 0,1% Tween 20; S – спайковый белок; Sia – сиаловая кислота.

* Адресат для корреспонденции.

вания. Поскольку вирус не должен связываться с самим собой, очевидно, что его гликан-узнающий белок не будет связывать такие типичные терминации углеводных цепей человека с сиаловой кислотой, как Neu5Ac α 2-3Gal и Neu5Ac α 2-6Gal; хотя нельзя исключить взаимодействия с O-ацетилированными сиалозидами, редкими для эпителиальной клетки хозяина, и это действительно имеет место для S-белка MERS-CoV. Иными словами, если SARS-CoV-2 и обладает сиало-связывающей способностью, то форма распознаваемой Sia должна отличаться от обычных сиало-мотивов Neu5Ac α 2-3Gal и Neu5Ac α 2-6Gal.

Было показано [12], что низкомолекулярный гепарин обладает значительным противовоспалительным действием при лечении пациентов с COVID-19 за счет значительного снижения провоспалительного цитокина IL-6; кроме того, считается, что гепарин может напрямую взаимодействовать с SARS-CoV-2. Гликозаминогликаны (ГАГ) могут действовать как факторы адгезии для аденовирусов, вирусов герпеса, папилломавируса, цитомегаловируса и других, и эта адгезия эффективно ингибируется растворимой формой ГАГ [13]. Коронавирусы также не являются исключением – NL63 и SARS-CoV-1 (в форме псевдовirusа) используют ГАГ для адгезии к клетке-хозяина вместе с рецептором ACE2 [14]. Примерная форма S-белка пандемического SARS-CoV-2 связывается с полноразмерным гепарином с поразительной аффинностью (40 пМ), что на несколько порядков лучше, чем для S-белка MERS-CoV [15], присутствие 2-O- и 6-O-сульфатов, по-видимому, важно для связывания [16]. Принимая во внимание все вышеперечисленное, мы исследовали гликановую специфичность рекомбинантного S-белка SARS-CoV-2, ожидая увидеть связывание с дополнительными углеводными рецепторами – сульфатированными или необычными (см. выше) сиалилированными гликанами млекопитающих, но обнаружили высокоаффинное взаимодействие в первую очередь с гликанами лактозаминового типа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гликоконъюгаты Glyc-РАА-biot (где Glyc – это гликан, РАА – полиакриламид, biot – биотин с C5-спейсером) с молекулярной массой 20 кДа, содержащие 20 мол% гликана и 5 мол% биотина, получены от «GlycoNZ», Новая Зеландия.

Гомотример S-белка. Рекомбинантный тримерный S-белок коронавируса SARS-CoV-2 был

получен с использованием исходного экспрессирующего плазмидного вектора SBW4G_S-FdT4 («Вектор», Россия). Химерный ген, кодирующий эктодомен S-гликопротеина и домен тримерного бета-пропеллера фибритина бактериофага T4 с C-концевой последовательностью 8-гистидиновой метки (His₈-tag), контролировали промотором СAG. Временная экспрессия достигалась трансфекцией трансплантированных клеток НЕК293 (Институт цитологии РАН, Россия) рекомбинантной плазмидой SBW4G_S-FdT4. Очистку рекомбинантных белков проводили с помощью аффинной хроматографии на приборе Ni-NTASuperFlow («Qiagen», Германия). Чистота и целостность всех очищенных рекомбинантных белков подтверждена SDS-PAGE; молекулярная масса одной субъединицы составляет 139 кДа, аминокислотная последовательность приведена на рисунке в Приложении.

Скрининговый твердофазный анализ (ТФА). S-Белок (5 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (PBS)) вносили в лунки планшета Nunc MaxiSorp («Thermo Fisher», США) и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре, после чего раствор удаляли, а лунки высушивали. Затем планшет промывали PBS, содержащим 0,1% (w/v) Tween 20 (PBS-T, «Merck», США). Гликоконъюгаты Glyc-РАА-biot двукратно, начиная с 10 мкг/мл, разбавляли раствором для разведения сыворотки («Эпитек», Россия). Планшет инкубировали с полученными растворами 90 мин на шейкере («Elmi», Латвия) при 37 °С, промывали и прибавляли по 100 мкл конъюгата пероксидазы хрена («Эпитек», Россия) в разведении 1/20 в PBS-T, затем инкубировали на термошейкере при 7 °С. Планшет промывали PBS-T и прибавляли по 100 мкл раствора тетраметилбензидина («Thermo Fisher», США), после чего инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре; цветную реакцию останавливали 5%-ной серной кислотой. С помощью микропланшетного ридера Bio-Rad Model 680 («Bio-Rad», США) измеряли поглощение при длине волны 450 нм.

Измерение констант диссоциации. Растворы конъюгатов 11 гликанов, продемонстрировавших наивысшую связывающую активность в скрининговом ТФА, двукратно, начиная с 10 мкг/мл, разбавляли раствором для разведения сыворотки («Эпитек», Россия) и вносили в лунки 96-луночного стрипованного планшета Nunc MaxiSorp («Thermo Fisher», США), покрытого S-белком (см. выше). Стрипы инкубировали на шейкере при 37 °С; каждые 10 мин один из стрипов промывали раствором PBS-T и помещали в холодильник (4 °С). Через 100 мин все

стрипы обрабатывали, как описано выше, и сравнивали данные стрипов, различающихся временем инкубации. Концентрация комплекса гликан/S-белок описывается уравнениями взаимодействия лиганд–рецептор (уравнения 1–4):

$$[LR] = A(1 - e^{-kt}), \quad (1)$$

$$A = \frac{[R]_0[L]_0}{K_d + [R]_0}, \quad (2)$$

$$k = k_+[R]_0 + k_-, \quad (3)$$

$$K_d = \frac{k_-}{k_+}, \quad (4)$$

где $[LR]$ – концентрация комплекса, $[R]_0$ и $[L]_0$ – начальные концентрации гликана и S-белка соответственно, k_+ и k_- – константы скорости. Показатель k рассчитывали путем аппроксимации экспериментальной зависимости концентрации комплекса гликан/S-белок от времени функцией (1) с использованием пакета программ OriginProc («OriginLab Corporation», США). Поскольку k определяли при нескольких концентрациях конъюгата, при построении графика зависимости рассчитанных параметров k от концентрации добавленных гликоконъюгатов было получено линейное уравнение (3). K_d рассчитывали согласно уравнению (4).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хотя наша группа широко использует гликановый эррей (printed glycan array, PGA) [17] для изучения гликан-связывающих (включая вирусные) белков, в случае профилирования специфичности S-белка мы использовали ТФА, где S-белок нанесен на полистироловый планшет, а гликополимеры типа Gluc-РАА-biot связываются с иммобилизованным на планшете белком. Хотя эта методология более хлопотная, и предполагались проблемы с вкладом неспецифического компонента из-за наличия избыточных остатков биотина в Gluc-РАА-biot (в среднем их количество составляет ~10 на одну цепь РАА [18]), у этого «обратного» метода ожидалось определенное преимущество – мы рассчитывали, что в этом анализе сравнение значений поглощения связывания S-белка с различными гликанами должно дать нам надежные относительные значения аффинности, в то время как PGA [19], где иммобилизованы лиганды, не гарантирует равную степень иммобилизации лиганда на твердой фазе. Всего с помощью ТФА

было исследовано взаимодействие со 155 гликоконъюгатами, среди которых типичные для клеток человека сиалогликаны, широкий спектр сульфатированных гликанов, а также множество олигосахаридов N-ацетилактозаминового типа, гликаны, представляющие собой антигены группы крови АВН, и многие другие. Максимальное значение поглощения в этой версии ТФА, которому можно доверять, составляет немногим более 3, поэтому мы отнесли к сильным сигналам значения, которые попадают в диапазон 2,0–3,2; значения <1,0 мы расценивали как отсутствие специфического связывания. Несмотря на то что условия анализа были намеренно «настроены» на усиление самых низких сигналов, он не выявил какого-либо значительного взаимодействия S-белка ни с сульфатированными, ни с обычными сиалилированными гликанами, т.е. имеющими в своем составе терминации Neu5Ac α 2-3Gal, Neu5Ac α 2-6Gal или Neu5Ac α 2-6GalNAc, а также структурные мотивы 9-NAc-Neu5Ac α (9-NAc-производные взяты как устойчивые миметики соответствующих O-Ac сиалозидов). Единственным сиалолигандом с обнаруженным высокоаффинным связыванием был дисахарид Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α (№ 11, таблица), хотя тетрасахарид ганглиозида GD2 (Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β) не обнаруживал связывания в нашем анализе, также как и трисахарид Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α . Связывание дисахарида Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α , по-видимому, в основном обусловлено двумя карбоксильными группами (т.е. кулоновским взаимодействием, это согласуется с недавно опубликованной статьей о связывании вируса с кластерами моносахарида Neu5Ac [20]) двух остатков Neu5Ac, случайно оказавшихся на таком расстоянии друг от друга, которое благоприятно для взаимодействия с лектиноподобным участком; следует отметить, что объемный заместитель R в Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α -R (в том числе и в ганглиозидах, где R – внутреннее углеводное ядро) отменяет его. В таблице показаны все гликаны, обладающие высокой связывающей активностью (их значение поглощения было больше 2,0).

Примечательно, что среди 10 топовых гликанов 8 (в таблице показаны серым цветом) являются типичными лигандами для галектинов человека – олиголактозамины, гликановая часть гликофинголипида асиало-GM1, а также тетрасахариды группы крови А (тип 4) и В (тип 4). Если мы посмотрим на «гликаны второго уровня», показавшие величину поглощения в диапазоне 2,0–2,6, среди них четыре относятся к производным лактозамина, а два – к моносахариду галактозе и ее сульфату по положению 3. То есть тенденция S-белка связывать бета-галактозиды

Структура гликанов, продемонстрировавших высокий уровень связывания с S-белком в ТФА (в его скрининговом варианте)

№	Структура и [тривиальное или короткое название] гликанов	Поглощение, ТФА
1	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc β [группоспецифический антиген А тип 4]	3,21
2	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α [LN6TF]	3,16
3	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β [LN ₂]	3,13
4	Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β [асиало GM1]	3,11
5	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β [LN6'LN]	2,99
6	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc β [группоспецифический антиген В тип 4]	2,90
7	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β [A _{III} с гидрофобным спейсером]	2,86
8	GlcNAc α 1-3GalNAc β	2,82
9	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β [антиген Galili]	2,76
10	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	2,64
11	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α [дисиадозид]	2,60
12	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β [антиген Le ^x]	2,56
13	GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc β	2,55
14	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β [LN ₃ , или антиген группы крови i]	2,42
15	GlcN(Gc) β	2,20
16	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4GlcNAc β [антиген группы крови I]	2,14
17	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4GlcNAc β	2,08
18	Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β	2,05
19	3-O-Su-Gal β	2,03
20	β -Gal	2,03
21	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4GlcNAc β [антиген Tk]	2,01

Примечание. Серым цветом выделены типичные лиганды галектинов. Используемые сокращения: LN – Gal β 1-4GlcNAc.

очевидна. Интересно, что незамещенный дисахарид Gal β 1-4GlcNAc β (т.е. мономерный LN) показал низкое связывание по сравнению с топовыми лактозаминами из таблицы, что также характерно для галектинов человека [21].

Несомненное сходство паттернов распознавания S-белка SARS-CoV-2 и галектинов можно объяснить структурными особенностями S-белка, а именно, тем что домен S1A различных CoV (MERS-CoV, HCoV-OC43, BCoV и TGEV) имеет специфический галектиновый фолд [9, 22]. Однако до сих пор связывание с содержащими галактозу гликанами – галектиновыми лигандами – для них не было описано. Предполагается, что галектиновый фолд в S-белке эволюционно заимствован у клетки-хозяина в его неполноразмерной форме и, следовательно, он не функционирует как лектин. То есть этот домен не способен связывать структурные мотивы, содержащие β Gal, однако в ходе дальнейшей эволюции у некоторых вирусов он настроился на распознавание других углеводных мотивов [23, 24].

Не все топовые гликаны (таблица) структурно похожи на галектиновые лиганды. О дисиадозиде мы говорили выше. Что касается трисахарида Le^x (Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β), известно, что он не связывается ни с одним из галектинов человека, но в то же время N-ацетиллактозамин является его составной частью; поэтому узнавание не совсем обычного лиганда не совсем обычным галектином не кажется нам удивительным. Про трисахарид группы крови А (GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β) также известно, что он не является галектиновым лигандом. Мы объясняем факт его попадания в топовые лиганды следующим образом: этот гликан отличается от других лигандов использованного набора гликопроб своей гидрофобностью, а именно, имеет спейсер – O(CH₂)₃NHCO(CH₂)₅NH-; тот же трисахарид А, лишенный этой гидрофобности, оказался плохим лигандом для S-белка. Мы считаем, что наблюдаемое связывание трисахарида А на самом деле является результатом успешной комбинации двух «слагаемых» – неспецифического (гидрофобного) и специфического (GalNAc α),

последнее является относительно слабым, и поэтому недостаточным для проявления сродства к S-белку без «помощи» необычного спейсера. Обнаруженная способность распознавать гликаны с концевым фрагментом глюкозамина, например GlcNAc α 1-3GalNAc α , а также другие гликаны, не принадлежащие к семейству лактозаминов (см. выше), на первый взгляд не укладывается в гипотезу галектино-подобного сайта связывания S-белка. Тем не менее нам известны примеры, когда замена одной или двух аминокислот в лектине не просто отменяет связывание углеводов, но приводит к способности распознавать другой гликан [25]. В нашем случае прямая разница в аминокислотной последовательности очень велика (данные не показаны) — речь идет только о сходстве фолдов. Таким образом, различие между S-белком и галектином, распознающим гликаны, само по себе не удивительно; но удивительным является «возвращение» галектинового фолда в S-белке последнего коронавируса к способности связывать типичные галектиновые лиганды, утраченной другими коронавирусами.

Мы провели дополнительное исследование с помощью такого же ТФА, но в кинетическом режиме (см. Материалы и методы), чтобы оценить аффинность взаимодействия рекомбинантного S-белка по отношению к 11 топовым гликоконъюгатам. Наибольшее сродство было обнаружено для дисиалозида ($K_d = 10$ нМ, все значения относятся к гликану, а не к его полимерному конъюгату) и Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α (LN6TF) с $K_d = 20$ нМ. Значения K_d для ACE2 в литературе варьируют от 1,2 нМ [2] до 95 нМ [26]. Конечно, было бы некорректно напрямую сравнивать эти данные, полученные в совершенно разных экспериментальных системах; тем не менее измеренные значения K_d предполагают возможность вклада углеводной рецепции *in vivo*. Конечно, особенно важно знать, какие гликаны являются реальными или

потенциальными/дополнительными мишенями вируса на респираторном эпителии. На основании полученных данных можно предположить, что это N-ацетиллактозаминоновый гликан в составе O-цепи гликопротеина, поскольку тетрасахарид, показавший одно из лучших значений K_d , — это LN6TF, тогда как типичные для N-цепей олиголактозаминоновые гликаны продемонстрировали меньшее сродство.

Большинство лактозаминоновых мотивов на клетках легочного эпителия маскируются присоединенной к ним сиаловой кислотой; поэтому маловероятно, что у здорового человека дополнительное сродство вируса (к лактозаминам) внесет значительный вклад в его первичную адгезию. Однако под действием нейраминидазы, которая присутствует в составе многих патогенов (в первую очередь вируса гриппа), остатки Sia элиминируются, тем самым обнажая остатки лактозаминов. Это позволяет нам выдвинуть гипотезу об усилении адгезии (и, следовательно, повышенной вирулентности) SARS-CoV-2 при параллельном инфицировании патогенами, имеющими мощную нейраминидазу.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-60335).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 86, вып. 3, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tortorici, M. A., Walls, A. C., Lang, Y., Wang, C., Li, Z., et al. (2019) Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 481-489, doi: 10.1038/s41594-019-0233-y.
2. Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., and Veesler, D. (2020) Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein, *Cell*, **181**, 282-291, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
3. Wang, C., Li, W., Drabek, D., Okba, N. M. A., van Haperen, R., et al. (2020) A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection, *Nat. Commun.*, **11**, 1-6, doi: 10.1038/s41467-020-16256-y.
4. Li, W., Hulsmit, R. J. G., Widjaja, I., Raj, V. S., McBride, R., et al. (2017) Identification of sialic acid-binding function for the Middle East respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E8508-E8517, doi: 10.1073/pnas.1712592114.
5. Park, Y. J., Walls, A. C., Wang, Z., Sauer, M. M., Li, W., et al. (2019) Structures of MERS-CoV spike glycoprotein in complex with sialoside attachment receptors, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 1151-1157, doi: 10.1038/s41594-019-0334-7.
6. Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., et al. (2020) Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV, *Nat. Commun.*, **11**, 1620, doi: 10.1038/s41467-020-15562-9.
7. Chen, Z., Mi, L., Xu, J., Yu, J., Wang, X., et al. (2005) Function of HAb18G/CD147 in invasion of host cells by

- severe acute respiratory syndrome coronavirus, *J. Infect. Dis.*, **191**, 755-760, doi: 10.1086/427811.
8. Wang, K., Chen, W., Zhou, Y.-S., Lian, J.-Q., Zhang, Z., et al. (2020) SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.03.14.988345.
 9. Qing, E., Hantak, M., Perlman, S., and Gallagher, T. (2020) Distinct roles for sialoside and protein receptors in coronavirus infection, *MBio*, **11**, e02764-e02819, doi: 10.1128/mBio.02764-19.
 10. Hao, W., Ma, B., Li, Z., Wang, X., Gao, X., et al. (2020) Binding of the SARS-CoV-2 spike protein to glycans, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.05.17.100537.
 11. Engin, A. B., Engin, E. D., and Engin, A. (2020) Dual function of sialic acid in gastrointestinal SARS-CoV-2 infection, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **79**, 103436, doi: 10.1016/j.etap.2020.103436.
 12. Shi, C., Wang, C., Wang, H., Yang, C., Cai, F., et al. (2020) Clinical observations of low molecular weight heparin in relieving inflammation in COVID-19 patients: a retrospective cohort study, *medRxiv*, doi: 10.1101/2020.03.28.20046144.
 13. Ströh, L. J., and Stehle, T. (2014) Glycan engagement by viruses: receptor switches and specificity, *Annu. Rev. Virol.*, **1**, 285-306, doi: 10.1146/annurev-virology-031413-085417.
 14. Milewska, A., Zarebski, M., Nowak, P., Stozek, K., Potempa, J., and Pyrc, K. (2014) Human Coronavirus NL63 utilizes heparan sulfate proteoglycans for attachment to target cells, *J. Virol.*, **88**, 13221-13230, doi: 10.1128/JVI.02078-14.
 15. Kim, S. Y., Jin, W., Sood, A., Montgomery, D. W., Grant, O. C., et al. (2020) Glycosaminoglycan binding motif at S1/S2 proteolytic cleavage site on spike glycoprotein may facilitate novel coronavirus (SARS-CoV-2) host cell entry, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.04.14.041459.
 16. Mycroft-West, C., Su, D., Pagani, I., Rudd, T., Elli, S., et al. (2020) Heparin inhibits cellular invasion by SARS-CoV-2: structural dependence of the interaction of the surface protein (spike) S1 receptor binding domain with heparin, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.04.28.066761.
 17. Olivera-Ardid, S., Khasbiullina, N., Nokel, A., Formanovsky, A., Popova, I., et al. (2019) Printed glycan array: a sensitive technique for the analysis of the repertoire of circulating anti-carbohydrate antibodies in small animals, *J. Vis. Exp.*, **144**, 1-7, doi: 10.3791/57662.
 18. Bovin, N. V. (1998) Polyacrylamide-based glycoconjugates as tools in glycobiology, *Glycoconj. J.*, **15**, 431-446, doi: 10.1023/a:1006963717646.
 19. Blixt, O., Head, S., Mondala, T., Scanlan, C., Huflejt, M. E., et al. (2004) Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17033-17038, doi: 10.1073/pnas.0407902101.
 20. Baker, A. N., Richards, S. J., Guy, C. S., Congdon, T. R., Hasan, M., et al. (2020) The SARS-COV-2 spike protein binds sialic acids and enables rapid detection in a lateral flow point of care diagnostic device, *ASC Central Science*, **6**, 2046-2052, doi: 10.1021/acscentsci.0c00855.
 21. Rapoport, E. M., Pochechueva, T. V., Kurmyshkina, O. V., Pazygina, G. V., Severov, V. V., et al. (2010) Solid-phase assays for study of carbohydrate specificity of galectins, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 310-319, doi: 10.1134/s0006297910030077.
 22. Li, F. (2015) Receptor recognition mechanisms of coronaviruses: a decade of structural studies, *J. Virol.*, **89**, 1954-1964, doi: 10.1128/JVI.02615-14.
 23. Peng, G., Sun, D., Rajashankar, K. R., Qian, Z., Holmes, K. V., and Li, F. (2011) Crystal structure of mouse coronavirus receptor-binding domain complexed with its murine receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 10696-10701, doi: 10.1073/pnas.1104306108.
 24. Peng, G., Xu, L., Lin, Y. L., Chen, L., Pasquarella, J. R., Holmes, K. V., and Li, F. (2012) Crystal structure of bovine coronavirus spike protein lectin domain, *J. Biol. Chem.*, **287**, 41931-41938, doi: 10.1074/jbc.M112.418210.
 25. Drickamer, K., and Taylor, M. E. (1993) Biology of animal lectins, *Annu. Rev. Cell Biol.*, **9**, 237-264, doi: 10.1146/annurev.cb.09.110193.001321.
 26. Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., et al. (2020) Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2, *Cell*, **181**, 894-904.e9, doi: 10.1016/j.cell.2020.03.045.

RECOMBINANT S PROTEIN OF SARS-CoV-2 *in vitro* IS CAPABLE OF BINDING GLYCANS OF THE LACTOSAMINE FAMILY

A. B. Ryzhikov¹, G. S. Onkhonova¹, I. R. Imatdinov¹, E. V. Gavrilova¹, R. A. Maksyutov¹, E. A. Gordeeva², G. V. Pazygina², I. M. Ryzhov², N. V. Shilova^{2,3}, and N. V. Bovin^{2*}

¹ State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Rospotrebnadzor, 630559 Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

² Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia; E-mail: professorbovin@yandex.ru

³ National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russian Federation, 117997 Moscow, Russia

Many viruses, beside binding to their main cell target, interact with other molecules that promote virus adhesion to the cell; often, these additional targets are glycans. The main receptor for SARS-CoV-2 is a peptide motif in the ACE2 protein. We studied interaction of the recombinant SARS-CoV-2 spike (S) protein with an array of glycoconjugates, including various sialylated, sulfated, and other glycans, and found that the S protein binds some (but not all) glycans of the lactosamine family. We suggest that parallel influenza infection will promote SARS-CoV-2 adhesion to the respiratory epithelial cells due to the unmasking of lactosamine chains by the influenza virus neuraminidase.

Keywords: SARS-CoV-2, spike glycoprotein, glycoconjugates, lactosamine