

УДК 571.27+577.2+577.29

РАЗЛИЧИЯ В ПРЕЗЕНТАЦИИ ПЕПТИДОВ ВАРИАНТОВ Омикрон-штамма ВА.1–ВА.5 ВИРУСА SARS-CoV-2 МОЛЕКУЛАМИ ГКГС

© 2022 г. С. А. Нерсисян^{1,2,*}, М. Ю. Шкурников^{1,2}, А. П. Жиянов^{1,2}, В. О. Новосад^{1,2}, член-корреспондент РАН А. Г. Тоневицкий^{1,2}

Поступило 01.09.2022 г.
После доработки 09.09.2022 г.
Принято к публикации 09.09.2022 г.

В настоящей работе анализировали аффинности связывания мутантных пептидов вариантов Омикрон-штамма ВА.1–ВА.5 и наиболее распространенных в мировой популяции вариантов главного комплекса гистосовместимости (ГКГС). Биоинформатический анализ проводили с помощью веб-портала T-CoV. Показано, что для всех пяти вариантов вируса мутации приводят к значительному снижению числа высокоаффинных пептидов для молекул HLA-B*07: 02 и HLA-C*01: 02, в то время как для аллели HLA-A*32: 01 мутации приводят к появлению новых потенциальных эпитопов (аффинность взаимодействия менее 50 нМ). В случае ГКГС класса II мутации оказывают разнонаправленный эффект на аффинности взаимодействий вирусных пептидов и HLA-DRB1*03: 01. А именно, мутации в Spike белке варианта ВА.1 приводят к более чем стократному уменьшению аффинности связывания эпитопа PINLVRDLPQGFSAL, а также к десятикратному уменьшению аффинности связывания этого эпитопа в случае вариантов ВА.2, ВА.4, ВА.5, и к увеличению аффинности на 30% для варианта ВА.3.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, Омикрон, ГКГС, презентация пептидов, мутации, T-CoV

Список сокращений: ГКГС – главный комплекс гистосовместимости, ИФА – иммуноферментный анализ.

DOI: 10.31857/S2686738922060233

T-клеточный иммунный ответ играет ключевую роль в патогенезе COVID-19 [1, 2]. Два основных класса T-клеток выполняют важнейшие функции для борьбы с инфекцией: цитотоксические T-лимфоциты (CD8 T-клетки) разрушают зараженные вирусом клетки, одной из главных функций T-хелперов (CD4 T-клетки) является доставка второго активирующего сигнала B-клеткам, необходимого для производства антител. Ключевым этапом активации T-клеток является взаимодействие T-клеточного рецептора с вирусным пептидом в составе главного комплекса гистосовместимости (ГКГС). Существует большое количество различных аллелей, кодирующих молекулы ГКГС, причем каждый из соответствующих вариантов молекул ГКГС обладает собствен-

ным, специфичным набором пептидов, с которыми он может связываться с высокой аффинностью. Ранее были выявлены аллели ГКГС, ассоциированные с тяжестью течения COVID-19 [3–5].

Известно, что мутации вируса SARS-CoV-2 могут приводить к существенным изменениям аффинностей взаимодействий соответствующих пептидов с молекулами ГКГС [6, 7]. Ранее нами был разработан биоинформатический алгоритм и веб-портал T-CoV (<https://t-cov.hse.ru>), позволяющий проводить исчерпывающий анализ влияния мутаций на эффективность презентации линейных пептидов SARS-CoV-2 молекулами ГКГС [8]. Помимо анализа индивидуальных аллелей, портал предусматривает возможность анализа на уровне гаплотипов [9].

Согласно данным портала Nextstrain (<https://nextstrain.org>) доминирующим вариантом SARS-CoV-2 в 2022 г. является Омикрон-штамм. Известно, что большое число мутаций в Spike белке позволяет Омикрону эффективно уклоняться от антител против Spike белка базового штамма [10]. Также Spike белок данного варианта потерял способность взаимодействия с серино-

¹ Лаборатория микрофлюидных технологий для биомедицины, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

² Факультет биологии и биотехнологии, Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Россия

*e-mail: snersisyan@hse.ru

вой протеазой TMPRSS2, вследствие чего эффективность репликации вируса значительно снизилась [11]. Нами ранее было показано, что мутации в вариантах Омикрон-штамма BA.1 и BA.2 приводят к критическому снижению аффинности взаимодействия HLA-DRB1*03:01 и единственного эпитопа Spike белка, соответствующего данной молекуле ГКГС (биоинформатический анализ и ИФА) [9]. Интересно, что к падению аффинности приводили две различные мутации, затрагивающие единый регион: делеция N211, замена L212I и вставка EPE 212–214 в случае варианта BA.1, замена V213G в случае BA.2. Насколько нам известно, подобный анализ не проводился для вариантов BA.3, BA.4 и BA.5.

Целью настоящей работы было проведение сравнительного анализа эффективности презентации вирусных пептидов вариантов Омикрон-штамма BA.1–BA.5 наиболее распространенными вариантами молекул ГКГС.

Первичные последовательности белков различных вариантов SARS-CoV-2 получали из портала GISAID [12] в формате FASTA, используя следующие идентификаторы:

- Уханьский базовый штамм: EPI_ISL_402125;
- Омикрон BA.1: EPI_ISL_6699752;
- Омикрон BA.2: EPI_ISL_9884589;
- Омикрон BA.3: EPI_ISL_9854919;
- Омикрон BA.4: EPI_ISL_11873073;
- Омикрон BA.5: EPI_ISL_13302233.

Полученные аминокислотные последовательности разбивали на всевозможные перекрывающиеся линейные пептиды длины 8–14 в случае ГКГС класса I (ГКГС-I) и 15–20 в случае ГКГС класса II (ГКГС-II). Аффинности взаимодействий вирусных пептидов и наиболее распространенных в мировой популяции молекул ГКГС (64 аллели ГКГС-I, 105 аллелей ГКГС-II) предсказывали с помощью программ netMHCpan версии 4.1 и netMHCPan версии 4.0 [13], интегрированных в алгоритм T-CoV [8]. Шкалу предсказанных аффинностей разбивали на три группы: ≤ 50 нМ – высокая аффинность связывания, от 50 до 500 нМ – средняя аффинность, более 500 нМ – низкая аффинность или отсутствие связывания. Существенным увеличением или снижением аффинности связывания пептида называли ситуацию, когда предсказанная аффинность попадала или выходила из диапазона высокой аффинности связывания соответственно.

Обработку данных проводили с помощью языка Python версии 3.8. Построение тепловых карт с иерархической кластеризацией строк/столбцов проводили с помощью библиотеки seaborn версии 0.11.2 [14].

На рис. 1 приведена диаграмма мутаций вариантов Омикрон BA.1–BA.5 вируса SARS-CoV-2

(89 уникальных мутаций). Значительная часть мутаций была общей для нескольких вариантов: 24 мутации (27%) были общими для всех вариантов, 9 мутаций (10%) были общими для четырех вариантов, 13 мутаций (15%) – для трех вариантов, 11 мутаций (12%) – для двух вариантов. Остальные изменения (36%) были специфичны для различных вариантов Омикрона. Более половины от всех изменений (46 из 89 мутаций, 52%) приходились на Spike белок. Важно отметить, что специфические мутации были равномерно распределены по всем белкам SARS-CoV-2 (точный тест Фишера применяли для каждого белка в отдельности, $p > 0.3$ во всех случаях).

Нами ранее было показано, что большое количество вирусных эпитопов по всей протеоме вируса (включая вспомогательные и неструктурные белки) ограничивает возможность уклонения вируса от презентации антигена за счет единиц–десятков мутаций [9]. Вследствие этого мы сосредоточили дальнейший анализ на Spike белке SARS-CoV-2, так как на использовании данного белка основано значительное число вакцин против COVID-19. В случае анализа ГКГС класса I были получены согласованные изменения аффинностей мутантных пептидов различных вариантов Омикрона. А именно, для всех пяти вариантов было обнаружено существенное снижение аффинностей взаимодействий вирусных пептидов из Spike белка с молекулами ГКГС, кодируемыми аллелями HLA-B*07:02 и HLA-C*01:02. В первом случае (HLA-B*07:02) тысячекратное снижение аффинности было следствием аминокислотной замены P681H (оригинальный эпитоп – SPRRARSVA), во втором случае (HLA-C*01:02) пятикратное снижение аффинности объяснялось заменой Y505H, попавшей в эпитоп YQPVRVVVL (обе замены P681H и Y505H присутствовали во всех вариантах Омикрона, см. рис. 1). Также были найдены мутации, существенно повышающие аффинность связывания некоторых пептидов с молекулами ГКГС-I. Так, три соседние замены на позициях 371, 373, 375 Spike белка приводили к появлению эпитопов с аффинностью меньше 50 нМ для HLA-A*32:01: VLYNLAPFF (BA.1), VLYNFAPFF (BA.2–BA.5). Позициям 373 и 375 соответствовали замены S373P и S375F, присутствующие в вариантах BA.1–BA.5, позиции 371 соответствовала замена S371L в случае варианта BA.1 и S371F для остальных вирусов.

Менее согласованная картина наблюдалась в случае аллелей ГКГС класса II. Для вышеупомянутой аллели HLA-DRB1*03:01 существует единственный пептид Spike белка с предсказанной аффинностью связывания менее 50 нМ (PINLYRDLPPQGFSAI, 27 нМ), при этом аффинность снижается на два порядка вследствие мутаций BA.1 (делеция N211, замена L212I, вставка 212–214 EPE) и на один порядок в случае BA.2

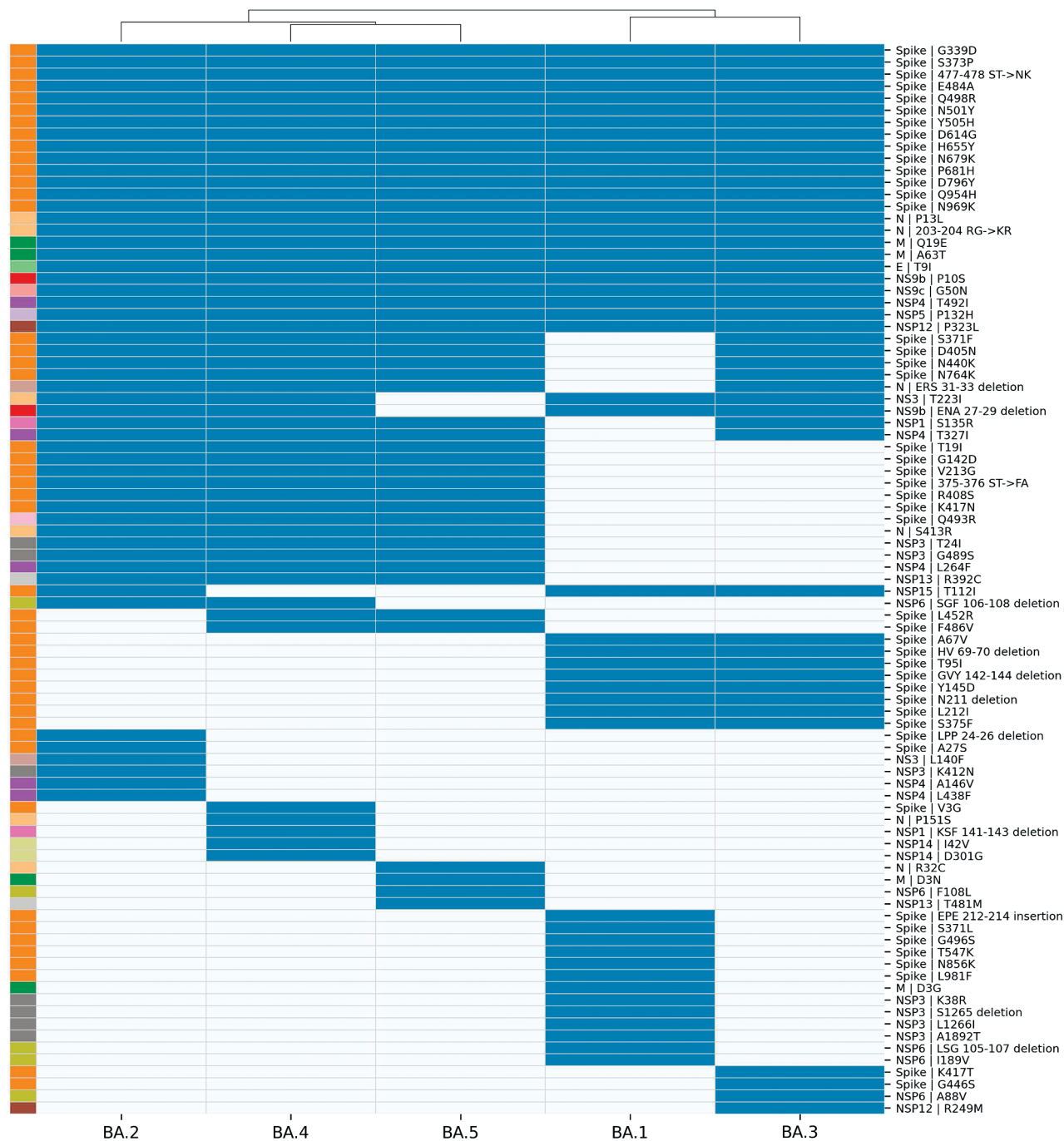


Рис. 1. Распределение мутаций по пяти вариантам (BA.1–BA.5) Омикрон-штамма SARS-CoV-2. Подписи строк включают в себя название вирусного белка и идентификатор мутации (в локальных координатах соответствующего белка). Цвета на вертикальной полосе слева соответствуют вирусным белкам.

(замена V213G). Предсказанные с помощью методов биоинформатики изменения были ранее валидированы нами экспериментально с использованием ИФА [9]. Интересно, что последовательности вариантов Омикрон BA.4 и BA.5 в данном регионе оказались идентичны BA.2 (замена V213G), тогда как в случае BA.3 наблюдались де-

лечения N211 и замена L212I, приводящие к неожиданному увеличению аффинности связывания на 30% (рис. 2). Таким образом, эффект наблюдаемых мутаций в случае аллели HLA-DRB1*03:01 можно разделить на три класса: вставка 212–214 EPE ведет к полной потере взаимодействия, замена V213G уменьшает аффинность взаимодей-

Базовый штамм Reference strain		Аффинность связывания с HLA-DRB1*03:01 binding affinity
	TPINLVR---DLPQGFSALEPL	27 nM
BA.1	TPI-IVREPEDLDPQGFSALEPL	>5000 nM
BA.2	TPINLGR---DLPQGFSALEPL	147 nM
BA.4	TPINLGR---DLPQGFSALEPL	
BA.5	TPINLGR---DLPQGFSALEPL	
BA.3	TPI-IVR---DLPQGFSALEPL	19 nM

Рис. 2. Мутации в эпитопе PINLVRDLPQGFSALEPL (выделен курсивом) приводят к изменению аффинности взаимодействия с HLA-DRB1*03:01. Жирным шрифтом выделены мутации.

ствия на порядок, тогда как замена L212I двукратно увеличивает аффинность связывания (делеция N211 не является релевантной, так как соответствует фланговой части пептида).

Схожий по силе эффект наблюдался для семейства аллелей HLA-DRB1*15 (HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB1*15:02, HLA-DRB1*15:03). В случае вирусов BA.2, BA.4, BA.5 наблюдалось появление нового эпитопа YSVLYNFAPFFAFKC (44 нМ) вследствие четырех колокализованных мутаций S371F, S373P, S375F, T376A. В случае же вирусов BA.1 и BA.3, отличающихся отсутствием мутации T376A, повышения предсказанной аффинности связывания не происходило.

Таким образом, было показано, что пептиды пяти вариантов Омикрон-штамма SARS-CoV-2 обладают различными профилями аффинностей связывания с молекулами главного комплекса гистосовместимости. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости изучения Т-клеточного иммунного ответа к каждому из вариантов Омикрон BA.1–BA.5 по отдельности. Результаты анализа штаммов BA.3, BA.4 и BA.5 добавлены на портал T-CoV.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1049).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Strålin K., Gorin J.-B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S., Wullimann D.J., Kammann T., Emgård J., Parrot T., Folkesson E., Karolinska COVID-19 Study Group, Rooyackers O., Eriksson L.I., Henter J.-I., Sönnernborg A., Allander T., Albert J., Nielsen M., Klingström J., Gredmark-Russ S., Björkström N.K., Sandberg J.K., Price D.A., Ljunggren H.-G., Aleman S., Buggert M. Robust T Cell Immunity in Convalescent

- Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19 // Cell (2020). V. 183. P. 158–168.e14.
2. Grifoni A., Sidney J., Vita R., Peters B., Crotty S., Weiskopf D., Sette A. SARS-CoV-2 human T cell epitopes: Adaptive immune response against COVID-19 // Cell Host & Microbe (2021). V. 29. P. 1076–1092.
3. Shkurnikov M., Nersisyan S., Jankevic T., Galatenko A., Gordeev I., Vechorko V., Tonevitsky A. Association of HLA Class I Genotypes With Severity of Coronavirus Disease-19 // Frontiers in Immunology (2021). V. 12. P. 641900.
4. Hovhannisyann A., Madelian V., Avagyan S., Nazaretyan M., Hyussyan A., Sirunyan A., Arakelyan R., Manukyan Z., Yepiskoposyan L., Mayilyan K.R., Jordan F. HLA-C*04:01 Affects HLA Class I Heterozygosity and Predicted Affinity to SARS-CoV-2 Peptides, and in Combination With Age and Sex of Armenian Patients Contributes to COVID-19 Severity // Frontiers in Immunology (2022). V. 13. P. 769900.
5. Migliorini F., Torsiello E., Spiezia F., Oliva F., Tingart M., Maffulli N. Association between HLA genotypes and COVID-19 susceptibility, severity and progression: a comprehensive review of the literature. // European Journal of Medical Research (2021). V. 26. P. 84.
6. Agerer B., Koblischke M., Gudipati V., Montaño-Gutierrez L.F., Smyth M., Popa A., Genger, L. Endler, D.M. Florian, V. Mühlgrabner, M. Graninger J.-W., Aberle S.W., Husa A.-M., Shaw L.E., Lercher A., Gattinger P., Torralba-Gombau R., Trapin D., Penz T., Barreca D., Fae I., Wenda S., Traugott M., Walder G., Pickl W.F., Thiel V., Allerberger F., Stockinger H., Puchhammer-Stöckl E., Weninger W., Fischer G., Hoepler W., Pawelka E., Zoufaly A., Valenta R., Bock C., Paster W., Geyeregger R., Farlik M., Halbritter F., Huppa J.B., Aberle J.H., Bergthaler A. SARS-CoV-2 mutations in MHC-I-restricted epitopes evade CD8+ T cell responses // Science Immunology (2021). V. 6. P. eabg6461.
7. Motozono C., Toyoda M., Zahradnik J., Saito A., Nasser H., Tan T.S., Ngare I., Kimura I., Uriu K., Kosugi Y., Yue Y., Shimizu R., Ito J., Torii S., Yonekawa A., Shimono N., Nagasaki Y., Minami R., Taya T., Sekiya N., Fukuhara T., Matsuura Y., Schreiber G. Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium, T. Ikeda, S. Nakagawa, T. Ueno, K. Sato, SARS-CoV-2 spike L452R variant evades cellular immunity and increases infectivity // Cell Host & Microbe (2021). V. 29. P. 1124–1136.e11.
8. Nersisyan S., Zhiyanov A., Shkurnikov M., Tonevitsky A. T-CoV: a comprehensive portal of HLA-peptide interactions affected by SARS-CoV-2 mutations // Nucleic Acids Research (2022). V. 50. P. D883–D887.
9. Nersisyan S., Zhiyanov A., Zakharova M., Ishina I., Kurbatskaia I., Mamedov A., Galatenko A., Shkurnikov M., A. Gabibov, A. Tonevitsky. Alterations in SARS-CoV-2 Omicron and Delta peptides presentation by HLA molecules // PeerJ (2022). V. 10. P. e13354.
10. Planas D., Saunders N., Maes P., Guivel-Benhassine F., Planchais C., Buchrieser J., Bolland W.-H., Porrot F., Staropoli I., Lemoine F., Péré H., Veyer D., Puech J., Rodary J., Baele G., Dellicour S., Raymenants J., Goriissen T., Geenen C., Vanmechelen B., Wawina-Bokalanga T., Marti-Carreras J., Cuypers L., Sève A., Hocqueloux L., Prazuck T., Rey F.A., Simon-Loriere E., Bruel T.,

- Mouquet H., André E., Schwartz O.* Considerable escape of SARS-CoV-2 Omicron to antibody neutralization // *Nature* (2022). V. 602. P. 671–675.
11. *Shuai H., Chan J.F.-W., Hu B., Chai Y., Yuen T.T.-T., Yin F., Huang X., Yoon C., Hu J.-C., Liu H., Shi J., Liu Y., Zhu T., Zhang J., Hou Y., Wang Y., Lu L., Cai J.-P., Zhang A.J., Zhou J., Yuan S., Brindley M.A., Zhang B.-Z., Huang J.-D., To K.K.-W., Yuen K.-Y., Chu H.* Attenuated replication and pathogenicity of SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron // *Nature* (2022). V. 603. P. 693–699.
12. *Elbe S., Buckland-Merrett G.* Data, disease and diplomacy: GISAID's innovative contribution to global health // *Global Challenges* (Hoboken, NJ) (2017). V. 1. P. 33–46.
13. *Reynisson B., Alvarez B., Paul S., Peters B., Nielsen M.* NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data // *Nucleic Acids Research* (2020). V. 48. P. W449–W454.
14. *Waskom M., Seaborn:* statistical data visualization // *Journal of Open Source Software* (2021). V. 6. P. 3021.

DIFFERENCES IN SARS-COV-2 OMICRON STRAIN VARIANTS BA.1–BA.5 PEPTIDES PRESENTATION BY HLA MOLECULES

S. A. Nersisyan^{a,b,#}, M. Yu. Shkurnikov^{a,b}, A. P. Zhiyanov^{a,b}, V. O. Novosad^{a,b}, and A. G. Tonevitsky^{a,b}

^a *Laboratory of microfluidic technologies for biomedicine, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^b *Faculty of Biology and Biotechnology, National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russian Federation*
[#]*e-mail: snersisyan@hse.ru*

In this manuscript we analyzed binding affinities of mutated peptides of Omicron strain variants BA.1–BA.5 and the worldwide prevalent HLA alleles. Bioinformatics analysis was conducted with the use of T-CoV web portal. We showed that for all five viral variants mutations cause a significant reduction in the number of tightly binding peptides for HLA-B*07: 02 and HLA-C*01: 02 molecules. At the same time, there were novel potential mutant epitopes (binding affinity less than 50 nM) in case of HLA-A*32: 01 allele. Interestingly, mutations caused multidirectional effect on the binding affinities of the viral peptides and HLA-DRB1*03: 01. Specifically, Spike protein mutations in BA.1 variant caused more than 100-fold decrease in PINLVRDLPGFSAL binding affinity, 10-fold decrease in affinity in the case of BA.2, BA.4, BA.5 variants, and 30% increase of affinity for the BA.3 variant.

Keywords: SARS-CoV-2, Omicron, HLA, peptide presentation, mutation, T-CoV