

УДК 616.92

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРОГНОЗА ТЕЧЕНИЯ COVID-19 С МУТАЦИЯМИ БЕЛКА NS8 SARS-COV-2 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ШТАММОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ВИРУСА

© 2022 г. М. Ю. Шкурников^{1,2,*}, Д. А. Аверинская¹, А. Г. Комаров³, И. А. Карбышев³, Г. И. Спешиллов³, И. А. Штинова³, Д. А. Дорошенко⁴, В. И. Вечорко⁴

Представлено академиком РАН С.И. Колесниковым

Поступило 08.08.2022 г.

После доработки 14.08.2022 г.

Принято к публикации 16.08.2022 г.

В середине 2021 г. штамм Дельта SARS-CoV-2 вызвал третью волну пандемии COVID-19. Огромные усилия были направлены на изучение влияния его мутаций на эффективность нейтрализующих антител. Значительно меньшее внимание было обращено на индивидуальные особенности презентации его пептидов молекулами главного комплекса гистосовместимости класса I (ГКГС-I). В данном исследовании была изучена взаимосвязь HLA-I генотипа пациентов в возрасте не старше 60 лет с тяжестью течения COVID-19, вызванной двумя наиболее распространенными летом 2021 г. вариантами штамма Дельта SARS-CoV-2: AY.122 и B.1.617.2. Анализ тяжести течения COVID-19 выявил более тяжелое течение заболевания, вызванного вариантом AY.122. Сравнение профиля мутаций двух наиболее распространенных вариантов штамма Дельта показал, что наибольший вклад в способность ГКГС-I презентировать пептиды вируса вносит мутация G8R в белке NS8. Учитывая, что белок NS8 способен подавлять созревание молекул ГКГС-I, появление мутации в одном из его иммуногенных эпитопов, могло внести весомый вклад в превалирование варианта AY.122 в российской популяции.

Ключевые слова: COVID-19, NS8, ORF8, HLA, ГКГС-I, AY.122, B.1.617.2

DOI: 10.31857/S2686738922060312

ВВЕДЕНИЕ

В середине 2021 г. штамм Дельта коронавируса SARS-CoV-2 вызвал третью волну пандемии COVID-19 в ряде стран мира, в том числе и в России [1]. Резкий рост заболеваемости был связан с высокой трансмиссивностью нового штамма по сравнению с альфа-вариантом [2]. Возрастание трансмиссивности во многом было обусловлено увеличением до 6 раз по сравнению со штаммом Альфа количества выдыхаемых на пике инфекции зараженным человеком вирусных частиц [3].

Дельта-вариант увеличил не только риск госпитализации по поводу COVID-19, но и риск смерти у непривитых пациентов [4]. Штамм Дельта активно мутировал, что привело к формированию подштаммов, значительно отличающихся по профилю мутаций [1]. Данное обстоятельство крайне важно, так как изменения аминокислотной последовательности белков SARS-CoV-2 значимо влияют на способность молекул главного комплекса гистосовместимости класса I (ГКГС-I) презентировать их на поверхности зараженной клетки [5].

Молекулы ГКГС-I являются одними из ключевых медиаторов первых звеньев развития специфического иммунного ответа на вирус SARS-CoV-2. Активная репликация и высвобождение вируса приводят к гибели зараженной клетки и поглощению ее остатков дендритными клетками и макрофагами. После фагоцитоза остатков погибших клеток и вирусных белков, содержащихся в них, дендритные клетки и макрофаги мигрируют в региональные лимфатические узлы и с помощью молекул ГКГС-I презентуют наивным цитотоксическим Т-лимфоцитам пептиды вируса

¹ НИУ Высшая школа экономики, Факультет биологии и биотехнологии, Москва, Россия

² Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

³ ГБУЗ «Диагностический центр (Центр лабораторных исследований) Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

⁴ ГБУЗ «Городская клиническая больница № 15 им. О.М. Филатова» Департамента здравоохранения, г. Москвы, Россия

*e-mail: mshkurnikov@hse.ru

SARS-CoV-2. В процессе презентации цитотоксические Т-лимфоциты получают сигнал активации и активно пролиферируют, образуя популяцию вирусоспецифических цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов (цТ-лимфоцитов) [6]. Активированные цТ-лимфоциты способны распознать зараженные вирусом SARS-CoV-2 клетки. Обнаружив на поверхности инфицированной клетки комплекс молекулы ГКГС-I и вирусного пептида, цТ-лимфоциты разрушают ее с помощью перфоринов и сериновых протеаз [7], тем самым прерывая размножение вируса.

Существует три основных типа молекул ГКГС-I, кодируемых генами HLA-A, HLA-B и HLA-C (от англ. Human Leukocyte Antigen). В геноме человека каждый ген может быть представлен в двух вариантах (аллелях), унаследованных от родителей. В популяции существуют десятки вариантов каждого аллеля, кодирующих молекулы ГКГС-I с индивидуальной способностью взаимодействовать с чужеродными пептидами. Индивидуальные комбинации молекул ГКГС-I существенно влияют на тяжесть многих инфекционных заболеваний [6].

За более чем два года пандемии COVID-19 накоплена значительная информация об особенностях формирования Т-клеточного иммунитета к COVID-19 [8]. Однако ассоциации HLA-генотипа и течения COVID-19 преимущественно анализировали по данным, относящимся к первой волне пандемии и исходному штамму вируса. Более того, при исследованиях ассоциаций и тяжести течения COVID-19 практически не учитывался возраст переболевших. Необходимо отметить, что возраст является значимым фактором в формировании иммунного ответа к COVID-19 [9]. В частности показано, что у людей старше 60 лет в значительной степени снижается длина теломер наивных Т-лимфоцитов, что приводит практически к десятикратному падению их способности к делению при активации [10], сокращается репертуар Т-клеточного рецептора [11].

Ранее на выборке пациентов первой волны нами было показано, что генотип HLA-I является значимым фактором риска тяжелого течения COVID-19 только у пациентов в возрасте не старше 60 лет [6]. В данном исследовании мы изучили взаимосвязь HLA-I генотипа пациентов в возрасте не старше 60 лет с тяжестью течения COVID-19, вызванной двумя наиболее распространенными летом 2021 г. вариантами штамма Дельта SARS-CoV-2: AY.122 и B.1.617.2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 45 пациентов, госпитализированных по поводу COVID-19 в августе 2021 г. Протокол исследования был одобрен

этическим комитетом ГБУЗ ГКБ № 15 им. О.М. Филатова ДЗМ. Все пациенты подписали информированное согласие.

Мазки из носо- и ротоглотки собирали в пробирки с транспортной средой. Для исследования образцов на наличие РНК SARS-CoV-2 применяли различные наборы реагентов для ОТ-ПЦР и комплектные к ним наборы для выделения РНК: ПОЛИВИР SARS-CoV-2 Express (ЛИТЕХ, Россия), АмплиПрайм SARS-CoV-2 DUO / МагноПрайм ФАКТ-Р (НекстБио, Россия) и SARS-CoV-2 “CoV-2-Тест” (ТестГен, Россия). Пригодными к секвенированию считали образцы с Ct менее 30.

Приготовление библиотек для секвенирования осуществляли с помощью панели праймеров и баркодов (“ДиаСистемс”, Россия). Панель праймеров содержала ген-специфические части из базы данных международного консорциума исследователей ARTIC network. Секвенирование осуществлялось на платформе Illumina MiSeq (Illumina) с использованием набора реагентов MiSeq 600 cycles v3, запускаемого в режиме чтения 2 × 250 п.о. Аннотирование последовательностей осуществлялось с применением баз данных Pango-lineage (версия 4.1.2) [12] и NextStain [13].

Определение HLA-генотипа осуществляли с помощью набора реагентов HLA-эксперт (ДНК-Технология, Россия), как описано ранее [6]. Анализ влияния мутаций на аффинность взаимодействия пептидов SARS-CoV-2 и молекул ГКГС-I осуществляли по протоколу T-CoV [14]. Последовательности белков подштаммов SARS-CoV-2 были получены из базы данных GISAID [15]: AY.122 (EPI_ISL_895058), B.1.617.2 (EPI_ISL_1315070).

Статистический анализ результатов осуществлялся в среде R с использованием критериев Вилкоксона и Хи-квадрат, а также точного теста Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В августе 2021 г. была сформирована выборка из 45 пациентов, госпитализированных со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19, проведено HLA-генотипирование и определена штаммовая принадлежность вируса SARS-CoV-2. Характеристика пациентов представлена в табл. 1. Секвенирование РНК, выделенной из мазков из носоглотки, позволило установить, что пациенты были инфицированы вариантами AY.122 и B.1.617.2 штамма Дельта SARS-CoV-2. По данным портала GISAID [15] выявленное нами соотношение вариантов SARS-CoV-2 характерно для московского региона в августе 2021 г. (отношение шансов 2.2, $p = 0.1$, 95% доверительный интервал 0.8–5.4).

Нам удалось установить, что тяжесть течения COVID-19 значительно различалась для больных вариантами AY.122 и B.1.617.2 (отношение шансов неопр., $p = 0.4$, 95% доверительный интервал 0.9 – неопр.). Мы проанализировали различия в профиле мутаций этих вариантов SARS-CoV-2 (рис. 1). В варианте AY.122 выявлено 12 мутаций: 6 мутаций в ORF1ab, две мутации во вспомогательных белках и четыре мутации в структурных белках. В свою очередь вариант B.1.617.2 несет 24 мутации: пять мутаций в ORF1ab, пять мутаций во вспомогательных белках и 14 мутаций в структурных белках. Необходимо отметить, что два варианта SARS-CoV-2 объединяют только две мутации: D614G в спайк-белке и P323L в РНК-зависимой РНК полимеразе из ORF1ab. Обе эти мутации закрепились в геноме SARS-CoV-2 еще в начале 2020 г. и ассоциированы с тяжестью течения COVID-19 [16]. Учитывая, что подавляющее большинство мутаций в вариантах вируса различаются, мы проанализировали их влияние на способность молекул ГКГС-I взаимодействовать с мутантными пептидами каждого варианта.

HLA-генотипирование пациентов показало, что наиболее частыми аллелями в выборке были HLA-A*02:01 (частота 0.26) и HLA-A*01:01 (частота 0.25), что характерно для популяции московского региона [6]. Малый объем выборки не позволил выявить взаимосвязи гаплотипов и отдельных аллелей с тяжестью течения COVID-19 для анализируемых вариантов SARS-CoV-2. Тем не менее был оценен индекс риска тяжелого течения COVID-19 [6], отражающий интегральную способность индивидуального набора молекул ГКГС-I презентировать пептиды SARS-CoV-2 (рис. 2, панель А). Различия в индексе риска между пациентами, переболевшими вариантом AY.122 в среднетяжелой и тяжелой форме, оказались недостоверными ($p = 0.47$). Однако можно отметить тенденцию к более высокому индексу риска у пациентов с тяжелым течением.

Анализ влияния мутаций на число вирусных пептидов, взаимодействующих с индивидуальным набором молекул ГКГС-I с аффинностью

Таблица 1. Характеристика выборки пациентов с COVID-19

Показатель	Вариант AY.122	Вариант B.1.617.2	<i>p</i>
<i>n</i>	37	8	
Возраст, медиана [25–75%]	35 [32–46]	45 [35–51.8]	0.26
Пол (муж./жен.)	10/27	1/7	0.65
Тяжесть			0.04
Средняя	14	8	
Тяжелая	23	0	
Максимальная степень поражения легких по КТ			0.37
КТ-0	3	0	
КТ-1	10	4	
КТ-2	5	1	
КТ-3	9	0	
КТ-4	3	0	
н.д.	7	3	
Исход			1
Летальный	1	0	
Выписан	36	8	
Диабет	8	2	1
Ожирение	7	1	1
Гипертония	8	2	1

менее 50 нМоль, показал что, различия достоверны для вспомогательных белков вируса (рис. 2, панель Б). Так, у инфицированным вариантом AY.122 число высокоаффинных пептидов значительно сократилось по сравнению с инфицированными вариантом B.1.617.2 ($p < 0.01$).

Значимое снижение числа высокоаффинных пептидов в варианте AY.122 прежде всего связано с мутацией G8R в белке NS8. Данная мутация вызывает падение аффинности взаимодействия пептидов FLGIITTV и FLVFLGIITTV с молекулой ГКГС-I, кодируемой наиболее частой для на-

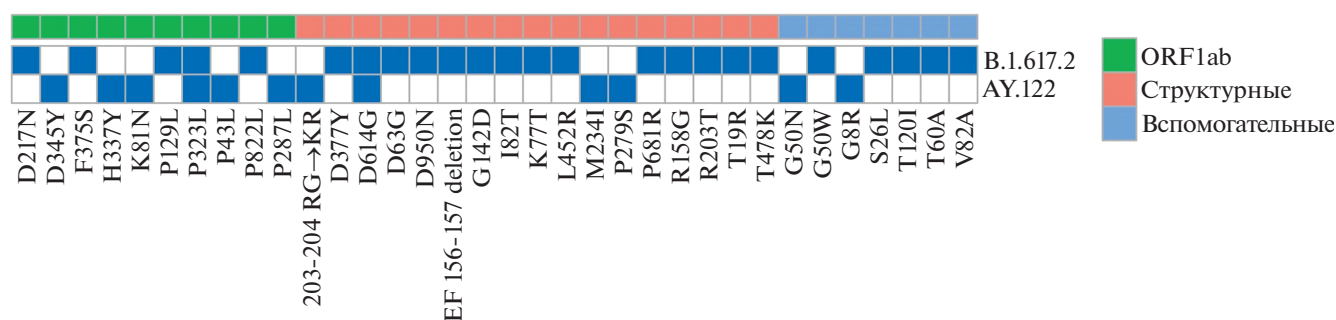


Рис. 1. Профиль мутаций в вариантах AY.122 и B.1.617.2 SARS-CoV-2.

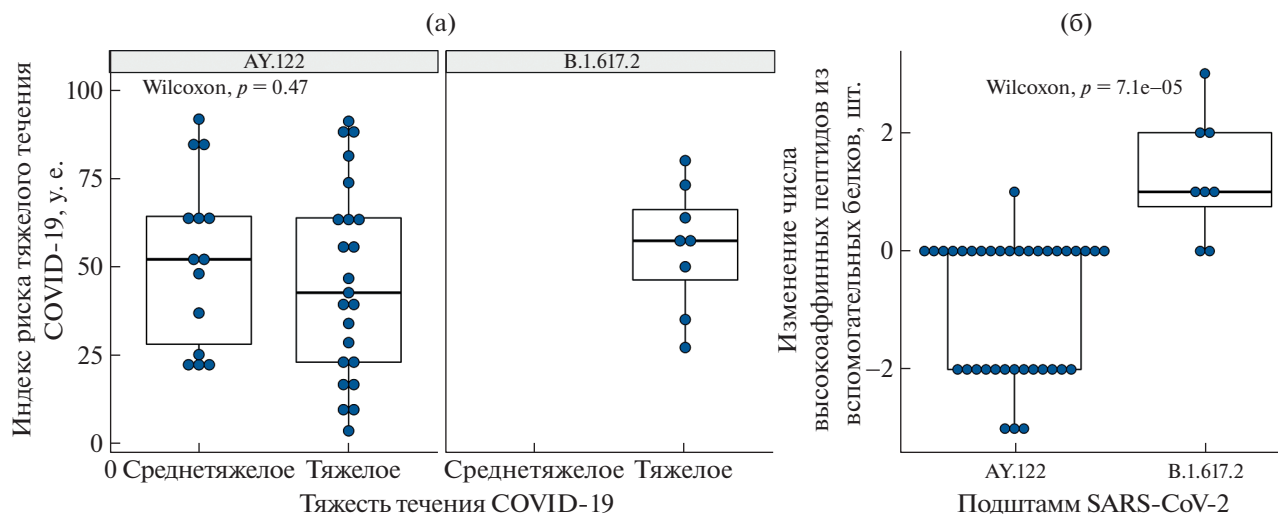


Рис. 2. Панель а — взаимосвязь индекса риска тяжелого течения COVID-19 с фактическим течением заболевания. Панель б — влияние мутаций во вспомогательных белках вариантов AY.122 и B.1.617.2 на аффинность их взаимодействия с индивидуальным набором молекул ГКГС-I.

шей популяции аллелью HLA-A*02:01. Ранее была показана иммуногенность пептида FLGIITTV у пациентов, переболевших COVID-19 [17]. Особого внимания заслуживает тот факт, что белок NS8 (ORF8) способен подавлять созревание молекул ГКГС-I и их транслокацию на поверхность зараженной клетки [18, 19]. Данные обстоятельства могли внести весомый вклад в превалирование варианта AY.122 в российской популяции и более тяжелое, по сравнению с другими вариантами штамма Дельта, течение COVID-19, вызванной им. Предлагаемый подход к анализу мутаций на уровне вариантов SARS-CoV-2 представляется очень важным, так как SARS-CoV-2 продолжает активно мутировать.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Анализ взаимосвязи индекса риска тяжелого течения COVID-19, основанного на аффинности взаимодействия молекул ГКГС-I с пептидами вируса, с фактическим течением заболевания позволяет отметить тенденцию к более высокому индексу риска у пациентов с тяжелым течением.

2. Анализ влияния мутаций во вспомогательных белках штаммов AY.122 и B.1.617.2 на аффинность их взаимодействия с индивидуальным набором молекул ГКГС-I объясняет превалирование AY.122 в российской популяции и более тяжелое, по сравнению с другими штаммами Дельта, течение COVID-19, вызванной им.

3. Настоящее исследование демонстрирует дополнительные возможности эпидемиологического мониторинга имеющей очевидную тенденцию к активному распространению и выраженной изменчивости коронавирусной инфекции SARS-CoV-2.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Все авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках реализации программы ДЗМ “Научное обеспечение столичного здравоохранения на 2020–2022 гг.”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klink G., Safina K.R., Nabieva E., et al. The rise and spread of the SARS-CoV-2 AY.122 lineage in Russia // *Virus Evolution*. 2022. V. 8. № 1.
2. Callaway E. Delta coronavirus variant: scientists brace for impact // *Nature*. 2021. V. 595. № 7865. P. 17–18.
3. Earnest R., Uddin R., Matluk N., et al. Comparative transmissibility of SARS-CoV-2 variants Delta and Alpha in New England, USA // *Cell Reports Medicine*. 2022. V. 3. № 4. P. 100583.
4. Bast E., Tang F., Dahn J., et al. Increased risk of hospitalisation and death with the delta variant in the USA // *The Lancet Infectious Diseases*. 2021. V. 21. № 12. P. 1629–1630.
5. Nersisyan S., Zhiyanov A., Zakharova M., et al. Alterations in SARS-CoV-2 Omicron and Delta peptides presentation by HLA molecules // *PeerJ*. 2022. V. 10. P. e13354.
6. Shkurnikov M., Nersisyan S., Jankevic T., et al. Association of HLA Class I Genotypes With Severity of Coronavirus Disease-19 // *Frontiers in Immunology*. Frontiers, 2021. V. 12. P. 641900.
7. Wherry E.J., Ahmed R. Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection // *Journal of Virology*. 2004. V. 78. № 11. P. 5535–5545.
8. Titov A., Shaykhutdinova R., Shcherbakova O.V., et al. Immunogenic epitope panel for accurate detection of

- non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2 // JCI Insight. 2022. V. 7. № 9.
9. Sanchez-Vazquez R., Guío-Carrión A., Zapatero-Gaviria A., et al. Shorter telomere lengths in patients with severe COVID-19 disease // Aging. 2021. V. 13. № 1. P. 1–15.
 10. Anderson J.J., Susser E., Arbeev K.G., et al. Telomere-length dependent T-cell clonal expansion: A model linking ageing to COVID-19 T-cell lymphopenia and mortality // eBioMedicine. 2022. V. 78. P. 103978.
 11. Britanova O., Putintseva E., Shugay M., et al. Age-Related Decrease in TCR Repertoire Diversity Measured with Deep and Normalized Sequence Profiling // The Journal of Immunology. 2014. V. 192. № 6. P. 2689–2698.
 12. O’Toole Á., Scher E., Underwood A., et al. Assignment of Epidemiological Lineages in an Emerging Pandemic Using the Pangolin Tool // Virus Evolution. 2021.
 13. Hadfield J., Megill C., Bell S.M., et al. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution // Bioinformatics. 2018. V. 34. № 23. P. 4121–4123.
 14. Nersisyan S., Zhiyanov A., Shkurnikov M., et al. T-CoV: a comprehensive portal of HLA-peptide interactions affected by SARS-CoV-2 mutations // Nucleic Acids Research. 2022. V. 50. № D1. P. D883–D887.
 15. Elbe S., Buckland-Merrett G. Data, disease and diplomacy: GISAID’s innovative contribution to global health // Global Challenges. 2017. V. 1. № 1. P. 33–46.
 16. Biswas S.K., Mudi S.R. Spike protein D614G and RdRp P323L: the SARS-CoV-2 mutations associated with severity of COVID-19 // Genomics & Informatics. 2020. V. 18. № 4. P. e44.
 17. Saini S.K., Hersby D.S., Tamhane T., et al. SARS-CoV-2 genome-wide T cell epitope mapping reveals immunodominance and substantial CD8+ T cell activation in COVID-19 patients. // Sci Immunol. 2021. V. 6. № 58.
 18. Zhang Y., Chen Y., Li Y., et al. The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2021. V. 118. № 23.
 19. Matsuoka K., Imahashi N., Ohno M., et al. SARS-CoV-2 accessory protein ORF8 is secreted extracellularly as a glycoprotein homodimer // Journal of Biological Chemistry. 2022. V. 298. № 3. P. 101724.

RELATIONSHIP OF COVID-19 SEVERITY WITH SARS-COV-2 NS8 PROTEIN MUTATIONS DEPENDED ON VIRUS STRAIN

M. Yu. Shkurnikov^{a,b,#}, D. A. Averinskaya^a, A. G. Komarov^c, I. A. Karbyshev^c, G. I. Speshilov^c, I. A. Shtinova^c, D. A. Doroshenko^d, and V. I. Vechorko^d

^a Faculty of Biology and Biotechnology, HSE University, Moscow, Russian Federation

^b Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^c Moscow City Public Institution of Health Care Diagnostic Center (Laboratory Testing Center) of Moscow Health Department, Moscow, Russian Federation

^d Moscow City Public Institution of Health Care O.M. Filatov City Clinical Hospital of Moscow Health Department, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: mshkurnikov@hse.ru

Presented by Academician of the RAS S.I. Kolesnikov

In mid-2021, the Delta strain of SARS-CoV-2 caused the third wave of the COVID-19 pandemic. The pivotal studies were aimed at studying changes in the efficiency of neutralizing antibodies to the spike protein. However, much less attention was paid to the T-cell response and the presentation of virus peptides by MHC-I molecules. In this study, we compared the features of the HLA-I genotype in symptomatic patients below the age of 60 years, and the severity of COVID-19 caused by the two most common lineages of the SARS-CoV-2 Delta strain in the summer of 2021: AY.122 and B.1.617.2. Analysis of the COVID-19 severity revealed a more severe course of the disease caused by the AY.122 lineage. Furthermore, a comparison of the mutation profile of the two most common lineages of the Delta strain showed that the G8R mutation in the NS8 protein makes the most significant contribution to the ability of MHC-I to present viral peptides. Given that the NS8 protein can suppress the maturation of MHC-I molecules, the appearance of a mutation in one of its immunogenic epitopes could significantly contribute to the prevalence of the AY.122 variant in the Russian population.

Keywords: COVID-19, NS8, ORF8, HLA, ГКГС-I, AY.122, B.1.617.2