

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-217

**ВЛИЯНИЕ АДАПТИВНЫХ МУТАЦИЙ НА АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА
БЕЛКА НУКЛЕОКАПСИДА SARS-COV-2****THE IMPACT OF ADAPTIVE MUTATIONS ON THE ANTIGENIC PROPERTIES
OF THE SARS-COV-2 NUCLEOCAPSID PROTEIN**

А. Я. Рак, П. И. Прокопенко, В. В. Музурова, И. Н. Исакова-Сивак

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

A. Ya. Rak, P. I. Prokopenko, V. V. Muzurova, I. N. Isakova-Sivak

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg

✉ alexandrak.bio@gmail.com

Аннотация

Различный характер гуморальных иммунных ответов, индуцируемых иммунизацией рекомбинантными белками нуклеокапсида (N) SARS-CoV-2 вариантов B.1, B.1.1.529 и содержащих адаптивные мутации P13L, R203K и G204R, свидетельствует о роли этих аминокислотных замен в моделировании антигенных свойств N-компонента в процессе вирусной эволюции.

Abstract

The different pattern of humoral immune responses induced by immunization with recombinant nucleocapsid (N) proteins of SARS-CoV-2 variants B.1, B.1.1.529 and bearing adaptive mutations P13L, R203K and G204R indicates the role of these amino acid substitutions in modeling the antigenic properties of the N component during viral evolution.

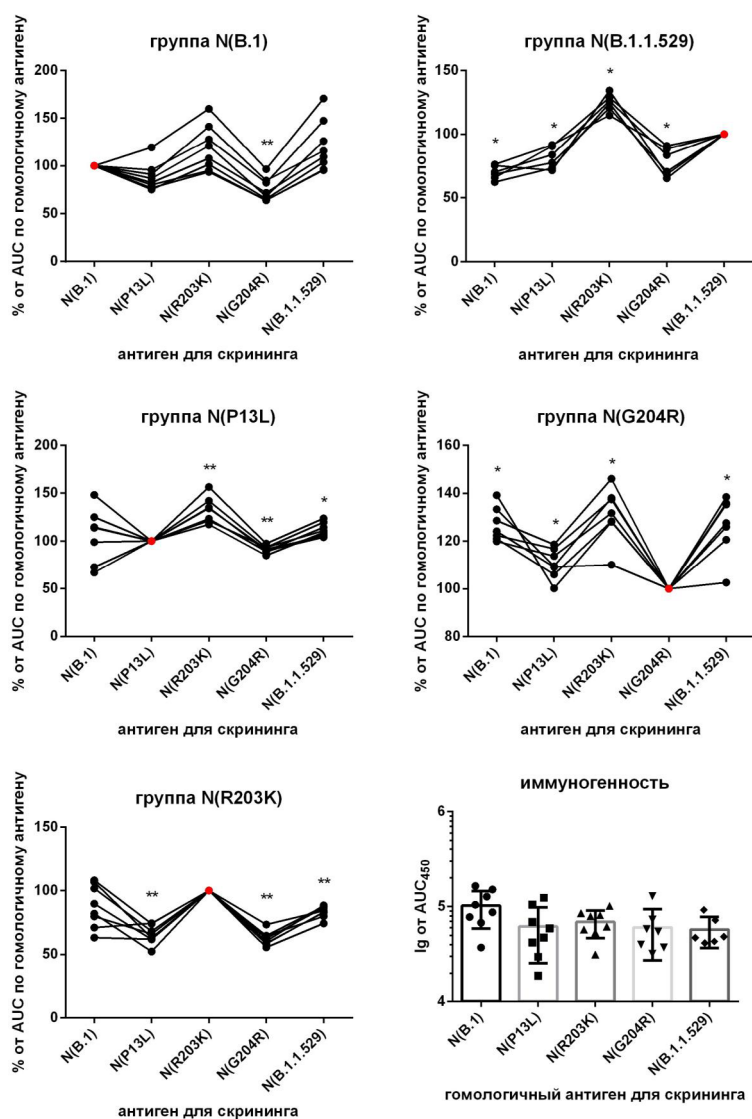
На сегодняшний день в мире зарегистрировано более чем 704 млн случаев заражения SARS-CoV-2, и с появлением все новых штаммов коронавируса это число продолжает расти. Эффективная борьба с распространением инфекции COVID-19 невозможна без понимания молекулярных механизмов ее прогрессии, а также в отсутствие высокоспецифичных этиотропных средств терапии и вакцинопрофилактики.

Ввиду значительной изменчивости поверхностных антигенов коронавируса в последние годы усилия исследователей направлены на создание универсальной вакцины против COVID-19 на основе наиболее консервативного компонента SARS-CoV-2. Одним из них является белок нуклеокапсида, или нуклеопротеин (N), — основной антиген вирионов, активно синтезируемый зараженными клетками и вызывающий интенсивную выработку противовирусных антител при COVID-19. Этот антиген также служит одной из главных мишеней противовирусного Т-клеточного иммунного ответа, что делает целесообразной разработку на его основе универсальных рекомбинантных вакцин против COVID-19. Несмотря на то что антитела против N-белка не обладают нейтрализующей активностью, они могут обеспечивать противовирусную защиту, выполняя функцию активаторов реакций врожденного иммунитета — каскада комплемента или антитело-опосредованного клеточного фагоцитоза/цитотоксичности.

Несмотря на достаточно высокую степень консервативности, N-белок также подвержен медленным эволюционным изменениям. Их адаптивность, т. е. появление в антигенном репертуаре вируса под давлением иммунного ответа хозяина, может повлиять на антигенные свойства N-компонента, но до сих пор остается неизученной. Подобные исследования представляются весьма актуальными как с точки зрения разработки кросс-протективных вакцин, так и для оценки релевантности существующих диагностических тест-систем, подразумевающих использование рекомбинантного N-белка предкового штамма коронавируса в качестве антигена.

В течение первых двух лет пандемии (2019–2020 гг.) комбинация R203K/G204R была основной выявляемой аминокислотной заменой (37 %) в N-белке SARS-CoV-2. В свою очередь, представляет интерес и аминокислотная замена P13L/S, расположенная в иммунодоминантной области-мишени для Т-клеток с фенотипом центральной и эффекторной памяти. Упомянутые мутации уникальны для SARS-CoV-2 линий B.1.351, P.1, B.1.617.2 и B.1.1.529, и их можно рассматривать в качестве эскап-вариаций, появившихся в вирусном геноме в результате уклонения от иммунного ответа хозяина и потенциально способных повлиять на антигенность N-белка.

Цель работы — исследовать кросс-специфичность анти-N-антител, выработанных к рекомбинантным нуклеопротеинам эволюционно отдаленных вариантов B.1 (Wuhan), B.1.1.529 (Omicron), а также к содержащим



Относительная специфичность анти-N-антител по отношению к гомологичным и гетерологичным антигенам и иммуногенность пяти вариантов рекомбинантных N-белков.

AUC — площадь под кривой OD_{450} , ** — $p < 0,01$, * — $p < 0,05$

«промежуточные» аминокислотные замены в положениях P13L, R203K, G204R.

Для проведения исследования полноразмерные рекомбинантные гистаг-содержащие N-антигены коронавируса были экспрессированы в клетках E.Coli BL21(DE3), очищены методом металл-аффинной хроматографии, а также масс-спектрометрически и иммунохимически идентифицированы. Далее их использовали для трехкратной иммунизации мышей линии BALB/c (внутрибрюшинно, 15 мкг/животное с двухнедельным интервалом) в комплексе с адьювантом (гидроксидом алюминия, 1 : 3), а также в качестве подложки в иммуноферментном анализе в концентрации 2 мкг/мл для скрининга полученных гипериммунных мышинных анти-N сывороток.

Несмотря на выраженную кросс-реактивность выработанных у мышей анти-N-антител и сходную иммуногенность белков, сродство N-специфических антител в отношении гетерологичных антигенов существенно различалось (см. рисунок). В частности, иммунизация животных различными мутантными N приводила к формированию антител, преимущественно распознающих белок с мутацией R203K и наименее активно — с заменой G204R. Эти факты хорошо согласуются с тандемным характером появления данных замен в процессе вирусной эволюции и представлениями о моделирующей антигенные свойства роли медленно появляющихся в иммуногенных эпитопах N аминокислотных замен (адаптивных мутаций).

Полученные результаты свидетельствуют о неодинаковой специфичности гуморальных иммунных ответов, индуцируемых N-антигеном различных ва-

риантов коронавируса, несмотря на его общий консерватизм, что необходимо учитывать при разработке новых тест-систем и прототипов универсальных вакцин.