

РЕКОНВАЛЕСЦЕНТЫ COVID-19 ИМЕЮТ ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ К БЕЛКУ Е ОБОЛОЧКИ ВИРУСА SARS-COV-2

Е.А. Орлова*, И.Г. Кондратов, О.Б. Огарков

ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»
664003, Российская Федерация, Иркутск, ул. Тимирязева, 16

Получен продуцент рекомбинантного белка Е оболочки вируса SARS-CoV-2 и разработана система его экспрессии и очистки в растворимой форме. Методом ИФА подтверждены его антигенные свойства. У реконвалесцентов COVID-19 статистически значимо повышен уровень иммуноглобулинов класса G к белку Е в сравнении с контрольной группой пациентов.

Ключевые слова: COVID-19, рекомбинантный белок Е, гуморальный иммунитет

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Источник финансирования: грант ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ «Молодёжный проект года».

Для цитирования: Орлова Е.А., Кондратов И.Г., Огарков О.Б. Реконвалесценты COVID-19 имеют гуморальный иммунитет к белку Е оболочки вируса SARS-CoV-2. *Биомедицина*. 2022;18(3):32–36. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-3-32-36>

Поступила 11.04.2022

Принята после доработки 18.04.2022

Опубликована 10.09.2022

COVID-19 CONVALESCENTS EXHIBIT HUMORAL IMMUNITY TO SARS-COV-2 ENVELOPE (E) PROTEIN

Elizaveta A. Orlova*, Ilya G. Kondratov, Oleg B. Ogarkov

Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems
664003, Russian Federation, Irkutsk, Timiryazeva Str., 16

In this work, we obtain a producer of the recombinant SARS-CoV-2 E protein and develop a system for its expression and purification in a soluble form. ELISA confirmed its antigenic properties. In COVID-19 convalescents, the level of IgG against the E protein was significantly increased in comparison with the control group of patients.

Keywords: COVID-19, recombinant protein E, humoral immunity

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: grant of the FSBSI SC FHHRP “Youth Project of the Year”.

For citation: Orlova E.A., Kondratov I.G., Ogarkov O.B. COVID-19 Convalescents Exhibit Humoral Immunity to SARS-COV-2 Envelope (E) Protein. *Journal Biomed.* 2022;18(3):32–36. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-3-32-36>

Submitted 11.04.2022

Revised 18.04.2022

Published 10.09.2022

Введение

Причины высокой вирулентности и иммуногенности SARS-CoV-2, обусловленные молекулярными особенностями вируса, не до конца понятны, несмотря на многочисленные исследования патогенеза COVID-19 и роли в нём гликопротеина S. В то же время за рамками глобальных исследований остаётся вирусный белок Е, составляющий оболочку вириона, но выполняющий более важные функции внутри инфицированной клетки, показанные для других представителей семейства *Coronaviridae*, но не до конца изученные в патогенезе.

Особенностью белка Е SARS-CoV-2 является структурная гомология его антигенных детерминант с эпитопами других патогенов и/или аутоантигенов. Высокое сходство трансмембранной области белка Е SARS-CoV-2 с последовательностью LysR-домена туберкулин-подобных белков микобактерий [4] может лежать в основе перекрёстного иммунитета против вируса SARS-CoV-2, вызванного туберкулёзной инфекцией [2], и объяснять наблюдаемое защитное действие вакцины БЦЖ [3]. Противоречивые результаты получены относительно оценки популяционного гуморального иммунитета к белку Е [1, 5].

Данная работа направлена на создание продуцента рекомбинантного белка Е оболочки вируса SARS-CoV-2, разработку методики его экспрессии и очистки в растворимой форме для дальнейших исследований его роли в патогенезе COVID-19, в т. ч. в формировании гуморального иммунитета.

Материалы и методы

Источником нуклеотидной последовательности гена Е послужил штамм вируса SARS-CoV-2, полученный в ходе обследования населения Иркутской области на поражённость вирусом SARS-CoV-2. В работе использовали экспрессионные векторы pET15b, pET22b(+), pGAT2 и pTYB12; бак-

териальные штаммы *E. coli* XL1-blue и B834(DE3).

Выделение РНК вируса SARS-CoV-2 проводили набором TRIzol LS («Thermo Fisher», США). Реакцию обратной транскрипции проводили набором «РЕБЕРТА-L» («Интерлабсервис», Россия). Целевой фрагмент генома амплифицировали с праймерами со встроенными сайтами рестрикции. Кодировующую область гена Е клонировали в экспрессионные векторы. Полученными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* (XL1-blue), корректность ДНК-вставки оценивали секвенированием по Сэнгеру.

Рекомбинантную плазмиду субклонировали в экспрессионный штамм *E. coli* (B834(DE3)). Индукцию штамма-продуцента проводили в 100 мл LB с 0,1 мМ IPTG в течение 18 ч при 25 °С. Наличие рекомбинантного белка в растворимой фракции клеточного лизата анализировали при помощи электрофореза в 15% ПААГ с 0,1% SDS. Рекомбинантный растворимый белок, клонированный в вектор pTYB12, очищали с помощью аффинной хроматографии на Chitin Beads (ИПАКТ, NEB) по протоколу производителя. Элюированный белок подвергали двухэтапной ультрафильтрации через микроконцентраторы «Центрикон»: для очистки от примесей интеина с помощью «Центрикон-30» и для концентрирования белка Е с помощью «Центрикон-10». Концентрацию белка определяли по стандартной методике Брэдфорд. Степень очистки полученного белка оценивали с помощью ПААГ-электрофореза, как описано выше.

ИФА для определения IgG к белку Е проводили, сенсибилизируя лунки планшета 200 нг рекомбинантного белка Е на лунку в 0,1 М NaHCO₃ в течение ночи при 4 °С. Лунки блокировали 2% р-ром сухого молока и последовательно инкубировали с образцами плазмы крови человека, разбавленными в соотношении 1:10 PBS,

с конъюгатом антител против IgG человека, меченными пероксидазой хрена («Вектор-Бест», Россия), с р-ром тетраметилбензидина («Вектор-Бест», Россия). Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм. ИФА для количественного определения IgG к белку S SARS-CoV-2 проводили с помощью набора «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест», Россия) по протоколу производителя.

Обработку данных проводили с помощью программы Past. Значимость различий оценивали с помощью критерия Манна–Уитни с учётом нормальности выборок, определяемой по критерию Шапиро–Уилка, различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследований

Для сборки рекомбинантных конструкций, кодирующих белок E, изначально были выбраны 4 коммерческих вектора — pET15b, pET22b(+), pGAT2 и pTYB12, которые отличаются типом белковой метки, экспрессируемой в единой рамке считывания с целевым белком. Первые два вектора кодируют короткий 6×His-tag на N- и C-концах белка соответственно, pGAT2 — белок глутатион-S-трансферазу и сайт для разрезания тромбином для удаления метки, pTYB12 — интеин с аутосплайсинговой активностью и хитин-связывающим доменом. При анализе продуктов экспрессии не было выявлено индукции синтеза рекомбинантных белков в векторах pET15b и pET22b(+). Несмотря на индукцию целевых продуктов в векторе pGAT2, белок накапливался в нерастворимой форме (данные не представлены). Индукция рекомбинантного белка E в векторе pTYB12 приводила к синтезу гибридного белка интеин-EP в растворимой форме с предсказанной молекулярной массой прекурсора ~67 кДа (рис. 1, дорожка 1).

Рекомбинантный белок интеин-EP из клеточного супернатанта штамма-продуцента очищали аффинной хроматогра-

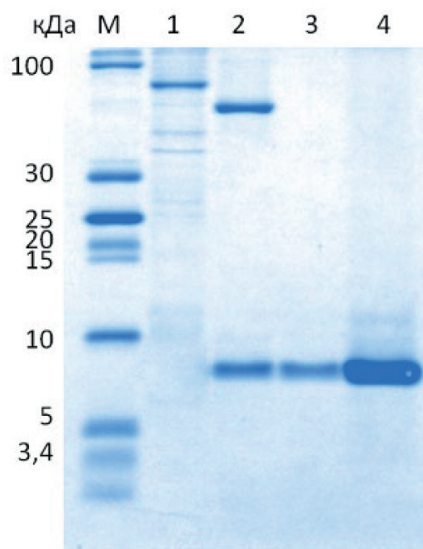


Рис. 1. Анализ белка E с помощью ПААГ-электрофореза.

Примечание: M — белковые маркеры. Дорожки: 1 — гибридный белок интеин-EP (MW 67 кДа); 2 — аутосплайсинг белка при добавлении DTT, ON +4 °C (MW интеина 58,4 кДа, EP 8,6 кДа); 3 — белок E, очищенный от примесей интеина с помощью «Центрикон-30»; 4 — белок E, сконцентрированный с помощью «Центрикон-10».

Fig. 1. Analysis of the E protein using PAAG electrophoresis.

Note: M — protein markers. Lanes: 1 — intein-EP fusion protein (MW 67 kDa); 2 — protein autosplicing with the addition of DTT, ON +4°C (intein MW 58.4 kDa, EP 8.6 kDa); 3 — E protein, purified from intein impurities using «Centricon-30»; 4 — E protein, concentrated using «Centricon-10».

фией, используя систему IMPACT. В ходе протеинового аутосплайсинга гибридный белок, вероятно, менял свою конформацию и утрачивал аффинные свойства хитин-связывающего домена, поскольку мы наблюдали его элюцию с сорбента вместе с белком E (рис. 1, дорожка 2). Чтобы очистить целевой белок от загрязнения интеином, его подвергали двухэтапной ультрафильтрации через микроконцентраторы «Центрикон»: 1-й этап — очистка от примесей интеина с помощью «Центрикон-30» (рис. 1, дорожка 3); 2-й этап — концентрация белка E

с помощью «Центрикон-10» (рис. 1, дорожка 4). Выход целевого белка Е составил в среднем 200 мкг/л культуры.

Для измерения количества IgG в плазме крови человека проводили непрямой вариант качественного ИФА с использованием полученного рекомбинантного белка Е. Исследование проводили на двух группах: здоровые доноры, не имевшие COVID-19 в анамнезе и с отрицательными значениями IgG к белку S SARS-CoV-2 (19 пациентов), и реконвалесценты COVID-19 с положительными значениями IgG к белку S SARS-CoV-2 (67 пациентов). По результатам ИФА мы впервые наблюдали реактивность образцов плазмы крови пациентов к полученному рекомбинантному белку. При сравнении реактивности образцов плазмы крови, полученных от двух групп пациентов, мы обнаружили статистически достоверную разницу в уровне IgG, специфичных к белку Е SARS-CoV-2, у контрольной здоровой группы и реконвалесцентов COVID-19 ($p=0,03$) (рис. 2).

Выводы

Рекомбинантный белок Е вируса SARS-CoV-2, экспрессированный в системе интеин-опосредованной индукции и очистки, структура которого верифицирована секвенированием рекомбинантной плазмиды, имеет антигенные свойства, подтвержден-

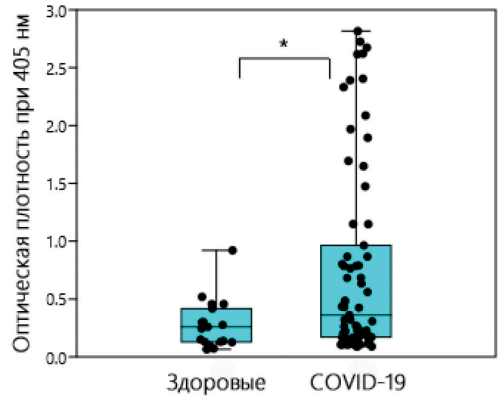


Рис. 2. Уровни IgG, реактивных к белку Е SARS-CoV-2, в плазме крови у здоровых доноров и реконвалесцентов COVID-19.

Примечание: * — разница между контрольной и COVID-19 группами статистически значима в непараметрическом тесте Манна – Уитни.

Fig. 2. Plasma levels of IgG reactive to SARS-CoV-2 E protein in healthy COVID-19 donors and convalescents. **Note:** * — difference between the control and COVID-19 groups is statistically significant in the non-parametric Mann – Whitney test.

ные ИФА. Разработанная методика получения растворимого рекомбинантного белка Е позволяет использовать его для дальнейшего изучения потенциальной биологической активности. Анализ популяционного иммунитета (IgG) к белку Е SARS-CoV-2 позволил выявить достоверные различия между группами здоровых и переболевших COVID-19 пациентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Chang S.E., Feng A., Menget W., Apostolidis S.A., Mack E., Artandi M., Barman L., Bennett K., Chakraborty S., Chang I., Cheung P., Chinthrajah S., Dhingra S., Do E., Finck A., Gaano A., Gefner R., Giannini H.M., Gonzalez J., Greib S., Gündisch M., Hsu A.R., Kuo A., Manohar M., Mao R., Neeli I., Neubauer A., Oniyide O., Powell A.E., Puri R., Renz H., Schapiro J., Weidenbacher P.A., Wittman R., Ahuja N., Chung H.R., Jagannathan P., James J.A., Kim P.S., Meyer N.J., Nadeau K.C., Radic M., Robinson W.H., Singh U., Wang T.T., Wherry E.J., Skevaki C., Luning Prak E.T., Utz P.J. New-onset IgG autoantibodies in hospitalized patients with COVID-19. *Nat. Commun.* 2021;12(1):e5417. DOI: 10.1038/s41467-021-25509-3.
2. Madan M., Pahuja S., Mohanet A., Pandey R.M., Madan K., Hadda V., Tiwari P., Guleria R., Mittal S. TB infection and BCG vaccination: Are we protected from COVID-19? *Public Health.* 2020;185:91–92. DOI: 10.1016/j.puhe.2020.05.042.
3. Netea M.G., Giamarellos-Bourboulis E.J., Domínguez-Andrés J., Curtis N., van Crevel R., van de Veerdonk F.L., Bonten M. Trained immunity: A tool for reducing susceptibility to and the severity of SARS-CoV-2 infection. *Cell.* 2020;181(5):969–977. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.042.

4. Nuovo G., Tili E., Suster D., Matys E., Hupp L., Magro C. Strong homology between SARS-CoV-2 envelope protein and a Mycobacterium sp. antigen allows rapid diagnosis of Mycobacterial infections and may provide specific anti-SARS-CoV-2 immunity via the BCG vaccine. *Ann. Diagn. Pathol.* 2020;48:151600. DOI: 10.1016/j.anndiag-path.2020.151600.
5. Szymczak A., Jędruchiewicz N., Torelli A., Kaczmarzyk-Radka A., Coluccio R., Kłak M., Konieczny A., Ferenc S., Witkiewicz W., Montomoli E., Miernikiewicz P., Bąchor R., Dąbrowska K. Antibodies specific to SARS-CoV-2 proteins N, S and E in COVID-19 patients in the normal population and in historical samples. *J. Gen. Virol.* 2021;102(11):001692. DOI: 10.1099/JGV.0.001692.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Орлова Елизавета Андреевна*, ФГБНУ
«Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»;
e-mail: elizaveta.a.orlova@gmail.com

Elizaveta A. Orlova*, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems;
e-mail: elizaveta.a.orlova@gmail.com

Кондратов Илья Геннадьевич, к.б.н., ФГБНУ
«Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»;
e-mail: kondratovig@mail.ru

Ilya G. Kondratov, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems;
e-mail: kondratovig@mail.ru

Огарков Олег Борисович, д.м.н., ФГБНУ
«Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»;
e-mail: obogarkov@mail.ru

Oleg B. Ogarkov, Dr. Sci. (Med.), Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems;
e-mail: obogarkov@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author