

А.К. Бисенева\*, Г.П. Погосян, К.Г. Ли

*Карагандинский университет имени академика Е.А. Букетова, Караганда, Казахстан**\*Автор для корреспонденции: biseneva.anar@gmail.com*

## Ассоциация полиморфизма rs12329760 гена TMPRSS2 с коронавирусной инфекцией

В статье представлены результаты генотипирования образцов ДНК, полученных от участников исследования с установленным статусом коронавирусной инфекции с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), по однонуклеотидному полиморфизму rs12329760 (С/Т) гена TMPRSS2. Генотипирование осуществлялось методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием методики «Аmplification refractory mutation system». Проанализировано распределение частот генотипов и аллелей rs12329760 С>Т гена TMPRSS2 у 80 людей экспериментальной и контрольной групп. Обнаружено наличие значимости однонуклеотидного полиморфизма rs12329760 гена TMPRSS2 в гомозиготном состоянии и гетерозиготном (СТ) и об отсутствии значимости генотипа ТТ. Обнаружено статистически значимое отличие распределения аллели Т.

*Ключевые слова:* SARS-CoV-2, TMPRSS2, COVID-9, SNP, однонуклеотидный полиморфизм, ген, восприимчивость.

### Введение

Коронавирусы — это вирусы, содержащие одноцепочечную (+) РНК, которые таксономически относятся к семейству *Coronaviridae* и подсемейству *Coronavirinae* [1]. Это оболочечные вирусы, имеющие сферическую, овальную или плеоморфную форму. S-белки коронавирусов представляют собой коронообразные шипы на внешней поверхности вируса с этим связано их название. Подсемейство можно разделить на четыре рода: Alpha-, Beta-, Gamma- и Deltacoronavirus,  $\alpha$ -CoVs и  $\beta$ -CoVs, в основном, заражают млекопитающих, тогда как  $\gamma$ -CoVs и  $\delta$ -CoVs преимущественно заражают птиц [2, 3]. SARS-CoV-2 относится к  $\beta$ -коронавирусам, которые имеют четыре линии (А–D) с SARS-CoV, а также SARS-CoV-2, принадлежащие к линии В, которая содержит примерно 200 секвенированных вирусных геномов [4].

Чтобы иметь возможность инфицировать, вирус должен сначала связываться с поверхностью хозяина и впоследствии инициировать сложный механизм проникновения. Для  $\beta$ -коронавирусов взаимодействие с клеткой-хозяином включает присоединение вирусного спайкового белка (S) к специфическому рецептору ангиотензинпревращающему ферменту 2 (ACE2) клетки-хозяина [5] с последующим опосредованным трансмембранной сериновой протеазой 2 (TMPRSS2) расщеплением S-белка для дальнейшего проникновения вируса в клетку-хозяина [4, 6]. Структурный анализ S-белка с помощью криогенной электронной микроскопии показал, что это тримерный белок, каждый из которых содержит две функциональные субъединицы: S1 и S2. Субъединица S1 необходима для распознавания рецепторов на поверхности восприимчивой клетки-хозяина, в то время как субъединица S2 отвечает за слияние вируса с клеточной мембраной клетки-хозяина [7].

Ген TMPRSS2 — трансмембранной сериновой протеазы 2 — кодирует одноименный белок из семейства сериновых протеаз. TMPRSS2 расположен на хромосоме 21q22, длиной ~ 44 кб, и содержит 14 экзонов [8]. Ген TMPRSS2 высокоэкспрессируется в средах, богатых андрогенами [9].

Было показано, что из экспрессирующих TMPRSS2 клеток выделяется большее количество вирусных частиц SARS-CoV-2, чем из неэкспрессирующих клеток [10].

Общеизвестно, что гены хозяина выступают в качестве фактора, имеющего отношение на восприимчивость и устойчивость к вирусным инфекциям. Одним из значимых факторов, определяющих восприимчивость и тяжесть заболевания коронавирусной инфекцией (КВИ) являются генетические различия между отдельными людьми. Такими генетическими вариациями являются однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) различных генов [11].

rs12329760 приводит к снижению стабильности структуры белка TMPRSS2 и ингибирует его связывание с ACE2 *in silico*. Напротив, он также демонстрирует повышенное сродство к доменам S-белка [12].

Было обнаружено, что распространенная миссенс-вариация TMPRSS2 rs12329760 не участвует в прямом взаимодействии с S-белком, но потенциально влияет на структурное подтверждение [13].

Эксперимент на мышиных моделях показал, что экспрессия ACE2 и TMPRSS2 в ОЕ увеличивается с возрастом [14]. Исследование, подготовленное Schuler et al. [15], показало, что экспрессия TMPRSS2 в эпителии легких также увеличивается с возрастом.

Ученые проанализировали частоты аллелей двух несинонимичных вариантов rs12329760 и rs75603675 гена TMPRSS2, обнаружили значительную взаимосвязь между частотой смертей от COVID-19 и частотами аллелей двух SNP. Кроме того, они получили данные, которые показывают, что жители Восточной Азии имеют более высокие частоты аллеля rs12329760, чем европейцы, и предположили, что это может обеспечить устойчивость к SARS-CoV-2 [16].

Wulandari L. и др. сообщалось об ассоциации rs12329760 с COVID-19 в индийской популяции [17]. Аналогичный результат был получен Andolfo I. и соавторами в европейской популяции генетических предков [18]. Напротив, исследование в немецкой популяции не выявило связи этого полиморфизма с риском заражения SARS-CoV-2 или тяжестью COVID-19 [19].

#### *Материалы и методы исследования*

Критериями включения для участников данного исследования являлись лица, возраст которых старше 18 лет; лица, не вакцинированные против COVID-19, или с момента вакцинации, прошло не менее 12 месяцев; представители восточных славян (украинцы, русские, белорусы). Объект исследования — геномная ДНК, выделенная из образцов цельной венозной крови с использованием комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала (кровь) «РИБО-сорб» (AmpliSens, Россия). Выделение проводилось согласно инструкции производителя. Выделенную ДНК подвергли анализу с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием методики «Амплификация рефракторной мутационной системы» (ARMS) [20] для выявления целевого однонуклеотидного полиморфизма (SNP) rs12329760 C>T. ПЦР в режиме реального времени проводили в амплификаторе DTLite (ДНК-Технология, Россия). Последовательности четырех праймеров (Lumiprobe, Russia): FIP (5'-AGGACTTCCTCTGAGATGAGTAAAC-3'), RIP (5'-ССАААСТТКАТСТТССГА-3'), FOP (5'-ТТАТАГССКАТГТСССТГС-3'), ROP (5'-АААААААААА-ГААГАААСТКАТГГА-3'). Условия проведения ПЦР в реальном времени: начальный цикл денатурации (94 °C в течение 3 мин), затем 40 циклов денатурации (15 с при 94 °C) и отжиг (30 с при 54 °C).

Были исследованы 80 проб плазмы крови на наличие или отсутствие иммуноглобулинов класса М и G к коронавирусной инфекции методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (Вектор «БЕСТ») и «SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ» (Вектор «БЕСТ», Россия). С помощью данного метода можно судить о течении заболевания, а именно IgM показывает наличие острой инфекции, а IgG подтверждает тот факт, что человек уже переболел. По результатам ИФА мы сформировали экспериментальную и контрольную группы участников, каждая из которых состояла из 40 человек. Равновесие Харди-Вайнберга (HWE) рассчитывали в экспериментальной и контрольной группах с использованием критерия  $\chi^2$ , и результаты рассматривались как отклоняющиеся от HWE при уровне значимости  $P < 0,05$ . При сравнении частот генотипов и аллелей применяли точный критерий Фишера. Ассоциации между генотипами/аллелями и КВИ оценивались с помощью отношения шансов (OR) с 95 % доверительным интервалом (95 % CI). Сравнение количественных признаков среди двух групп выполнялось с помощью теста Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $P < 0,05$ . Учитывая возможный риск ложноположительного результата для конечного результата, была применена поправка Бонферрони для корректировки значения P. Порог значимости с поправкой Бонферрони для аллелей считался 0,0253, для генотипов указан в таблице 1. Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы Graph Pad Prism 8.

#### *Результаты и их обсуждение*

Характеристика экспериментальной и контрольной группы участников представлена в таблице 2. Не обнаружены статистические различия по полу и возрасту в исследуемых группах.

**Частота встречаемости генотипов rs12329760C>T в экспериментальной и контрольной группах**

Генотип	Экспериментальная группа		Контрольная группа		OR (CI95 %)	P
	n	%	n	%		
СС	29	72,5	38	95	0,1388 (0,02852–0,6752)	0,012*
ТТ	3	7,5	1	2,5	3,162 (0,3147–31,78)	p>0,05
СТ	8	20	1	2,5	9,750 (1,158- 82,11)	0,0133*

*Примечание.* Статистически значимые различия установлены с помощью точного теста Фишера. \*Порог значимости с поправкой Бонферрони считался 0,0170.

В нашем исследовании гомозиготный вариант ТТ встречался в 3 раза чаще у лиц с КВИ (7,5 %), чем у лиц группы контроля (2,5 %), однако результат статистически не значим, вероятно, в связи с небольшим размером выборки. Наш результат имеет похожую тенденцию со статистически значимыми результатами других исследований с участием больших выборок. Например, M. Rokni и другие установили, что аллель Т полиморфизма rs12329760 оказала наибольшее влияние на риск COVID-19 среди изученных других однонуклеотидных вариантов, кроме этого генотип ТТ по сравнению с генотипом СС значительно повышал риск COVID-19 [21].

Т а б л и ц а 2

**Характеристика групп участников исследования**

Признаки		Экспериментальная группа	Контрольная группа	P
Пол (n, %)	Мужской	17 (42,5 %)	23 (57,5 %)	p>0,05*
	Женский	23 (57,5 %)	17 (42,5 %)	p>0,05*
Возраст	Min	18	32	p>0,05#
	Max	79	86	
	Mean±SD	50,10±15,58	51,05±14,86	
	Median	51	49	

*Примечание.* \*Статистически значимые различия установлены с помощью критерия  $\chi^2$ . #Статистически значимые различия установлены с помощью теста Манна-Уитни.

Частота генотипов rs12329760 в экспериментальной группе соответствовала равновесию Харди-Вайнберга (p=0,1493), но было нарушено в контрольной группе (p=0,0002). Установлено, что в экспериментальной и контрольной группах у генотипа СС высокая частота встречаемости (табл. 1). В экспериментальной группе частота генотипа СС у мужчин составила 76,5 %, у женщин — 69,6 %. В нашем исследовании гомозиготный генотип СС превалировал над гетерозиготным СТ и гомозиготным ТТ генотипами. В контрольной группе среди мужчин частота генотипа СС — 91,3 %, у женщин — 100 %. В экспериментальной группе частота генотипа ТТ у мужчин составила 5,9 %, у женщин — 8,7 %. В контрольной группе генотипы ТТ и СТ среди женщин не были выявлены.

Как видно из рисунка, существенных различий в распределении аллели С между группами не наблюдалось.

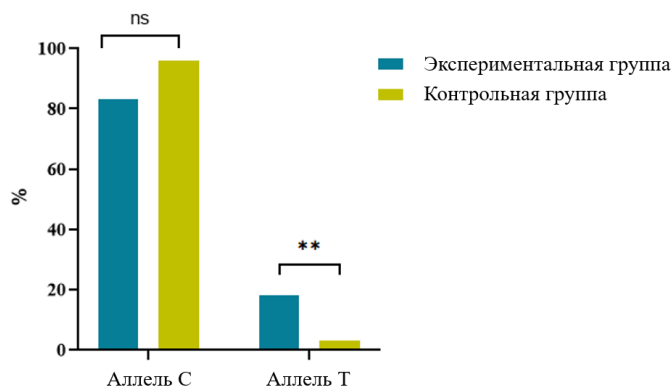


Рисунок. Распределение аллелей rs12329760C>T гена TMPRSS2

Статистически незначимый результат ( $OR=1,220$ , 95 % CI, 6698–2,176,  $p=0,5$ ) показывает отсутствие ассоциации аллели С полиморфизма rs12329760 и КВИ, в то время как у аллели Т она была найдена ( $OR=6,641$ , 95 % CI, 831–22,96,  $p=0,0052$ ). В исследовании S. Abdelsattar и других частота аллели Т показала значительное увеличение в тяжелой группе COVID–19 [22].

#### Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования выявленные показатели статистической значимости свидетельствуют о наличии значимости полиморфизма rs12329760 гена TMPRSS2 в гомозиготном состоянии (СС) и гетерозиготном (СТ) и об отсутствии значимости генотипа ТТ. Обнаружено статистически значимое отличие распределения аллели Т. Из-за небольшого размера выборки мы не можем утверждать относительно связи между полиморфизмом rs12329760 и КВИ. Поэтому для точного доказательства наличия или отсутствия связи однонуклеотидного полиморфизма гена TMPRSS2 необходимо увеличение выборки, а также исследование с учетом факторов, таких как пол, возраст, сопутствующие заболевания и др.

#### References

- 1 Woo, P.C.Y., Huang, Y., Lau, S.K.P. & Yuen, K.-Y. (2010). Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*, 2 (8); 1804–1820. <https://doi.org/10.3390/v2081803>
- 2 Holmes, K.V. (2001). Coronaviruses In: Fields virology. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 1187–1203.
- 3 Cui, J., Li, F. & Shi, Z.L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17 (3); 181–192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- 4 Letko, M., Marzi, A. & Munster, V. (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nature Microbiology*, 5 (4); 562–569. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y>
- 5 Li, F. (2016). Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annual Review of Virology*, 3; 237–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>
- 6 Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R.S. & Li, F. (2020). Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *Journal of Virology*, 94 (7); e00127–20.
- 7 Yang, Y., Xiao, Z., Ye, K. & al. (2020). SARS-CoV-2: characteristics and current advances in research. *Journal of Virology*, 17 (1); 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01369-z>
- 8 Glowacka, I., Bertram, S., Müller, M.A., Allen, P., Soilleux, E., Pfefferle, S., Steffen, I. et al. (2011). Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *Journal of Virology*, 85 (9); 4122–4134. <https://doi.org/10.1128/JVI.02232-10>
- 9 Baughn, L.B., Sharma, N., Elhaik, E., Sekulic, A., Bryce, A.H. & Fonseca, R. (2020). Targeting TMPRSS2 in SARS-CoV-2 infection. *Mayo Clinic Proceedings*, 95(9); 1989–1999. <https://doi.org/doi:10.1016/j.mayocp.2020.06.018>
- 10 Matsuyama, S., Nao, N., Shirato, K. et al. (2020). Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117 (13); 7001–7003. <https://doi.org/10.1073/pnas.200258911>
- 11 Srivastava, A., Bandopadhyay, A., Das, D., Pandey, R.K., Singh, V. et al. (2020). Genetic Association of ACE2 rs2285666 Polymorphism With COVID–19 Spatial Distribution in India. *Frontiers in Genetics*, 11; 564–581.
- 12 Saih, A., Bouqdayr, M., Baba, H., Hamdi, S. et al. (2021). Computational Analysis of Missense Variants in the Human Transmembrane Protease Serine 2 (TMPRSS2) and SARS-CoV-2. *BioMed Research International*, 9982729. <https://doi.org/10.1155/2021/9982729>
- 13 Vishnubhotla, R., Vankadari, N., Ketavarapu, V., Amanchu, R., Avanthi, S. et al. (2020). Genetic variants in TMPRSS2 and Structure of SARS-CoV-2 spike glycoprotein and TMPRSS2 complex. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.06.30.179663>
- 14 Zou, X., Chen, K., Zou, J., Han, P., Hao, J. & Han, Z. (2020). Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Frontiers in Medicine*, 14 (2); 185–192. <https://doi.org/10.1007/s11684-020-0754-0>
- 15 Schuler, B.A., Habermann, A.C., Plosa, E.J. et al. (2021). Age-determined expression of priming protease TMPRSS2 and localization of SARS-CoV-2 in lung epithelium. *Journal of Clinical Investigation*, 131 (1); e140766. <https://doi.org/10.1101/2020.05.22.1111>
- 16 Sungwon, J., Blazyte, A., Changhan, Yoon et al. (2020). Ethnicity-dependent allele frequencies are correlated with COVID-19 case fatality rate. *Authorea*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-37798/v1>
- 17 Wulandari, L., Hamidah, B., Pakpahan, C., Damayanti, N.S., Kurniati, N.D. et al. (2021). Initial Study on TMPRSS2 p.Val160Met Genetic Variant in COVID-19 Patients. *Human Genomics*, 15(29) <https://doi.org/10.1186/s40246-021-00330-7>
- 18 Andolfo, I., Russo, R., Lasorsa, V.A., Cantalupo, S., Rosato, B.E. et al. (2021). Common Variants at 21q22.3 Locus Influence MX1 and TMPRSS2 Gene Expression and Susceptibility to Severe COVID-19. *iScience*, 24; 102322. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102322>

19 Schönfelder, K., Breuckmann, K., Elsner, C., Dittmer, U., Fistera, D. et al. (2021). Transmembrane Serine Protease 2 Polymorphisms and Susceptibility to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2 Infection: A German Case-Control Study. *Frontiers in Genetics*, 12; 667231. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.667231>

20 Medrano, R.F. & de Oliveira, C.A. (2014). Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Molecular Biotechnology*, 56 (7); 599–608. <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9734-4>

21 Rokni, M., Heidari Nia M., Sarhadi, M., Mirinejad, S., Sargazi, S. et al. (2022). Association of TMPRSS2 Gene Polymorphisms with COVID-19 Severity and Mortality: a Case-Control Study with Computational Analyses. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 194 (8); 3507–3526. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03885-w>

22 Abdelsattar, S., Kasemy, Z.A., Ewida, S.F., Abo-Elsooud, R.A.A., Zytoon, A.A. et al. (2022). ACE2 and TMPRSS2 SNPs as Determinants of Susceptibility to, and Severity of, a COVID-19 Infection. *Journal of Biomedical Science*, 12 (79); 10238. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2021.10238>

А.К. Бисенева, Г.П. Погосян, К.Г. Ли

### **TMPRSS2 генінің rs12329760 полиморфизм коронавирустық инфекциямен қауымдастығы**

Мақалада TMPRSS2 генінің rs 12329760 (C/T) бірнуклеотидті полиморфизмі бойынша коронавирустық инфекцияның (КВИ) белгіленген мәртебесі бар зерттеуге қатысушылардан алынған ДНҚ үлгілерін генотиптеу нәтижелері келтірілген. Генотиптеу полимеразды тізбекті реакция (ПТР) әдісімен нақты уақыт режимінде «Рефракторлық мутациялық жүйені күшейту» әдісін қолдана отырып жүзеге асырылды. Эксперименттік және бақылау топтарының 80 адамында TMPRSS2 генінің rs12329760 C>T генотиптерімен аллельдерінің жиіліктерінің таралуы талданды. Гомозиготалы күйде (CC) және гетерозиготалы (CT) TMPRSS2 генінің rs12329760 бір нуклеотидті полиморфизмінің маңыздылығының болуы және TT генотипінің маңыздылығының болмауы анықталды. T аллельінің таралуының статистикалық маңызды айырмашылығы табылған.

*Кілт сөздер:* SARS-CoV-2, TMPRSS2, COVID-19, SNP, бір нуклеотидті полиморфизм, ген, сезімталдық.

A.K. Bisseneva, G.P. Pogossyan, K.G. Li

### **Association of polymorphism rs12329760 of the TMPRSS2 gene with coronavirus infection**

The article presents the results of genotyping of DNA samples obtained from study participants with the established status of coronavirus infection (COVID-19) using enzyme immunoassay for the single nucleotide polymorphism rs12329760 (C/T) of the TMPRSS2 gene. Genotyping was carried out by polymerase chain reaction (PCR) in real time using the technique “Amplification of the refractory mutation system” (ARMS). The distribution of frequencies of genotypes and alleles rs12329760 C>T of the TMPRSS2 gene in 80 people of the experimental and control groups was analyzed. The presence of the significance of the single nucleotide polymorphism rs12329760 of the TMPRSS2 gene in the homozygous state (CC) and heterozygous (CT) and the absence of the significance of the TT genotype was found. A statistically significant difference in the distribution of the T allele was found.

*Keywords:* SARS-CoV-2, TMPRSS2, COVID-19, SNP, single nucleotide polymorphism, gene, susceptibility.