



**VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS INSTITUTAS
FIZIKINĖS CHEMIJOS KATEDRA**

Mantvydas Usvaltas

Farmacinė Chemija

Magistro baigiamasis darbas

**SARS-COV-2 SPYGLIO BALTymo OMIKRON VARIANTO
IR POLIKLONINIŲ ANTIKŪNŲ SAŲVEIKOS TYRIMAS TAIKANT
REALAUS LAIKO VISIŠKO VIDAUS ATSPINDŽIO
ELIPSOMETRIJOS METODĄ**

Darbo vadovė

dr. Ieva Plikusienė

Mokslinis konsultantas

dr. Vincentas Mindaugas Mačiulis

Vilnius 2024

TURINYS

SANTRUMPOS	3
ĮVADAS.....	4
1. LITERATŪROS ANALIZĖ	6
1.1 Optiniai biosensoriai.....	6
1.1.1 Spektrinė elipsometrija.....	8
1.1.2 Spektrinės elipsometrijos tyrimo eiga.....	8
1.2 Kinetikos sąveikos modeliai.....	9
1.3 SARS-CoV-2 kilmė	10
1.3.1 SARS-CoV-2 patekimas į ląsteles.....	11
1.3.2 SARS-CoV-2 variantai	12
1.3.3 Vakcinų ir infekcijų sukelti antikūnai prieš SARS-CoV-2 S baltymą.....	13
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI	15
2.1 Medžiagos ir prietaisai.....	15
2.2 Metodai.....	15
2.2.1 Aukso PPR lusto modifikacijos.....	15
2.2.2 VVAE matavimai	16
2.2.3 Skirtingų koncentracijų serumų paruošimas	16
2.2.4 Dviejų žingsnių matematinio modelio pritaikymas apskaičiuojant kinetinius ir termodinamikos parametrus	16
3. REZULTATAI	17
3.1 SARS-CoV-2-oS kovalentinė imobilizacija	17
3.2 Imuninių kompleksų formavimasis tarp kovalentiškai imobilizuoto SARS-CoV-2-oS ir polikloninių antikūnų.....	18
3.3 SARS-CoV-2-oS ir polikloninių antikūnų kinetinė analizė.....	19
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	23
IŠVADOS	26
SANTRAUKA	27
SUMMARY.....	28
LITERATŪROS SĄRAŠAS	29
PRIEDAI	40

SANTRUMPOS

11-MUR – 11-merkaptoundekano rūgtis

ACE2 – angiotenziną konvertuojantis fermentas 2 (*angl.*, angiotensin-converting enzyme 2)

EDC – N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimido hidrochloridas

MERS-CoV – Artimųjų Rytų respiracinis sindromas koronavirusas (*angl.*, Middle East respiratory syndrome-related coronavirus)

NHS – 0.1 M N-hidroksisukcinimidas

PBS – fosfatinio buferio tirpalas

PPR – paviršiaus plazmonų rezonansas

RBD – receptoriaus prisijungimo domenai (*angl.*, receptor binding domain)

RBM – receptoriaus prisijungimo motyvas (*angl.*, receptor binding motif)

S – spygliys

SAM – savitvarkis monosluoksnis (*angl.*, self-assembled monolayer)

SARS-CoV – sunkaus ūminio respiracinio sindromo koronavirusas (*angl.*, severe acute respiratory syndrome coronavirus)

SARS-CoV-2 – sunkaus ūminio respiracinio sindromo koronavirusas 2 (*angl.*, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)

SARS-CoV-2-oS – SARS-CoV-2 Omikron S

SV – signalo vienetai

VOC – nerimą keliantys variantai (*angl.*, variants of concern)

VOI – susidomėjimą keliantys variantai (*angl.*, variants of interest)

VUM – stebimi variantai (*angl.*, variants under monitoring)

VVAE – visiško vidaus atspindžio elipsometrija

WHO – Pasaulinė sveikatos organizacija (*angl.*, World Health Organization)

ĮVADAS

Sunkaus ūminio respiracinio sindromo koronavirusas 2 (SARS-CoV-2) priklauso dvi epidemijas sukėlusiai *Coronaviridae* virusų šeimai, kurios nariai išsiskiria savo karūnos forma, matoma per elektroninį mikroskopą (Amanat & Krammer, 2020). Dėka tyrimų, pradėtų po pirmojo karto, kai pasaulis susidūrė su sunkaus ūminio respiracinio sindromo koronavirusu (SARS-CoV) (Roper & Rehm, 2009), buvo greitai išvystytos vakcinos, kurios suformavo imuninį atsaką prieš SARS-CoV-2 spyglio baltymą. Tačiau laikui bėgant buvo stebimas didelis mutacijų skaičius būtent S baltyme, kuris yra pagrindinis antikūnų taikinytis (Greaney, Starr, ir kt., 2021). Siekiant apsaugoti visuomenę ir būti pasiruošę ateityje, yra būtini tyrimai (Plikusiene, Maciulis, Juciute, Maciuleviciene, ir kt., 2022), padedantys geriau suprasti žmonių imuninį atsaką prieš besikeičiančius virusus.

Spyglio (S) baltymas, susidedantis iš dviejų (S1 ir S2) subvienetų, yra transmembraninis homotrimeras, aptinkamas ant viruso paviršiaus. S1 subvienete esantis receptoriaus prisijungimo domenas yra atsakingas už prisijungimą prie angiotenziną konvertuojančio fermento 2 (ACE2) receptoriaus, kas lemia tolimesnį viruso patekimą į ląstelę ir replikaciją (Xia, 2021). Mutacijos, įvykusios šiame domene, ne tik padidino afiniškumą ACE2 receptoriui, bet ir padėjo išvengti imuninio atsako, kurio metu antikūnai galėtų neutralizuoti virusą (Jangra ir kt., 2021; Lupala ir kt., 2022). Savo paplitimu labiausiai išsiskyrė Omikron variantas, kuris turėjo net 15 mutacijų RBD (He ir kt., 2021).

Pagal duomenis, gautus iki 2024 metų balandžio 15 dienos, buvo panaudota virš 15 milijardų vakcinos dozių ir pilnai paskiepyta virš 60% pasaulio gyventojų (Mathieu ir kt., 2021). Pirmaisiais mėnesiais po vakcinacijos, antikūnai geba veiksmingai neutralizuoti SARS-CoV-2 virusą, tačiau praėjus pusmečiui yra stebimas staigus šio veiksmingumo sumažėjimas (Ssentongo ir kt., 2022). Atsiradus SARS-CoV-2 Omikron variantui, žymiai padidėjo užsikrėtusiųjų skaičius ir greitis, kuriuo plito virusas. Lyginant su kitais variantais, vakcinacijos ir persirgimai turėjo mažesnę įtaką SARS-CoV-2 Omikron gebėjimui išvengti žmogaus imuninio atsako (McLean ir kt., 2022; Planas ir kt., 2022).

Vakcinų efektyvumas prieš SARS-CoV-2 Omikron variantą gali būti įvertintas įvairiais metodais (Araf ir kt., 2022; Gram ir kt., 2022; Karim & Karim, 2021). Vienas iš metodų, kurio metu galima įvertinti sąveikas tarp įvairių molekulių yra visiško vidaus atspindžio elipsometrija (VVAE). Tai yra optinis matavimo būdas, kuris pasižymi dideliu jautrumu, nereikalauja papildomų molekulinų žymių ir yra atliekamas realiu laiku. Kovalentiškai imobilizuojant SARS-CoV-2 Omikron S (SARS-CoV-2-oS) baltymą ant modifikuoto aukso paviršiaus galima stebėti kaip tiriami antikūnai sąveikauja su juo (Plikusiene, Maciulis, Juciute, Maciuleviciene, ir kt., 2022). Optinis modelis gali būti pritaikytas gautiems eksperimento duomenims ir gauti optiniai parametrai yra panaudojami kinetikos bei termodinamikos skaičiavimuose. Ši informacija gali būti toliau naudojama lyginant sąveikas bei afiniškumą su ankstesniais arba naujai atsiradusiais variantais, kuriant imuninius jutiklius bei atliekant klinikinius tyrimus.

Darbo tikslas:

Raliu laiku ištirti sąveiką tarp kovalentiškai imobilizuoto SARS-CoV-2-oS baltymo ir polikloninių antikūnų, esančių kraujo serumuose, paimtuose iš persirgusio COVID-19 liga ir paskiepyto individų.

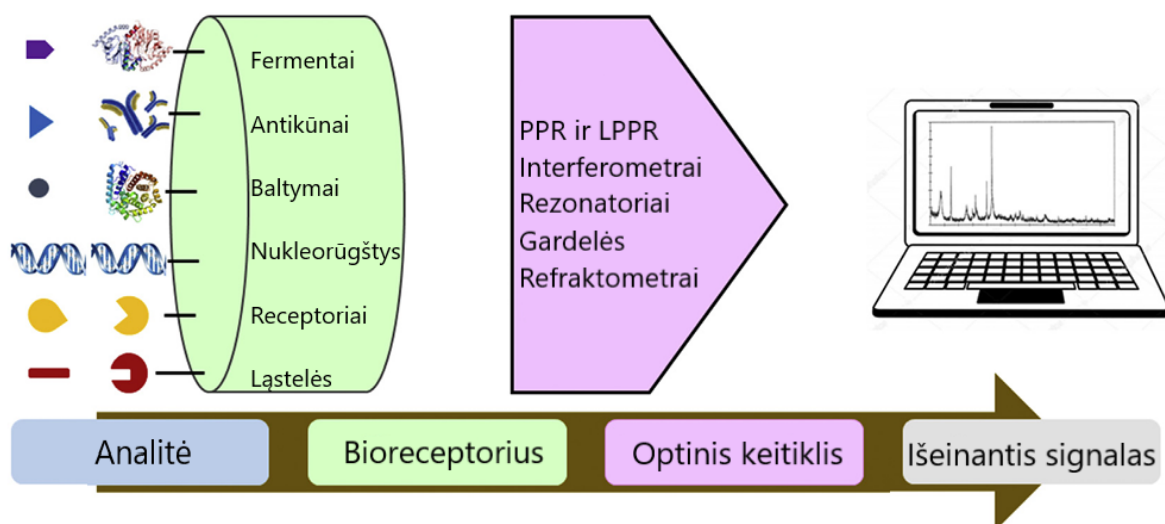
Darbo uždaviniai:

1. Parinkti sąlygas kovalentiniam SARS-CoV-2-oS baltymo imobilizavimui.
2. VVAE metodu nustatyti elipsometrinių parametrų pokyčius polikloniniams antikūnams sąveikaujant su SARS-CoV-2-oS baltymu.
3. Pritaikyti optinį modelį ir apskaičiuoti paviršiaus masės tankius po polikloninių antikūnų sąveikos su SARS-CoV-2-oS.
4. Pritaikyti dviejų žingsnių modelį ir apskaičiuoti kinetinius parametrus bei termodinamiką po polikloninių antikūnų sąveikos su SARS-CoV-2-oS.

1. LITERATŪROS ANALIZĖ

1.1 Optiniai biosensoriai

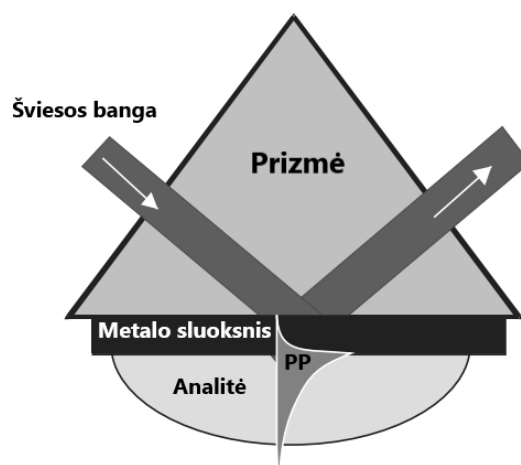
Biosensoriai gali būti skirstomi į skirtingas grupes priklausomai nuo to, koks fizikocheminis keitiklis yra naudojamas. Pagrindinės keturios biosensorių grupės yra įvardijamos kaip: optiniai, elektrocheminiai, termometriniai, pjezoelektriniai arba magnetiniai biosensoriai, o iš šių išvardintų grupių dažniausiai aptariami yra optiniai biosensoriai. Optinis biosensorius yra kompaktiškas analitinis prietaisas, kuris analizės metu naudoja bioreceptorius su integruota optinio keitiklio sistema. Pagrindinė optinio biosensoriaus funkcija yra sukurti signalą, kuris būtų proporcingas matuojamos analitės koncentracijai. Analizės metu kaip bioreceptoriai gali būti naudojami fermentai, antikūnai, antigenai, receptoriai, nukleorūgštys, ląstelės ir audiniai, dėl to naudojant optinius biosensorius gali būti atliekami įvairūs tyrimai sąveikaujant biologinėms molekulėms (1 pav.). Toliau optiniai biosensoriai gali būti išskirstomi pagal tai, ar yra naudojamos žymos, ar ne. Nenaudojant žymų, gaunamas signalas yra sukuriamas analitei tiesiogiai sąveikaujant su bioreceptoriumi, o naudojant žymas, optinis signalas yra sukuriamas kolorimetrijos, fluorescencijos arba liuminescencijos metodų metu. Žymos yra pritaikomos aptinkant paprastas molekules, tokias kaip gliukozė, ir vienas iš žinomiausių komercinių pritaikymų yra rankinis gliukometris, kuris yra naudojamas asmenų sergančių diabetu. Komercinio pritaikymo biosensorių yra ir nenaudojančių žymų. Vienas svarbus pavyzdys yra hemometriai, kurie naudoja kolorimetrijos biosensorių įvertinti hemoglobulino koncentraciją kraujyje. Technologijos tampa vis labiau prieinamos ir kompaktiškos, šiomis dienomis paprastas optinio biosensoriaus funkcijas gali atlikti net išmanusis telefonas, panaudojant jame esančią kamerą (Meng ir kt., 2023).



1 pav. Absorbcijos, pralaidumo, rezonanso ir liuminescencijos pokytis gali būti aptinkamas panaudojant specifines nanomedžiagas ir toliau konvertuojamas į išmatuojamą kiekį panaudojant optinius rodmenis. (Lakhera ir kt., 2022, p. 21).

Didelis pokytis optiniuose tyrimuose įvyko po staigaus paviršiaus metodų, tokių kaip paviršiaus plazmonų rezonanso (PPR), paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos bei interferencijos vystymosi. Dėl tikslių rezultatų bei gebėjimo atlikti tyrimą realiu laiku ir nenaudojant žymų, PPR metodas

išskirtinai yra laikomas kaip vienas iš svarbiausių analitinių įrankių tiriant biomolekulines sąveikas (Yadav ir kt., 2012). Kai p-poliarizuota šviesa (poliarizacija įvyksta paraleliai bangos sklidimo plokštumai), esant visiško vidaus atspindžio sąlygoms, atsимуša į plono metalo sluoksnį, elektronai, esantys metalo paviršiuje, yra sužadinami ir yra stebimi laisvųjų elektronų kolektyviniai virpėjimai bei paviršiaus plazmonų formavimasis. Paviršiaus plazmonai plinta palei plono metalo sluoksnį ir kerta šalia esančią terpę, dėl to lūžio rodiklio pokyčiai, įvykstantys šalia plono metalo sluoksnio, lemia paviršiaus plazmono greičio pokytį (Piliarik ir kt., 2009). Kai paviršiaus elektronai yra sužadinami, stebima šviesos absorbcija ir sklaida žymiai padidėja lyginant su identišku paviršiumi, kuriame nėra stebimas plazmono susidarymas (Pillai ir kt., 2007). PPR fenomenas įvyksta, kai yra jam būdingas šviesos kritimo kampas ir šviesos bangos ilgis, ties kuriais yra stebimas atsispindėjusios šviesos minimalus intensyvumas. Metodo metu, plono sluoksnio metalai yra parenkami pagal gebėjimą sukelti aštrų PPR atsaką. Tokie metalai kaip sidabras ir varis, nors ir sukelia aštrius PPR atsakus ir yra pigesni už auksą, turi bendrą neigiamą savybę – lengva paviršiaus oksidacija. Tokiu atveju yra naudojami papildomi dielektrikų sluoksniai, kurie ne tik apsaugo paviršių nuo oksidacijos, bet ir suaštrina PPR atsaką (Kumar ir kt., 2021; Taya ir kt., 2023). Dauguma PPR sensorių naudoja Kretschmanno prizmės konfigūraciją (2 pav.), kurioje metalo sluoksnis yra tiesiogiai patalpinamas ant prizmės nepaliekant tarpo (Ramanavičius, 2007). Ši konfigūracija lemia efektyvesnę paviršiaus plazmonų rezonanso sukėlimą.



2 pav. Paviršiaus plazmonų (PP) sužadinimas naudojant Kretschmanno prizmės konfigūraciją (Piliarik ir kt., 2009).

Nuo pirmojo karto, kai 1983 m. Liedbergas pritaikė PPR fenomeną tirti biologinius procesus (Liedberg ir kt., 1983), PPR sensoriai pritraukė didelį dėmesį įvairiose sferose: vaistų atradime (Lawson, 2015), nukleorūgščių aptikime (Boozer ir kt., 2006), maisto saugoje (Zhou ir kt., 2019) ir aplinkos monitoringe (C.-W. Huang ir kt., 2023). Tyrimai parodė, kad atsispindėjusios šviesos fazė keičiasi daug drastiškiau negu intensyvumas (Halpern ir kt., 2011; Yu ir kt., 2007; Yuan ir kt., 2006; Kabashin ir kt., 2009). Dėl to PPR biosensoriai, analizuojantys šviesos fazę, yra jautriausi biomolekulines sąveikas stebintys biosensoriai. Aukšto dažnio šviesos virpesiai negali būti stebimi tiesiogiai, dėl to yra naudojamos kompleksinės optinės konfigūracijos užfiksuoti PPR sukeltus fazės pokyčius. Tarp metodų įvertinti fazės pokyčius yra naudojama heterodinų detekcija, elipsometrija ir įvairios interferometrijos technikos (Y. h. Huang ir kt., 2012).

1.1.1 Spektrinė elipsometrija

Spektrinė elipsometrija yra optinis matavimo būdas, skirtas nustatyti bandinio optines savybes ir gebantis pritaikyti matavimuose PPR fenomeną. Matavimo metu poliarizuota šviesa yra nukreipiama į bandinį arba pro jį praleidžiamas ir išmatuojamas jos atspindys. Tokiu būdu yra nustatomas šviesos poliarizacijos būsenos pokytis. Žodis „elipsometrija“ kilo iš fakto, kad tiesiškai poliarizuotai šviesai atsispindėjus nuo bandinio, ji tampa eliptiškai poliarizuota, tai reiškia, kad šviesos bangos elektrinis vektorius sklisdamas erdvėje brėžia elipsę (Fujiwara, 2007). Gauti rezultatai tiesiogiai neapibūdina analitės optinių savybių, todėl norint sužinoti optinius parametrus (lūžio rodiklį ir ekstinkcijos koeficientą), reikia sukonstruoti optinį modelį, aprašantį eksperimentinius rezultatus. Šis modelis leidžia įvertinti analizuojamų sluoksnių storį ir susiformavusią paviršiaus masę. Matavimams yra naudojami prietaisai vadinami elipsometrais. Pagrindinis elipsometro tikslas yra nustatyti du elipsometrinius parametrus: Ψ ir Δ . Jie parodo šviesos bangos amplitudės santykį – Ψ ir fazės skirtumą – Δ (Tompkins & Irene, 2005). Naudojant spektrinę elipsometriją, yra parenkamas šviesos kritimo kampas ir yra nustatoma Ψ ir Δ priklausomybė nuo bangos ilgio (spektras). Atsižvelgiant į kas yra tiriama, matavimai yra atliekami įvairiuose spektro ruožuose (Fujiwara, 2007).

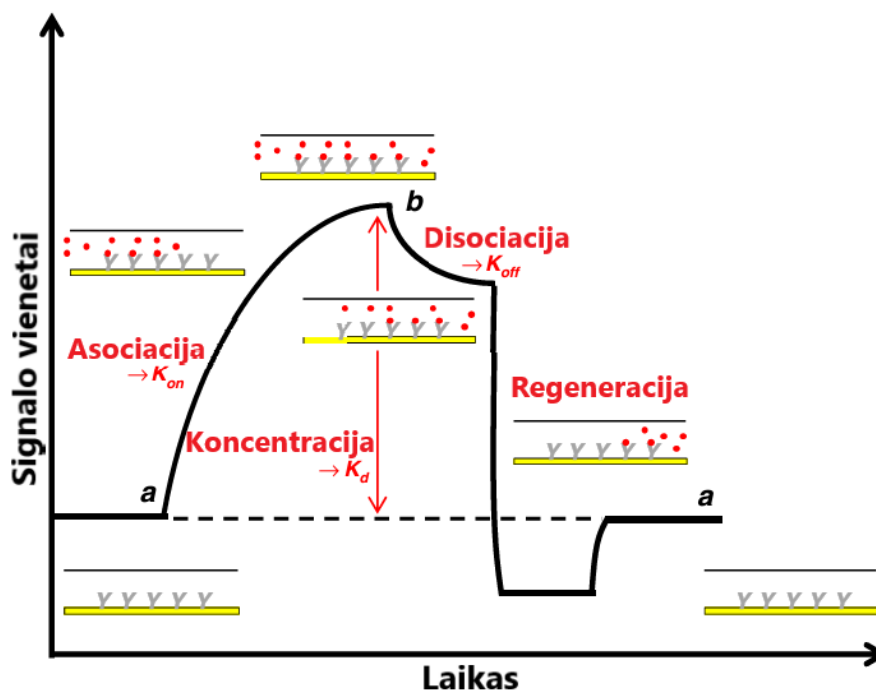
Nuo to laiko, kai Drude 1887 metais aprašė elipsometriją, atliekamų tyrimų greitis ir tikslumas progresyviai augo dėl pažangių technologijų. Spektrinė elipsometrija yra gerai tinkamas būdas norint sužinoti įvairių plonų sluoksnių optines savybes. Taip pat, šis metodas gali būti taikomas ir matuojant optinį atsaką realiuoju laiku. Dabar realaus laiko stebėjimai būna atliekami ne tik plono sluoksnio augimo charakterizavimui, bet ir diagnozavimui tokių procesų kaip ėsdinimas ir terminė oksidacija. Atliekant matavimus elipsometru yra svarbu atsižvelgti į bandinio savybes – mėginių paviršiaus šiurkštumas turi būti sąlyginai mažas, bandinys turi atspindėti arba praleisti šviesą. Elipsometrijos matavimas tampa sudėtingas, jei šviesa išsklaidoma dėl paviršiaus šiurkštumo, kuris taip pat žymiai sumažina atspindinčios šviesos intensyvumą, reikalingą įvertinti poliarizacijos būsenos pokytį (Fujiwara, 2007). Dabar elipsometrijos tyrimai yra pritaikomi nuo puslaidininkių fizikos iki mikroelektronikų ir biologijos (Tompkins & Hilfiker, 2015).

Panaudojant spektrinę elipsometriją visiško vidaus atspindžio sąlygomis ir taip ją jungiant su PPR reiškiniu, galima tirti kaip formuojasi sluoksniai iš biologiškai aktyvių molekulių realiu laiku (Gauglitz, 2020; Plikusiene, Maciulis, Ramanavicius, ir kt., 2022). Adsorbuojant organinėms molekulėms arba vykstant reakcijoms organiniame sluoksnyje ant metalo paviršiaus, įvyksta atspindžio minimumo pokytis spektre arba kritimo kampe (Bombarová ir kt., 2015). Biomolekulių sąveikos tyrimams elipsometrija gerai tinka, nes tai yra dideliu jautrumu pasižymintis, neardantis, molekulių žymėjimo nereikalaujantis metodas (Schubert, 2004).

1.1.2 Spektrinės elipsometrijos tyrimo eiga

Įprastai plonas aukso sluoksnis, esantis ant stiklo, yra patalpinamas į mažo tūrio tėkmės celę, per kurią skystas tirpalas yra praleidžiamas. Norint aptikti analitės molekulės prisijungimą prie receptoriaus molekulės, dažnai pirmiau yra imobilizuojama receptoriaus molekulė ant sensoriaus paviršiaus ir tada analitės molekulė yra įleidžiama pro tėkmės celę. Iš lazerio šaltinio poliarizuota šviesa yra nukreipiama per prizmę į paviršių, esantį po aukso sluoksniu, kuriame esant kritiniui šviesos kritimo kampui susidaro paviršiaus plazmonai. Ši paviršiaus šviesos absorbcija yra

ižvelgiama dėl atsispindėjusios šviesos intensyvumo sumažėjimo (Cooper, 2004). Realus laiko PPR eksperimento atsakas yra dažniausiai pateikiamas sensogramos forma. Jeigu įvyksta sąveika tarp imobilizuotos receptoriaus molekulės ir analitės, aplinkos lūžio rodiklis pasikeičia ir tai yra matoma kaip signalo intensyvumo padidėjimas (Beseničar ir kt., 2006). Eksperimento pradžioje visos imobilizuotos molekulės dar nesąveikauja su analite ir signalų vienetų (SV) reikšmė yra lygi pradiniam kritiniam kampui a (3 pav.). Įleidus analitės į tėkmės celę, jeigu jos sąveikauja su imobilizuotomis receptoriaus molekulėmis, yra asociacijos fazė, per kurią prisijungimo vietos yra užimamos, ir kreivės forma gali būti naudojama apskaičiuoti molekulių asociacijos greitį (k_{on}). Kai yra pasiekama pastovi fazė, tada (SV) parodo maksimaliai pasikeitusį kritinį kampą b . Ši maksimali (SV) vertė yra proporcinga imobilizuotoms ir analizuojamoms molekulėms ir gali būti panaudota apskaičiuoti disociacijos konstantą (k_d). Kai analitės molekulės yra pašalinamos iš pastovios tėkmės, įvyksta disociacijos fazė, kurios metu prisijungimo vietos yra atlaisvinamos ir pasikeitusi kreivės forma gali būti panaudota apskaičiuojant disociacijos greitį (k_{off}). Paviršius toliau gali būti regeneruojamas ir kritinis kampas a yra grąžinamas į pradinę vertę, iš naujo pradėti eksperimentą (Mozsolits ir kt., 2003). PPR eksperimento metu mažiausia aptinkama koncentracija priklauso nuo daugelio veiksnių, kurie apima molekulinę masę, optinius parametrus, analitės molekulės prisijungimo afiniškumą ir receptoriaus molekulių paviršiaus padengimą. PPR atsakas koreliuoja su masės koncentracijos pokyčiu ant sensoriaus paviršiaus ir dėl to priklauso nuo analitės molekulinės masės kartu su galimų prisijungimo vietų ant sensoriaus paviršiaus skaičiumi (Patching, 2014).



3 pav. Įprasto PPR eksperimento įvertinti sąveika tarp analitės molekulės ir receptoriaus molekulės schematinė iliustracija (Patching, 2014).

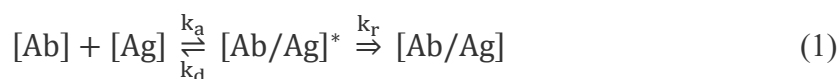
1.2 Kinetikos sąveikos modeliai

Langmuir adsorbcijos izoterma yra vienas iš dažniausiai naudojamų modelių nustatant adsorbuotos medžiagos kiekį ant adsorbento paviršiaus. 1916 metais Irving Langmuir pristatė šį modelį junginiams, adsorbuojantiems ant paprastų paviršių kartu su hipoteze, kad paviršius turi ribotą

kiekį lygiaverčių prisijungimo vietų, prie kurių junginiai gali prisijungti per sorbcijos procesą. Šis modelis turi keturis neatsiejamus reikalavimus, kurie gali būti apibendrinti taip (Latour, 2015):

- Prisijungimo vietos privalo būti homogeniškos;
- Kiekviena adsorbcijos vieta sąveikauja su individualia tirpale esančia molekule;
- Eksperimento metu yra pasiekama dinamiška grįžtama pusiausvyra;
- Ant paviršiaus molekulės negali tarpusavyje sąveikauti, tokiu būdu pakeičiant adsorbcijos elgseną (Langmuir, 1916).

Baltymų adsorbcijos izotermos labai dažnai atrodo kaip Langmuir izoterma, tačiau retai Langmuir modelio reikalingos sąlygos būna išpildomos (Latour, 2015). Tiriant sąveikas tarp baltymų, kinetikos skaičiavimai gali neatitikti Langmuir modelio, dėl susidariusių stiprių negrįžtamų sąveikų tarp receptoriaus ir analitės molekulių arba analitei sąveikaujant su keliomis receptoriaus molekulėmis (Plikusiene, Maciulis, Vertelis, ir kt., 2023). Tokiu atveju gali būti pritaikyti kiti skaičiavimai kaip dviejų žingsnių modelis, kuris yra dažnai naudojamas įvertinti antikūnų ir antigenų imuninių kompleksų formavimąsi.



Pirmasis žingsnis aprašo antikūno ir antigeno komplekso $[Ab/Ag]$ formavimąsi. Šio komplekso formavimosi greitį ir afiniškumą tarp $[Ab]$ ir $[Ag]$ apibūdina asociacijos greičio konstanta (k_a). Susiformavus kompleksui, sąveika tarp $[Ab]$ ir $[Ag]$ gali būti negrįžtama ir apibūdinama stabilių imuninių kompleksų formavimosi greičio konstanta (k_r) arba molekulės gali nutolti viena nuo kitos, ką parodo disociacijos greičio konstanta (k_d). Antikūno ir antigeno sąveikos procesas yra dalinai negrįžtamas ir dėl to yra naudojamas dviejų žingsnių modelis. Laiko tarpas, per kurį antikūno ir antigeno kompleksas spontaniškai disocijuoja, yra daug ilgesnis negu asociacijos greitis, kas yra būdinga tarp didelio afiniškumo antikūnų ir antigenų (Galanti ir kt., 2016; Plikusiene, Maciulis, Vertelis, ir kt., 2023).

1.3 SARS-CoV-2 kilmė

Koronavirusai yra plati grupė virusų, galinčių užkrėsti daugelį skirtingų gyvūnų ir žmonėse sukelti vidutinę arba sunkią kvėpavimo takų infekciją. Šie virusai buvo aptikti keliuose paukščių šeiminiukuose, taip pat ir įvairiuose žinduoliuose, įskaitant kupranugarius, šikšnosparnius, himalajines civetas, peles, šunis ir kates (Su ir kt., 2016). Atitinkamai 2002 ir 2012 metais paplito du gyvūninės kilmės labai patogeniški virusai: SARS-CoV ir Artimųjų Rytų respiracinis sindromas koronavirusas (MERS-CoV). Prieš aptinkant šiuos virusus buvo manoma, kad koronavirusai gali sukelti tik nesunkias infekcijas (Ksiazek ir kt., 2003), tačiau jie ne tik sukėlė mirtinas kvėpavimo takų ligas, bet ir pavertė atsirandančius koronavirusus XXI a. visuomenės sveikatos problema (Cui ir kt., 2019). Pirmą kartą užfiksuotas 2019 metų gruodį Kinijoje, Uhane, naujasis virusas, kuris sukūrė visą pasaulį ir kurio padarinius galime jausti iki šiandienos, buvo pavadintas SARS-CoV-2 ir liga, kurią šis virusas sukelia, yra gerai žinoma kaip COVID-19 (Wu ir kt., 2020).

Kinijoje mokslininkai apie niekad anksčiau nematytą betakoronavirusą paskelbė 2020 metų sausio mėnesio pradžioje (Zhu ir kt., 2020) ir dar to paties mėnesio pabaigoje Pasaulinė sveikatos organizacija (WHO) šio viruso plitimą įvardijo kaip reikalaujantį tarptautinio susirūpinimo dėl grėsmės visuotinei sveikatai (Eurosurveillance editorial team, 2020). SARS-CoV-2 gebėjimas lengvai

plisti tarp žmonių ir didelė gausa tarptautinių kelionių lėmė greitą COVID-19 paplitimą visame pasaulyje. Praėjus beveik mėnesiui po epidemijos Kinijoje, 2020 metų kovo 11 dieną WHO oficialiai įvardijo COVID-19 plitimą kaip pandemiją (World Health Organization, 2020).

SARS-CoV-2 priklauso *Coronaviridae* virusų šeimai, kuri pasižymi viengrandžiu, teigiamos prasmės RNR genomu, kurio ilgis varijuoja nuo 26 iki 32 kilobazių ir yra didžiausias žinomas genomas tarp RNR virusų (Saberio ir kt., 2018; Su ir kt., 2016). Kinijoje atliktas pilnas genomo tyrimas ir filogenetinė analizė (žr. 1 priedą) parodė, kad SARS-CoV-2 galimai kilo iš šikšnosparniuose anksčiau aptiktų virusų: bat-SL-CoVZC45 ir bat-SL-CoVZXC21, kurie pasižymi atitinkamai 87,99% ir 87,23% sekos tapatumais (Lu ir kt., 2020). Penkiuose genų regionuose iš trylikos buvo nustatyti genų sekų tapatumai, viršijantys 90%, o iš šių penkių didžiausias nustatytas tapatumas, kuris siekė 98,7%, buvo tarp genų, koduojančių viruso apvalkalą. Svarbus skirtumas, turėjęs įtakos SARS-CoV-2 greitam plitimui, yra nustatytas mažiausias sekos tapatumas, kuris siekė tik 75% tarp genų, koduojančių spyglio (S) baltymą. Tarp žinomų koronavirusų: SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV ir šikšnosparniuose aptiktų panašių į SARS koronavirusų, buvo nustatytas skirtumas S baltymą koduojančio geno ilgyje. Lyginant su kitais žinomais koronavirusais, SARS-CoV-2 turi žymiai ilgesnį S baltymą koduojantį geną (Lu ir kt., 2020). Dėl didelio evoliucinio tarpo tarp SARS-CoV-2 ir giminingiausių gyvūnuose esančių virusų nėra užtikrinta, kad buvo tiesioginis SARS-CoV-2 perėjimas iš šikšnosparnių į žmones. Yra tikėtina, kad perėjimas įvyko lokacijoje, kurioje didelio gyventojų tankumo populiacija kontaktuoja su gyvais gyvūnais galinčiais nešioti SARS-CoV-2, tačiau giminingi šikšnosparnių virusai nebuvo aptikti Uhano gyvūnų turguje, kuri yra laikoma pandemijos pradžia ir iki šios dienos nėra išaiškintas tikslus perėjimo įvykis (Pagani ir kt., 2023).

1.3.1 SARS-CoV-2 patekimas į ląsteles

Pagrindinis SARS-CoV-2 patekimo į ląsteles būdas yra prisijungiant prie ACE2 (Shang ir kt., 2020). Dar 2003 metais ACE2 buvo nustatytas kaip SARS-CoV receptorius reikalingas patekti į šeimininko ląstelę ir replikuotis (Li ir kt., 2003). ACE2 yra cinko metalofermentas bei karboksipeptidazė ir kaip transmembraninis fermentas yra randamas ant endotelio ląstelių (Tanzadehpanah ir kt., 2023). Šis fermentas yra neatsiejamas renino-angiotenzino sistemos, palaikančios normalų kūno kraujospūdį, dalis. Sergantiems COVID-19 žmonėms SARS-CoV-2 sukelia kvėpavimo takų sutrikimus, tačiau sveikuose žmonėse buvo nustatytas mažas ACE2 kiekis, esantis kvėpavimo takų ląstelėse, nors pagrindinis šio viruso patekimo būdas yra per ACE2 (Y. Wang ir kt., 2020). Galimas paaiškinimas yra, kad ACE2 genai yra aktyvinami virusų arba uždegiminių citokinų (Zhuang ir kt., 2020), kas lemtų tolimesnį viruso plitimą kvėpavimo takų organuose.

SARS-CoV-2 virionas susideda iš nukleokapsidės, membranos, apvalkalo ir S baltymų. Virusų patekimas į ląstelę, tai yra prisijungimas prie šeimininko ląstelės ir ląstelės membranos susiliejimas vyksta tarpininkaujant S glikobaltymams. Šie baltymai yra surenkami į homotrimerus ir jų kopijos yra įterpiamos į viriono membraną, suteikiant karūną primenančią išvaizdą. Dar biosintezės metu infekuotuose ląstelėse S baltymas yra skaidomas proproteino konvertazių, tokių kaip furinas, į S1 ir S2 subvienetus, kurie tarpusavyje lieka susijungę nekovalentišku būdu (Hoffmann ir kt., 2020). Įvykti SARS-CoV-2 infekcijai yra reikalingas didelis afiniškumas ir sąveika su ACE2 esančiu ląstelės membranoje. Pirmiausia prie ACE2 receptoriaus 1 heliksės (Lys31, Tyr41) ir 5 heliksės (Lys353) prisijungia S1 subvienetas ir po to seka S2 subvieneto prisitvirtinimas prie ląstelės membranos (Tanzadehpanah ir kt., 2023). Kad galėtų tarpininkauti membranų susiliejimui S2 subvienetas turi

susiliejiimo peptidą ir kitus būtinus darinius (Fehr & Perlman, 2015). Patekimui į ląstelę yra labai svarbūs konformaciniai pokyčiai, atsirandantys S1 ir S2 subvienetuose, kai S baltymas sąveikauja su receptoriumi. SARS-CoV-2 išsiskiria nuo SARS-CoV papildoma skaidymo vieta (S2'), kuri yra pačio S2 subvieneto viduje. S2' vieta yra prieinama fermentams, virusui sąveikaujant su ACE2 receptoriumi. Yra du skirtingi patekimo į ląstelę keliai: endosominis ir ląstelės paviršiaus. Patekimo kelias pro ląstelės paviršių priklauso nuo to, ar membranoje yra S2' vietą skaidanti transmembraninė proteazė, serinas 2 (Shulla ir kt., 2011). Kitu atveju, virusas patenka į ląstelę endosominiu keliu ir katapsinas L yra reikalingas skaidyti S2' vietą (Huang ir kt., 2006). Abejais atvejais, suskaidžius S2' vietą, yra paleidžiamas susiliejiimo peptidas, kuris formuoja susiliejiimo porą, pro kurią virusinis genomus patenka į ląstelės citoplazmą (Jackson ir kt., 2022).

1.3.2 SARS-CoV-2 variantai

SARS-CoV-2 variantai ir mutantai atsirado dėl evoliucijos ir adaptacijos šeimininkuose, aplinkos veiksnių, genomo mutacijų, kurios apima genų insercijas arba delecijas, amino rūgščių modifikacijų ir rekombinacijų, įvykstančių viruso genome. Dauguma šių variantų geba greitai plisti tarp daugelio šalių (El-Shabasy ir kt., 2022; Wahid ir kt., 2021). Pagal naujausią paskelbtą WHO klasifikaciją, SARS-CoV-2 variantai yra klasifikuojami į tris kategorijas: stebimi variantai (VUM), susidomėjimą keliantys variantai (VOI) ir nerimą keliantys variantai (VOC). Graikų abėcėlės raidės yra paskiriamos VOC, o VOI yra naudojamos Nextstrain ir Pango mokslinės nomenklatūros sistemos. Su šiais pakeitimais, SARS-CoV-2 Alfa, Beta, Gama, Delta, taip pat ir Omikron tėvinė linija yra dabar laikomi anksčiau cirkuliuojusiais VOC. Šiuo metu Omikron subvariantai yra individualiai klasifikuojami esantys VUM arba VOI (World Health Organization, 2023).

Virusų variantai atsiranda esant nukleotidų pokyčiams, kurie įvyksta virusinio genomo replikacijos metu ir yra žinoma, kad šie pokyčiai įvyksta didesniu dažniu RNR virusuose nei DNR virusuose (Lauring & Hodcroft, 2021). Tačiau koronavirusai, kurie pasižymi didžiausiu genomo dydžiu, koduoja fermentą, galintį ištaisyti klaidas, atsiradusias replikacijos metu, ir dėl to yra žymiai mažesnis nukleotidų pokyčių dažnis koronavirusuose lyginant su kitais RNR virusais (Denison ir kt., 2011). SARS-CoV-2 koduoja nestruktūrinį baltymą 14 (nsp14), kuris pasižymi egzoribonukleaziniu aktyvumu, tai yra gebėjimu replikacijos metu ištaisyti nukleotidų klaidas. Taip pat buvo nustatyta, kad šio baltymo inaktyvacija yra žalinga SARS-CoV-2 ir MERS-CoV replikacijai (Moeller ir kt., 2022; Ogando ir kt., 2020). Esant natūraliai atrankai, padidėja genomo mutacijų, kurios yra palankios viruso replikacijai, transmisijai ir imuninei evazijai, dažnis. Imuninė evazija įvyksta, kai genomo pokyčiai paverčia imuninį atsaką neveiksnu dėl negebėjimo atpažinti ir pašalinti virusą. Palankias mutacijas lemia ir įvairūs gydymo būdai bei aplinkos veiksniai, kurie veikia kaip selektyvūs postūmiai naujiems variantams, prisidedant prie jų išsilaikymo (Mascola ir kt., 2021).

Pirmasis SARS-CoV-2 variantas, aptiktas 2020 metų rugsėjo pabaigoje ir klasifikuotas kaip keliantis nerimą, buvo B.1.1.7 (Alfa). Šis variantas turėjo didelį skaičių mutacijų, lėmusių jo paplitimą. Virusų transmisijos padidėjimą lėmė N501Y aminorūgšties pakeitimas, kuris padidino S baltymo afiniškumą sąveikaujant su ACE2 (Chan ir kt., 2021), taip pat prisidėjo ir P618H aminorūgšties pakeitimas, esantis šalia furino skaidymo vietos (Peacock ir kt., 2020). Delecijos, įvykusios 69 ir 70 S baltymo pozicijose, lėmė naudojamų testų neveiksmingumą aptikti S baltymo geną. Šis S baltymo geno trūkumas buvo panaudotas kaip specifinis biomarkeris, nustatant teigiamuose polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) testuose Alfa linijos virusus (Bal ir kt., 2021;

Volz ir kt., 2021). Kaip ir Alfa variantas, B.1.351 (Beta) variantas, kuris buvo aptiktas 2020 metų spalio mėnesį, turėjo taškines mutacijas receptoriaus prisijungimo domene (RBD), įskaitant ir N501Y mutaciją. Atlikti tyrimai parodė, kad atsiradę nauji K417N ir E484K aminorūgščių pakeitimai kartu su jau Alfa variante aptikta N501Y mutacija toliau didino S baltymo afiniškumą prisijungiant prie ACE2 (Nelson ir kt., 2021; Zahradník ir kt., 2021). Panašias genomo mutacijas turėjo P.1 (Gama) variantas, kuris buvo aptiktas 2021 sausio mėnesį. Nuo Beta varianto išsiskyrė K417T aminorūgšties pakeitimu, esančiu RBD (Fujino ir kt., 2021). Masiškai padidinęs užsikrėtusiųjų skaičių, B.1.617.2 (Delta) variantas, kuris buvo aptiktas 2020 metų gruodžio mėnesį, turėjo L452R ir E484Q aminorūgščių pakeitimus RBD. Buvo nustatyta, kad P681R aminorūgšties pakeitimas, esantis furino skaidymo vietoje, padidino S1 ir S2 subvienetų skaidymą (Cherian ir kt., 2021; Ferreira ir kt., 2021). Užkrečiamiausiu SARS-CoV-2 variantu laikomas B.1.1.529 (Omikron) mutacijų skaičiumi aplenkė Delta variantą (Arabi ir kt., 2023). Pirmoji šios atmainos infekcija buvo nustatyta mėginyje paimtame Pietų Afrikoje 2021 lapkričio 9-tą dieną, o lapkričio 26-tą dieną WHO klasifikavo šią atmainą kaip susirūpinimą keliančią (World Health Organization, 2021). Atlikus SARS-CoV-2 originalios atmainos ir Omikron atmainos S geno sekų palyginimą buvo nustatytos 39-ios skirtingos mutacijos. Tarp šių mutacijų 27-ios nebuvo aptiktos Delta atmainoje. Drastiškiausios mutacijos buvo aptiktos S1 ir S2 subvienetų furino skaidymo vietoje RBD ir jame esančiame receptoriaus prisijungimo motyve (RBM). Tarp 15-os mutacijų RBD, 10 iš jų buvo aptikta kritiškai svarbiame RBM, kai Delta atmainoje buvo aptiktos tik dvi mutacijos šiame motyve. Omikron buvo nustatytas 760 kartų didesnis mutacijų dažnis RBM palyginus su visu S genu, kas galėtų paaiškinti greitą viruso plitimą (Kim ir kt., 2021). Omikron atmainos dominuojantį plitimą galėjo lemti S447N, Q498R ir N501Y aminorūgščių pakeitimai, kurie jau anksčiau buvo žinomi kaip gebantys padidinti afiniškumą ACE2 receptoriui (L. Wang & Cheng, 2022).

1.3.3 Vakcinų ir infekcijų sukelti antikūnai prieš SARS-CoV-2 S baltymą

Plazminių ląstelių sukurti cirkuliuojantys antikūnai, esant pakankamai aukštai koncentracijai gali užkirsti kelią infekcijai, o atminties B limfocitai turi ilgalaikius antigenam specifinius B limfocitus, kurie yra atsakingi už ilgai išliekančią greitą reakciją į šią infekciją (Victoria & Nussenzweig, 2012). SARS-CoV-2 infekcijos metu susidaro antikūnai prieš S ir N baltymus (Okba ir kt., 2020), tačiau tik S baltymui specifiniai antikūnai yra neutralizuojantys ir atsakingi už apsauginį imuninį atsaką prieš SARS-COV-2 (Deng ir kt., 2020; Stephens & McElrath, 2020). Taip pat S baltymas kaip antigenas vakcinų vystymo metu buvo pasirinktas dėl savo lokacijos, kuri yra laisvai prieinama antikūnams ir imunologinėms ląstelėms (Ravichandran ir kt., 2020) ant viruso paviršiaus. Vakcinų ir infekcijų sukeltų neutralizuojančių antikūnų veiksmingumas yra siejamas su sumažėjusiu SARS-CoV-2 užsikrėtimų skaičiumi (Chodick ir kt., 2021; Hanrath ir kt., 2021), tačiau šis veiksmingumas per keletą mėnesių stipriai sumažėja, nors ir antikūnai išlieka aptinkami kraujo serumuose (Dan ir kt., 2021; Rodda ir kt., 2021).

Po vakcinacijos arba užsikrėtimo SARS-CoV-2 virusu susidaro plazmos IgM, IgG ir IgA antikūnai prieš S baltymą ir RBD. Buvo nustatyta kad, IgG kiekiai yra didesni negu IgM ir IgA. Tačiau išsiskiriantis skaičius yra tarp vakcinuotų ir persirgusių žmonių IgG ir IgM antikūnų, kurių kiekis yra reikšmingai didesnis vakcinuotų žmonių grupėje (Z. Wang ir kt., 2021). Šie antikūnai gali būti kategorizuojami į keturias klases, priklausomai nuo antikūnų taikinių, esančių RBD. Tarp šių, 1 ir 2 klasės antikūnai yra laikomi veiksmingiausiais ir taip pat jų yra aptinkama daugiausiai (Brouwer

ir kt., 2020; Gaebler ir kt., 2021; Z. Wang ir kt., 2021). Šių antikūnų taikiniai yra epitopai, kurie persidengia ir taip pat yra artimai susiję su RBD esančiomis K417, E484 ir N501 aminorūgštimis. Dėl savo selektyvumo, jie yra labai jautrūs mutacijoms (Weisblum ir kt., 2020). Neutralizacijos tyrimai parodė, kad nauji variantai, turintys mutacijas RBD, žymiai sumažina plazmos neutralizavimo veiksmingumą (Z. Wang ir kt., 2021). Tokie rezultatai buvo matomi tiriant tiek sirgusių, tiek vakcinuotų žmonių kraujo plazmas (Greaney, Loes, ir kt., 2021; Li ir kt., 2020; Wibmer ir kt., 2021).

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

2.1 Medžiagos ir prietaisai

1 lentelė. Tyrimo metu naudotos medžiagos ir prietaisai

Medžiaga	Gamintojas, šalis
11-merkaptoundekanoinė rūgštis (11-MUR)	Sigma-Aldrich, JAV
Etanolamino hidrochloridas	Sigma-Aldrich, JAV
Fosfatinio buferio tirpalas (PBS)	Roth, Vokietija
Glicinas	Roth, Vokietija
Lūžio rodiklį atitinkantis skystis	Cargille, JAV
Metanolis	Honeywell, Prancūzija
N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimido hidrochloridas (EDC)	Roth, Vokietija
N-hidroksisukcinimidas (NHS)	Sigma-Aldrich, JAV
SARS-CoV-2-oS	Baltymas, Lietuva
Prietaisai	Gamintojas, šalis
Borosilikatinio stiklo BK7 prizmė	Cargille, JAV
Spektrinis elipsometras M-2000X	J.A.Woollam, JAV
Stilinė BK7 plokštelė, padengta Cr-Au	XanTec bioanalytics GmbH, Vokietija

2.2 Metodai

2.2.1 Aukso PPR lusto modifikacijos

SARS-CoV-2-oS kovalentinė imobilizacija ant aukso (Au) lusto paviršiaus buvo atlikta panaudojant 11-merkaptoundekano rūgšties (11-MUR) savitvarkį monosluoksnį (SAM). Pirmiausia, Au lustas, kurį sudarė 1 mm storio borosilikatinis stiklas BK7 padengtas Chromo-Au sluoksniu, buvo nuvalomas, įmerkiant 3 min. į ultragarsinėje vonelėje esantį metanolį. Metanoliumi išgaravus, Au lustas buvo įmerktas į 1 mM 11-MUR metanolyje tirpalą. Au lustas buvo laikomas 18 val., kad pilnai susiformuotų ant aukso paviršiaus SAM.

Norint kovalentiškai imobilizuoti SARS-CoV-2-oS ant SAM, pirmiausiai buvo aktyvuojamos 11-MUR esančios karboksi grupės, įleidus 3 kartus po 5 min. į elipsometrijos matavimų celę tirpalą, kurį sudaro 1:1 santykiu 0.1 M N-hidroksisukcinimidas (NHS) ir 0.4 M N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimido hidrochloridas (EDC). Po aktyvavimo, celė buvo nuplaunama įleidžiant PBS tirpalą (pH=7,4). Po nuplovimo, buvo įleidžiamas 333 nM SARS-CoV-2-oS tirpalas PBS tirpale ir laikomas 45 min. Po SARS-CoV-2-oS imobilizacijos, paviršius buvo nuplaunamas PBS tirpalu ir likusios aktyvios karboksi grupės buvo blokuojamos įleidžiant 10 min. 1 M etanolamino tirpalą (pH=8,5).

Po SARS-CoV-2-oS imobilizacijos sekė paviršiaus sąveika su monokloniniais ir polikloniniais antikūnais. Prieš įleidžiant antikūnus, buvo įleidžiamas PBS tirpalas, norint išlaikyti ir stabilizuoti bazinę liniją. Po SARS-CoV-2-oS ir antikūnų sąveikos, paviršius buvo nuplaunamas naudojant PBS tirpalą. Po nuplovimo paviršius buvo regeneruojamas naudojant 10 mM glicino tirpalą ir eksperimentas kartojamas su kitomis antikūnų koncentracijomis.

2.2.2 VVAE matavimai

Elipsometriniai matavimai buvo atlikti naudojant elipsometrą J.A. Woollam M200X (Lincoln, NE, USA). Visi VVAE eksperimentai buvo atlikti esant 70° kritimo kampui 200-1000 nm spektre. BK7 prizmė buvo prijungta prie komercinio PPR Au lusto naudojant imersinę alyvą ir toliau buvo įtaisyta į VVAE celę, kurios diametras yra 5 mm. VVAE eksperimentinėje dalyje matavimams buvo naudojama pusiau pratekanti sistema su iš teflono pagaminta cele, o tirpalai įleidžiami švirkšto pagalba. Po kiekvienos paviršiaus modifikacijos buvo įrašomas spektras elipsometrinių parametrų: $\Psi(\lambda)$ ir $\Delta(\lambda)$. Tyrime apskaičiuojant paviršiaus masę buvo naudojamas Ψ parametras dėl didesnio jautrumo esant skirtingoms serumo koncentracijoms. Regresijos analizei buvo naudojama Complete EASE programa iš J. A. Woollam Company. Jos pagalba buvo apskaičiuota iš molekulių susidariusių monoslukšnių storiai ir lužio rodikliai laike, toliau panaudojant juos paviršiaus masės skaičiavimuose.

2.2.3 Skirtingų koncentracijų serumų paruošimas

Žmogaus kraujo serumai buvo surinkti iš dviejų savanorių: persirgusio ir skiepyto. Persirgęs asmuo sirgo COVID-19 prieš atsirandant Omikron variantui, o skiepytas asmuo buvo skiepytas Comirnaty vakcina. Visas kraujas buvo surinktas į vakuuminį mėgintuvėlį, kuriame yra 3.5 mL CAT serumo separatoriaus krešėjimo aktyvatoriaus, Tavo Klinika laboratorijoje. Serumai buvo gauti centrifuguojant 15 min. 5000x g. Atliekant kinetinius matavimus buvo naudotas 1:35 skiedimas, gautas skiedžiant PBS (pH=7,4) tirpalu. Pradinės persirgusio ir skiepyto individų polikloninių antikūnų prieš RBD koncentracijos buvo atitinkamai 152 nM ir 137.5 nM.

2.2.4 Dviejų žingsnių matematinio modelio pritaikymas apskaičiuojant kinetinius ir termodinamikos parametrus

Įvertinti sąveikos tarp imobilizuoto SARS-CoV-2-oS baltymo ir polikloninių antikūnų kinetinius parametrus bei termodinamiką buvo panaudotas dviejų žingsnių negrįžtamo prisijungimo matematinis modelis. Atlikus elipsometrinių parametro Δ laike duomenų normalizavimą buvo pritaikytas modelis apskaičiuojant asociacijos greičio, disociacijos greičio ir sulaikymo konstantas. Iš šių rezultatų toliau buvo apskaičiuota: asociacijos konstanta (K_A), disociacijos konstanta (K_D) ir Gibso laisvoji energija (ΔG). R yra dujų konstanta, kuri yra lygi $8.314 \text{ J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$, o T yra reakcijos temperatūra lygi kambario temperatūrai išreikštai kelvinais.

$$K_A = \frac{k_a}{k_d} \quad (2)$$

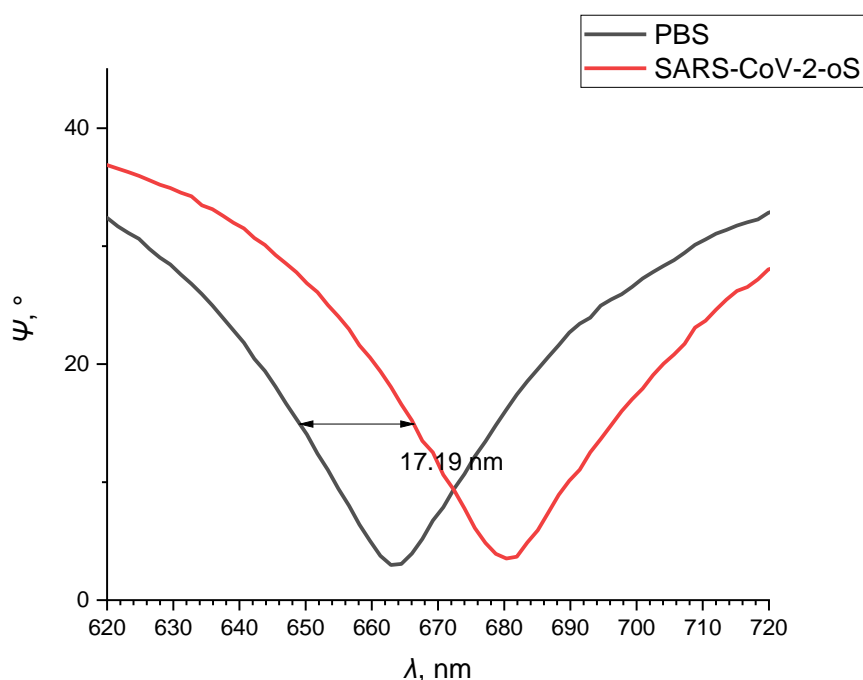
$$K_D = \frac{k_d}{k_a} \quad (3)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_A \quad (4)$$

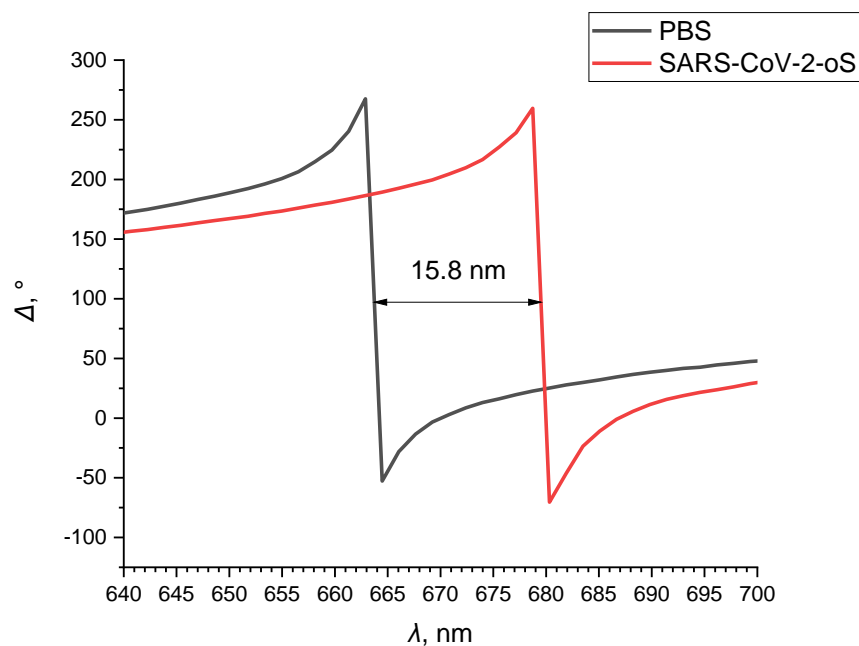
3. REZULTATAI

3.1 SARS-CoV-2-oS kovalentinė imobilizacija

Tyrimas, kurio metu buvo kovalentiškai imobilizuojami SARS-CoV-2-oS baltymai ant 11-MUR SAM sluoksnio ir toliau formuojami imuniniai kompleksai tarp SARS-CoV-2-oS ir polikloninių antikūnų, buvo vykdomas VVAE sąlygomis. SARS-CoV-2-oS 333 nM tirpalo koncentracija buvo pasirinkta pagal apskaičiuotą ant 11-MUR SAM sluoksnio esantį maksimalų prisijungimo vietų skaičių. Įleistas SARS-CoV-2-oS tirpalas celėje buvo laikomas 45 min., kol nusistovi bazinė linija, ir nuplovimas vykdomas naudojant PBS tirpalą. Vykdam analizę, bangos ilgis, kuriame yra stebimas elipsometrinio parametro pokytis laike, buvo parenkamas pagal tai, kad būtų kuo arčiau PPR bangos ilgio ir kad jame būtų stebimas mažas triukšmas. Apskaičiuojant paviršiaus masę, susidariusią po SARS-CoV-2-oS imobilizacijos ir po sąveikos su polikloniniais antikūnais, analizė buvo vykdoma pagal $\Delta(t)$ parametą 666 nm ilgio bangoje. Kinetika, kuri buvo įvertinta naudojant dviejų žingsnių modelį, buvo analizuojama pagal $\Delta(t)$ parametą 661 nm ilgio bangoje. Po SARS-CoV-2-oS imobilizacijos, didesnis poslinkis, kurio dydis buvo 17.19 nm, spektre buvo Ψ parametro (4 pav.), Δ poslinkio dydis buvo 15.8 nm (5 pav).



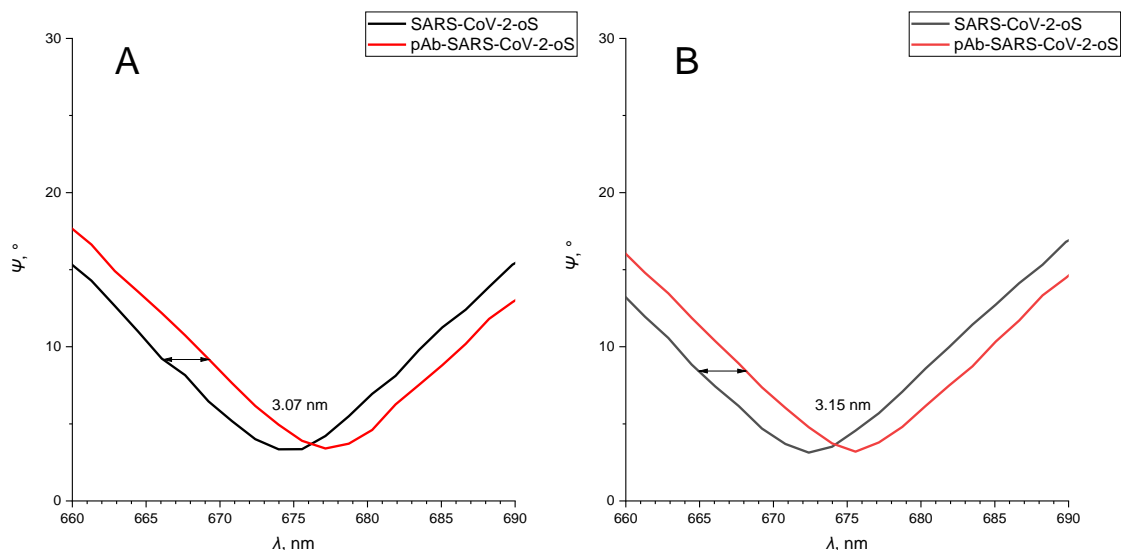
4 pav. Elipsometrinio parametro Ψ pokytis spektre SARS-CoV-2-oS imobilizacijos ant 11-MUR SAM modifikuoto PPR aukso lusto paviršiaus metu.



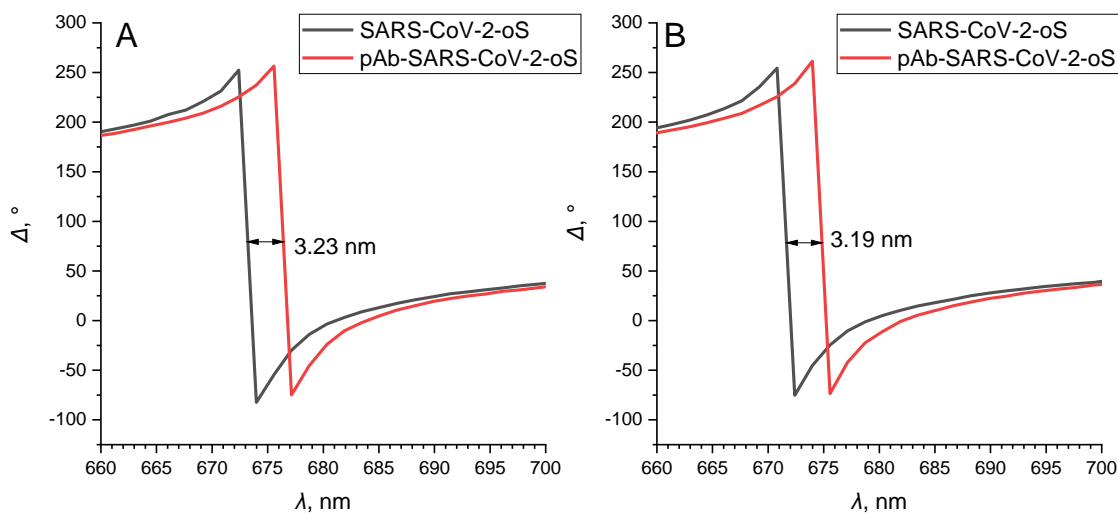
5 pav. Elipsometrinio parametro Δ pokytis spektre SARS-CoV-2-oS imobilizacijos ant 11-MUR SAM modifikuoto PPR aukso lusto paviršiaus metu.

3.2 Imuninių kompleksų formavimasis tarp kovalentiškai imobilizuoto SARS-CoV-2-oS ir polikloninių antikūnų.

Tyrimo metu buvo įvertinta sąveika tarp polikloninių antikūnų ir imobilizuoto SARS-CoV-2-oS baltymo. Kraujo serumai, kuriuose buvo nustatyta koncentracija polikloninių antikūnų prieš SARS-CoV-2 receptoriaus prisijungimo domeną, buvo paimti iš dviejų individų: persirgusio, bet neskiepyto ir skiepyto, bet nesirgusio COVID-19 liga. Skiepytas individas buvo skiepytas Comirnaty vakcina. Kitas individas buvo persirgęs to paties varianto sukelta COVID-19 liga. Kraujo serumai buvo praskiesti 35 kartus naudojant PBS tirpalą. Polikloninių antikūnų prieš SARS-CoV-2 RBD koncentracija kraujo serume paimtame iš persirgusio individo buvo 4.34 nM, o paimtame iš skiepyto individo buvo 3.93 nM. Atliekant matavimus, į VVAE celę praskiesti serumai buvo įleidžiami 30 min., kol nusistovi bazinė linija. Po sąveikos, celė buvo praplaunama naudojant PBS tirpalą. Įvertinti, ar įvyko sąveika tarp SARS-CoV-2-oS ir polikloninių antikūnų, buvo stebimas Ψ ir Δ poslinkis spektre. Susidarius ant paviršiaus antikūnų sluoksniui tiek po skiepyto, tiek po persirgusio individų praskiestų kraujo serumų įleidimų buvo matomi panašūs Ψ ir Δ poslinkiai. Po persirgusio asmens kraujo serumo įleidimo buvo matomas 3.07 nm Ψ poslinkis spektre, o po skiepyto asmens kraujo serumo įleidimo – 3.15 nm poslinkis spektre (6 pav.). Stebint Δ elipsometrinį parametą, atitinkamai buvo nustatyti 3.23 nm ir 3.19 nm poslinkiai spektre (7 pav).



6 pav. Elipsometrinio parametro Ψ pokytis spektre sąveikaujant persirgusio (A) ir skiepyto (B) individų polikloniniams antikūnams (pAb) su imobilizuotu SARS-CoV-2-oS baltymu.



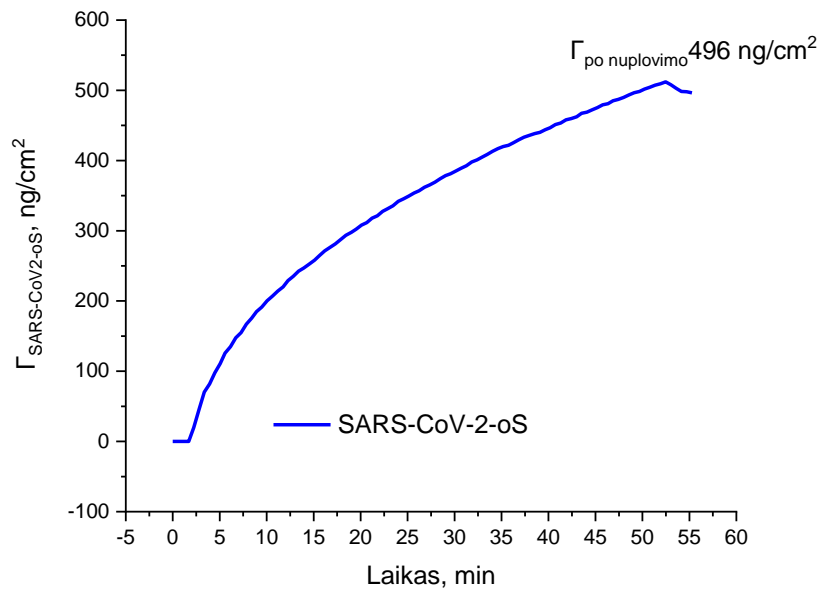
7 pav. Elipsometrinio parametro Δ pokytis spektre sąveikaujant persirgusio (A) ir skiepyto (B) individų polikloniniams antikūnams (pAb) su imobilizuotu SARS-CoV-2-oS baltymu.

3.3 SARS-CoV-2-oS ir polikloninių antikūnų kinetinė analizė

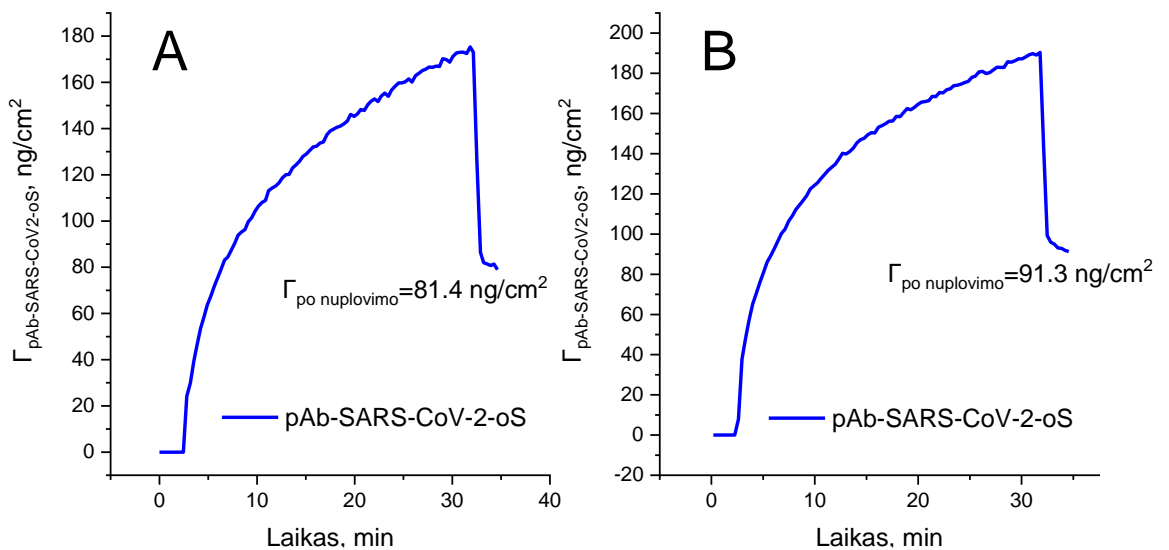
Įvertinti pAb-SARS-CoV-2 paviršiaus masės tankį po sąveikos su SARS-CoV-2-oS buvo sukonstruotas optinis modelis pagal gautus Ψ ir Δ elipsometrinis parametrus spektre. Gauti rezultatai elipsometrijos duomenų analizėje buvo pritaikyti optiniame modelyje naudojant Complete EASE programinę įrangą. Iš šio optinio modelio buvo apskaičiuoti lūžio rodikliai ir susiformavusių sluoksnių storiai, kurie toliau buvo naudoti apskaičiuojant paviršiaus masės tankius, pritaikius de Feijter formulę:

$$\Gamma = \frac{d(n_{sluoksnis} - n_{bufferis})}{\Delta n / \Delta c} \times 100 \quad (2)$$

Šioje formulėje susiformavusio SARS-CoV-2-oS arba pAb sluoksnio storis yra žymimas raide d , o $\Delta n/\Delta c$ yra lūžio rodiklio priklausomybė nuo baltymo koncentracijos (0.18) (Plikusiene, Maciulis, Juciute, Ramanavicius, ir kt., 2022; Zhao ir kt., 2011). Grafikuose yra vaizduojamas paviršiaus masės Γ pokytis laike (8 pav. ir 9 pav.). Tai yra sausa masė, į kurią neįeina PBS buferis, esantis tarp paviršiuje prisijungusių molekulių. Nustatant paviršiaus masės tankį, grafikuose buvo stebimas paviršiaus masės tankis likęs po nuplovimo PBS buferiu. Po persirgusio asmens pAb sąveikos su SARS-CoV-2-oS susiformavo sluoksnis, kurio paviršiaus masės tankis siekė 81.4 ng/cm^2 . Didesnis paviršiaus masės tankis, kuris siekė 91.3 ng/cm^2 , buvo nustatytas po sąveikos su skiepyto asmens pAb.

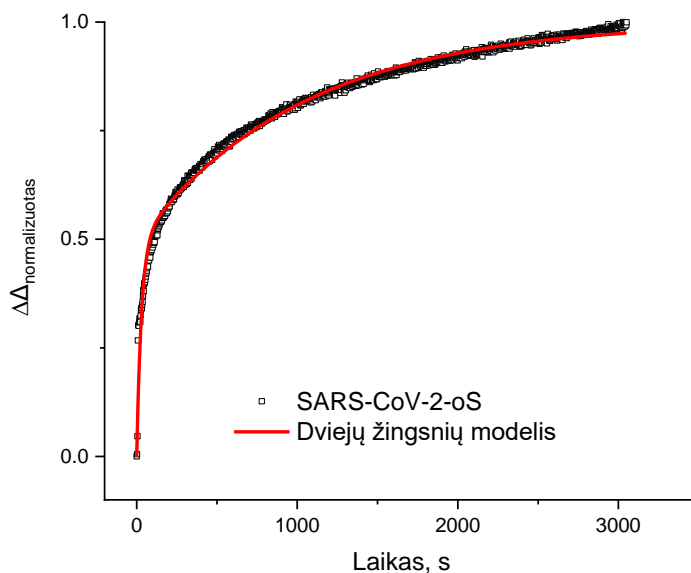


8 pav. SARS-CoV-2-oS baltymo paviršiaus masės tankio Γ pokytis laike imobilizacijos ant MUR-11 SAM paviršiaus metu.

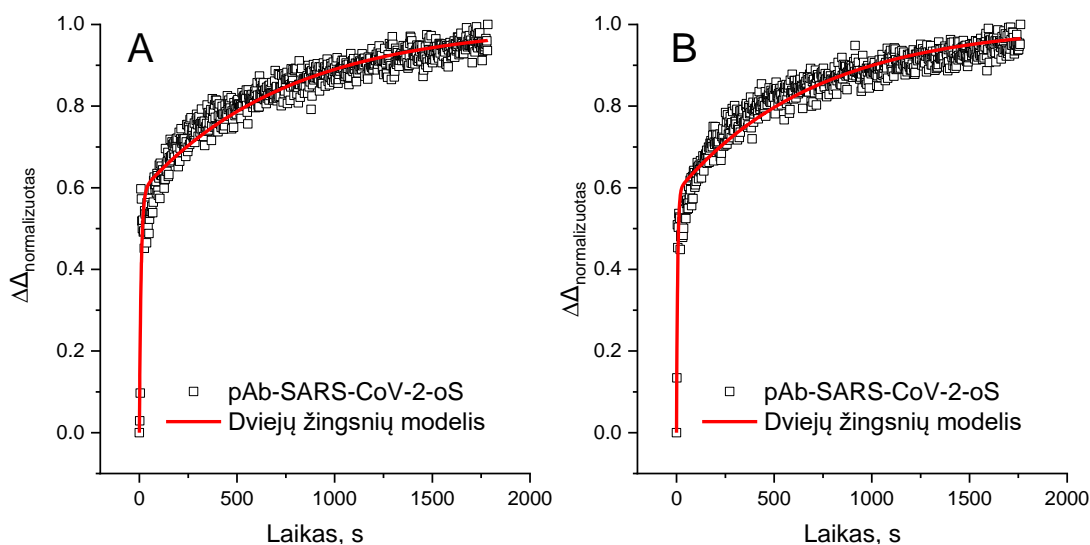


9 pav. Persirgusio (A) ir skiepyto (B) individų polikloninių antikūnų paviršiaus masės tankio Γ pokytis laike sąveikaujant su SARS-CoV-2-oS baltymu.

Eksperimento metu gauti Δ pokyčiai laike buvo normalizuoti ir pritaikyti negrižtamame dviejų žingsnių matematiniame modelyje. Iš šio modelio buvo apskaičiuota asociacijos greičio konstanta (k_a), disociacijos greičio konstanta (k_d), stabilių imuninių kompleksų formavimosi greičio konstanta (k_r), pusiausvyros asociacijos ir disociacijos konstantos (K_A ir K_D) ir Gibso laisvoji energija (ΔG). Normalizuoti Δ pokyčiai laike po SARS-CoV-2-oS baltymų imobilizacijos ir polikloninių antikūnų prisijungimo buvo grafiškai pavaizduoti (10 pav. ir 11 pav.) kartu su pritaikytu negrižtamu dviejų žingsnių modelio nubrėžta kreive.



10 pav. Normalizuoto Δ parametro pokytis laike SARS-CoV-2-oS imobilizacijos ant MUR-11 SAM paviršiaus metu. Kvadratėliais yra žymimi eksperimento metu gauti duomenys, o kreivė žymi pritaikytą matematinę modelį.



11 pav. Normalizuoto Δ parametro pokytis laike sąveikaujant persirgusio (A) ir skiepyto (B) individų polikloniniams antikūnams (pAb) su SARS-CoV-2-oS baltymu. Kvadratėliais yra žymimi eksperimento metu gauti duomenys, o kreivė žymi pritaikytą matematinę modelį.

Analizės metu buvo nustatyta, kad tiek, skiepyto tiek persirgusio individų polikloninių antikūnų sąveikos su SARS-CoV-2-oS baltymu greičio konstantos yra tos pačios eilės (2 lentelė). Skiepyto asmens pAb asociacijos greičio konstanta ($k_a = 2.67 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) buvo didesnė negu persirgusio asmens pAb ($k_a = 1.53 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Tačiau nustatyta persirgusio asmens pAb disociacijos greičio konstanta ($k_d = 2.97 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$) buvo beveik 2 kartus mažesnė negu skiepyto asmens pAb ($k_d = 7.47 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$). Lyginant pusiausvyros konstantas, persirgusio asmens disociacijos konstanta ($K_D = 0.195 \text{ nM}$) buvo apie 14 kartų mažesnė negu skiepyto asmens pAb ($K_D = 2.8 \text{ nM}$), o asociacijos konstantos buvo atitinkamai $K_A = 5.14 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ir $K_A = 3.58 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. Sąveikos tarp skiepyto asmens polikloninių antikūnų ir SARS-CoV-2 baltymo apskaičiuota Gibso laisvoji energija yra lygi -53.63 kJ/mol , o persirgusio asmens – -54.5 kJ/mol .

2 lentelė. Polikloninių antikūnų ir SARS-CoV-2-oS sąveikų kinetiniai parametrai ir Gibso energija

	$k_a \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$k_r \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_d \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_A \text{ (M}^{-1}\text{)}$	$K_D \text{ (M)}$	$\Delta G \text{ (kJ/mol)}$
pAb-SARS-CoV-2-oS skiepyto asmens	2.67×10^7	2.48×10^{-4}	7.47×10^{-3}	3.58×10^9	2.8×10^{-9}	-53.63
pAb-SARS-CoV-2-oS persirgusio asmens	1.53×10^7	1.48×10^{-4}	2.97×10^{-3}	5.14×10^9	1.95×10^{-10}	-54.5
SARS-CoV-2-oS	5.09×10^4	3.27×10^{-5}	2.64×10^{-4}	1.93×10^8	5.18×10^{-9}	-46.5

4. REZULTATŲ APITARIMAS

Darbo metu buvo tiriamos sąveikos tarp SARS-CoV-2-oS baltymo ir polikloninių antikūnų, esančių kraujo serumuose, paimtuose iš skiepyto Comirnaty vakcina ir persirgusio COVID-19 liga individų. VVAE būdu gauti elipsometrinių parametrų pokyčiai buvo panaudoti apskaičiuojant paviršiaus masės tankius, kinetiką ir termodinamiką.

Eksperimento metu panaudojant VVAE metodą buvo įvertintos sąveikos tarp SARS-CoV-2-oS baltymo ir polikloninių antikūnų, esančių dviejuose skirtinguose kraujo serumuose, paimtuose iš skiepyto ir persirgusio individų. Tam padaryti pirmiausiai buvo atliktos PPR lusto modifikacijos, kurių metu ant paviršiaus esančio 11-MUR SAM buvo atlikta SARS-CoV-2-oS baltymų nekryptinga imobilizacija. Sąveikos tarp antikūnų prieš RBD ir SARS-CoV-2 S baltymo yra aptinkamos nepriklausomai nuo S baltymo orientacijos ant modifikuoto aukso lusto paviršiaus (Cardoso ir kt., 2022; Drobysh ir kt., 2022; Plikusiene, Maciulis, Juciute, Maciuleviciene, ir kt., 2022) ir eksperimento metu nustatyti elipsometrinių parametrų Ψ (17.19 nm) ir Δ (15.8 nm) poslinkiai spektre parodė, kad imobilizacija naudojant 11-MUR SAM buvo sėkminga. Afiniškumas tarp tirtų polikloninių antikūnų ir SARS-CoV-2-oS baltymo buvo įvertintas apskaičiuojant polikloninių antikūnų paviršiaus masės tankius ir pritaikant dviejų žingsnių modelį gauti kinetinius parametrus bei Gibso laisvąją energiją. Žinant, kad lūžio rodiklis yra plataus koncentracijų diapazono linijinė funkcija, pritaikius de Feijter formulę (De Feijter ir kt., 1978) buvo apskaičiuotas absoliutus paviršiaus masės tankis. Tikslios sąveikos, lemiančios imuninių kompleksų tarp polikloninių antikūnų ir SARS-CoV-2-oS baltymo formavimąsi, nėra žinomos ir ankstesni SARS-CoV-2 baltymų ir antikūnų tyrimai (Plikusiene ir kt., 2021; Plikusiene, Maciulis, Juciute, Maciuleviciene, ir kt., 2022) parodė, kad šių sąveikų kinetika ir termodinamika negali būti įvertinama panaudojant vieno žingsnio Langmuir modelį, dėl to buvo pritaikytas negrižtamas dviejų žingsnių matematinis modelis, kuris į skaičiavimus įtraukia papildomą sulaikymo k_r konstantą.

Plikusiene, Maciulis, Juciute, ir kt., 2023 atliktame tyrime po SARS-CoV-2 *wild-type* S (SARS-CoV-2-wtS), SARS-CoV-2 alfa S (SARS-CoV-2- α S) ir SARS-CoV-2 beta S (SARS-CoV-2- β S) sąveikos su polikloniniais antikūnais, esančiais kraujo serume, paimtame iš asmens, skiepyto Comirnaty vakcina, buvo nustatyti paviršiaus masės tankiai. Po antikūnų sąveikos su SARS-CoV-2-wtS, VVAE metodu nustatytas paviršiaus masės tankis siekė 297 ng/cm², po sąveikos su SARS-CoV-2- α S – 281 ng/cm² ir po sąveikos su SARS-CoV-2- β S – 249 ng/cm². Laboratoriniai ir in silico tyrimai parodė, kad mutacijos, įvykusios S baltymo RBD, lėmė S baltymo didesnę afiniškumą ACE2 receptoriui (Barton ir kt., 2021; Mungmunpantipantip & Wiwanitkit, 2022; Vogt ir kt., 2022) ir imuninę evaziją, dėl kurios yra sumažėjęs polikloninių antikūnų afiniškumas S baltymui. Šio darbo metu po SARS-CoV-2-oS sąveikos su polikloniniais antikūnais, esančiais kraujo serume, paimtame iš asmens, skiepyto Comirnaty vakcina, buvo nustatytas paviršiaus masės tankis, kuris siekė 91.3 ng/cm². Nustatytas paviršiaus masės tankis buvo net apie 3 kartus mažesnis, lyginant su tankiu, nustatytu po antikūnų sąveikos su SARS-CoV-2-wtS, SARS-CoV-2- α S ar SARS-CoV-2- β S. Šis skirtumas galėtų paaiškinti Omikron varianto dominavimą ir greitą paplitimą (Arabi ir kt., 2023), žinant, kad mutacijos lėmė ne tik didžiausią afiniškumą ACE2 receptoriui (Kim ir kt., 2022), bet ir gebėjimą išvengti imuninio atsako. Įdomu pasirodė tai, kad nustatytas paviršiaus masės tankis, kuris siekė 81.4 ng/cm², po sąveikos su polikloniniais antikūnais, esančiais kraujo serume, paimtame iš asmens, sirgusio COVID-19, buvo mažesnis. Tyrimo, kuriame buvo įvertintas įvairių kraujo serumų efektyvumas neutralizuoti SARS-CoV-2 Omikron variantą, rezultatai parodė, kad serumai, paimti iš asmenų, persirgusių COVID-19 liga, yra veiksmingesni už tik pasiskiepijusią vieną dozę asmenų

kraujo serumus (Ozono ir kt., 2021). Šie rezultatai atitinka ir tolimesnę tyrime apskaičiuotą kinetiką ir termodinamiką, o didesnis nustatytas paviršiaus masės tankis po sąveikos su polikloniniais antikūnais, esančiais kraujo serume, paimtame iš asmens, paskiepyto Comirnaty vakcina, galėjo būti dėl negrįžtamų molekulinų sąveikų.

Kitame Plikusiene, Maciulis, Juciute, Maciuleviciene, ir kt., 2022 tyrime buvo įvertinti kinetiniai parametrai, gauti po polikloninių antikūnų, esančių kraujo serume, paimtame iš asmens, skiepyto Comirnaty vakcina, sąveikos su SARS-CoV-2-wtS, SARS-CoV-2- α S ir SARS-CoV-2- β S. Kinetikos tyrimo metu gautos asociacijos (k_a) ir disociacijos (k_d) greičio konstantos, pusiausvyros asociacijos (K_A) ir disociacijos (K_D) konstantos ir sulaikymo konstanta (k_r) yra pateikiamos 3 lentelėje. Šio tyrimo metu skiepyto asmens polikloninių antikūnų asociacijos greitis sąveikaujant su SARS-CoV-2-oS baltymu siekė $2.67 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, kas yra 5.5 kartų daugiau negu sąveikaujant su SARS-CoV-2- β S ir 8.4 kartų daugiau negu sąveikaujant su SARS-CoV-2-wtS baltymais. Iš tyrimo metu gautų ir ankstesnių rezultatų yra matoma tendencija, kad didėjant mutacijų skaičiui, didėja ir asociacijos greitis. Panaši tendencija yra matoma ir su kitais kinetiniais parametrais. Didėjant mutacijų skaičiui, didėja ir disociacijos greičio konstanta. Šio tyrimo metu nustatyta antikūnų disociacijos greičio konstanta ($k_d=7.47 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) sąveikaujant su SARS-CoV-2-oS baltymu buvo net 228 kartus didesnė negu sąveikaujant su SARS-CoV-2- β S ir 725 kartus didesnė negu sąveikaujant su SARS-CoV-2-wtS baltymais. Toks didelis skirtumas parodo, kad antikūnai sudaro žymiai silpnesnes sąveikas su SARS-CoV-2-oS baltymu, kas lemia greitą disociaciją ir atitinka tai, kad mutacijos, kurios keičia prisijungimų vietų afiniškumą, pagrinde veikia tik k_d , o k_a yra tik nežymiai paveikiamas (Agius ir kt., 2013). Antikūnų afiniškumas SARS-CoV-2-oS baltymui atsižvelgiant į pusiausvyros disociacijos konstantą ($K_D=1.68 \times 10^{-6} \text{ M}$) buvo 5217 kartų mažesnis negu SARS-CoV-2-wtS ir 3071 kartų mažesnis negu SARS-CoV-2- β S baltymams. Žymūs afiniškumo skirtumai atitinka žinomą didelį efektyvumo sumažėjimą skiepytų ir nskiepytų asmenų polikloniniams antikūnams neutralizuojant SARS-CoV-2 Omikron virusus (Schubert ir kt., 2022). Lyginant šiame darbe gautus skiepyto ir persirgusio individų polikloninių antikūnų sąveikos su SARS-CoV-2-oS kinetinius parametrus, persirgusio asmens antikūnų asociacijos greičio konstanta buvo ($k_a=1.53 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) mažesnė nei skiepyto asmens antikūnų. Disociacijos greičio konstanta ($k_d=2.97 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) buvo 2 kartus mažesnė, o afiniškumas SARS-CoV-2-oS baltymui buvo net apie 14 kartų žemesnis. Didesnis sirgusio asmens polikloninių antikūnų afiniškumas SARS-CoV-2-oS baltymui atitinka kitų tyrimų rezultatus, kurie parodė, kad reikšmingas vakcinų poveikis prieš SARS-CoV-2 Omikron yra matomas tik po trijų vakcinavimų (Dulovic ir kt., 2022; Schubert ir kt., 2022). Atsižvelgus į sąveikos laisvąją energiją yra matomas panašus skiepyto ($\Delta G=-53.63 \text{ kJ/mol}$) ir persirgusio ($\Delta G=-54.5 \text{ kJ/mol}$) individų polikloninių antikūnų afiniškumas SARS-CoV-2-oS baltymui. Abejais atvejais polikloniniams antikūnams yra termodinamiškai palanku su SARS-CoV-2-oS formuoti imuninį kompleksą.

3 lentelė. Polikloninių antikūnų specifinių sąveikų su SARS-CoV-2 variantais kinetiniai parametrai (Plikusiene, Maciulis, Juciute, Maciuleviciene, ir kt., 2022).

	SARS-CoV-2-wtS	SARS-CoV-2- α S	SARS-CoV-2- β S
$k_a \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	3.19×10^6	5.01×10^6	5.92×10^6
$k_d \text{ (s}^{-1}\text{)}$	1.03×10^{-5}	1.97×10^{-5}	3.27×10^{-5}
$K_A \text{ (M}^{-1}\text{)}$	3.09×10^{11}	2.54×10^{11}	1.81×10^{11}
$K_D \text{ (M)}$	3.22×10^{-10}	$3.93 \cdot 10^{-10}$	5.47×10^{-10}
$k_r \text{ (s}^{-1}\text{)}$	5.05×10^{-6}	1.48×10^{-5}	1.33×10^{-5}

Įvertinus polikloninių antikūnų sąveikas su SARS-CoV-2 S baltymais yra matoma tendencija, lemianti prastesnį imuninį atsaką prieš didesnį kiekį mutacijų RBD turinčius SARS-CoV-2 variantus. Reikšmingam imuniniui atsakui neužtenka dviejų dozių Comirnaty vakcinos ir yra būtinas papildomas skiepijamas.

IŠVADOS

1. Kovalentinė SARS-CoV-2-oS imobilizacija buvo atlikta ant 11-MUR modifikuoto aukso PPR lusto paviršiaus.
2. VVAE eksperimento metu buvo gauti elipsometrinių parametrų pokyčiai parodė, kad SARS-CoV-2-oS imobilizacija buvo sėkminga ir įvyko sąveika su polikloniniais antikūnais.
3. Pritaikius optinį modelį buvo apskaičiuoti paviršiaus masės tankiai ir nustatyta, kad po SARS-CoV-2-oS sąveikos su polikloniniais antikūnais, esančiais kraujo serume, paimtame iš asmens skiepyto Comirnaty vakcina, buvo didesnis paviršiaus masės tankis – 91.3 ng/cm^2 , negu po sąveikos su persirgusio COVID-19 asmens polikloniniais antikūnais – 81.4 ng/cm^2 .
4. Pritaikius dviejų žingsnių matematinį modelį buvo nustatyta, kad polikloniniais antikūnais, esantys kraujo serume, paimtame iš asmens skiepyto Comirnaty vakcina, jungiasi lėčiau prie SARS-CoV-2-oS, tačiau disocijuoja 2 kartus lėčiau už polikloninius antikūnus, esančius kraujo serume, paimtame iš persirgusio COVID-19 asmens, kurie taip pat turi 14 kartų didesnę afiniškumą SARS-CoV-2-oS baltymui ir termodinamiškai palankiau formuoja imuninį kompleksą.

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

MANTVYDAS USVALTAS

SARS-CoV-2 spyglio baltymo omikron varianto ir polikloninių antikūnų sąveikos tyrimas taikant realaus laiko visiško vidaus atspindžio elipsometrijos metodą

Tyrimo metu buvo ištirta sąveika tarp kovalentiškai imobilizuoto SARS-CoV-2-oS baltymo ir polikloninių antikūnų, esančių kraujo serumuose, paimtuose iš persirgusio COVID-19 liga ir paskiepyto Comirnaty vakcina individų. Parinkus tinkamas sąlygas SARS-CoV-2-oS baltymo kovalentiniam imobilizavimui, buvo panaudotas realaus laiko visiško vidaus atspindžio elipsometrijos metodas nustatyti elipsometrinių parametrų pokyčius polikloniniams antikūnams sąveikaujant su SARS-CoV-2-oS baltymu. Sąveikų įvertinimui buvo pritaikyti matematiniai modeliai: optinis modelis, su kuriuo buvo apskaičiuotas paviršiaus masės tankis, ir dviejų žingsnių modelis, su kuriuo buvo apskaičiuoti kinetiniai parametrai bei termodinamika. Nustatyta, kad po SARS-CoV-2-oS baltymo sąveikos su polikloniniais antikūnais, esančiais kraujo serume, paimtame iš asmens skiepyto Comirnaty vakcina, susiformuoja didesnis paviršiaus masės tankis. Šių antikūnų asociacijos greitis yra didesnis už polikloninių antikūnų, esančių kraujo serume, paimtame iš COVID-19 liga persirgusio asmens, greitį, tačiau disociacijos greitis yra žemesnis. Taip pat, polikloniniai antikūnai, esantys kraujo serume, paimtame iš COVID 19 liga persirgusio asmens, turi 14 kartų didesnę afiniškumą SARS-CoV-2-oS baltymui ir termodinamiškai palankiau formuoja imuninį kompleksą.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

MANTVYDAS USVALTAS

Investigation of SARS-CoV-2 Spike Omicron Protein Interaction with Polyclonal Antibodies by Real Time Total Internal Reflection Ellipsometry

During the study, the interaction between covalently immobilized SARS-CoV-2-oS protein and polyclonal antibodies present in blood sera obtained from individuals who had recovered from COVID-19 and those vaccinated with the Comirnaty vaccine was investigated. After selecting suitable conditions for the covalent immobilization of the SARS-CoV-2-oS protein, real time total internal reflection ellipsometry method was employed to determine changes in ellipsometric parameters upon interaction of polyclonal antibodies with the SARS-CoV-2-oS protein. Mathematical models were applied for the evaluation of interactions: an optical model was used to calculate the surface mass density, and a two-step model was utilized to calculate kinetic parameters and thermodynamics. It was found that after interaction of the SARS-CoV-2-oS protein with polyclonal antibodies present in blood serum obtained from an individual vaccinated with the Comirnaty vaccine, a higher surface mass density was formed. The association rate of these antibodies is higher than that of polyclonal antibodies present in blood serum obtained from an individual who had recovered from COVID-19, however, the dissociation rate is lower. Additionally, polyclonal antibodies present in blood serum obtained from an individual who had recovered from COVID-19 exhibit a 14-fold higher affinity to the SARS-CoV-2-oS protein and thermodynamically favour the formation of an immune complex.

LITERATŪROS ŠARĀŠAS

1. Agius, R., Torchala, M., Moal, I. H., Fernández-Recio, J., & Bates, P. A. (2013). Characterizing Changes in the Rate of Protein-Protein Dissociation upon Interface Mutation Using Hotspot Energy and Organization. *PLOS Computational Biology*, *9*(9), e1003216. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003216>
2. Amanat, F., & Krammer, F. (2020). SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. *Immunity*, *52*(4), 583–589. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.007>
3. Arabi, M., Al-Najjar, Y., Mhaimed, N., Salameh, M. A., Paul, P., AlAnni, J., Abdelati, A. A., Laswi, I., Khanjar, B., Al-Ali, D., Elshafeey, A., Mhaimed, O., Burney, Z., D'Souza, A., Sinha, P., Bhatti, M., Pillai, K. V., Homssi, M., Bshesh, K., ... Zakaria, D. (2023). Severity of the Omicron SARS-CoV-2 variant compared with the previous lineages: A systematic review. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *27*(11), 1443–1464. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17747>
4. Araf, Y., Akter, F., Tang, Y., Fatemi, R., Parvez, Md. S. A., Zheng, C., & Hossain, Md. G. (2022). Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. *Journal of Medical Virology*, *94*(5), 1825–1832. <https://doi.org/10.1002/jmv.27588>
5. Bal, A., Destras, G., Gaymard, A., Stefic, K., Marlet, J., Eymieux, S., Regue, H., Semanas, Q., d'Aubarede, C., Billaud, G., Laurent, F., Gonzalez, C., Mekki, Y., Valette, M., Bouscambert, M., Gaudy-Graffin, C., Lina, B., Morfin, F., Josset, L., & Group, C.-D. H. S. (2021). *Two-step strategy for the identification of SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 and other variants with spike deletion H69-V70, France, August to December 2020* (p. 2020.11.10.20228528). medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.11.10.20228528>
6. Barton, M. I., MacGowan, S. A., Kutuzov, M. A., Dushek, O., Barton, G. J., & van der Merwe, P. A. (2021). Effects of common mutations in the SARS-CoV-2 Spike RBD and its ligand, the human ACE2 receptor on binding affinity and kinetics. *eLife*, *10*, e70658. <https://doi.org/10.7554/eLife.70658>
7. Beseničar, M., Maček, P., Lakey, J. H., & Anderluh, G. (2006). Surface plasmon resonance in protein–membrane interactions. *Chemistry and Physics of Lipids*, *141*(1), 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2006.02.010>
8. Bombarová, K., Chlupík, J., & Cirák, J. (2015). Surface Plasmon Resonance Ellipsometry Based Biosensor for the Investigation of Biomolecular Interactions. *Materials Today: Proceedings*, *2*(1), 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2015.04.010>
9. Boozer, C., Kim, G., Cong, S., Guan, H., & Londergan, T. (2006). Looking towards label-free biomolecular interaction analysis in a high-throughput format: A review of new surface plasmon resonance technologies. *Current Opinion in Biotechnology*, *17*(4), 400–405. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.06.012>
10. Brouwer, P. J. M., Caniels, T. G., van der Straten, K., Snitselaar, J. L., Aldon, Y., Bangaru, S., Torres, J. L., Okba, N. M. A., Claireaux, M., Kerster, G., Bentlage, A. E. H., van Haaren, M. M., Guerra, D., Burger, J. A., Schermer, E. E., Verheul, K. D., van der Velde, N., van der Kooi, A., van Schooten, J., ... van Gils, M. J. (2020). Potent neutralizing antibodies from COVID-

19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science*, 369(6504), 643–650.
<https://doi.org/10.1126/science.abc5902>

11. Cardoso, A. R., Alves, J. F., Frasco, M. F., Piloto, A. M., Serrano, V., Mateus, D., Sebastião, A. I., Matos, A. M., Carmo, A., Cruz, T., Fortunato, E., & Sales, M. G. F. (2022). An ultra-sensitive electrochemical biosensor using the Spike protein for capturing antibodies against SARS-CoV-2 in point-of-care. *Materials Today Bio*, 16, 100354.
<https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100354>
12. Chan, K. K., Tan, T. J. C., Narayanan, K. K., & Procko, E. (2021). An engineered decoy receptor for SARS-CoV-2 broadly binds protein S sequence variants. *Science Advances*, 7(8), eabf1738. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf1738>
13. Cherian, S., Potdar, V., Jadhav, S., Yadav, P., Gupta, N., Das, M., Rakshit, P., Singh, S., Abraham, P., Panda, S., & Team, N. I. C. (2021). SARS-CoV-2 Spike Mutations, L452R, T478K, E484Q and P681R, in the Second Wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *Microorganisms*, 9(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071542>
14. Chodick, G., Tene, L., Patalon, T., Gazit, S., Ben Tov, A., Cohen, D., & Muhsen, K. (2021). Assessment of Effectiveness of 1 Dose of BNT162b2 Vaccine for SARS-CoV-2 Infection 13 to 24 Days After Immunization. *JAMA Network Open*, 4(6), e2115985.
<https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.15985>
15. Cooper, M. A. (2004). Advances in membrane receptor screening and analysis. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, 17(4), 286–315. <https://doi.org/10.1002/jmr.675>
16. 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>
17. Dan, J. M., Mateus, J., Kato, Y., Hastie, K. M., Yu, E. D., Faliti, C. E., Grifoni, A., Ramirez, S. I., Haupt, S., Frazier, A., Nakao, C., Rayaprolu, V., Rawlings, S. A., Peters, B., Krammer, F., Simon, V., Saphire, E. O., Smith, D. M., Weiskopf, D., ... Crotty, S. (2021). Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6529), eabf4063. <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>
18. De Feijter, J. A., Benjamins, J., & Veer, F. A. (1978). Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air–water interface. *Biopolymers*, 17(7), 1759–1772. <https://doi.org/10.1002/bip.1978.360170711>
19. Deng, W., Bao, L., Liu, J., Xiao, C., Liu, J., Xue, J., Lv, Q., Qi, F., Gao, H., Yu, P., Xu, Y., Qu, Y., Li, F., Xiang, Z., Yu, H., Gong, S., Liu, M., Wang, G., Wang, S., ... Qin, C. (2020). Primary exposure to SARS-CoV-2 protects against reinfection in rhesus macaques. *Science*, 369(6505), 818–823. <https://doi.org/10.1126/science.abc5343>
20. Denison, M. R., Graham, R. L., Donaldson, E. F., Eckerle, L. D., & Baric, R. S. (2011). Coronaviruses: An RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA Biology*, 8(2), 270–279. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.15013>
21. Drobysch, M., Liustrovaite, V., Baradoke, A., Rucinskiene, A., Ramanaviciene, A., Ratautaite, V., Viter, R., Chen, C.-F., Plikusiene, I., Samukaite-Bubniene, U., Slibinskas, R., Ciplys, E., Simanavicius, M., Zvirbliene, A., Kucinskaite-Kodze, I., & Ramanavicius, A. (2022). Electrochemical Determination of Interaction between SARS-CoV-2 Spike Protein and Specific

Antibodies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), Article 12.
<https://doi.org/10.3390/ijms23126768>

22. Dulovic, A., Kessel, B., Harries, M., Becker, M., Ortmann, J., Griesbaum, J., Jüngling, J., Junker, D., Hernandez, P., Gorny, D., Glöckner, S., Melhorn, V., Castell, S., Heise, J.-K., Kemmling, Y., Tonn, T., Frank, K., Illig, T., Klopp, N., ... Strengert, M. (2022). Comparative Magnitude and Persistence of Humoral SARS-CoV-2 Vaccination Responses in the Adult Population in Germany. *Frontiers in Immunology*, 13, 828053.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.828053>

23. El-Shabasy, R. M., Nayel, M. A., Taher, M. M., Abdelmonem, R., Shoueir, K. R., & Kenawy, E. R. (2022). Three waves changes, new variant strains, and vaccination effect against COVID-19 pandemic. *International Journal of Biological Macromolecules*, 204, 161–168. Scopus.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.118>

24. Eurosurveillance editorial team. (2020). Note from the editors: World Health Organization declares novel coronavirus (2019-nCoV) sixth public health emergency of international concern. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 25(5), 200131e. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.5.200131e>

25. Ferreira, I., Datir, R., Papa, G., Kemp, S., Meng, B., Rakshit, P., Singh, S., Pandey, R., Ponnusamy, K., Radhakrishnan, V. S., Consortium (INSACOG), T. I. S.-C.-2 G., Consortium, T. C.-19 G. U. (COG-U., Sato, K., James, L., Aggarwal, A., & Gupta, R. K. (2021). *SARS-CoV-2 B.1.617 emergence and sensitivity to vaccine-elicited antibodies* (p. 2021.05.08.443253). bioRxiv.
<https://doi.org/10.1101/2021.05.08.443253>

26. Fujino, T., Nomoto, H., Kutsuna, S., Ujiie, M., Suzuki, T., Sato, R., Fujimoto, T., Kuroda, M., Wakita, T., & Ohmagari, N. (2021). Novel SARS-CoV-2 Variant in Travelers from Brazil to Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 27(4), 1243–1245.
<https://doi.org/10.3201/eid2704.210138>

27. Fujiwara, H. (2007). *Spectroscopic Ellipsometry: Principles and Applications*. John Wiley & Sons.

28. Gaebler, C., Wang, Z., Lorenzi, J. C. C., Muecksch, F., Finkin, S., Tokuyama, M., Cho, A., Jankovic, M., Schaefer-Babajew, D., Oliveira, T. Y., Cipolla, M., Viant, C., Barnes, C. O., Bram, Y., Breton, G., Hägglöf, T., Mendoza, P., Hurley, A., Turroja, M., ... Nussenzweig, M. C. (2021). Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature*, 591(7851), 639–644.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03207-w>

29. Galanti, M., Fanelli, D., & Piazza, F. (2016). Conformation-controlled binding kinetics of antibodies. *Scientific Reports*, 6(1), 18976. <https://doi.org/10.1038/srep18976>

30. Gauglitz, G. (2020). Critical assessment of relevant methods in the field of biosensors with direct optical detection based on fibers and waveguides using plasmonic, resonance, and interference effects. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(14), 3317–3349.
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02581-0>

31. Gram, M. A., Emborg, H.-D., Schelde, A. B., Friis, N. U., Nielsen, K. F., Moustsen-Helms, I. R., Legarth, R., Lam, J. U. H., Chaine, M., Malik, A. Z., Rasmussen, M., Fonager, J., Sieber, R. N., Stegger, M., Ethelberg, S., Valentiner-Branth, P., & Hansen, C. H. (2022). Vaccine effectiveness against SARS-CoV-2 infection or COVID-19 hospitalization with the Alpha, Delta, or

Omicron SARS-CoV-2 variant: A nationwide Danish cohort study. *PLOS Medicine*, 19(9), e1003992. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003992>

32. Greaney, A. J., Loes, A. N., Crawford, K. H. D., Starr, T. N., Malone, K. D., Chu, H. Y., & Bloom, J. D. (2021). *Comprehensive mapping of mutations to the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human serum antibodies* (p. 2020.12.31.425021). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.12.31.425021>
33. Greaney, A. J., Starr, T. N., Barnes, C. O., Weisblum, Y., Schmidt, F., Caskey, M., Gaebler, C., Cho, A., Agudelo, M., Finkin, S., Wang, Z., Poston, D., Muecksch, F., Hatziioannou, T., Bieniasz, P. D., Robbiani, D. F., Nussenzweig, M. C., Bjorkman, P. J., & Bloom, J. D. (2021). Mapping mutations to the SARS-CoV-2 RBD that escape binding by different classes of antibodies. *Nature Communications*, 12(1), 4196. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24435-8>
34. Halpern, A. R., Chen, Y., Corn, R. M., & Kim, D. (2011). Surface plasmon resonance phase imaging measurements of patterned monolayers and DNA adsorption onto microarrays. *Analytical chemistry*, 83(7), 2801–2806. <https://doi.org/10.1021/ac200157p>
35. Hanrath, A. T., Payne, B. A. I., & Duncan, C. J. A. (2021). Prior SARS-CoV-2 infection is associated with protection against symptomatic reinfection. *The Journal of Infection*, 82(4), e29–e30. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.12.023>
36. He, X., Hong, W., Pan, X., Lu, G., & Wei, X. (2021). SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics and prevention. *MedComm*, 2(4), 838–845. <https://doi.org/10.1002/mco2.110>
37. Huang, C.-W., Lin, C., Nguyen, M. K., Hussain, A., Bui, X.-T., & Ngo, H. H. (2023). A review of biosensor for environmental monitoring: Principle, application, and corresponding achievement of sustainable development goals. *Bioengineered*, 14(1), 58–80. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2095089>
38. Huang, Y. h., Ho, H. p., Kong, S. k., & Kabashin, A. v. (2012). Phase-sensitive surface plasmon resonance biosensors: Methodology, instrumentation and applications. *Annalen Der Physik*, 524(11), 637–662. <https://doi.org/10.1002/andp.201200203>
39. Yadav, S. P., Bergqvist, S., Doyle, M. L., Neubert, T. A., & Yamniuk, A. P. (2012). MIRG Survey 2011: Snapshot of rapidly evolving label-free technologies used for characterizing molecular interactions. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, 23(3), 94–100. <https://doi.org/10.7171/jbt.12-2303-002>
40. Yu, X., Ding, X., Liu, F., Wei, X., & Wang, D. (2007). A surface plasmon resonance interferometer based on spatial phase modulation for protein array detection. *Measurement Science and Technology*, 19(1), 015301. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/19/1/015301>
41. Yuan, W., Ho, H. P., Wong, C. L., Wu, S. Y., Suen, Y. K., Kong, S. K., & Lin, C. (2006). Sensitivity enhancement of phase-sensitive surface plasmon resonance biosensor using multi-pass interferometry. *2006 International Symposium on Biophotonics, Nanophotonics and Metamaterials*, 202–205. <https://doi.org/10.1109/METAMAT.2006.335035>
42. Jangra, S., Ye, C., Rathnasinghe, R., Stadlbauer, D., Alshammary, H., Amoako, A. A., Awawda, M. H., Beach, K. F., Bermúdez-González, M. C., Chernet, R. L., Eaker, L. Q., Ferreri, E. D., Floda, D. L., Gleason, C. R., Kleiner, G., Jurczynszak, D., Matthews, J. C., Mendez, W. A., Mulder, L. C. F., ... Schotsaert, M. (2021). SARS-CoV-2 spike E484K mutation reduces antibody

neutralisation. *The Lancet Microbe*, 2(7), e283–e284. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00068-9)

43. Kabashin, A. V., Patskovsky, S., & Grigorenko, A. N. (2009). Phase and amplitude sensitivities in surface plasmon resonance bio and chemical sensing. *Optics Express*, 17(23), 21191–21204. <https://doi.org/10.1364/OE.17.021191>

44. Karim, S. S. A., & Karim, Q. A. (2021). Omicron SARS-CoV-2 variant: A new chapter in the COVID-19 pandemic. *The Lancet*, 398(10317), 2126–2128. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02758-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02758-6)

45. Kim, S., Liu, Y., Ziarnik, M., Cao, Y., Zhang, X. F., & Im, W. (2022). Binding of Human ACE2 and RBD of Omicron Enhanced by Unique Interaction Patterns Among SARS-CoV-2 Variants of Concern. *bioRxiv*, 2022.01.24.477633. <https://doi.org/10.1101/2022.01.24.477633>

46. Kim, S., Nguyen, T. T., Taitt, A. S., Jhun, H., Park, H.-Y., Kim, S.-H., Kim, Y.-G., Song, E. Y., Lee, Y., Yum, H., Shin, K.-C., Choi, Y. K., Song, C.-S., Yeom, S. C., Kim, B., Netea, M., & Kim, S. (2021). SARS-CoV-2 Omicron Mutation Is Faster than the Chase: Multiple Mutations on Spike/ACE2 Interaction Residues. *Immune Network*, 21(6), e38. <https://doi.org/10.4110/in.2021.21.e38>

47. Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J. A., Lim, W., Rollin, P. E., Dowell, S. F., Ling, A.-E., Humphrey, C. D., Shieh, W.-J., Guarner, J., Paddock, C. D., Rota, P., Fields, B., ... SARS Working Group. (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 348(20), 1953–1966. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030781>

48. Kumar, R., Pal, S., Pal, N., Mishra, V., & Prajapati, Y. K. (2021). High-performance bimetallic surface plasmon resonance biochemical sensor using a black phosphorus–MXene hybrid structure. *Applied Physics A*, 127(4), 259. <https://doi.org/10.1007/s00339-021-04408-w>

49. Lakhera, P., Chaudhary, V., Kush, P., & Kumar, P. (2022). Chapter 21 - Nanomaterial-mediated biosensors: Concept and biological applications. N. K. Mehra, S. Srivastava, J. Madan, & P. kumar Singh (Sud.), *Multifunctional Nanocarriers* (p. 523–553). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85041-4.00020-2>

50. Langmuir, I. (1916). THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. PART I. SOLIDS. *Journal of the American Chemical Society*, 38(11), 2221–2295. <https://doi.org/10.1021/ja02268a002>

51. Latour, R. A. (2015). The langmuir isotherm: A commonly applied but misleading approach for the analysis of protein adsorption behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(3), 949–958. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35235>

52. Luring, A. S., & Hodcroft, E. B. (2021). Genetic Variants of SARS-CoV-2-What Do They Mean? *JAMA*, 325(6), 529–531. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.27124>

53. Lawson, A. D. G. (2015). G Protein-Coupled Receptors—Targets for Fragment-based Drug Discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(24), 2523–2527. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150701113151>

54. Li, Q., Wu, J., Nie, J., Zhang, L., Hao, H., Liu, S., Zhao, C., Zhang, Q., Liu, H., Nie, L., Qin, H., Wang, M., Lu, Q., Li, X., Sun, Q., Liu, J., Zhang, L., Li, X., Huang, W., & Wang, Y.

- (2020). The Impact of Mutations in SARS-CoV-2 Spike on Viral Infectivity and Antigenicity. *Cell*, 182(5), 1284-1294.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.012>
55. Liedberg, B., Nylander, C., & Lunström, I. (1983). Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators*, 4, 299–304. [https://doi.org/10.1016/0250-6874\(83\)85036-7](https://doi.org/10.1016/0250-6874(83)85036-7)
56. Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., ... Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *Lancet (London, England)*, 395(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
57. Lupala, C. S., Ye, Y., Chen, H., Su, X.-D., & Liu, H. (2022). Mutations on RBD of SARS-CoV-2 Omicron variant result in stronger binding to human ACE2 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 590, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.12.079>
58. Mascola, J. R., Graham, B. S., & Fauci, A. S. (2021). SARS-CoV-2 Viral Variants-Tackling a Moving Target. *JAMA*, 325(13), 1261–1262. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.2088>
59. Mathieu, E., Ritchie, H., Ortiz-Ospina, E., Roser, M., Hasell, J., Appel, C., Giattino, C., & Rodés-Guirao, L. (2021). A global database of COVID-19 vaccinations. *Nature Human Behaviour*, 5(7), 947–953. <https://doi.org/10.1038/s41562-021-01122-8>
60. McLean, G., Kamil, J., Lee, B., Moore, P., Schulz, T. F., Muik, A., Sahin, U., Türeci, Ö., & Pather, S. (2022). The Impact of Evolving SARS-CoV-2 Mutations and Variants on COVID-19 Vaccines. *mBio*, 13(2), e02979-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.02979-21>
61. Meng, Z., Tayyab, M., Lin, Z., Raji, H., & Javanmard, M. (2023). A Smartphone-Based Disposable Hemoglobin Sensor Based on Colorimetric Analysis. *Sensors*, 23(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/s23010394>
62. Moeller, N. H., Shi, K., Demir, Ö., Belica, C., Banerjee, S., Yin, L., Durfee, C., Amaro, R. E., & Aihara, H. (2022). Structure and dynamics of SARS-CoV-2 proofreading exoribonuclease ExoN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(9), e2106379119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2106379119>
63. Mozsolits, H., Thomas, W. G., & Aguilar, M.-I. (2003). Surface plasmon resonance spectroscopy in the study of membrane-mediated cell signalling. *Journal of Peptide Science*, 9(2), 77–89. <https://doi.org/10.1002/psc.439>
64. Mungmunpantipantip, R., & Wiwanitkit, V. (2022). Change in binding affinity with ACE2 receptor in beta, delta and omicron SARS CoV2 variants. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 14(2), 124–128.
65. Nelson, G., Buzko, O., Spilman, P., Niazi, K., Rabizadeh, S., & Soon-Shiong, P. (2021). *Molecular dynamic simulation reveals E484K mutation enhances spike RBD-ACE2 affinity and the combination of E484K, K417N and N501Y mutations (501Y.V2 variant) induces conformational change greater than N501Y mutant alone, potentially resulting in an escape mutant* (p. 2021.01.13.426558). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.01.13.426558>
66. Ogando, N. S., Zevenhoven-Dobbe, J. C., van der Meer, Y., Bredenbeek, P. J., Posthuma, C. C., & Snijder, E. J. (2020). The Enzymatic Activity of the nsp14 Exoribonuclease Is

Critical for Replication of MERS-CoV and SARS-CoV-2. *Journal of Virology*, 94(23), e01246-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.01246-20>

67. Okba, N. M. A., Müller, M. A., Li, W., Wang, C., GeurtsvanKessel, C. H., Corman, V. M., Lamers, M. M., Sikkema, R. S., Bruin, E. de, Chandler, F. D., Yazdanpanah, Y., Hingrat, Q. L., Descamps, D., Houhou-Fidouh, N., Reusken, C. B. E. M., Bosch, B.-J., Drosten, C., Koopmans, M. P. G., & Haagmans, B. L. (2020). *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2–Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients*. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200841>

68. Ozono, S., Zhang, Y., Ode, H., Sano, K., Tan, T. S., Imai, K., Miyoshi, K., Kishigami, S., Ueno, T., Iwatani, Y., Suzuki, T., & Tokunaga, K. (2021). SARS-CoV-2 D614G spike mutation increases entry efficiency with enhanced ACE2-binding affinity. *Nature Communications*, 12(1), 848. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21118-2>

69. Pagani, I., Ghezzi, S., Alberti, S., Poli, G., & Vicenzi, E. (2023). Origin and evolution of SARS-CoV-2. *European Physical Journal plus*, 138(2), 157. <https://doi.org/10.1140/epjp/s13360-023-03719-6>

70. Patching, S. G. (2014). Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein–ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(1, Part A), 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.028>

71. Peacock, T. P., Goldhill, D. H., Zhou, J., Baillon, L., Frise, R., Swann, O. C., Kugathasan, R., Penn, R., Brown, J. C., Sanchez-David, R. Y., Braga, L., Williamson, M. K., Hassard, J. A., Staller, E., Hanley, B., Osborn, M., Giacca, M., Davidson, A. D., Matthews, D. A., & Barclay, W. S. (2020). *The furin cleavage site of SARS-CoV-2 spike protein is a key determinant for transmission due to enhanced replication in airway cells* (p. 2020.09.30.318311). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.09.30.318311>

72. Piliarik, M., Vaisocherová, H., & Homola, J. (2009). Surface Plasmon Resonance Biosensing. A. Rasooly & K. E. Herold (Sud.), *Biosensors and Biodetection* (p. 65–88). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-567-5_5

73. Pillai, S., Catchpole, K. R., Trupke, T., & Green, M. A. (2007). Surface plasmon enhanced silicon solar cells. *Journal of Applied Physics*, 101(9), 093105. <https://doi.org/10.1063/1.2734885>

74. 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., Gorissen, S., Geenen, C., ... Schwartz, O. (2022). Considerable escape of SARS-CoV-2 Omicron to antibody neutralization. *Nature*, 602(7898), 671–675. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04389-z>

75. Plikusiene, I., Maciulis, V., Juciute, S., Maciuleviciene, R., Balevicius, S., Ramanavicius, A., & Ramanaviciene, A. (2022). Investigation and Comparison of Specific Antibodies' Affinity Interaction with SARS-CoV-2 Wild-Type, B.1.1.7, and B.1.351 Spike Protein by Total Internal Reflection Ellipsometry. *Biosensors*, 12(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/bios12050351>

76. Plikusiene, I., Maciulis, V., Juciute, S., Ramanavicius, A., Balevicius, Z., Slibinskas, R., Kucinskaite-Kodze, I., Simanavicius, M., Balevicius, S., & Ramanaviciene, A. (2022). Investigation of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein interaction with a specific antibody by

combined spectroscopic ellipsometry and quartz crystal microbalance with dissipation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 626, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.06.119>

77. Plikusiene, I., Maciulis, V., Juciute, S., Ramanavicius, A., & Ramanaviciene, A. (2023). Study of SARS-CoV-2 Spike Protein Wild-Type and the Variants of Concern Real-Time Interactions with Monoclonal Antibodies and Convalescent Human Serum. *Biosensors*, 13(8), 784. <https://doi.org/10.3390/bios13080784>

78. Plikusiene, I., Maciulis, V., Ramanaviciene, A., Balevicius, Z., Buzavaite-Verteliene, E., Ciplys, E., Slibinskas, R., Simanavicius, M., Zvirbliene, A., & Ramanavicius, A. (2021). Evaluation of kinetics and thermodynamics of interaction between immobilized SARS-CoV-2 nucleoprotein and specific antibodies by total internal reflection ellipsometry. *Journal of Colloid and Interface Science*, 594, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.02.100>

79. Plikusiene, I., Maciulis, V., Ramanavicius, A., & Ramanaviciene, A. (2022). Spectroscopic Ellipsometry and Quartz Crystal Microbalance with Dissipation for the Assessment of Polymer Layers and for the Application in Biosensing. *Polymers*, 14(5), 1056. <https://doi.org/10.3390/polym14051056>

80. Plikusiene, I., Maciulis, V., Vertelis, V., Juciute, S., Balevicius, S., Ramanavicius, A., Talbot, J., & Ramanaviciene, A. (2023). Revealing the SARS-CoV-2 Spike Protein and Specific Antibody Immune Complex Formation Mechanism for Precise Evaluation of Antibody Affinity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), 13220. <https://doi.org/10.3390/ijms241713220>

81. Ramanavičius, A. (Sud.). (2007). Paviršiaus plazmonų rezonansas ir jo pritaikymas biomedicininiams tyrinėjimams. *Medicina*, 355–365.

82. Ravichandran, S., Coyle, E. M., Klenow, L., Tang, J., Grubbs, G., Liu, S., Wang, T., Golding, H., & Khurana, S. (2020). Antibody signature induced by SARS-CoV-2 spike protein immunogens in rabbits. *Science Translational Medicine*, 12(550), eabc3539. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc3539>

83. Rodda, L. B., Netland, J., Shehata, L., Pruner, K. B., Morawski, P. A., Thouvenel, C. D., Takehara, K. K., Eggenberger, J., Hemann, E. A., Waterman, H. R., Fahning, M. L., Chen, Y., Hale, M., Rathe, J., Stokes, C., Wrenn, S., Fiala, B., Carter, L., Hamerman, J. A., ... Pepper, M. (2021). Functional SARS-CoV-2-Specific Immune Memory Persists after Mild COVID-19. *Cell*, 184(1), 169–183.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.029>

84. Roper, R. L., & Rehm, K. E. (2009). SARS vaccines: Where are we? *Expert Review of Vaccines*, 8(7), 887–898. <https://doi.org/10.1586/erv.09.43>

85. Saberi, A., Gulyaeva, A. A., Brubacher, J. L., Newmark, P. A., & Gorbalenya, A. E. (2018). A planarian nidovirus expands the limits of RNA genome size. *PLoS Pathogens*, 14(11), e1007314. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007314>

86. Schubert, M. (2004). *Infrared Ellipsometry on Semiconductor Layer Structures: Phonons, Plasmons, and Polaritons*. Springer Science & Business Media.

87. Schubert, M., Bertoglio, F., Steinke, S., Heine, P. A., Ynga-Durand, M. A., Maass, H., Sammartino, J. C., Cassaniti, I., Zuo, F., Du, L., Korn, J., Milošević, M., Wenzel, E. V., Krstanović, F., Polten, S., Pribanić-Matešić, M., Brizić, I., Baldanti, F., Hammarström, L., ... Hust, M. (2022). Human serum from SARS-CoV-2-vaccinated and COVID-19 patients shows reduced binding to the

RBD of SARS-CoV-2 Omicron variant. *BMC Medicine*, 20(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s12916-022-02312-5>

88. Ssentongo, P., Ssentongo, A. E., Voleti, N., Groff, D., Sun, A., Ba, D. M., Nunez, J., Parent, L. J., Chinchilli, V. M., & Paules, C. I. (2022). SARS-CoV-2 vaccine effectiveness against infection, symptomatic and severe COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 22(1), 439. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07418-y>
89. Stephens, D. S., & McElrath, M. J. (2020). COVID-19 and the Path to Immunity. *JAMA*, 324(13), 1279–1281. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.16656>
90. Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*, 24(6), 490–502. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>
91. Taya, S. A., Daher, M. G., Almawgani, A. H. M., Hindi, A. T., Zyoud, S. H., & Colak, I. (2023). Detection of Virus SARS-CoV-2 Using a Surface Plasmon Resonance Device Based on BiFeO₃-Graphene Layers. *Plasmonics*, 18(4), 1441–1448. <https://doi.org/10.1007/s11468-023-01867-0>
92. Tanzadehpanah, H., Lotfian, E., Avan, A., Saki, S., Nobari, S., Mahmoodian, R., Sheykhhasan, M., Froutagh, M. H. S., Ghotbani, F., Jamshidi, R., & Mahaki, H. (2023). Role of SARS-COV-2 and ACE2 in the pathophysiology of peripheral vascular diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 166, 115321. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115321>
93. Tompkins, H. G., & Hilfiker, J. N. (2015). *Spectroscopic Ellipsometry: Practical Application to Thin Film Characterization*. Momentum Press.
94. Tompkins, H. G., & Irene, E. A. (Sud.). (2005). *Handbook of ellipsometry*. William Andrew Pub. ; Springer.
95. Victora, G. D., & Nussenzweig, M. C. (2012). Germinal Centers. *Annual Review of Immunology*, 30(Volume 30, 2012), 429–457. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075032>
96. Vogt, A.-C. S., Augusto, G., Martina, B., Chang, X., Nasrallah, G., Speiser, D. E., Vogel, M., Bachmann, M. F., & Mohsen, M. O. (2022). Increased Receptor Affinity and Reduced Recognition by Specific Antibodies Contribute to Immune Escape of SARS-CoV-2 Variant Omicron. *Vaccines*, 10(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050743>
97. Volz, E., Mishra, S., Chand, M., Barrett, J. C., Johnson, R., Geidelberg, L., Hinsley, W. R., Laydon, D. J., Dabrera, G., O’Toole, Á., Amato, R., Ragonnet-Cronin, M., Harrison, I., Jackson, B., Ariani, C. V., Boyd, O., Loman, N. J., McCrone, J. T., Gonçalves, S., ... Ferguson, N. M. (2021). Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature*, 593(7858), 266–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03470-x>
98. Wahid, M., Jawed, A., Mandal, R. K., Dailah, H. G., Janahi, E. M., Dhama, K., Somvanshi, P., & Haque, S. (2021). Variants of SARS-CoV-2, their effects on infection, transmission and neutralization by vaccine induced antibodies. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 25(18), 5857–5864. Scopus. https://doi.org/10.26355/eurrev_202109_26805

99. Wang, L., & Cheng, G. (2022). Sequence analysis of the emerging SARS-CoV-2 variant Omicron in South Africa. *Journal of Medical Virology*, 94(4), 1728–1733. <https://doi.org/10.1002/jmv.27516>
100. Wang, Z., Schmidt, F., Weisblum, Y., Muecksch, F., Barnes, C. O., Finkin, S., Schaefer-Babajew, D., Cipolla, M., Gaebler, C., Lieberman, J. A., Oliveira, T. Y., Yang, Z., Abernathy, M. E., Huey-Tubman, K. E., Hurley, A., Turroja, M., West, K. A., Gordon, K., Millard, K. G., ... Nussenzweig, M. C. (2021). mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature*, 592(7855), 616–622. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03324-6>
101. Weisblum, Y., Schmidt, F., Zhang, F., DaSilva, J., Poston, D., Lorenzi, J. C., Muecksch, F., Rutkowska, M., Hoffmann, H.-H., Michailidis, E., Gaebler, C., Agudelo, M., Cho, A., Wang, Z., Gazumyan, A., Cipolla, M., Luchsinger, L., Hillyer, C. D., Caskey, M., ... Bieniasz, P. D. (2020). Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *eLife*, 9, e61312. <https://doi.org/10.7554/eLife.61312>
102. Wibmer, C. K., Ayres, F., Hermanus, T., Madzivhandila, M., Kgagudi, P., Oosthuysen, B., Lambson, B. E., Oliveira, T. de, Vermeulen, M., Berg, K. van der, Rossouw, T., Boswell, M., Ueckermann, V., Meiring, S., Gottberg, A. von, Cohen, C., Morris, L., Bhiman, J. N., & Moore, P. L. (2021). *SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma* (p. 2021.01.18.427166). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.01.18.427166>
103. World Health Organization. (2020). *Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Situation report – 51*. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57_10
104. World Health Organization. (2021, lapkričio 26). *Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern*. [https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern)
105. World Health Organization. (2023, kovo 16). *Statement on the update of WHO’s working definitions and tracking system for SARS-CoV-2 variants of concern and variants of interest*. <https://www.who.int/news/item/16-03-2023-statement-on-the-update-of-who-s-working-definitions-and-tracking-system-for-sars-cov-2-variants-of-concern-and-variants-of-interest>
106. Wu, J. T., Leung, K., & Leung, G. M. (2020). Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: A modelling study. *Lancet (London, England)*, 395(10225), 689–697. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30260-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30260-9)
107. Xia, X. (2021). Domains and Functions of Spike Protein in SARS-Cov-2 in the Context of Vaccine Design. *Viruses*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/v13010109>
108. Zahradník, J., Marciano, S., Shemesh, M., Zoler, E., Chiaravalli, J., Meyer, B., Rudich, Y., Dym, O., Elad, N., & Schreiber, G. (2021). *SARS-CoV-2 RBD in vitro evolution follows contagious mutation spread, yet generates an able infection inhibitor* (p. 2021.01.06.425392). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.01.06.425392>
109. Zhao, H., Brown, P. H., & Schuck, P. (2011). On the Distribution of Protein Refractive Index Increments. *Biophysical Journal*, 100(9), 2309–2317. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.03.004>

110. Zhou, J., Qi, Q., Wang, C., Qian, Y., Liu, G., Wang, Y., & Fu, L. (2019). Surface plasmon resonance (SPR) biosensors for food allergen detection in food matrices. *Biosensors & Bioelectronics*, *142*, 111449. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111449>

111. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine*, *382*(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>

PRIEDAI

1. 1 priedas. Sekos tapatumas tarp wild-type SARS-CoV-2 ir lentelėje nurodytų koronavirusų genomų.

**SEKOS TAPATUMAS TARP WILD-TYPE SARS-COV-2 IR LENTELĖJE
NURODYTŲ KORONAVIRUSŲ GENOMŲ**

Variantas	Amino rūgščių sekos				Nukleotidų sekos			
	SARS-CoVGZ02	Bat-SL-CoVZXC21	Bat-SL-CoVZC45	Bat-SL-CoVZC45	SARS-CoVGZ02	Bat-SL-CoVZXC21	Bat-SL-CoVZC45	Bat-SL-CoVZC45
Pilnas genomas (%)	--	--	--	--	79	87.5	87.6	87.6
1ab	86.2	95.2	95.6	95.6	79.5	88.7	88.9	88.9
1a	80.5	95.1	95.6	95.6	75.4	90.3	90.7	90.7
1b	95.6	95.5	95.8	95.8	86.3	86.1	86	86
S	76.2	79.6	80.2	80.2	72.7	74.7	75.2	75.2
3	73.1	92	90.9	90.9	75.6	88.9	87.8	87.8
E	94.7	100	100	100	93.5	98.7	98.7	98.7
M	90.1	98.6	98.6	98.6	85.1	93.4	93.4	93.4
7	68.9	93.4	93.4	93.4	74.5	95.2	95.2	95.2
8	85.2	88.4	87.6	87.6	82.1	89.1	88.8	88.8
10b	--	94.2	94.2	94.2	--	88.5	88.5	88.5
N	90.3	94.3	94.3	94.3	88.1	91.2	91.1	91.1
13	--	73.2	73.2	73.2	--	89.5	89.1	89.1
14	--	92.9	92.9	92.9	--	96.7	96.7	96.7
Geno regionas (%)								