

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФФИННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ ВИРИОНОВ ПАНДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА A/California/7/2009 (H1N1pdm09) С ФЕТУИНОМ И МУЦИНОМ КОНКУРЕНТНЫМ И КИНЕТИЧЕСКИМ МЕТОДАМИ

© 2019 г. Г.С. Онхонова, С.В. Мальцев, А.Б. Рыжиков

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора,
630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 20.12.2017 г.

После доработки 29.04.2019 г.

Принята к публикации 30.04.2019 г.

Изучена аффинность связывания пандемического вируса гриппа A/California/7/2009 (H1N1pdm09) с фетуином и муцином. Проведено сравнение трех методов на основе иммуноферментного анализа для количественного определения рецепторной специфичности штаммов вируса гриппа – конкурентного метода Диксона в прямых координатах, конкурентного метода с использованием концентрации полумаксимального ингибирования IC_{50} и кинетического метода. Обнаружено, что конкурентные методы существенно искажают результат из-за неспецифического связывания конкурирующих белков, в то время как кинетический метод исключает подобное влияние и в будущем может быть широко использован для точного измерения рецепторной специфичности вируса гриппа с рецепторами типа $\alpha 2$ -3 и $\alpha 2$ -6.

Ключевые слова: рецепторная специфичность, равновесная константа диссоциации, сиаловая кислота.

DOI: 10.1134/S0006302919040033

Грипп – это острая вирусная инфекция, которая, циркулируя по всему миру, может заражать млекопитающих, птиц и людей. Являясь одной из основных причин заболеваемости и смертности, грипп вызывает ежегодные эпидемии и даже пандемии и представляет серьезную проблему для здравоохранения и экономики. В процессе жизненного цикла все вирионы проходят обязательную стадию – прикрепление к поверхности клетки-мишени. Для каждого вируса имеется специфический рецептор на поверхности чувствительных клеток, и в свою очередь у вируса есть белок, посредством которого он связывается с клеточным рецептором. У вируса гриппа это белок гемагглютинин, а рецепторы на поверхности клетки – это гликолипиды или гликопротеины, терминальным фрагментом которых является сиаловая кислота (в основном N-ацетилнейраминовая кислота (Neu5Ac)).

Структурное различие остатков сиаловых кислот, прикрепленных к гликановым цепям, является ключевым фактором для определения спе-

цифичности связывания различных субтипов вируса гриппа с клеточными рецепторами. Существует две основные химические формы сиаловой кислоты ($\alpha 2$ -3 и $\alpha 2$ -6) и разные штаммы вируса гриппа отличаются сродством к ним [1]. Штаммы вируса птичьего гриппа используют в качестве рецептора сиаловые кислоты, прикрепленные к следующему остатку сахара посредством связи $\alpha 2$ -3 (Neu5Ac $\alpha 2$ -3Gal) [2]. Рецепторы такого типа главным образом содержатся на эпителиальных клетках пищеварительного тракта птиц. Штаммы вируса человеческого гриппа преимущественно прикрепляются к сиаловым кислотам со связью $\alpha 2$ -6 (Neu5Ac $\alpha 2$ -6Gal) [3]. Такие рецепторы являются основными для клеток эпителия верхних дыхательных путей человека. При этом небольшое количество $\alpha 2$ -3 рецепторов присутствует на реснитчатом эпителии и эпителиальных клетках нижних дыхательных путей человека. По этой причине существует риск инфицирования людей вирусом высокопатогенного птичьего гриппа, и такие ситуации для человека, как правило, сопровождаются осложнениями вплоть до летального исхода.

Одним из методов для оценки рецепторной специфичности вирусов гриппа является имму-

Сокращения: ИФА – иммуноферментный анализ, ФСБ – фосфатно-солевой буфер, ФСБ-Т – фосфатно-солевой буфер с добавлением Tween-20.

ноферментный анализ (ИФА). Для оценки результатов, полученных в ИФА, используют стационарные конкурентные и кинетический методы. Не смотря на простоту и относительно низкую стоимость постановки, ИФА имеет ряд недостатков. Во-первых, для всех видов анализа характерен довольно длительный период проведения эксперимента, что для большой выборки бывает неудобно. Во-вторых, при полуколичественном методе ИФА невозможно сравнить значения между различными штаммами вируса гриппа. При количественных конкурентных методах существует проблема неспецифического связывания конкурирующих белков, что в некоторых случаях приводит к значительной погрешности измерения. Кроме того, конкурентные методы корректны только при определенных строго подобранных соотношениях конкурирующих молекул и их констант диссоциации. Подобрать рабочие соотношения и концентрации бывает достаточно трудоемко, и поэтому этот этап часто игнорируется исследователями. Кинетический метод ИФА, опробованный в данной работе, лишен перечисленных недостатков полуколичественного и конкурентного анализа и предлагается как наиболее оптимальный метод для измерения рецепторной специфичности штаммов вируса гриппа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кинетический метод определения константы диссоциации. Кинетика взаимодействия вируса гриппа с рецепторами может быть описана кинетикой лиганд-рецепторного взаимодействия. Моделируя процесс инфицирования, мы предполагаем, что вирус в малом количестве попадает на эпителий дыхательных путей, покрытый избытком рецепторов. Выражение для концентрации образовавшегося комплекса в условиях малости концентрации лиганда по сравнению с концентрацией рецепторов, в которых система находилась в данном исследовании, выглядит следующим образом [5]:

$$[LR] = A(1 - e^{-kt}), \quad (1)$$

$$A = \frac{[R]_0 [L]_0}{K_d + [R]_0}, \quad (2)$$

$$k = k_+ [R]_0 + k_-, \quad (3)$$

$$K_d = \frac{k_-}{k_+}, \quad (4)$$

где $[LR]$ — концентрация комплексов лиганд-рецептор, $[R]_0$ — начальная концентрация рецепторов, $[L]_0$ — начальная концентрация лиганда (антигена), K_d — равновесная константа диссоциации лиганд-рецепторных комплексов, k_+ —

константа скорости прямой реакции, k_- — константа скорости обратной реакции, t — время. Показатель экспоненты k подбирается путем аппроксимации экспериментальной зависимости концентрации лиганд-рецепторных комплексов от времени функцией (1). Если k определено при двух и более концентрациях рецептора, то, построив зависимость рассчитанных параметров k от концентрации добавленных рецепторов, регрессионными методами можно получить уравнение прямой, которое позволяет определить k_+ и k_- , а следовательно, и равновесную константу диссоциации K_d .

Конкурентные методы определения константы диссоциации. При конкурентном связывании в нашем случае два типа рецепторов взаимодействуют с лигандом по следующей схеме [6]:

$$[L_1R] = \frac{[L]_0 [R_1]_0}{[R_1]_0 + K_{d1}(1 + \frac{[R_2]_0}{K_{d2}})}, \quad (5)$$

где $[L_1R]$ — концентрация комплексов, $[L]_0$ — концентрация лиганда, $[R_1]_0$, $[R_2]_0$ и K_{d1} , K_{d2} — концентрации и константы диссоциации конкурирующих рецепторов.

В случае конкурентного метода Диксона константой диссоциации является значение абсциссы точки пересечения кривых вытеснения одного рецептора вторым при различных концентрациях первого рецептора. По теории точка пересечения кривых вытеснения лежит в отрицательной области и является результатом графического решения системы уравнений с двумя неизвестными, одна из которых и есть равновесная константа диссоциации.

Еще одним конкурентным методом измерения константы диссоциации является метод с использованием концентрации полумаксимального ингибирования IC_{50} . Равновесную константу диссоциации в данном методе можно определить следующим образом:

$$K_{d2} = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[R_1]_0}{K_{d1}}}, \quad (6)$$

где IC_{50} — концентрация второго рецептора, ингибирующая связывание первого рецептора на 50%.

В данной работе в качестве первого рецептора (конкурента) использовали белки муцин и фетuin, в качестве второго — те же белки, меченные биотином. Считая, что константы диссоциации для меченого белка и конкурента равны, получаем:

$$K_d = IC_{50} - [R_1]_0. \quad (7)$$

Характеристики использованного в работе штамма. Для исследования был выбран вирусный штамм A/California/7/2009 (H1N1pdm09). Субтип H1N1 стал причиной пандемий в 1918 и 2009 гг., а также причиной эпидемии в России в 2016 г. Штамм H1N1pdm09, ставший серьезной проблемой для здравоохранения, впервые был зафиксирован в Северной Америке в апреле 2009 г. По официальным данным, распространившись на более чем 200 стран, он стал причиной более 18000 смертей по всему миру. Пандемический вирус H1N1 распространяется среди людей как вирус обычного сезонного гриппа и имеет схожие симптомы. Однако при тяжелой форме течения болезни развивается вирусная пневмония, без лечения которой смертность очень высока. В ряде исследований [7,8] была изучена рецепторная специфичность связывания штамма H1N1(pdm2009) и было выяснено, что он предпочтительно связывается с рецепторами типа $\alpha 2$ -6. Однако по данным работы [9] утверждается также, что этот штамм может связываться с рецепторами типа $\alpha 2$ -3, но с меньшей аффинностью.

Модели рецепторов. В качестве моделей рецепторов на поверхности чувствительных клеток были использованы белки фетуин и муцин. Вирус гриппа имеет сродство к данным белкам через взаимодействие с сиаловыми кислотами. Из литературных данных известно, что фетуин содержит $\alpha 2$ -3 и $\alpha 2$ -6 рецепторы [10], муцин — преимущественно $\alpha 2$ -6 рецепторы [11,12], хотя количество и тип сиаловых кислот зависит от вида организма и разные типы муцина могут содержать различные типы рецепторов [13,14]. Молекулярная масса фетуина, использованного в данной работе, составляет 48,4 кДа. В отличие от фетуина, муцин сильно дифференцирован по молекулярной массе. По имеющимся на сегодняшний день данным приводятся ее оценки в очень широком диапазоне — от 10 до 1000 кДа. Мы дополнительно провели электрофорез в денатурирующих условиях, который показал, что минимальную молекулярную массу муцина можно считать примерно равной массе используемого в работе фетуина. В итоге массу используемого в работе муцина оценили как среднее геометрическое известного из литературы диапазона, т.е. 100 кДа, что не противоречит данным электрофореза.

Иммуноферментный анализ. Для определения рецепторной специфичности был выбран иммуноферментный анализ. Первым этапом работы стала оптимизация условий прямого и конкурентного взаимодействия вируса гриппа применительно к модельным белкам — фетуину и муци-

ну. Далее проводили подбор кинетических моделей для анализа результатов ИФА и затем — непосредственное измерение аффинности связывания выбранного штамма вируса гриппа тремя методами — методом Диксона в прямых координатах, методом с использованием концентрации полумаксимального ингибирования IC_{50} и с помощью кинетического метода.

Очистка вируса гриппа. Вирусную аллантоисную жидкость (100 мл) с инактивированным материалом фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и центрифугировали 3 ч при 20000 об/мин на центрифуге Sigma 3-30K с ротором 12150-N. Надосадочную жидкость сливали, а бляшку растворяли в 0,5 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ). Полученный концентрат хроматографически очищали методом гель-фильтрации на колонке с объемом смолы 20 мл (Sephacrose-4B, Pharmacia, Швеция). Колонку уравнивали буфером ФСБ. Концентрацию белка в итоговом растворе вирусных частиц измеряли методом Бредфорда.

Конкурентный метод с использованием ИФА. Очищенный вирус в ФСБ сорбировали на стандартный 96-луночный планшет для проведения иммунологических реакций (SPL Life Science, Корея) в течение ночи при комнатной температуре с концентрацией 10 мкг/мл по 50 мкл до полного высыхания антигена. Планшет промывали раствором ФСБ с добавлением 0,05% Tween-20 (ФСБ-Т) с помощью устройства для промывки микропланшет PW40 (Bio-Rad, США). Далее планшет заполняли биотинилированным муцином/фетуином (Sigma-Aldrich, США) в растворе для разведения сыворотки (ЗАО «Эпитек», Новосибирск, Россия) и проводили серийные двукратные разведения по горизонтали, начиная с концентраций 0,2 мкг/мл и 10 мкг/мл соответственно. Также проводили разведения по вертикали немеченого муцина/фетуина, начиная с концентрации 500 мкг/мл. Смесь раскапывали в двух повторениях: в четыре столбца с присушенным вирусом и четыре пустых столбца для контроля. Далее все действия выполняли согласно стандартному протоколу: планшет промывали, заполняли раствором конъюгата (стрептавидин—полипероксидаза хрена, ЗАО «Биосан», Новосибирск, Россия) в ФСБ-Т с концентрацией 1 : 10000, выдерживали 40 мин при комнатной температуре и снова промывали. После промывки от конъюгата планшет заполняли по 100 мкл в лунку смесью (1:30) тетраметилбензида и буферного раствора для субстрата (ЗАО «Эпитек», Новосибирск, Россия) и инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. После этого добав-

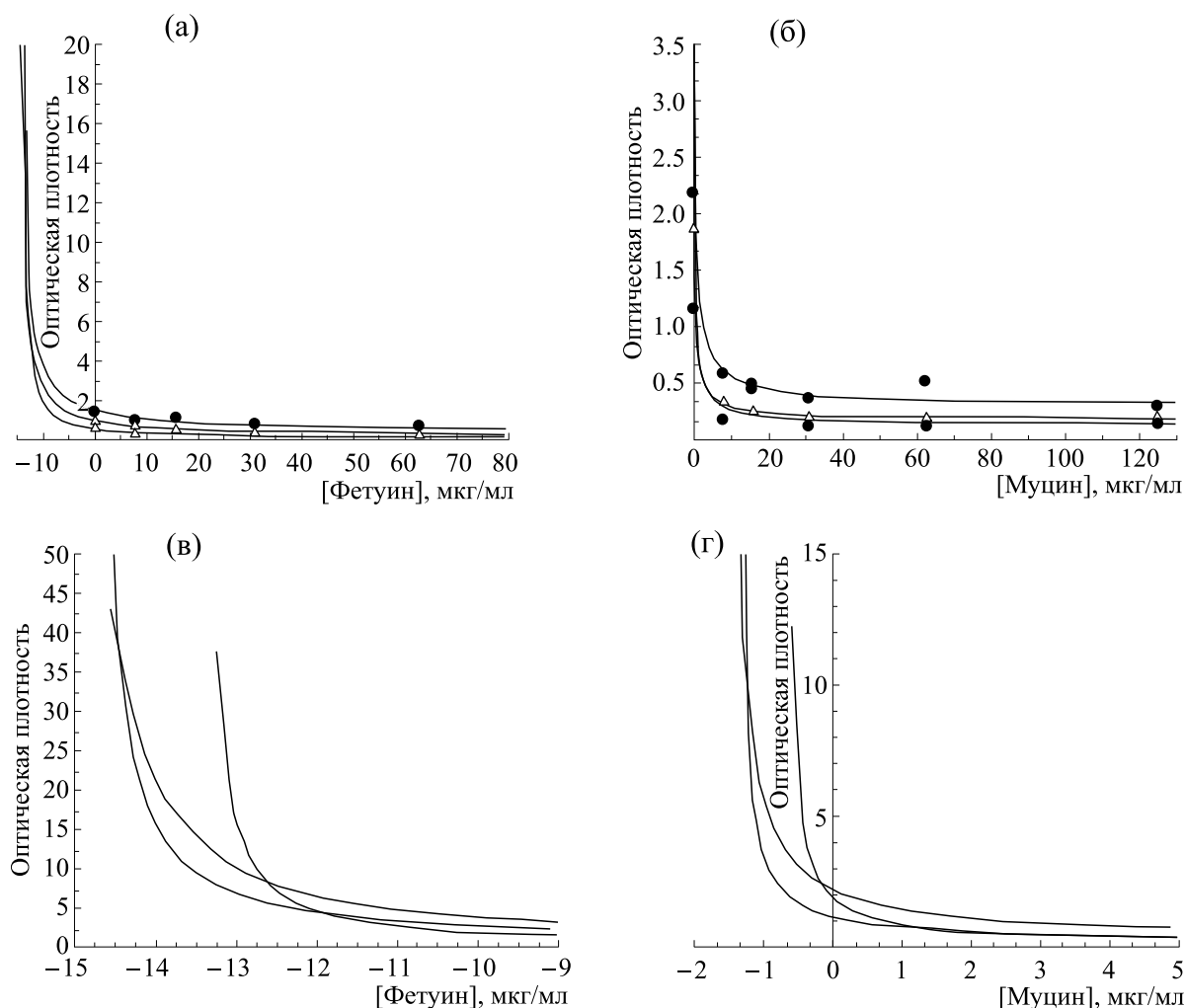


Рис. 1. Зависимости оптической плотности от концентрации конкурентного белка фетуина (а) и муцина (б). Три кривых вытеснения соответствуют трем различным разведениям биотинилированного белка для штамма вируса гриппа A/California/7/2009 (H1N1pdm09). На графиках (в) и (г) представлены соответствующие зависимости в увеличенном масштабе.

ляли по 50 мкл стоп-реагента (H_2SO_4 , 5%) в лунку и измеряли поглощение на фотометре Multiskan EX (Labsystems, Финляндия) на длине волны 450 нм.

Кинетический метод с использованием ИФА.

Для эксперимента очищенный вирус сорбировали на планшет по 50 мкл с концентрацией по общему белку 10 мкг/мл в течение ночи при комнатной температуре до полного высыхания антигена. После сорбции лунки промывали раствором ФСБ-Т. Муцин и фетуин, меченные биотином, разводили в растворе для разведения сыворотки и проводили серийные двукратные разведения по вертикали в четыре лунки, начиная с 0,5 мкг/мл и 10 мкг/мл соответственно. Каждые 10 мин один стрип снимали с планшета, промывали раствором ФСБ-Т и убирали в холодильник (4°C). По

истечении 120 мин планшет промывали, заполняли раствором конъюгата в ФСБ-Т с концентрацией 1:10000, выдерживали 40 мин при комнатной температуре и снова промывали. Далее планшет заполняли по 100 мкл в лунку смесью (1 : 30) тетраметилбензидина и буферного раствора для субстрата и инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Для остановки реакции добавляли по 50 мкл стоп-реагента (H_2SO_4 , 5%) в лунку и измеряли поглощение на фотометре Multiskan EX на длине волны 450 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам конкурентных ИФА были получены кривые вытеснения для штамма вируса гриппа A/California/7/2009 (H1N1pdm09) (рис. 1)

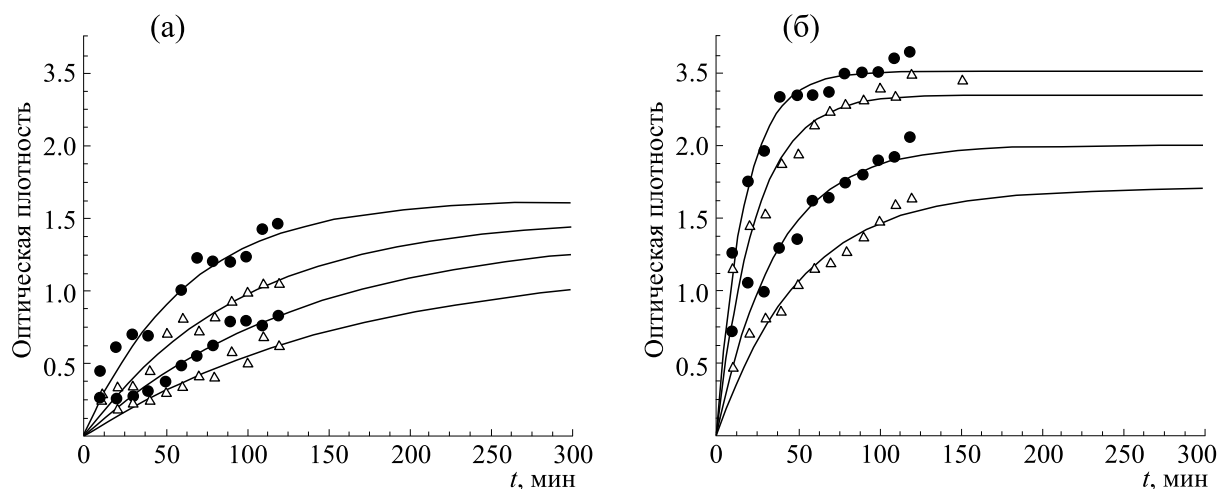


Рис. 2. Кинетика связывания штамма вируса гриппа A/California/7/2009 (H1N1pdm09) с фетуином (а) и муцином (б). Четыре кривые соответствуют четырем различным разведениям биотинилированного белка.

и рассчитаны равновесные константы диссоциации методом Диксона в прямых координатах и методом с использованием концентрации полумаксимального ингибирования IC_{50} . Значения точек пересечения кривых и параметра IC_{50} были определены с помощью пакета программ Scilab 4.0.

Экспериментальные точки кинетического ИФА аппроксимировали функцией (1) при помощи пакета программ Origin 8 (рис. 2) в целях вычисления коэффициентов k в показателе экспоненты при различных начальных концентрациях фетуина и муцина. Далее были построены зависимости рассчитанных параметров k от начальной концентрации добавленного белка (фетуина или муцина) (рис. 3), и регрессионными метода-

ми вычислены равновесные константы диссоциации в соответствии с формулой (4).

В таблице содержатся значения равновесных констант диссоциации для выбранного штамма вируса гриппа и двух белков, рассчитанные тремя методами: методом Диксона в прямых координатах, методом с использованием концентрации полумаксимального ингибирования IC_{50} и с помощью кинетического метода.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Значения константы аффинности вируса гриппа A/California/7/2009 (H1N1pdm09) с фетуином, равные обратным значениям равновесной константы диссоциации, измеренные методом Диксона в прямых координатах и методом IC_{50} ,

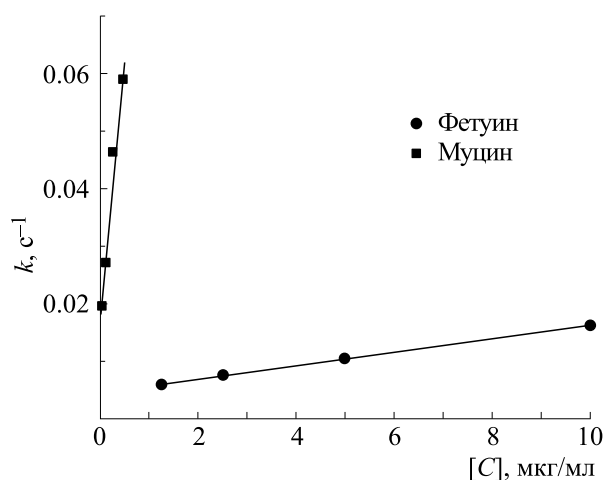


Рис. 3. Зависимости рассчитанных параметров k от концентрации фетуина и муцина для штамма вируса гриппа A/California/7/2009 (H1N1pdm09).

Таблица 1. Равновесные константы диссоциации для штамма вируса гриппа A/California/7/2009 (H1N1pdm09) с фетуином и муцином

Метод	K_d , нМ	
	Фетуин	Муцин
Метод Диксона в прямых координатах	272.9 ± 12.2	12.2 ± 5.9
Метод с использованием концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50})	192.9 ± 43.7	49.1 ± 2.3
Кинетический метод	81.6 ± 74.9	1.68 ± 0.38

отличаются в среднем не более чем на $1,5 \text{ мкмоль}^{-1}$. Измерения кинетическим методом демонстрируют большую аффинность в сравнении с конкурентными методами — средняя разница составляет $6,8\text{--}8,3 \text{ мкмоль}^{-1}$. Значение аффинности вируса с муцином, измеренное кинетическим методом, также превышает значения, полученные конкурентными методами. Однако разница между кинетическим и конкурентными методами по сравнению с фетуином более существенна — в среднем $513,2\text{--}574,8 \text{ мкмоль}^{-1}$. Подобная разница между конкурентными и кинетическими методами объясняется влиянием неспецифического связывания конкурирующих белков при конкурентном измерении в ИФА, что занижает реальное значение константы диссоциации. Полученные результаты указывают на то, что влияние неспецифического связывания конкурирующих белков на результат очень существенно в отношении муцина и умеренно для фетуина.

ВЫВОДЫ

Широко используемые конкурентные методы ИФА для измерения аффинности вируса гриппа относительно адекватно работают с фетуином, но существенно искажают результат при использовании муцина. Отработанный в рамках настоящей работы кинетический метод имеет преимущество перед конкурентными методами в случае наличия проблемы неспецифического связывания для некоторых белков.

Таким образом, кинетический метод может применяться для измерения рецепторной специфичности вирусов гриппа А наряду с конкурентными методами в ИФА, а также остальными существующими методами. Кроме того, это наиболее оптимальный метод ИФА для измерения аффинности связи вируса с белками, имеющими природное свойство связываться с себе подоб-

ным белком, что в особенности было продемонстрировано в данной работе на примере муцина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Т. Н. Ильичева, С. В. Нетесов и В. Н. Гуреев, *Вирусы гриппа: методическое пособие*. (Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 2014), ч. 1.
2. A. S. Gambaryan, S. S. Iamnikova, D. K. L'vov, et al., *Mol. Biol.* **36**, 542 (2002).
3. K. Shinya, M. Ebina, S. Yamada, et al., *Nature* **440**, 435 (2006).
4. R. McBride, J. C. Paulson, and R. P. de Vries, *J. Vis. Exp.*, No 111, e53847, DOI: 10.3791/53847 (2016).
5. С. Д. Варфоломеев и К. Г. Гуревич, *Биокинетика: практический курс* (ФАИР-ПРЕСС, М., 1999).
6. С. Д. Варфоломеев и С. В. Зайцев, *Кинетические методы в биохимических исследованиях* (Изд-во Моск. ун-та, М., 1982).
7. T. R. Maines, A. Jayaraman, J. A. Belser, et al., *Science* **325**, 484 (2009).
8. R. Xu, R. McBride, C. M. Nycholat, et al., *J. Virol.* **86**, 982 (2012).
9. R. A. Childs, A. S. Palma, S. Wharton, et al., *Nat. Biotechnol.* **27**, 797 (2009).
10. J. U. Baenziger and D. Fiete, *J. Biol. Chem.* **254** (3), 789 (1979).
11. S. Mizan, A. Henk, A. Stallings, et al., *J. Bacteriol.* **182**, 6874 (2000).
12. H. Schachter, E. J. McGuire, and S. Roseman, *J. Biol. Chem.* **246**, 5321 (1971).
13. S. C. Baos, D. B. Phillips, L. Wildling, et al., *Biophys. J.* **102**, 176 (2012).
14. M. C. Rose and J. A. Voynow, *Physiol. Rev.* **86** (1), 245 (2006).

Determination of the Binding Affinity of Pandemic Influenza Virus A/California/7/2009 (H1N1pdm09) to Fetuin and Mucin by Competitive and Kinetic Methods

G.S. Onkhonova, S.V. Maltsev, and A.B. Ryzhikov

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia

The binding affinity of pandemic influenza virus A/California/7/2009 (H1N1pdm09) to fetuin and mucin was studied. Three methods - a competitive Dixon method in direct coordinates, a competitive method with the use of the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) and a kinetic method were used for quantitative determination of receptor specificity of influenza virus strains. ELISA assay results were compared to those obtained from each of three methods. It has been found that since non-specific binding of competing proteins has been observed from each of the competitive methods, there are significant differences in the results, while the kinetic method excludes such an effect and in the future it can be widely used to measure accurately the receptor specificity of the influenza virus with sialic acids $\alpha 2-3$ and $\alpha 2-6$.

Keywords: receptor specificity, equilibrium dissociation constant, sialic acid