

РАЗРАБОТКА НОВОГО МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ ВИРУС-КЛЕТОЧНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ПОМОЩЬЮ УСКОРИТЕЛЬНОЙ МАСС- СПЕКТРОМЕТРИИ

Прокопьева Е.А.^{1,2}, Пархомчук Е.В.^{3,2}, Соболев И.А.¹, Шестопапов А.М.¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск, e-mail: ellap@bk.ru;

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск;

³ФГБУН Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск, e-mail: ekaterina@catalysis.ru

Ускорительная масс-спектрометрия (УМС) в настоящее время переживает этап бурного развития. Возникают новые методы, расширяется инструментальная база, появляются новые способы обработки данных, что в свою очередь предоставляет исследователям альтернативные возможности для анализа и исследования веществ. Эффективность УМС достигается за счет высокой чувствительности прибора, быстроты анализа и универсальности применения для изучения различных химических соединений. В данной работе представлена разработка нового метода диагностики с использованием УМС, которая позволит изучить вирус-клеточное взаимодействие на примере пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09 с введенной меткой радиоуглерода. Обогащение изотопом ¹⁴C вирусосодержащей жидкости позволит провести сверхточный (с поштучным подсчетом) анализ количества проникших вирусных частиц в легкие экспериментально инфицированных млекопитающих. Предлагаемый нами новый метод диагностики вирус-клеточного взаимодействия подходит для количественного и качественного анализов не только вирусов, но и практически любых пептидов и белков, содержащих хотя бы одну СООН-группу. Благодаря данному методу станет возможным углубленное изучение вирус-клеточного взаимодействия и механизма развития высоколетальной инфекции. В связи с тем, что циркуляция вируса гриппа А(H1N1)pdm09, вызвавшего пандемию в 2009 г., сохранилась и по сей день, крайне актуальным остается изучение механизмов патогенеза вирусов гриппа с пандемическим потенциалом.

Ключевые слова: ускорительная масс-спектрометрия (УМС), вирус гриппа, изотоп ¹⁴C

DEVELOPMENT OF A NEW METHOD FOR THE DIAGNOSIS OF VIRUS-CELL INTERACTION USING ACCELERATOR MASS SPECTROMETRY

Prokopeva E.A.^{1,2}, Parkhomchuk E.V.^{3,2}, Sobolev I.A.¹, Shestopalov A.M.¹

¹Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, e-mail: ellap@bk.ru;

²Novosibirsk State University, Novosibirsk;

³Boreskov Institute of Catalysis SB RAS, Novosibirsk, e-mail: ekaterina@catalysis.ru

Accelerator mass spectrometry (AMS) is currently undergoing of rapid development. New methods are emerging, the tool base is expanding, new ways of data processing appear, which provides researchers with alternative opportunities for analysis and research of substances. The efficiency of AMS is achieved due to the high sensitivity of the instrument, speed of analysis, and versatility of application for the study of various chemical compounds. This article presents the development of a new diagnosis method of using accelerator mass spectrometry, which will allow studying the virus-cell interactions on the example of pandemic influenza virus A(H1N1)pdm09 with the introduced label of radiocarbon. Enrichment of the virus-containing liquid with isotope ¹⁴C will allow us to carry out an ultra-precise analysis of the number of penetrated viral particles into the lungs of experimentally infected mammals. The proposed new method of diagnosis of virus-cell interaction is suitable for quantitative and qualitative analysis not only for study viruses, but also for virtually any peptides and proteins containing at least one COOH-group. This method will help to study in-depth the virus-cell interaction and the mechanism of development of high-lethal infection. Due to the fact that the circulation of influenza A(H1N1)pdm09 virus, which caused the pandemic worldwide in 2009, still occur the study of the mechanisms of pathogenesis of influenza viruses with pandemic potential remains extremely relevant.

Keywords: Accelerator mass spectrometry (AMS), influenza virus, isotope ¹⁴C

В современных исследованиях ускорительная масс-спектрометрия (УМС) находит широкое применение в таких науках, как экология, биоорганическая химия, молекулярная

биология, иммунология, фармакология, токсикология, а также позволяет осуществлять генетический анализ. Почти во всех этих приложениях используется уникальная чувствительность УМС, которая более чем в 1000 раз выше чувствительности альтернативных методов. С помощью УМС определяются механизмы связывания канцерогенов с ДНК, возраст и время обновления клеток, проводится количественный анализ состава протеом [1, 2]. Это определяет возможности применения УМС для углубленного изучения отдельных вирусных белков, нахождения первичной структуры, возможность секвенирования *de novo* и определения посттрансляционных модификаций [1].

На сегодняшний день наиболее широко масс-спектрометрический анализ применяется для изучения биологически значимых молекул в пептидах, он позволяет не только устанавливать форму и функции белков, но и проводить полный скрининг. Данный факт объясняется колоссальным разнообразием белков в живых организмах и их исключительной функциональной важностью. От установления структуры и функции отдельных белков молекулярная биология перешла к их сплошному скринингу. Современный масс-спектрометрический метод анализа позволяет определять сложные белковые смеси, такие как белки – мишени лекарств или биомаркеры, даже при очень низких концентрациях. В настоящее время нанобиотехнология открывает возможности поиска новых подходов к решению актуальных проблем диагностики в вирусологии.

Среди острых респираторных вирусных инфекций наиболее значимые социально-экономические проблемы вызывает грипп. Вирус гриппа А может вызывать стохастические эпизоотии, ежегодные эпидемии и случайные пандемии. Не так давно, в 2009 г., из-за вируса гриппа А(H1N1)pdm09 возникла первая пандемия в XXI в. Данному патогену было уделено пристальное внимание в связи с опасением повторения катастрофической гриппозной пандемии, аналогичной «Испанке», вызванной вирусом H1N1 в 1918 г. и унесшей по разным оценкам от 50 млн до 100 млн жизней по всему миру. Молекулярные механизмы, за счет которых пандемический вирус гриппа А(H1N1)pdm09 преодолел межвидовой барьер и приобрел высококонтагиозные свойства, легко передаваясь от человека к человеку, до сих пор до конца не изучены. На примере именно пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09 доказана способность патогена за короткий пассажный период достигать 100%-ной адаптации к млекопитающим и вызывать высоколетальное заболевание среди инфицированных [3]. Данные результаты позволяют предсказать развитие событий в случае создания благоприятных условий для циркулирующего пандемического вируса гриппа к той популяции млекопитающих, иммунный ответ которых он может элиминировать.

Разработка нового метода диагностики с использованием ускорительной масс-спектрометрии позволит изучить вирус-клеточное взаимодействие на примере вируса гриппа

с введенной меткой радиоуглерода. Обогащение изотопом ^{14}C вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) позволит провести сверхточный (с поштучным подсчетом) анализ количества проникших вирусных частиц в легкие экспериментально инфицированных млекопитающих. Благодаря данному методу станет возможным углубленное изучение вирус-клеточного взаимодействия и механизма развития высоколетальной инфекции.

Ввиду постоянной эволюции вируса гриппа А крайне важно изучать его вирусологические и химико-физические свойства, поскольку новые данные принесут как фундаментальные, так и важные прикладные знания о вирус-клеточном взаимодействии на примере вируса гриппа в такие области исследований, как ветеринария и медицина.

Цель исследования: разработка метода диагностики вирус-клеточного взаимодействия с помощью ускорительной масс-спектрометрии.

В связи с целью были поставлены следующие задачи:

- 1) вычисление количества вирусных частиц в ВСЖ и требуемой радиоактивной дозы;
- 2) разработка методики внесения радиоуглеродной метки в белки вирусной частицы.

Материалы и методы исследования

Для разработки метода диагностики вирус-клеточного взаимодействия с помощью ускорительной масс-спектрометрии были выбраны нижеследующие реактивы:

- меченая мочеви́на в виде препарата «Уреакапс» (37 кБк, АО НИФХИ им. Л.Я. Карпова);
- метиловый спирт с радиоуглеродной меткой (радиохимическая чистота 98%, В/О «Изотоп»);
- кросс-линкер 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC) (AppliChem, Германия),
- пандемический вирус гриппа А штамм А/Tomsk/273-MA3/2010(H1N1pdm09), адаптированный к аутобредным мышам CD1 (MA-CD1).

Зауглероживание биологических образцов для дальнейшего УМС-анализа будет проводиться на абсорбционно-каталитической установке в ФГБУН Институте катализа им. Г.К. Борескова СО РАН [4], определение содержания радиоуглерода – на уникальной научной установке «Ускорительный масс-спектрометр Института ядерной физики СО РАН» (УНУ «УМС ИЯФ СО РАН») [5].

Результаты исследования и их обсуждение

В связи с ужесточением таможенных требований Российской Федерации на перевозку радиоактивных веществ методика внесения метки в любые материалы, в том числе вирусы, определяется прежде всего доступностью соединений, меченных радиоуглеродом. С этой точки зрения в качестве исходных меченых веществ можно использовать радиоактивные метанол и мочеви́ну. Последний реагент выпускается АО НИФХИ им. Л.Я. Карпова и реализуется для медицинских целей, препарат имеет активность 37 кБк. Оба вещества – и

метанол, и мочевины – могут быть ковалентно пришиты к карбоксильным группам белковых молекул, находящимся в оболочке вирусных частиц. Для связывания с вирусным белком первичного амина (мочевины) или спирта (метанола) с образованием амидной или простой эфирной связи соответственно необходима активация карбоксильной группы белка, для чего используют так называемые кросс-линкеры – карбодиимиды. Наиболее распространенным из них является дициклогексил карбодиимид (англ. DCC), использование которого подразумевает проведение реакций в органических растворителях, таких как ацетонитрил, метанол, ДМСО и других, что делает DCC непригодным для внесения метки в биологические объекты, в том числе вирусы. Связывание веществ, имеющих аминогруппу (в нашем случае это мочевины), с карбоксильными группами белков (в нашем случае – вирусных) в водной среде проводят с помощью водорастворимых карбодиимидов, чаще всего 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (англ. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC, EDAC или EDCI) по механизму, представленному на рисунке.

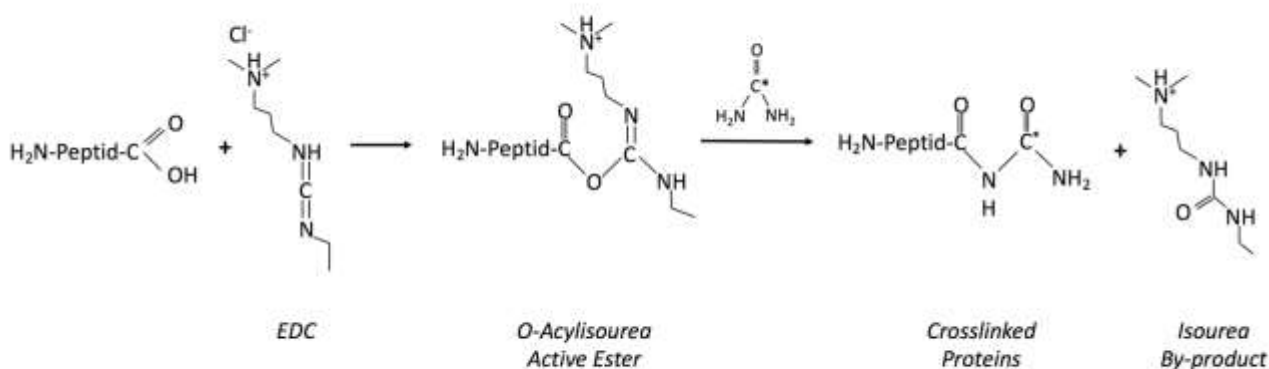


Схема механизма связывания карбоксильной группы, расположенной на поверхностном белке вируса гриппа, с первичным амином (на примере мочевины, меченной ¹⁴C) через активацию карбоксильной группы белка кросс-линкером EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide).

Результатом реакции белковых групп и мочевины в присутствии EDC являются амидная связь между белком и мочевиной и образование побочного продукта из EDC в виде изомочевины.

Если требуется провести связывание карбоксильной группы со спиртовой группой (например, в случае меченого метанола), можно использовать тот же водорастворимый карбодиимид EDC, однако необходимо присутствие катализатора, в качестве которого

обычно применяется 4-диметиламинопиридин (4-dimethylaminopyridine, DMAP).

Очевидно, что для внесения метки необходимо определить количество присутствующих на поверхности вируса гриппа карбоксильных групп и концентрацию вирусных частиц в пробе.

Морфология вирусных частиц (вирионов) чаще представлена в виде сферической формы диаметром 80–120 нм, их оболочка образована липидным бислоем, сформированным из плазматической мембраны клетки-хозяина [6, 7]. На поверхности вирусной оболочки находятся гликопротеины – гемагглютинин (hemagglutinin, HA), нейраминидаза (neuraminidase, NA) и интегральный мембранный белок (membrane protein, M2). Первые два гликопротеина представлены в форме шипов и имеют в своей структуре рецептор-связывающие домены (антигенные сайты, эпитопы), при помощи которых вирус взаимодействует с антителами. Для расчета количества карбоксильных групп, содержащихся на поверхности вириона вируса гриппа А, нами был выбран пандемический вирус гриппа А(H1N1)pdm09 в связи с тем, что циркуляция данного патогена до сих пор сохраняется среди сезонных вирусов гриппа.

В условиях BSL3 (biosafety level 3) нами ранее был получен адаптированный вариант вируса гриппа А(H1N1)pdm09 (штамм А/Tomsk/273MA3/2010(H1N1pdm09) (*MA-CDI*) путем пассирования через аутбредных мышей CD1, вызывающий высоколетальное заболевание среди инфицированных животных и в результате инфекции приводящий к 100%-ной летальности [3]. Расчет количества карбоксильных групп, содержащихся на всех вирусных частицах в объеме 1 мл штамма *MA-CDI*, выполнили на основании общепринятых данных из литературы [6] и вычисления значения гемагглютинирующей единицы (ГАЕ):

1) согласно литературным данным на поверхности одного гемагглютинина вируса гриппа А субтипа Н1 может быть расположено до 103 аминокислотных остатков, содержащих карбоксильные группы, в антигенных сайтах (наиболее вариабельные эпитопы, взаимодействующие с антителами) [8-10];

2) согласно литературным данным на поверхности одной нейраминидазы вируса гриппа А субтипа Н1 имеется до 25 эпитопов [11-13];

3) согласно литературным данным на вирионах сферической структуры располагается примерно 500 шипов HA и 100 шипов NA [7, 14, 15];

4) известно, что 1000 ГАЕ/мл обеспечивается $(2-4) \times 10^{10}$ шт/мл вирусных частиц [6];

5) для штамма *MA-CDI* это значение составляет 640 ГАЕ/мл, значит, физический титр вируса гриппа равен

$$\frac{640 \text{ ГАЕ/мл} \times (2-4) \times 10^{10}}{1000 \text{ ГАЕ/мл}}$$

$$1000 \text{ ГАЕ/мл}$$

и дает значение в диапазоне $(128-256) \times 10^8$ шт/мл;

б) из расчета 128×10^8 шт/мл активных вирусных частиц определяем число карбоксильных групп по нижней границе:

128×10^8 шт/мл \times (500 гемагглютининов на поверхности 1 шт вирусной частицы \times 103 аминокислоты на поверхности 1 шт НА + 100 нейраминидаз на поверхности 1 шт вирусной частицы \times 25 аминокислот на поверхности 1 шт НА) = 6912×10^{11} ед.;

7) из расчета 256×10^8 шт/мл активных вирусных частиц определяем число карбоксильных групп по верхней границе:

256×10^8 шт/мл \times (500 гемагглютининов на поверхности 1 шт вирусной частицы \times 103 аминокислоты на поверхности 1 шт НА + 100 нейраминидаз на поверхности 1 шт вирусной частицы \times 25 аминокислот на поверхности 1 шт НА) = 13824×10^{11} ед.

Если в одной пробе объемом 1 мл около $(128-256) \times 10^8$ шт вирусных частиц, а на их поверхности находится $10^{14}-10^{15}$ карбоксильных групп, то для внесения радиоуглеродной метки в пробу потребуется $10^{14}-10^{15}$ молекул мочевины. В одной капсуле Уреакапс содержится около 10^{16} молекул мочевины с радиоуглеродом, значит, потребуется 10–100-кратное разбавление препарата для проведения реакции связывания метки с вирусным белком одной пробы, можно ожидать активность 1 мл пробы в диапазоне от 3700 до 370 Бк. При работе с метанолом с активностью 40 МБк потребуется 10000–100000-кратное разбавление с получением активности пробы того же порядка. Если в организм лабораторного животного массой около 20 г будет введено 5 мкл пробы, меченной ВСЖ, то оценка удельной активности биологической пробы в среднем по нижней границе дает 0,9 Бк/г, что в 3 раза превышает фоновую активность радиоуглерода живых объектов. Таким образом, можно ожидать достоверного УМС-анализа получаемых проб на содержание радиоуглерода, а значит, и на содержание вирусных частиц.

Для получения контрольного раствора-аналога без радиоактивной метки планируется проведение реакции взаимодействия вирусных частиц с немеченой мочевиной в присутствии EDC в тех же условиях.

Таким образом, предлагается технология, основанная на связывании меченных радиоуглеродом веществ (мочевины и/или метанола) и карбоксильных групп белков вируса гриппа. Связывание затрагивает только углерод в свободных карбоксильных группах и не сопровождается существенным изменением структуры молекулы. Реакция протекает в водной среде в присутствии EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид), используемого для связывания с карбоксильной группой. Условия реакции предотвращают гидролиз пептидных связей.

Данная работа рассматривает частный случай применения технологии для получения изотопно меченных стандартов вирусных пептидов, белков.

Краткий протокол

1. Определение количества вирусных частиц в ВСЖ.
2. Получение меченого стандарта в реакции образования амидной связи между меченой мочевиной и вирусным белком в присутствии EDC в водной среде.
3. Интраназальное инфицирование экспериментальных животных полученным меченым стандартом.
4. Интраназальное введение экспериментальным животным раствора-аналога без радиоактивной метки.
5. Определение содержания радиоуглерода в различных органах лабораторных животных с помощью УМС-анализа биологических проб.
6. Обработка и обобщение результатов.

Заключение

Предлагаемый нами новый метод диагностики вирус-клеточного взаимодействия подходит для количественного и качественного анализов не только вирусов, но и практически любых пептидов и белков, содержащих хотя бы одну СООН-группу. Предполагается, что данный метод может стать широко востребованным и применим для любых белковых соединений, содержащих в своем составе -СООН группы.

Возможность в лабораторных условиях связывать карбоксильные группы пептидов и белков с мечеными радиоуглеродом веществами сделает полученные соединения пригодными для использования в качестве стандартов для количественного УМС-анализа.

Список литературы

1. Кордюкова Л.В., Серебрякова М.В. Масс-спектрометрические подходы в изучении оболочечных вирусов: новые возможности для структурной биологии и профилактической медицины // Биохимия. 2012. Т. 77. Вып. 8. С. 1002-1016.

2. Parkhomchuk E.V., Gulevich D.G., Taratayko A.I., Baklanov A.M., Selivanova A.V., Trubitsyna T.A., Voronova I.V., Kalinkin P.N., Okunev A.G., Rastigeev S.A., Reznikov V.A., Semeykina V.S., Sashkina K.A., Parkhomchuk V.V. Ultrasensitive detection of inhaled organic aerosol particles by accelerator mass spectrometry. *Chemosphere*. 2016. vol. 159. P. 80-88. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.05.078.
3. Prokopyeva E.A., Sobolev I.A., Prokopyev M.V., Shestopalov A.M. Adaptation of influenza A(H1N1)pdm09 virus in experimental mouse models. *Infection, genetics and evolution*. 2016. vol. 39. P. 265-271. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.01.022.
4. Lysikov A.I., Kalinkin P.N., Sashkina K.A., Okunev A.G., Parkhomchuk E.V., Rastigeev S.A., Parkhomchuk V.V., Kuleshov D.V., Vorobyeva E.E., Dralyuk R.I. Novel Simplified Absorption-Catalytic Method of Sample Preparation for AMS analysis designed at the Laboratory of Radiocarbon Methods of Analysis (LRMA) in Novosibirsk Akademgorodok. *International Journal of Mass-spectrometry*. 2018. vol. 433. P. 11-18. DOI: 10.1016/j.ijms.2018.08.003.
5. Parkhomchuk V.V., Rastigeev S.A. Accelerator mass spectrometer of the center for collective use of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. *Journal of Surface Investigation*. 2011. vol. 5. is. 6. P. 1068-1072. DOI: 10.1134/S1027451011110140.
6. Фридман Э.А., Коликов В.М. Некоторые биологические и физико-химические принципы получения убитых гриппозных вакцин // Убитая гриппозная вакцина. Т. 47. Л., 1976. С. 49-53.
7. Кильбурн Э.Д. Вирусы гриппа и грипп. М.: «Медицина», 1978. 585 с.
8. Gohil D., Kothari S., Shinde P., Meharunkar R., Warke R., Chowdhary A., Deshmukh R. Genetic Characterization of Influenza A(H1N1) Pandemic 2009. *Current microbiology*. 2017. vol. 74. no.8. P. 899-907. DOI: 10.1007/s00284-017-1262-6.
9. Stray S.J., Pittman L.B. Subtype- and antigenic site-specific differences in biophysical influences on evolution of influenza virus hemagglutinin. *Virology journal*. 2012. vol. 9. P. 91. DOI: 10.1186/1743-422X-9-91.
10. Bush R.M., Bender C.A., Subbarao K., Cox N.J., Fitch W.M. Predicting the evolution of human influenza A. *Science*. 1999. vol. 286. no.5446. P. 1921-1925.
11. Smith D.J., Lapedes A.S., de Jong J.C., Bestebroer T.M., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science*. 2004. vol. 305. no. 5682. P. 371-376. DOI: 10.1126/science.1097211.
12. Prokop'eva E.A., Kurskaya O.G., Saifutdinova S.G., Glushchenko A.V., Shestopalova L.V., Shestopalov A.M., Shkurupii V.A. Biological Characteristics of Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Circulating in West Siberia during Pandemic and Post-Pandemic Periods. *Bulletin of Experimental*

Biology and Medicine. 2014. vol. 156. no. 5. P. 673-679. DOI: 10.1007/s10517-014-2423-2.

13. Huang J.W., Lin W.F., Yang J.M. Antigenic sites of H1N1 influenza virus hemagglutinin revealed by natural isolates and inhibition assays. *Vaccine*. 2012. P. 6327–6337. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.07.079.

14. Saxena S.K., Mishra N., Saxena R., Swamy M.L., Sahgal P., Saxena S., Tiwari S., Mathur A., Nair M.P. Structural and antigenic variance between novel influenza A/H1N1/2009 and influenza A/H1N1/2008 viruses. *Journal of infection in developing countries*. 2010. vol. 4. no. 1. P. 001-006.

15. Liu J., Gong L., Xu Y., Sun Z., Gao Q., Dong Z. Genetic and antigenic characterization of influenza A(H1N1)pdm09 in Yantai, China, during the 2009-2017 influenza season. *Journal of Medical Virology*. 2019. no. 91(3). P. 351-360. DOI: 10.1002/jmv.25328.