

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.55, 578.22

ПОЛУЧЕНИЕ И КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ПИКОРНАИНА 3С РИНОВИРУСА А28

© 2023 г. А. Е. Тишин¹, А. В. Гладышева^{1,*}, Л. А. Пятавина^{1,2}, С. Е. Олькин¹, А. А. Гладышева^{1,2},
И. Р. Иматдинов¹, А. В. Власкина³, А. Ю. Николаева³, В. Р. Самыгина^{3,4}, А. П. Агафонов¹

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, Кольцово, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

⁴Институт кристаллографии А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

*E-mail: gladysheva_av@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 18.06.2023 г.

После доработки 18.06.2023 г.

Принята к публикации 05.07.2023 г.

Пикорнаин 3С риновируса человека представляет собой ценную с точки зрения коммерческого использования цистеиновую протеазу и широко используется для удаления аффинных меток и белков слияния при очистке целевого белка. Полученный в данной работе вариант пикорнаина 3С риновируса А28 не аннотирован в базах данных NCBI, имеет идентичность в PDB 79% и не использовался ранее в белковой инженерии. Разработан протокол выделения и очистки белка для структурных исследований, а также получены начальные условия кристаллизации. Получение и анализ структуры пикорнаина 3С риновируса А28 создадут новые возможности как для проведения фундаментальных исследований по отслеживанию эволюции протеолитических ферментов, так и дизайна оптимального варианта этой протеазы.

DOI: 10.31857/S0023476123600313, EDN: HZHBKY

ВВЕДЕНИЕ

Риновирусы (HRV — human rhinovirus), относящиеся к семейству *Picornaviridae*, широко распространены в природе и являются одними из основных инфекционных агентов, вызывающих простудные заболевания по всему миру [1, 2]. Геном HRV представлен одноцепочечной РНК положительной полярности размером ~7200 нуклеотидов, заключен внутри икосаэдрического безоболочечного капсида размером ~30 нм и состоит из одной открытой рамки считывания, кодирующей 11 белков. Уникальность генома HRV заключается в использовании вирусного белка VPg для синтеза вирусной РНК. Белок VPg ковалентно связан с 5'-нетранслируемым регионом вирусной (5'UTR) РНК и является единственным вирусным белком, который, как известно, подвергается капсидированию. 5'UTR содержит обширные элементы вторичной структуры РНК, в том числе внутренний сайт посадки рибосомы (IRES), который управляет кэп-независимой трансляцией вирусного генома. Вторичная структура 5'UTR РНК региона IRES взаимодействует с клеточными белками, рекрутируя рибосомы и инициируя синтез полипротеина, который далее процессируется вирусными белками — пикор-

наинами 2А и 3С с образованием как не полностью процессированных промежуточных полипротеинов, так и зрелых вирусных белков [3, 4].

Пикорнаин 3С (протеаза 3С, пикорназа 3С) относится к классу цистеиновых протеаз, гидролизует пептидную связь в белке по специфическому аминокислотному сайту Leu-Gln-Ala-Ile-Phe-Gln↓Gly-Pro между глутамином и глицином и представляет собой небольшой мономерный белок с молекулярной массой ~20 кДа. Вирусные протеазы 3С сворачиваются в два топологически эквивалентных шестицепочечных β-бочонка с протяженной неглубокой бороздкой для связывания субстрата, расположенной между ними. В протеазе 3С HRV каталитически важные аминокислотные остатки Cys-His-Glu образуют связанный кластер с общей геометрией, сходной с каталитической триадой Ser-His-Asp, обнаруженной в трипсиноподобном семействе сериновых протеаз. Высококонсервативная последовательность Gly-X-Cys-Gly-Gly в вирусных протеазах 3С служит для позиционирования Cys₁₄₇ при нуклеофильной атаке на карбонильный углерод субстрата и для ориентации NH-групп Gly₁₄₅ и Cys₁₄₇ с образованием “оксианиона”, что необходимо для стабилизации тетраэдрического переходного

состояния. Таким образом, каталитический механизм активации атакующего нуклеофила и стабилизации тетраэдрического промежуточного переходного состояния в протеазах 3С очень похож на каталитический механизм трипсиноподобных сериновых протеаз, что позволяет предположить, что вирусные протеазы 3С механически связаны с сериновыми протеазами [5, 9].

Пикорнаин 3С в настоящее время используется в белковой инженерии для отщепления аффинных меток и белков слияния благодаря высокой сайт-специфичности и активности, а также хорошей растворимости. Известно, что протеаза 3С проявляет большую активность при 4°C по сравнению с часто используемой TEV-протеазой (протеазой вируса гравировки табака) и не теряет активность в буферах и добавках, используемых при получении рекомбинантных белков [10]. Отметим, что протеаза 3С является основной мишенью для скрининга кандидатных противовирусных препаратов против HRV-инфекции, поскольку играет важную роль в репликативном цикле вируса и не имеет клеточных гомологов [11]. Таким образом, рекомбинантная 3С-протеаза может быть использована для получения рекомбинантных белков без аффинных меток и партнеров-слияния в фармацевтической и биотехнологической промышленности, а также в качестве мишени для поиска кандидатных терапевтических препаратов против HRV-инфекции.

Исследуемый в данной работе вариант HRV A28 ранее не аннотировался в базах данных NCBI. Ближайший по аминокислотной последовательности вариант пикорнаина 3С в базе данных Protein Data Bank (**PDB**, <https://www.rcsb.org>) имеет идентичность 79% с исследуемым белком, а наиболее изученный и используемый для белковой инженерии пикорнаин 3С HRV B14 имеет идентичность с пикорнаином 3С HRV A28 приблизительно 52% согласно Basic Local Alignment Search Tool (**BLAST**, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). В соответствии с этими данными изучение структуры пикорнаина 3С HRV A28 создаст новые возможности для фундаментальных исследований по отслеживанию эволюции протеолитических ферментов семейства пикорнавирусов на примере пикорнаина 3С HRV A28 и обеспечит условия для поиска оптимальных кандидатных противовирусных препаратов против риновирусной инфекции. Разработан протокол выделения и очистки белка для проведения экспериментов по кристаллизации и найдены перспективные условия для выращивания кристаллов для последующего рентгеноструктурного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выбор объекта для исследования. Поиск близкородственных белков, пространственные струк-

туры которых уже были решены экспериментально, выполнен с помощью NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) по базе данных PDB с использованием алгоритма blastp (protein-protein BLAST). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей выполнено в программе Unipro UGENE (“УНИПРО”, Россия) с использованием итеративного метода выравнивания Muscle. Моделирование пространственных структур вирусных белков проводили в облачной версии программы AlphaFold2 – AlphaFold2_advanced.ipynb. Качество моделей оценивали по коэффициенту достоверности для каждой аминокислоты с учетом прогнозируемой локальной разности расстояний (pLDDT) AlphaFold2 [12]. Вторичные структуры были предсказаны в ESPript (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php>).

Сборка генетической конструкции. Генетическая последовательность, кодирующая протеазу 3С, получена из кДНК копии генома HRV A28 (Genbank ID: UFT26780) и клонирована совместно с партнером-слияния SUMO и N-концевой 14×His-меткой, необходимой для аффинного связывания с сорбентом Ni-NTA-сефарозой при хроматографической очистке белка. Для получения продуцента рекомбинантной пикорназы 3С был выбран штамм *E. coli* KRX, поскольку в нем используется система многоступенчатого контроля экспрессии РНК полимеразы бактериофага T7, что предотвращает фоновую экспрессию транскриптов, которая может привести к нежелательным процессам. После трансформации клеток плазмидой p-14×His-SUMO-3С был осуществлен скрининг клонов-рекомбинантов с высоким уровнем экспрессии химерного белка. По результатам скрининговых исследований сформирован и депонирован в коллекцию отдела Геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора рабочий банк штамма-продуцента *E. coli* KRX p-14×His-SUMO-3С-5.

Наработка биомассы и хроматографическая очистка. Для наработки пикорнаина 3С штамм-продуцент *E. coli* “KRX p-14×His-SUMO-3С-5” инокулировали в 250 мл жидкой питательной среде SOB, содержащей 100 мкг/мл селективного антибиотика канамицина, и культивировали при 37°C, покачивании 250 rpm в течение 12–14 ч. Индукцию экспрессии осуществляли добавлением 0.1% (v/v) L-рамнозы и 1 mM IPTG с последующим культивированием при 20°C, 250 rpm в течение 20–24 ч. Полученную биомассу гомогенизировали под высоким давлением с использованием Avestin EmulsiFlex-C3 (пятикратно, 25 000 psi (~1700 bar)). Для снижения вязкости гомогената и исключения контаминации целевого белка нуклеиновыми кислотами продуцента использовали рабочее разведение бензоназы с хлоридом магния (100 е.а./мл). Гомогенат осветляли

центрифугированием (10 000 g, 15 мин), супернатант фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Для хроматографической очистки целевого химерного белка 14×His-SUMO-3С проводили прямое нанесение фильтрата на колонку с Ni-NTA-сефарозой. Фракции с первой аффинной хроматографии (first IMAC) диализовали против реакционного буфера с добавлением SUMO-протеазы при 4°C в течение 24 ч. После этого гидролизованный белок использовали для проведения второй аффинной хроматографии (second reverse IMAC) согласно [13]. Фракции, полученные после первой и второй IMAC-хроматографии, проанализированы методом SDS-PAGE-электрофореза. Очищенный рекомбинантный белок оценивали с помощью SDS-PAGE-анализа по методу Laemmli с использованием 12% полиакриламидных сборных гелей (Invitrogen, США) в присутствии 0.1% SDS [14]. Предварительно окрашенные стандарты SeeBlue Plus 2 (Invitrogen, США) использовали в качестве стандартных белковых маркеров в диапазоне размеров от 4 до 250 кДа. Для получения активной протеазы 3С HRV A28 проведено отщепление партнера слияния SUMO и 14×His-метки, что необходимо для дальнейших кристаллографических исследований.

Для определения степени чистоты белка и олигомеризации проводили эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) на хроматографе LC-20 Prominence при следующих условиях: колонка Shodex PROTEIN KW-803, 8.0 × 300 мм, температура колонки — 25°C, подвижная фаза (ПФ) — 0.05 М NaH₂PO₄, 0.3 М NaCl, pH 6.8, скорость ПФ — 1.0 мл/мин, регистрация хроматограммы — 278 нм, концентрация белка в пробе — 0.4 мг/мл, объем пробы — 5 мкл. Концентрацию белка в образцах определяли флуоресцентным методом (Qubit Protein Assay Kit, США) в трех повторах.

Непосредственно перед кристаллизацией проводили дополнительную гель-фильтрацию с использованием колонки HiLoad 16/600 Superdex 200prep grade (GE Healthcare, Швеция) в 25 мМ Трис-Cl-буфере, содержащем 150 мМ хлорида натрия, pH 7.8. Белок концентрировали до значения 8 мг/мл с использованием центрифужного концентратора с размером пор 10 кДа (Millipore, США).

Кристаллизация белка. Подбор условий кристаллизации пикорнаина 3С на первом этапе осуществляли методом диффузии в парах (вариант “сидячей капли”) с помощью роботизированной системы кристаллизации (Douglas Instruments, Великобритания) с использованием стандартных наборов для кристаллизации глобулярных белков компаний “Hampton Research” (США): Crystal Screen HT, Index HT, PEG/Ion HT; PEGRx HT — “Anatrace” (США): TOP96 и “Molecular dimen-

sions” (Великобритания): PactPremier. Скрининг условий кристаллизации проводился в кристаллизационных низкопрофильных 96-луночных планшетах (ArtRobbins, США), при этом каждая лунка содержала три подлунки, которые использовались для варьирования концентрации белка в рамках одного условия кристаллизации. Всего было подготовлено пять планшетов при двух значениях температуры: 15 и 4°C. Соотношения белка и противораствора в каждой лунке — 1 : 1, 2 : 1 и 1 : 2, суммарный объем кристаллизационного раствора в каждой подлунке — 0.4 мкл, объем кристаллизационного противораствора, содержащего осадитель, — 50 мкл. Оптимизацию найденных условий кристаллизации проводили при температурах 15 и 4°C методом диффузии в парах (вариант “висячей капли”) в 24-луночных планшетах типа VDX фирмы “Hampton research” (США). Для этого кристаллизационные капли суммарным объемом 3 мкл, состоявшие из смеси белок : кристаллизационный противораствор в соотношении 1 : 2, 1 : 1, 2 : 1, наносили на силиконизированное стекло, герметично закрепленное над резервуаром с 500 мкл кристаллизационного противораствора, содержащего осадитель.

Просмотр результатов кристаллизационных экспериментов проводили вручную с использованием оптического микроскопа Nikon при увеличении ×200–1000 1 раз в неделю в первый месяц инкубации планшетов и 1 раз в месяц — в последующий срок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование в AlphaFold2. Несмотря на наличие в базе данных GenBank девяти аминокислотных последовательностей гена 3С HRV A28 с уровнем гомологии 100% (GenBank ID: AER92574, AER92577, UFT26780, QYI87778, UHU34959, WAK75528, QZU26640, QZU26685, UFT26750), ближайший по аминокислотной последовательности вариант пикорнаина 3С, имеющий решенную пространственную структуру в базе данных PDB, имеет идентичность 79% (PDB ID: 2XYA) с исследуемым в работе белком, а наиболее изученный и используемый для белковой инженерии пикорнаин 3С HRV B14 имеет идентичность с пикорнаином 3С HRV A28 приблизительно 52% (PDB ID: 6KYZ и 2B0F).

Для того чтобы исследовать структурное сходство и консервативность пикорнавирусных протеаз, структура пикорнаина 3С HRV A28 была предсказана с использованием программного обеспечения AlphaFold2. Прогнозируемая модель имела высокую достоверность построения структуры pLDDT = 96.3, pTM = 0.925. Пространственная структура пикорнаина 3С HRV A28 демонстрирует высокое топологическое сходство с другими пикорнаинами. Так, коэффициент схо-

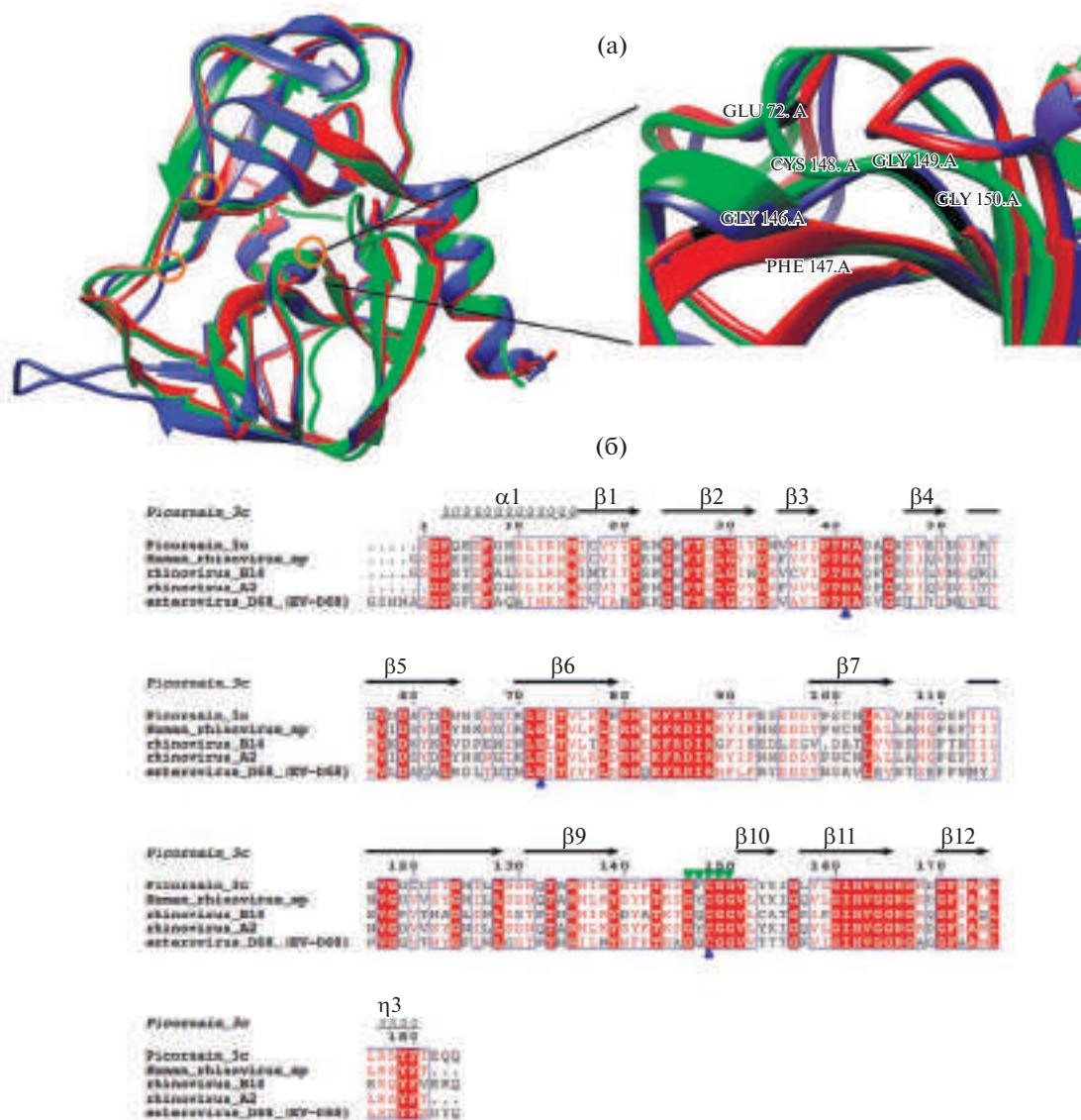


Рис. 1. Модели пикорнаинов демонстрируют высокое структурное сходство: а – наложение пространственной модели пикорнаина 3С HRV A28 (красный), пикорнаина *Human rhinovirus sp.* (PDB ID: 2XYA, синий) и пикорнаина HRV B14 (PDB ID: 6KYZ, зеленый). Оранжевыми кружками выделены позиции каталитически важных аминокислот. Отдельно вынесена структура области высококонсервативной последовательности; б – выравнивание аминокислотных последовательностей гена 3С HRV и энтеровируса D68. Для пикорнаина 3С HRV A28 указаны элементы вторичной структуры. Синими треугольниками обозначены каталитически важные аминокислоты, зелеными – высококонсервативная последовательность. Красные поля с белыми буквами указывают на строгую идентичность последовательностей.

жести TM-score составил 0.91 со структурой 2XYA, 0.93 со структурой 6KYZ и 0.95 со структурой пикорнаина энтеровируса D68 (PDB ID: 7L8H). Несмотря на то что уровень гомологии пикорнаина 3С HRV A28 с пикорнаином 3С энтеровируса D68 по аминокислотной последовательности 46%, коэффициент схожести моделей этих белков оказался наибольшим из рассмотренных. Топологически пикорнаин 3С HRV A28 представлен одной большой α -спиралью ($\alpha 1$), образованной

15 аминокислотами, и двенадцатью β -листами ($\beta 1$ – $\beta 12$) (рис. 16). Обнаружены каталитически важные остатки аминокислот Cys₁₄₉, His₄₁ и Glu₇₂, характерные для пикорнаинов, которые образуют связанный кластер аминокислот с общей геометрией, сходной с каталитической триадой Ser-His-Asp семейства трипсиноподобных сериновых протеаз (рис. 1а) [15]. Одна из аминокислот каталитического центра Cys₁₄₉ располагается в высококонсервативном регионе

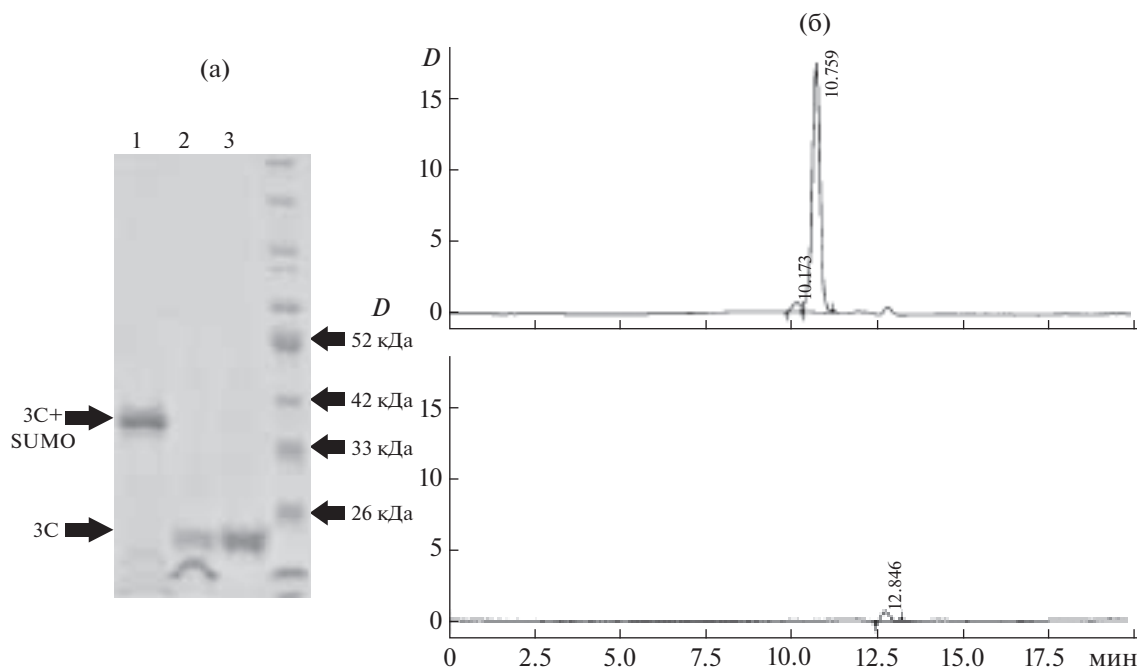


Рис. 2. Получение пикорнаина 3C HRV A28 без аффинных меток и белков слияния: а — вторая аффинная (реверс) хроматография пикорнаина 3С (1 — химерный белок 14×His-SUMO-3С до добавления SUMO-протеазы; 2 — продукты ферментативного отщепления партнера слияния SUMO; 3 — фракция белков, не связавшихся с Ni-NTA сефарозой после нанесения); б — профили эксклюзионной хроматографии препарата пикорнаина 3С (вверху) и растворителя белковой фракции (внизу).

Gly₁₄₇-**Phe**₁₄₈-Cys₁₄₉-Gly₁₅₀-Gly₁₅₁ вирусных пикорназ, который является мишенью для нуклеофильной атаки на карбонильный углерод субстрата (рис. 1а) [5]. При этом появление Phe₁₄₈ влечет изменение топологии региона. У вирусных пикорназ последовательность аминокислот Gly₁₄₇-**Phe**₁₄₈-Cys₁₄₉-Gly₁₅₀-Gly₁₅₁ образует не протяженную α-спираль, в то время как у пикорнаина 3С HRV A28 наблюдается свободная петля (рис. 1б).

Наработка и ферментативная активность. Для кристаллизации пикорнаина 3С HRV A28 потребовалось отщепление метки 14 × His-SUMO. Для этого химерный белок 14 × His-SUMO-3С подвергали протеолитическому расщеплению SUMO-протеазой, продукты гидролиза наносили на колонку с Ni-NTA-сефарозой, по результатам реверс хроматографии получен препарат рекомбинантного пикорнаина 3С HRV A28 без партнера слияния и меток. При анализе белковых фракций методом SDS-PAGE установлено, что пикорнаин 3С соответствует теоретически рассчитанной массе 20.3 кДа, а также имеет высокую степень чистоты и гомогенности (рис. 2а). Согласно проведенному эксклюзионному ВЭЖХ-анализу, в полученном образце присутствовал мажорный пик, соответствующий целевому белку (~20 кДа) с чистотой более 96%

(рис. 2б). Пики растворителя (буфера пикорнаина 3С HRV A28) при определении степени чистоты и олигомеризации белковой фракции не учитывали. Ферментативная активность пикорнаина 3С подтверждена с использованием химерного белка-субстрата SUMO-3Csite-AmilCP, представляющего собой синий хромопротеин AmilCP из кораллов *Acropora millepora* и содержащий сайт расщепления протеазы 3С в линкерном регионе после лидирующей последовательности SUMO (Leu-Gln-Ala-Ile-Phe-Gln-Gly-Pro). Для этого подготовленные разведения протеазы 3С вносили в буферный раствор, содержащий равное количество белка-субстрата (массовые соотношения 1 : 1, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 и 1 : 10 000). После инкубации при 25°C в течение 1 часа продукты гидролиза анализировали с использованием метода SDS-PAGE (рис. 3). Показано, что рекомбинантный хроматографически очищенный пикорнаин 3С HRV A28 проявляет строго специфическую протеолитическую активность в отношении модельного белка-субстрата 14 × His-SUMO-3Csite-AmilCP, содержащего сайт распознавания и расщепления LQAIFQG↓P в линкерном регионе (рис. 3).

Кристаллизация. Проведение дополнительной стадии очистки (гель-фильтрация) непосредственно перед кристаллизацией являлось важ-

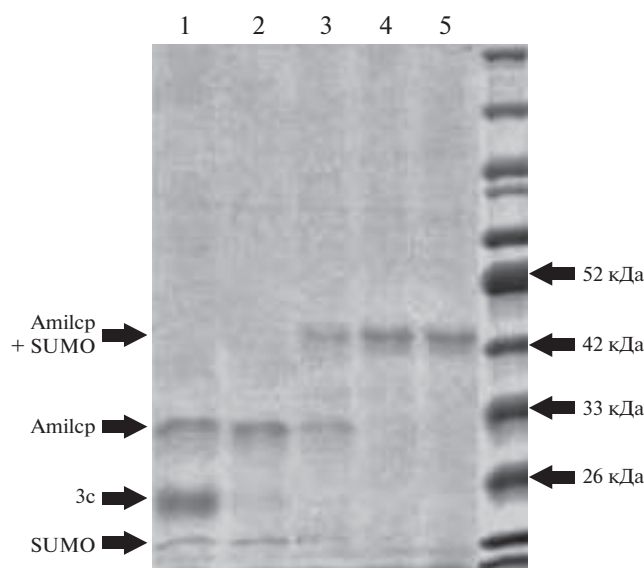


Рис. 3. Подтверждение специфической ферментативной активности пикорнаина 3С HRV A28 (1–5 – массовые соотношения субстрата к ферменту 1 : 1, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 и 1 : 10 000 соответственно).

ным фактором для получения результатов, так как позволило отделить мономер пикорнаина от агрегатов большей массы, которые составляли приблизительно половину объема образца. В результате широкого скрининга условий в большинстве кристаллизационных капель наблюдался легкий и средний гранулированный осадок, который в ряде условий при длительном времени инкубации переходил в агрегаты. В части условий были получены микрокристаллические осадки, в нескольких – мелкие одиночные кристаллы и сростки очень малого размера (линейный размер по наибольшей грани менее 15–20 мкм). На основе полученных условий провели два повтора оптимизации, суммарно – четыре планшета, каждый по 24 условия. В подавляющем большинстве условий оптимизации, даже при низких концентрациях осадителя, наблюдается выпадение легкого или среднего гранулированного осадка и микрокристаллина, в ряде условий со временем наблюдается выпадение агрегатов белка. Кристаллов, размеры которых были бы пригодны для проведения рентгеноструктурного эксперимента, не наблюдалось, однако было получено несколько перспективных условий при 15°C (табл. 1), которые после оптимизации позволят получить кристаллы для дифракционного эксперимента. В случае условий 20% ПЭГ 3350, 0.2 М хлорида кальция понадобится решить проблему образования сростков. Наиболее перспективными являются условия 2 М сульфат аммония, 0.2 М калий-натриевый тартрат, 0.1 М цитратный буфер pH 5.6 и 28% ПЭГ 400, 0.2 М хлорид кальция, 0.1 М

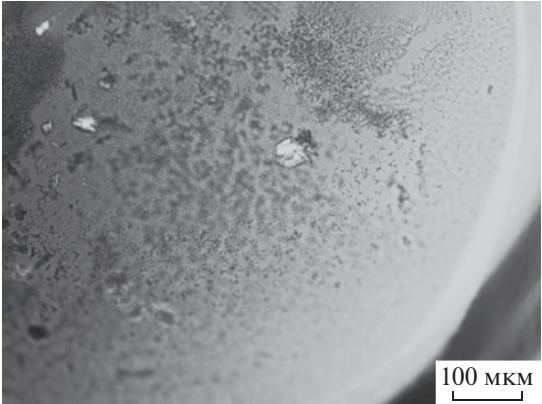
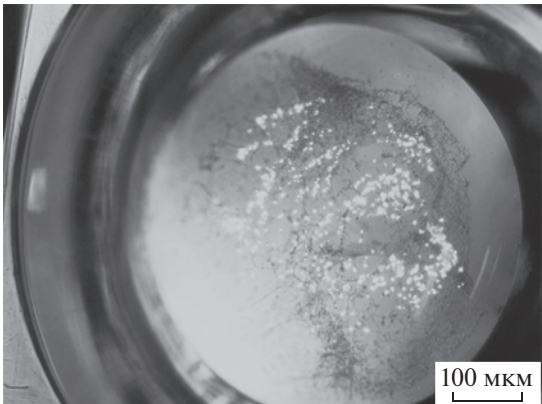
HEPES pH 7.5. В первом случае понадобится варьирование условий, позволяющее уменьшить количество зародышей при кристаллизации, получив таким образом меньшее количество кристаллов большего размера в капле. Во втором случае достаточно получить друзы большего размера, так как отдельные кристаллы возможно отщепить от друз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пикорнаин 3С риновируса человека представляет собой ценную коммерческую цистеиновую протеазу, которая может специфически распознавать короткую аминокислотную последовательность Leu-Gln-Ala-Ile-Phe-Gln↓Gly-Pro для удаления белков слияния при очистке целевого рекомбинантного белка. Белки слияния, такие как MBP (белок, связывающий мальтозу), GST (глутатион-S-трансфераза) и т.д., широко используются для облегчения экспрессии и очистки гетерологичных белков в различных клетках-хозяевах. Однако эти белки слияния обычно необходимо впоследствии удалять с помощью протеаз, чтобы свести к минимуму их потенциальные побочные эффекты в отношении целевых белков. По сравнению с другими широко используемыми коммерческими протеазами, такими как TEV-протеаза, энтерокиназа или протеаза SUMO, преимущество пикорнаина 3С заключается в высокой субстратной специфичности и протеолитической активности в широком диапазоне температур от 4 до 30°C [16]. Таким образом, пикорнаин 3С может проводить эффективные реакции удаления метки и белков слияния даже при низких температурах, когда структура и активность целевых белков в значительной степени стабилизируются, что способствует его практическому применению в научных кругах, наукоемкой промышленности, фарминдустрии и медицине.

В настоящей работе был получен оригинальный рекомбинантный пикорнаин 3С риновируса A28, показана его ферментативная активность, проведена попытка его кристаллизации и получены начальные перспективные условия кристаллизации. Моделирование пространственной структуры пикорнаина 3С в AlphaFold 2 выявило видоизменение структуры с α -спирали на свободную петлю в паттерне важных высококонсервативных аминокислот семейства пикорнаиновых протеаз. Таким образом, решение структуры пикорнаина 3С HRV A28 экспериментальными методами является актуальной задачей дальнейших исследований. Несмотря на значительный прогресс в технологии и понимании процесса роста кристаллов, кристаллизация макромолекул продолжает оставаться эмпирической наукой рациональных проб и ошибок, направляемой результатами предыдущих попыток [17]. Поэтому

Таблица 1. Перспективные условия кристаллизации пикорнаина 3С HRV A28

Условия кристаллизации	Фотографии кристаллов
0.2 М хлорид кальция 20% ПЭГ 3350	
0.2 М хлорид кальция 0.1 М HEPES 28% ПЭГ 400 pH 7.5	
0.2 М калий-натриевый тартрат 2 М сульфат аммония 0.1 М цитратный буфер pH 5.6	

работы по кристаллизации и рентгеноструктурному анализу пикорнаина 3С HRV A28, полученного в рамках проведенного исследования, будут продолжаться, перспективные условия получения кристаллов в данный момент оптимизируются.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение от 12.10.2021 № 075-15-2021-1355) в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследова-

ний и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 гг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bizot E., Bousquet A., Charpié M. et al. // Front. Pediatr. 2021. V. 22. P. 643219. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.643219>
2. Ljubin-Sternak S., Meštrović T. // Viruses. 2023. V. 15 (4). P. 825. <https://doi.org/10.3390/v15040825>

3. *Flather D., Nguyen J.H.C., Semler B.L., Gershon P.D.* // PLoS Pathog. 2018. V. 14 (8). P. e1007277. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007277>
4. *Jensen L.M., Walker E.J., Jans D.A., Ghildyal R.* // Methods Mol. Biol. 2015. V. 1221. P. 129. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1571-2_10
5. *Matthews D.A., Dragovich P.S., Webber S.E. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96 (20). P. 11000. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11000>
6. *Bjorndahl T.C., Andrew L.C., Semenchenko V., Wis-hart D.S.* // Biochemistry. 2007. V. 46 (45). P. 12945–58. <https://doi.org/10.1021/bi7010866>
7. *Cui S., Wang J., Fan T. et al.* // J. Mol. Biol. 2011. V. 408 (3). P. 449. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.03.007>
8. *Yuan S., Fan K., Chen Z. et al.* // Virol. Sin. 2020. V. 35 (4). P. 445. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00196-4>
9. *Sun D., Chen S., Cheng A., Wang M.* // Viruses. 2016. V. 8 (3) P. 82. <https://doi.org/10.3390/v8030082>
10. *Ullah R., Shah M.A., Tufail S. et al.* // PLoS One. 2016. V. 11 (4) P. e0153436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153436>
11. *Wanga Q.M., Chen S.H.* // Curr. Protein Pept. Sci. 2007. V. 8 (1). P. 19. <https://doi.org/10.2174/138920307779941523>
12. *Jumper J., Evans R., Pritzel A. et al.* // Nature. 2021. V. 596 (7873). P. 583. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
13. *de Marco A.* // Nat Protoc. 2006. V. 1 (3). P. 1538. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.289>
14. *Brunelle J.L., Green R.* // Methods Enzymol. 2014. V. 541. P. 151. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>
15. *Akaberi D., Båhlström A., Chinthakindi P.K.* // Antiviral Res. 2021. V. 190. P. 105074. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105074>
16. *Fan X., Li X., Zhou Y. et al.* // ACS Chem Biol. 2020. V. 15 (1). P. 63. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00539>
17. *Timofeev V., Samygina V.* // Crystals. 2023. V. 13 P. 71. <https://doi.org/10.3390/cryst13010071>