

**А.У. Исабек, С.О. Садикалиева, Е.Д. Бурашев,
О.В. Червякова, М.М. Касенов, К.Т. Султанкулова**

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
Казахстан, Жамбылская область, пгт. Гвардейский,
e-mail: isabekova__aisha@mail.ru

ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ ПЕРВОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА

На данный момент значительную обеспокоенность вызывает распространение в мире эпизотий высокопатогенного вируса гриппа птиц. Вирус гриппа обладает наиболее высокой генетической вариабельностью и вероятностью появления новых штаммов, способных создавать большие эпидемии. Эволюция вируса гриппа протекает очень быстро, следовательно, первоочередной задачей исследователей является антигенное картирование подтипов гемагглютинина, а также выявления особенностей антигенной структуры. Рентгеновская кристаллография является часто используемым методом при определении трехмерной структуры белка.

Целью данных исследований являлось получение рекомбинантного белка первой субъединицы гемагглютинина методом бактериальной экспрессии в *Escherichia coli* для дальнейшего определения его трехмерной структуры.

В результате проведенных исследований плазида, имеющая в своем составе нуклеотидную последовательность гена, кодирующего целевой белок первой субъединицы гемагглютинина, была трансформирована в клетки *E. coli*, штамм ER2566. Были отработаны оптимальные условия экспрессии целевого гена в клетках *E. coli*, штамм ER2566 и очистки рекомбинантного белка методом металл-аффинной хроматографии. Степень очистки белка составила не менее 95%. Полученный рекомбинантный белок будет использован для дальнейших работ по кристаллографии и трехмерному моделированию белка.

Ключевые слова: вирус гриппа птиц, гемагглютинин, экспрессия, рекомбинантный белок.

A.U. Isabek, S.O. Sadikalieva, E.D. Burashev,
O.V. Chervyakova, M.M. Kasenov, K.T. Sultankulova

The Research Institute for Biological Safety Problems,
Kazakhstan, Gvardeyskiy, Zhambyl dist., e-mail: isabekova__aisha@mail.ru

Obtaining protein preparations of the first subunit of hemagglutinin influenza virus

At the moment, there is considerable concern about the spread in the world of epizootics of the highly pathogenic avian influenza virus. Influenza virus has the highest genetic variability and the likelihood of new strains that can create large epidemics. The evolution of the influenza virus proceeds very quickly, therefore, the paramount task of the researchers is antigenic mapping of hemagglutinin subtypes, as well as identifying the characteristics of the antigenic structure. X-ray crystallography is a commonly used method for determining the three-dimensional structure of a protein.

The purpose of these studies was to obtain a recombinant protein of the first hemagglutinin subunit by bacterial expression in *Escherichia coli* to further determine its three-dimensional structure.

As a result of the research, a plasmid containing the nucleotide sequence of a gene encoding the target protein of the first hemagglutinin subunit was transformed into *E. coli* cells, strain ER2566. The optimal conditions for the expression of the target gene in *E. coli* cells, strain ER2566, and purification of the recombinant protein by metal affinity chromatography were worked out. The degree of protein purification was at least 95%. The resulting recombinant protein will be used for further work on crystallography and three-dimensional modeling of the protein.

Key words: avian influenza virus, hemagglutinin, expression, recombinant protein.

А.У. Исабек, С.О. Садикалиева, Е.Д. Бурашев,
О.В. Червякова, М.М. Касенов, К.Т. Султанкулова

Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты,
Қазақстан, Жамбыл облысы, Гвардейский қтқ., e-mail: isabekova___aisha@mail.ru

Тұмау вирусының гемагглютининінің бірінші бөлігінің ақуыздық препаратын алу

Қазіргі уақытта құс тұмауының жоғары патогенді вирусының эпизоотиясының бүкіл әлемде таралуы өте үлкен алаңдаушылық тудырады. Тұмау вирусы аса жоғары генетикалық өзгергіштікке ие. Жаңа штаммдардың пайда болуы үлкен эпидемия тудыру мүмкіншілігі өте жоғары болып табылады. Тұмау вирусының эволюциясы өте тез жүреді, сол себептен қазіргі таңда зерттеушілердің басты міндеті тұмау вирусының гемагглютининінің түрлерін антигендік карталандыру, сонымен қатар антигендік құрылымының сипаттамаларын анықтау болып табылады. Рентгендік кристаллография әдісі ақуыздың құрылымын анықтауда жиі қолданылатын әдіс болып саналады.

Жұмыстың мақсаты – *Escherichia coli* жасушалары негізінде бактериалды экспрессия әдісін қолдана отырып, тұмау вирусының гемагглютининінің бірінші бөлігінің рекомбинантты ақуызын алу және одан әрі оның үш өлшемді құрылымын анықтау болып табылады.

Зерттеулер нәтижесінде гендік нуклеотидтер тізбегі бар тұмау вирусының гемагглютининінің бірінші бөлігінің ақуызын кодтайтын плазмида *Escherichia coli* жасушаларының ER2566 штамына енгізілді. Металл-афиндік хроматография арқылы рекомбинантты ақуызды тазартуға оңтайлы жағдайлар жасалды. Ақуызды тазарту деңгейі кем дегенде 95% құрады. Алынған рекомбинантты ақуыз әрі қарай кристаллография және ақуызды үш өлшемді модельдеу үшін қолданылады.

Түйін сөздер: құс тұмауы вирусы, гемагглютинин, экспрессия, рекомбинантты ақуыз.

Введение

Вирус птичьего гриппа является чрезвычайно заразной, многоорганной системной болезнью домашней птицы, приводящей к высокой смертности. Вирус птичьего гриппа является одним из смертельно опасных патогенов [1, 2]. Данным вирусом заражаются многие виды диких и домашних птиц, большое количество различных видов млекопитающих и человек. Вирусы гриппа типа А принадлежат к роду *Alphainfluenzavirus* семейства *Orthomyxoviridae* и вызывают сезонные заболевания с высокой заболеваемостью и смертностью у 5-10% населения мира. С конца 2003 года H5N1 достиг эпизоотического уровня у домашней птицы в ряде азиатских стран, включая Китай, Вьетнам, Таиланд, Корею, Индонезию, Японию и Камбоджу, и теперь распространился на популяции диких птиц [3, 4].

Вирусы гриппа типа А и В имеют 8 генов, которые кодируют 10 белков, включая поверхностные белки гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA). В случае вируса гриппа типа А поверхностные белки были разделены на различные подтипы в соответствии с различиями. На сегодняшний день были определены 16 подтипов HA и 9 подтипов NA [5, 6]. Гемагглютинин и нейраминидаза формируют поверхностные пепломеры вириона и являются основными мишенями для противовирусных антител [7, 8].

HA играет ключевую роль в инициации вирусной инфекции, связываясь с концевыми сиаловыми кислотами (N-ацетилнейраминовой кислотой [NeuAc]) гликановых рецепторов на клетках-хозяевах с последующим рН-зависимым слиянием вирусной оболочки с мембраной клетки-хозяина [9, 10]. Свойства гемагглютинина привлекают самое пристальное внимание исследователей. Гемагглютинин (HA), главный антиген на вирусной поверхности, является основной мишенью для нейтрализации антител и отвечает за связывание вируса с рецепторами хозяина, обеспечивая проникновение в клетку-хозяина посредством эндоцитоза и последующего слияния мембран. Гемагглютинин синтезируется в качестве одноцепочечного предшественника (HA0) в эндоплазматической сети, где он собирается в виде тримера, а затем экспортируется на поверхность клетки через аппарат Гольджи. На клеточной поверхности HA0 расщепляется специфическими протеазами-хозяевами на HA1 и HA2 [11-14].

Вирус гриппа постоянно меняется, и важно следить за молекулярной эволюцией циркулирующих штаммов, чтобы регулярно обновлять состав вакцины, разрабатывать новые препараты против гриппа [15, 16]. Знание пространственной структуры белка дает возможность определения механизма работы, направленной разработки профилактических препаратов. Определение

пространственной структуры белка (трехмерное моделирование) является бурно развивающейся отраслью современной науки [17, 18]. В настоящее время для получения 3D структур белковых молекул широко используются методы ядерного магнитного резонанса (ЯМР), спектроскопии и рентгеновская кристаллография [19, 20].

Многие зарубежные известные учёные проводят исследования с использованием методов кристаллографии для получения трехмерной структуры белка и получают высокие результаты значимые как для терапии вируса гриппа, так и для определения механизмов патогенеза [21-23].

Рентгеновская кристаллография является наиболее популярным подходом для определения трехмерной структуры белка. Последующим этапом работы после очистки белков является кристаллизация препаратов. Следовательно, для получения кристаллов белков важным является получение высокоочищенного белкового препарата. Следовательно, получение белкового препарата является одним из основных этапов получения трехмерной структуры белка [24-27].

Целью данной работы является получение очищенного белка первой субъединицы вируса гриппа типа А для дальнейшего определения его трехмерной структуры.

Методы исследования

В качестве объекта исследования в работе был использован штамм А/курица/СКО/5/05 (H5N1) вируса гриппа птиц А/Н5, который был получен из коллекции микроорганизмов НИИПББ.

Экспрессия и определение растворимости рекомбинантного белка

Экспрессию рекомбинантного белка проводили в экспрессирующих клетках *E.coli* штамма ER2566. Из бактериальных штаммов, экспрессирующих рекомбинантный белок, готовили ночную культуру в LB среде с добавлением 50 мкг/мл канамицина (LB-kan50). Ночную культуру разводили средой LB-kan в соотношении 1:50, после чего клетки выращивали при 37 °С до OD₆₀₀=0.6-1 на шейкере (200 об/мин). Экспрессию индуцировали добавлением 1 мМ изопропил-β-D-тиогактопиранозид (ИПТГ). После добавления ИПТГ ночную культуру инкубировали при 37 °С в течение 4 ч. Растворимость рекомбинантного белка определяли с использованием реагента B-PER® Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, США). Осадок клеток, которые были индуцированы,

ресуспендировали реагентом B-PER с добавлением 0,5 М ЭДТА и инкубировали в ротаторе в течение 30 минут. По истечению времени инкубации центрифугировали 20 минут при 13 000 об/мин. Отделили надосадок от осадка и провели ДСН-ПААГ-электрофорез для визуализации результатов.

ДСН-ПААГ-электрофорез и иммуоблот

Электрофоретическое разделение белков проводили в 9 % ДСН-ПААГе. Для визуализации белков использовали окрашивание Coomassie G-250 или иммунодетекцию. Для иммунодетекции белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану и детектировали с помощью поликлональных антител к рекомбинантным белкам. Нитроцеллюлозный блот блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре в буфере (ББ: 150 мМ NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH 7,5, содержащем 5 % обезжиренного сухого молока). Затем блот инкубировали со вторичными антителами, меченными щелочной фосфатазой при тех же условиях. После чего проявляли добавлением субстрата BCIP/NBT.

Получение очищенных белковых препаратов

Для очистки рекомбинантного белка осадок клеток ресуспендировали в буфере (100 мМ Трис HCl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 1 % Triton X-100, 1% DOX) из расчета 15 мл на 1 г сырого клеточного осадка. К полученной суспензии добавляли лизоцим до конечной концентрации 1 мг/мл. Лизис клеток осуществляли путём двукратного замораживания (-70 °С) – оттаивания (+37 °С) суспензии. Фракцию растворимых белков получали центрифугированием лизата клеток при 10000× g в течение 20 мин. Очистку белка проводили методом металло-аффинной хроматографии с использованием HisPur™ Cobalt Superflow Agarose (Thermo Scientific, США) в нативных условиях. Для солиubilизации белка использовали буфер NBV [50 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 8М мочевины, pH 7,4]. Проводили трехкратную отмывку агарозы буфером NWB [20 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 15 мМ имидазол, pH 7,4]. Белки элюировали буфером NEV [20 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 500 мМ имидазол, pH 7,4]. Электрофоретическое разделение белков проводили в ДСН-ПААГ в денатурирующих редуцирующих условиях. Для визуализации белков использовали окрашивание Coomassie G-250.

Результаты исследований

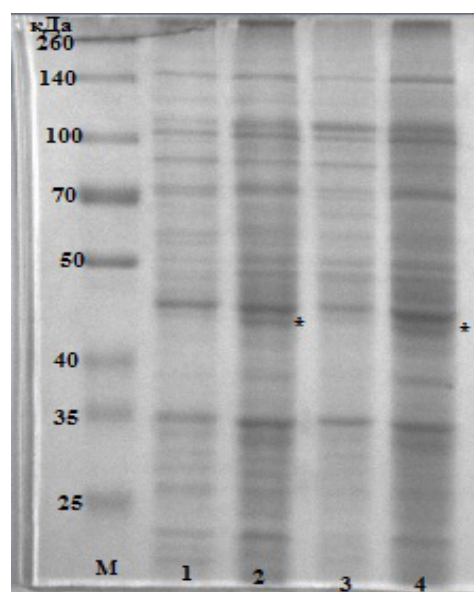
Авторами (Бурашев, 2019: 204) ранее были получены плазмидные ДНК, в которых в резуль-

тате ПЦР-анализа выявили наличие гена первой субъединицы гемагглютинина. Ранее полученные плазмидные ДНК были трансформированы в экспрессирующие клетки *E. coli* штамм ER2566 для проведения экспрессии первой субъединицы гемагглютинина [28].

Индукция экспрессии целевого гена ИПТГ приводила к наработке белкового продукта размером около 45 кДа, что соответствовало расчетной величине молекулярного веса рекомбинантного белка, также целью выбора условий очистки рекомбинантного белка HA1 определили его растворимость при экспрессии в клетках *E. coli*. (рис. 1).

Решение о том, следует ли очищать 6xHis-меченные белки в нативных или денатурирующих условиях зависит от местоположения и растворимости белка, доступности метки 6xHis, последующее применение и необходимость сохранения биологической активности. Поскольку взаимодействие между сорбентом и меткой 6xHis рекомбинантного белка не зависит от третичной структуры, белки могут быть очищены либо в нативной, либо в денатурирующей форме условия. Чтобы установить наилучшую стратегию очистки, важно определить, является ли белок растворимым в цитоплазме или находится в цитоплазматических тельцах включения. Многие белки образуют тельца включения, когда наблюдается высокий уровень экспрессии в бактериях, в то время как другие хорошо переносятся клеткой и остаются в цитоплазме в их родной конфигурации. Белки, которые содержат соответствующий лидерный пептид в последовательности могут секретироваться в периплазматическое пространство, но это зависит от клетки-хозяина и от природы как лидерного пептида, так и рекомбинантного белка.

Как видно из рисунка 1, в ночной культуре до добавления ИПТГ (индуктора экспрессии) синтез целевого белка не наблюдался (дорожка 1), а при добавлении ИПТГ наблюдается синтез предположительно целевого белка. Специфичность синтезируемого белка требуется определить иммунодетекцией. Также при определении растворимости синтезируемого белка (рис. 1) наблюдалось значительное накопление белка в клетке в растворимой форме (дорожка 4), в то время, когда в нерастворимой фракции белков накопление белка наблюдается в следовых количествах (дорожка 3). В результате определения растворимости установили, что очистку белка целесообразно проводить в нативных условиях.



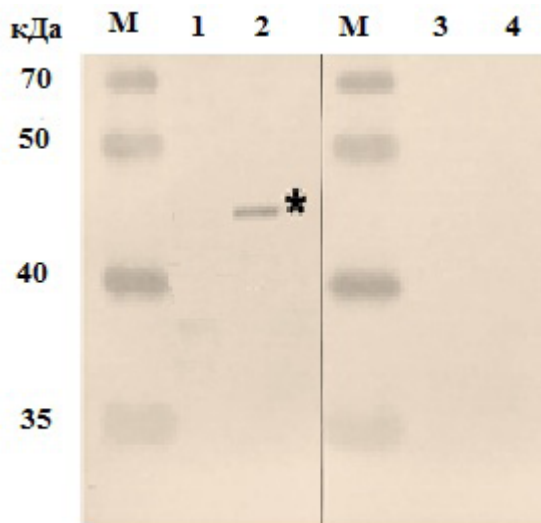
М – маркер молекулярного веса белков; 1 – лизат клеток до индукции экспрессии; 2 – лизат клеток после индукции экспрессии; 3- нерастворимая фракция белков (включения); 4 – растворимая фракция белков

Рисунок 1 – Результаты экспрессии и определения растворимости рекомбинантного белка (HA1) штамма вируса гриппа А/курица/СКО/5/05 (H5N1)

Для определения специфичности синтезируемого белка нами были проведены исследования иммунодетекции (рис 2). Данный метод является современным методом лабораторной диагностики и применяется в качестве более точного «подтверждающего» анализа.

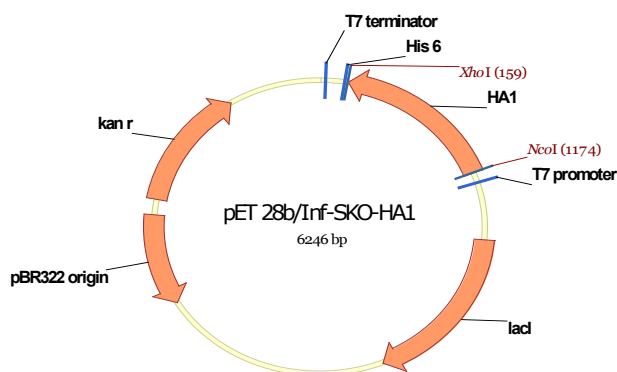
В результате проведения иммунодетекции было определено, что синтезируемый белок специфический связался с антителами в сыворотке H5N1 и визуально детектировался при добавлении субстрата (рис. 2 дорожка 2), в то время, когда при обработке данного белка нормальной сывороткой связывание и детекция не наблюдались (рис. 2 дорожка 4). Результаты иммуноблота определили, что синтезируемый рекомбинантный белок является первой субъединицей гемагглютинина.

При создании генетической конструкции для экспрессии целевого гена в состав нуклеотидной последовательности был включен участок, кодирующий гексагистидиновую метку His6 (рис. 3). Это позволило использовать для очистки целевого белка метод металл-аффинной хроматографии. Также согласно рисунку 3, в качестве сайтов рестрикции нами были выбраны сайты рестриктаз NcoI и XhoI, следовательно, клонирование гена первой субъединицы гемагглютинина проводили по выше указанным сайтам.



М – маркер молекулярного веса белков; 1,3- лизат клеток до индукции экспрессии; 2,4 – лизат клеток после индукции экспрессии. 1,2- пробы инкубированы специфической козьей сывороткой к рекомбинантному белку (H5N1); 3,4 – пробы инкубированы нормальной козьей сывороткой.

Рисунок 2 – Иммунодетекция синтезируемого рекомбинантного белка.

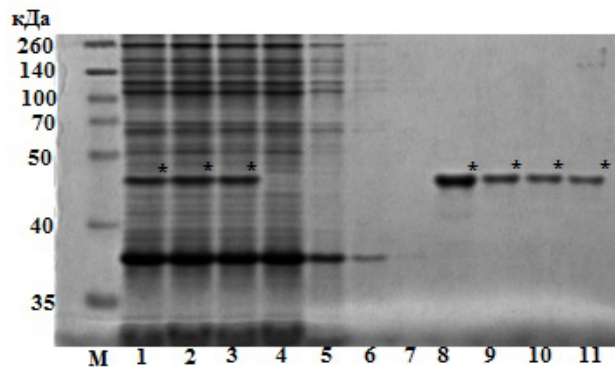


pBR322 origin- сайт начала репликации, kan r – ген устойчивости к канамицину, lacI-ген репрессора лактозного оперона, T7 promoter – промотор фага T7, T7 terminator – терминатор транскрипции фага T7, HA1 – встроенный рекомбинантный ген HA1, His6 – последовательность кодирующая гексагистидиновый таг

Рисунок 3 – Карта плазмиды pET28/Inf-SKO-HA1

Металл-аффинная хроматография является высокоспецифичным и надежным методом очистки рекомбинантных белков вследствие относительно высокого сродства и специфичности некоторых металлов к эпитопу, содержащему шесть или более остатков гистидина [29, 30].

Очистка белков, содержащих в своей структуре метки, достаточно проста, и можно сэкономить много времени благодаря высокой специфичности метки рекомбинантного белка и лиганда иммобилизованного на хроматографическом сорбенте. Конечно же, дальнейшая очистка рекомбинантного белка необходима, если требуется большая степень чистоты, но применение аффинной метки позволяет уже на первом этапе очистки избавиться от большинства примесных белков, облегчает и дальнейшую очистку.



М – маркер молекулярного веса белков; 1 – общий пул клеток; 2 – клеточный лизат до фильтрации; 3 – клеточный лизат после фильтрации; 4 – проскок через колонку; 5-7 – промывки; 8-11 – элюирование белка

Рисунок 4 – Электрофоретический анализ белковых фракций в процессе очистки целевого белка HA1 штамма А/курица/СКО/5/05 (H5N1)

На рисунке 3 показаны результаты электрофоретического анализа после очистки методом металл-аффинной хроматографии. В дорожке М – показан разбег маркера, белкового раствора с белками, у которых известна молекулярная масса. В первой дорожке показано распределение всех белков клетки-производителя по массе компонентов фракций. В четвертой дорожке показан результат связывания (адсорбция) гистидиновой метки белка и лиганда. Как видно из рисунка 3, белок полностью связался с лигандом. В дорожках 8-11 показаны результаты элюирования белка, согласно данным результатам видно, что использованный метод очистки позволил получить препараты рекомбинантного белка с чистотой не менее 95%.

Эндогенные белки с остатками гистидина, которые взаимодействуют с группами лиганда, могут быть удалены путем снижения рН промывочного буфера до 6,3 или путем до-

бавления имидазола в концентрации 10–50 мМ. В бактериальных системах экспрессии рекомбинантные белки обычно экспрессируются на высоких уровнях, а уровень загрязняющие белки относительно низкий. Поэтому, как правило, нет необходимости промывать связанный бхHis-меченный белок в очень жестких условиях. Нами не проводились процедуры промывки белков при пониженной концентрации буфера так как, в результате промывки буфером при рН 7,4 уровень загрязнения сопутствующими белками был почти нулевой.

Аналогично, если концентрация имидазола увеличивается до 100–250 мМ, бхHis-тегированный белки также будут диссоциировать, потому что они больше не могут конкурировать за сайты связывания на смоле. Условия элюирования являются высоко воспроизводимыми, но должны быть определены для каждого бхHis-тегированного белка. Мономеры обычно элюируются при рН примерно 5,9, тогда как агрегаты и белки, которые содержат более одной метки бхHis, элюируются при рН приблизительно 4,5. Реагенты, такие как EDTA или EGTA, хелатируют ионы кобальта

и удаляют их из НТА группы. Это приводит к тому, что бхHis-меченный белок элюируется в виде белково-металлического комплекса. При элюировании белков нами был использован буфер с содержанием 500 мМ имидазола и рН 7,4.

Выводы

В результате проведенных исследований была создана генетическая конструкция для экспрессии белка HA1 в клетках *E.coli*. Отработаны оптимальные условия экспрессии и очистки целевого рекомбинантного белка. Определена специфичность синтезируемого белка иммунотекцией. Степень очистки белка составила не менее 95%.

Полученный рекомбинантный белок будет использован для дальнейших работ по кристаллографии и трехмерному моделированию белка.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках проекта AP05132243, финансируемого Министерством образования и науки Республики Казахстан.

Литература

- 1 Swayne D.E., Suarez D.L. Highly pathogenic avian influenza // Rev. Sci. Tech. – 2000. – Vol. 8. – P. 463–482.
- 2 Rohm C, Zhou N, Suss J, Mackenzie J, Webster RG. Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes // Virology. – 1996. – Vol. 217. – P. 508–516
- 3 Всемирная организация здравоохранения. Руководство по лабораторной диагностике и вирусологическому надзору за гриппом. Всемирная организация здравоохранения, Женева, Швейцария. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf?sequence=1
- 4 Lyons D., Lauring A. Mutation and Epistasis in Influenza Virus Evolution // Viruses. – 2018. – Vol. 10. – P. 401–407
- 5 Visher E., Whitefield S.E., McCrone J.T., Fitzsimmons W., Lauring A.S. The Mutational Robustness of Influenza A Virus // PLoS Pathog. – 2016. – Vol. 12. – P. 56–58.
- 6 Swayne D.E., Suarez D.L. Highly pathogenic avian influenza // Rev. Sci. Tech. – 2000. Vol. 19. – P. 463–482.
- 7 Lvov D.K., Kaverin N.V. Avian influenza in Northern Eurasia / D.K. Lvov, N.V Kaverin // In: Klenk H.D., Matrosovich M., Steh J., eds. Monographs in Virology. Volume 27: Avian Influenza. Basel, Switzerland: Karger, 2008: 41–58.
- 8 Kaverin N.V., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignat'eva A.V. Antigenic structure of influenza A virus hemagglutinin // Voprosy virusologii. – 2012. – Vol. 1. – P. 148–158.
- 9 Skehel J.J., Wiley D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin // Annu Rev Biochem. – 2000. – Vol. 69. – P. 531–569.
- 10 Air G.M. Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza A virus // Proc Natl Acad Sci. – 1998. – Vol. 78. – P. 7639–7643.
- 11 Stevens J., Blixt O., Tumpey T.M., Taubenberger J.K., Paulson J.C., Wilson I.A. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus // Science. – 2006. – Vol. 312. – P. 404–410.
- 12 Khurana S., Verma S., Verma N., Crevar C.J., Carter D.M., Manischewitz J., King L.R., Ross T.M., Golding H. Bacterial HA1 vaccine against pandemic H5N1 influenza virus: evidence of oligomerization, hemagglutination, and crossprotective immunity in ferrets // J. Virol. – 2011. Vol. 85. – P. 1246–1256.
- 13 Harper S et al. Influenza // Clinics in Laboratory Medicine. – 2002. – Vol. 22, No. 4. – P. 863–882.
- 14 Kido H., Yokogoshi Y., Sakai K., Tashiro M., Kishino Y., Fukutomi A Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein // J. Biol. Chem. – 1992. – P. 13573–13267.
- 15 Skehel J. J., Wiley D. C., Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin // Annu. Rev. Biochem. – 2000. Vol. 69. – P. 520–531.

- 16 Nelson M.I., Holmes E.C. The evolution of epidemic influenza // *Nat Rev Genet.* – 2007. Vol. 8. – P. 196–205.
- 17 Nobusawa E., Sato K. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses // *J Virol.* – 2006. Vol. 80. – P. 3675–3678.
- 18 Хёльте Х.Д., Зиппль В., Роньян Д., Фолькерс Г. Молекулярное моделирование. Теория и практика. – М: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015.
- 19 Levinthal C., Molecular Model-Building by Computer // *Scientific American.* – 1966. Vol. 214. – P. 42–52.
- 20 Levitt M., The birth of computational structural biology // *Nat. Struct. Biol.* – 2001. Vol. 8. – P. 392–393.
- 21 Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S., Hay A.J. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol // *Antiviral Res.* – 2008. – Vol. 81, No 2. – P. 132-140.
- 22 Kadama R.U., Wilson I.A. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. Department of Integrative Structural and Computational Biology. The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, 2016 // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2017. Vol. 114. – P. 4848-4850.
- 23 Faix J., Grosse R. Staying in shape with formins // *Dev. Cell.* – 2006. Vol.10. – P. 693–706.
- 24 Bolanos-Garcia V. M., Chayen N. E. New directions in conventional methods of protein crystallization // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 2009. Vol. 101. – P. 1203–1210.
- 25 Chayen N. E., Saridakis E. Sear R. P. Experiment and theory for heterogeneous nucleation of protein crystals in a porous medium // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2007. Vol. 103. – P. 597–601.
- 26 Boyko K.M., Popov V.O., Kovalchuk M.V. Promising approaches to crystallization of macromolecules suppressing the convective mass transport to the growing crystal // *Russ. Chem. Rev.* – 2015. – Vol. 84 (8). – P. 853-859.
- 27 Russo Krauss I. et al. An overview of biological macromolecule crystallization // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14, № 6. – P. 11643–11691.
- 28 Е.Д. Бурашев, А.У. Исабек, К.Т. Султанкулова, Н.Т. Сандыбаев Создание векторной конструкции и бактериальная экспрессия первой субъединицы гемагглютинина // *Вестник СемГУ.* – 2019. №3(87). С. 204-208
- 29 Hochuli E. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Dobeli, R. Gentz, D. Stuber // *Biotechnology.* – 1988. V. 6. – P. 1321–1325.
- 30 Wei C. Nurul T, Wahida AG, Shaharum S. Construction and heterologous expression of a truncated haemagglutinin (HA) protein from the avian influenza virus H5N1 in *Escherichia coli* // *Trop. Biomed.* – 2014. Vol. 31. – P. 1-10.

References

- 1 Swayne D.E., Suarez D.L. (2000) Highly pathogenic avian influenza. *Rev. Sci. Tech.* 19:463–482.
- 2 Rohm C, Zhou N, Suss J, Mackenzie J, Webster RG. (1996). Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology* 217:508–516.
- 3 World Health Organization. Guidelines for laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. World Health Organization, Geneva, Switzerland. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf?sequence=1
- 4 Lyons D., Luring A. (2018) Mutation and Epistasis in Influenza Virus Evolution. *Viruses*, 10: 401-407.
- 5 Visher E, Whitefield S.E., McCrone J.T., Fitzsimmons W., Luring A.S. (2016) The Mutational Robustness of Influenza A Virus. *PLoS Pathog*, 12(8)
- 6 Swayne D.E., Suarez D.L. (2000) Highly pathogenic avian influenza. *Rev. Sci. Tech.*, 19:463–482.
- 7 Lvov D.K., Kaverin N.V. (2008) Avian influenza in Northern Eurasia. *Monographs in Virology*. Vol. 27: Avian Influenza. Basel, Switzerland: Karger; 41–58.
- 8 Kaverin N.V., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignat'eva A.V. (2012) Antigenic structure of influenza A virus hemagglutinin. *Voprosy virusologii. Suppl.* 1:148–58.
- 9 Skehel J.J., Wiley D.C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69:531–569.
- 10 Air GM. (1981). Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci*, 78:7639–7643.
- 11 Stevens, J., Blixt, O., Tumpey, T.M., Taubenberger, J.K., Paulson, J.C., Wilson I.A. (2006) Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*, 312:404–410
- 12 Khurana S, Verma S, Verma N, Crevar CJ, Carter D.M, Manischewitz J, King L.R, Ross T.M, Golding H. (2011) Bacterial HA1 vaccine against pandemic H5N1 influenza virus: evidence of oligomerization, hemagglutination, and crossprotective immunity in ferrets. *J. Virol.*, 85:1246–1256.
- 13 Harper S et al. (2002). Influenza. *Clinics in Laboratory Medicine*, 22(4):863–882.
- 14 H Kido, Y Yokogoshi, K Sakai, M Tashiro, Y Kishino, A Fukutomi and N Katunuma (1992) Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 267:13573-13267.
- 15 J. J. Skehel, D. C. Wiley, (2000) Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin *Annu. Rev. Biochem.*, 69:520-531
- 16 Nelson M.I, Holmes E.C. (2007) The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet.*, 8:196–205.
- 17 Nobusawa E, Sato K. (2006) Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J Virol.*, 80:3675–3678.
- 18 Hjol'te H.-D., Zippel V., Ron'jan D., Fol'kers G. (2005) Molekuljarnoe modelirovanie [Molecular modeling]. *Teorija i praktika. Laboratorija znaniy* [in Russian]

- 19 Levinthal C., (1966) Molecular Model-Building by Computer. *Scientific American.*, 214:42–52
- 20 Levitt M., (2001) The birth of computational structural biology, *Nat. Struct. Biol.*, 8:392–393
- 21 Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S., Hay A.J. (2008) Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral Res.*, 81(2):132-140.
- 22 R.U. Kadama, I.A. Wilson. (2017) Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 114 (19):4848-4850
- 23 Faix J., (2006) Grosse R. Staying in shape with formins. *Dev. Cell.*,10:693–706
- 24 Bolanos-Garcia V. M., Chayen N. E. (2009) New directions in conventional methods of protein crystallization. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 101:1203–1210.
- 25 Chayen N. E., Saridakis E., Sear R. P. (2006) Experiment and theory for heterogeneous nucleation of protein crystals in a porous medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:597–601
- 26 Boyko K.M., Popov V.O., Kovalchuk M.V. (2015) Promising approaches to crystallization of macromolecules suppressing the convective mass transport to the growing crystal. *Russ. Chem. Rev.*, 84 (8):853-859.
- 27 Russo Krauss I. et al. (2013) An overview of biological macromolecule crystallization. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(6):11643–11691.
- 28 E.D. Burashev, A.U. Isabek, K.T. Sultankulova, N.T. (2019) Sandybaev Sozdanie vektornoj konstrukcii i bakterial'naja jekspressija pervoj subedinicy gemaggljutinina [Creation of a vector construct and bacterial expression of the first subunit of hemagglutinin] *Vestnik SemGU*, 3(87):204-208. [in Russian]
- 29 Hochuli E. Bannwarth E., Hochuli W., Dobeli H., Gentz R., Stuber D. (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent *Biotechnology*, 6:321–1325.
- 30 Wei C, Nurul T, Wahida AG, Shaharum S. (2014) Construction and heterologous expression of a truncated haemagglutinin (HA) protein from the avian influenza virus H5N1 in *Escherichia coli*. *Trop. Biomed.* 31:1–10.