

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-107

## РАЗРАБОТКА ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ХАСЕКИ, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ<sup>\*</sup>

### DEVELOPMENT OF A PLATFORM FOR PRODUCING RECOMBINANT PROTEINS OF THE HASEKI TICK VIRUS SUITABLE FOR STRUCTURAL RESEARCH

И. А. Осинкина, А. В. Гладышева

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

I.A. Osinkina, A.V. Gladysheva

*State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo*

✉ osinkinai\_ia@vector.nsc.ru

#### Аннотация

Изучение новых вирусов, одним из которых является вирус Хасеки, — важная часть системы противодействия вирусным угрозам. При этом рентгеноструктурный анализ (PCA), хотя и способен помочь в изучении неизвестных белков новых вирусов, требует особого подхода в их получении. В данном исследовании был разработан комплекс биотехнологических решений, позволяющий получить рекомбинантные белки вируса Хасеки, пригодные для проведения структурных исследований.

#### Abstract

The study of new viruses, one of which is the Haseki tick virus, is an important part of the system for preventing viral threats. However, X-ray crystallography, while useful for studying unknown proteins from new viruses, requires a specific approach for obtaining them. In this study, a set of biotechnological solutions was developed to produce recombinant Haseki virus proteins suitable for X-ray structural analysis.

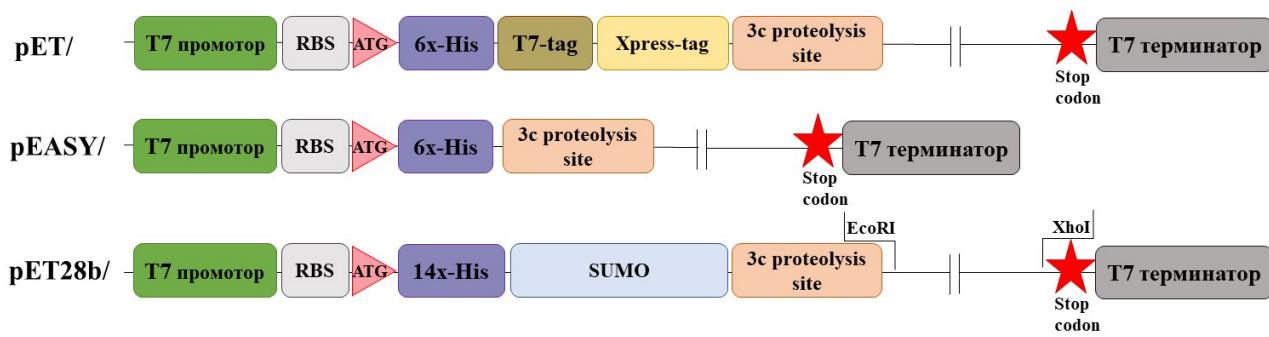
Изучение новых вирусов, потенциально патогенных для человека, — важный этап противодействия вирусным угрозам. Вирус Хасеки, отнесененный к семейству *Flaviviridae*, — недавно обнаруженный вирус с показанными случаями заражения людей. Строение его генома отличается от типичных представителей семейства, что затрудняет его изучение методами молекулярно-генетического анализа, в связи с чем до настоящего момента геном вируса оставался неаннотированным [1].

В ходе выполнения работы посредством построения скрытой марковской модели с помощью HMMER v3.1b2, а также моделирования с применением AlphaFold3 участков полипротеина вируса Хасеки были впервые обнаружены домены неструктурных белков: NS3 протеазы и геликазы (1598–1801 и 1802–2291 а. о.) и NS5 RdRp (3999–4709 а. о.), а также неизвестные высокоструктурированные домены SP1 и SP2 в позициях 1–173 и 672–831 а. о., предположительно связанные с белком Erns и гликопротеином оболочки. Однако все обнаруженные домены имеют уровень гомологии ниже 30 % с белками представителей семейства, что исключает возможность их точной идентификации [2].

PCA способен помочь в идентификации и изучении этих белков, однако требует их получения в нативной конформации, большой концентрации с чистотой более 95 %, что вызвало необходимость разработки технологической платформы для получения рекомбинантных белков вируса Хасеки, пригодных для структурных исследований.

ПЦР-сборкой с перекрытием были *de novo* собраны ДНК-копии последовательностей, кодирующих белки SP1 (474 н. п.), SP2 (450 н. п.), NS3 (2082 н. п.), NS3pro (612 н. п.) и NS3hel (1470 н. п.) вируса Хасеки. На их основе получены устойчивые генетические конструкции pJET1.2/SP1, -SP2, PUC19/SP1, -SP2, -NS3, -NS3pro и -NS3hel, для хранения ДНК-копий последовательностей белков. Путем переклонирования были созданы рекомбинантные плазмидные ДНК pET/SP1; 14x-His-Tev-SP1; pEASY/SP1, -SP2; pET28b/SP1, -SP2, -NS3pro, -NS3hel, предназначенные для продукции рекомбинантных химерных белков в системе *E. coli*. Конструкции содержат аффинную метку, метки для повышения растворимости и сайт протеолиза пикорнаином Зс риновируса A28, что обеспечивает возможность получения высокоочищенных белков, пригодных для структурных исследований (см. рисунок).

\* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2025-452 от 30.05.2025).



Мы использовали различные штаммы клеток *E. coli* — BL-21(DE3), KRX, HyperStable, LysTech и T7EvoPro — для сравнения эффективности наработки в них рекомбинантных белков вируса Хасеки. Были получены штаммы-продуценты BL/pET/SP1, KRX/pET/SP1, BL/pEASY/SP1, KRX/pEASY/SP1, HS/pEASY/SP1, BL/Tev-SP1, KRX/Tev-SP1, HS/Tev-SP1, T7Evo/Tev-SP1, LT/Tev-SP1, BL/pEASY/SP2, KRX/pEASY/SP2, HS/pEASY/SP2, BL/pET28b/SP2, KRX/pET28b/SP2, HS/pET28b/SP2, обеспечивающие синтез рекомбинантных химерных белков SP1 и SP2.

При культивировании штаммов BL/pET/SP1 и KRX/pET/SP1 в течение 20–22 ч при 20 °C и 180 об/мин с индукцией 1 мМ ИПТГ (+0,1 % L-рамнозы для штамма KRX/) наблюдался высокий уровень наработки рекомбинантного белка SP1 (26 кДа), в растворимой форме в периплазме бактериальных клеток. Удалось получить до 12,7 г биомассы клеток с 1 л культуры. При культивировании штаммов, содержащих конструкции на основе pEASY/ и pET28b/ в описанных ранее условиях, а также при варьировании температуры от 16 до 37 °C и концентрации ИПТГ от 0,1 до 2 мМ не наблюдалась наработка целевых белков; в штаммах, содержащих конструкции 14x-His-Tev-SP1, наработка белка происходила в тельцах включения, что неприменимо для работ по кристаллизации белка и проведении РСА.

Рекомбинантный белок SP1 был выделен из лизата клеток BL/pET/SP1 и KRX/pET/SP1 и очищен с помощью ионообменной (в градиенте pH) и эксклюзионной хроматографии. Чистота препарата белка составила < 95 % по SDS-PAGE с концентрацией 32 мг/мл. Соответствие требуемым параметрам подтверждается успешно проведенными экспериментами по измерению малоуглового рентгеновского рассеяния и динамического рассеяния света.

Таким образом, разработанная технологическая платформа позволяет получать рекомбинантные белки вируса Хасеки, пригодные для проведения структурных и функциональных исследований, что может в дальнейшем способствовать разработке вакцин и иммунобиологических препаратов.

### Литература

- Kartashov M. Y., Gladysheva A. V., Shvalov A. N. et al. Novel Flavi-like virus in ixodid ticks and patients in Russia // Tick Borne Diseases. 2023. No. 14 (2). P. 70.
- Gladysheva A. V., Osinkina I. A., Radchenko N. S. et al. Tertiary Structures of Haseki Tick Virus Nonstructural Proteins Are Similar to Those of Orthoflaviviruses // Int. J. Mol. Sci. 2024. No. 25 (24). P. 13654.