

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**Манухова Татьяна Ивановна**

**Вирус мозаики альтернантеры: вирионы,  
вирусоподобные и структурно модифицированные частицы,  
структура и свойства**

1.5.10 – Вирусология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Диссертация подготовлена на кафедре вирусологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

**Научный руководитель**

Карпова Ольга Вячеславовна, доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты**

Жердев Анатолий Виталиевич, доктор химических наук, ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН», ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиохимии отдела лиганд-рецепторных взаимодействий и биосенсорики

Замятнин Андрей Александрович, доктор биологических наук, доцент, Факультет биоинженерии и биоинформатики ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», исполняющий обязанности декана

Зиновкин Роман Алексеевич, кандидат биологических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, заведующий лабораторией электронного транспорта отдела молекулярной энергетики микроорганизмов

Защита диссертации состоится «6» июня 2024 г. в 16:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: mgu.03.01.dissovet@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале <https://dissovet.msu.ru/dissertation/2998>

Автореферат разослан «\_\_» апреля 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета, доктор  
биологических наук



Т.В. Комарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### *Актуальность темы исследования и степень ее разработанности*

Вирусы растений рода *Potexvirus* семейства *Alphaflexiviridae* имеют нитевидные вирионы, образованные единственным структурным белком оболочки (БО) и одноцепочечной геномной РНК положительной полярности (ICTV, релиз 2022). Вирионы потексвирусов представляют собой гибкие частицы со спиральной симметрией длиной 470-580 нм и диаметром ~13 нм (Atabekov *et al.*, 2007). В отличие от палочковидных вирусов растений получение данных о структуре нитевидных вирусов было ограничено техническими возможностями (Parker *et al.*, 2002). Лишь в последние годы были опубликованы работы, посвященные структурной биологии потексвирусов: вируса мозаики папайи (ВМП) (Yang *et al.*, 2012; Kendall *et al.*, 2013), вируса мозаики бамбука (DiMaio *et al.*, 2015), вируса мозаики пепино (Agirrezabala *et al.*, 2015), X вируса картофеля (ХВК) (Grinzato *et al.*, 2020), вируса мозаики нарцисса (ВМН) (Kendall *et al.*, 2013). Полученные структурные данные важны для понимания механизма сборки, взаимодействия субъединиц БО друг с другом и с РНК, а также позволяют находить возможные сайты модификации поверхности вирионов, что имеет ключевое значение для применения вирусов растений при создании медицинских биотехнологий (Yang *et al.*, 2012; Grinzato *et al.*, 2020).

В 1999 году в Австралии был выделен и описан новый потексвирус – вирус мозаики альтернантеры (ВМАльт) – близкий по нуклеотидной последовательности генома к ВМП (Geering and Thomas, 1999). В нашей работе был использован изолят ВМАльт – ВМАльт-MU (Moscow University), определенный на кафедре вирусологии МГУ имени М.В. Ломоносова (Ivanov *et al.*, 2011). Тогда же при изучении свойств БО ВМАльт было обнаружено, что он полимеризуется *in vitro* в отсутствие РНК при pH 4.0, а также при pH 8.0 с образованием вирусоподобных частиц (ВПЧ), морфологически сходных с нативными вирионами (Mukhamedzhanova *et al.*, 2011). В отличие от БО ВМАльт белок оболочки ВМП полимеризуется *in vitro* с образованием ВПЧ в отсутствие геномной РНК исключительно при pH 4.0 (Erickson *et al.*, 1976). В условиях, приближенных к физиологическим (pH 6-8), БО ВМП образует только олигомеры с коэффициентом седиментации до 25S (Erickson *et al.*, 1976). Помимо БО ВМАльт и ВМП, способность к сборке с образованием ВПЧ *in vitro* была описана для БО ВМН (Robinson *et al.*, 1975), но дальнейших исследований о свойствах и структуре этих частиц проведено не было. Также известно, что БО ХВК может образовывать однослойные и двухслойные диски, однако в отличие от БО ВМП и ВМАльт частиц, близких по длине к вирионам получено не было (Kaftanova *et al.*, 1975).

Исследования, посвященные структуре ВПЧ потексвирусов и ее сравнению со структурой вирионов, немногочисленны. Robinson с соавторами (1975) установили, что вирионы и ВПЧ ВМН имеют структурные отличия. Напротив, ВПЧ ВМП имеют сходные с вирионами параметры спирали согласно данным метода дифракции рентгеновских лучей. Помимо ВПЧ потексвирусов были получены и исследованы нуклеокапсид-подобные частицы (НПЧ), образованные БО и гетерологичной РНК. Tremblay с соавторами (2006) обнаружили структурные различия при сравнении НПЧ ВМП с нативными вирионами ВМП методами кругового дихроизма и частичного трипсинолиза. В 2021 году была опубликована работа, в рамках которой были получены НПЧ ВМАльт на основе рекомбинантного БО ВМАльт и реплицирующегося в растениях РНК-вектора на основе ХВК (Thuenemann *et al.*, 2021). С помощью криоэлектронной микроскопии с разрешением 3.3 Å были определены параметры спирали НПЧ ВМАльт (Thuenemann *et al.*, 2021). Однако эти данные следует рассматривать с осторожностью, т.к. НПЧ представляют собой искусственную систему, включающую гетерологичную РНК, свойства которой могут в значительной степени отличаться от нативных вирионов ВМАльт и ВПЧ, не содержащих РНК.

Ранее на примере вирусов со спиральным типом симметрии – палочковидных вирионов вируса табачной мозаики (ВТМ) (Atabekov *et al.*, 2011), вируса штриховатой мозаики ячменя, вируса мозаики долихоса (ВМД) (Трифонова *и др.*, 2017), а также нитевидных вирионов ХВК (Nikitin *et al.*, 2016) – была продемонстрирована возможность термической перестройки с образованием структурно модифицированных частиц (СЧ). Образование СЧ сопровождается изменениями структуры БО, а также деградацией геномной РНК. Условия структурного перехода, изученные пока лишь для ВТМ и ХВК, отличаются друг от друга, что, по-видимому, связано с различиями строения их вирионов. И СЧ ВТМ, и СЧ ХВК обладают высокими адсорбционными свойствами (Atabekov *et al.*, 2011; Dobrov *et al.*, 2014; Nikitin *et al.*, 2016). Перспективные результаты были получены при исследовании свойств и возможностей биотехнологического применения СЧ ВТМ. На данный момент на их основе в качестве платформы-адьюванта были разработаны вакцинные кандидаты против вируса краснухи, сибирской язвы и COVID-19 (Trifonova *et al.*, 2017; Granovskiy *et al.*, 2022). Кроме того, *in vitro* было продемонстрировано, что СЧ ВТМ могут быть использованы для таргетной доставки химиотерапевтических препаратов к клеткам рака молочной железы (Bruckman *et al.*, 2016). Помимо вирионов СЧ могут быть получены из различных форм БО ВТМ, в том числе ВПЧ, при нагревании до 65°C (Atabekov *et al.*, 2011), а также из ВПЧ ВМАльт при нагревании до 94°C (СЧ<sub>ВПЧ</sub>) (Трифонова *и др.*,

2017). Однако до настоящего времени получить СЧ из вирионов (СЧ<sub>вир</sub>) ВМАльт не удавалось (Трифорова и др., 2017).

Исследование и сравнительный анализ структуры морфологически сходных вирусных и вирусоподобных частиц ВМАльт обеспечивает не только новые знания о строении вирионов и ВПЧ, но и данные о роли РНК-белковых взаимодействий в морфологии и стабильности частиц. В свою очередь, получение СЧ<sub>вир</sub> ВМАльт и сравнение условий термической перестройки, необходимых для образования СЧ<sub>вир</sub>, с условиями образования СЧ<sub>ВПЧ</sub> и СЧ других вирусов, позволяет получить дополнительную информацию о структурных особенностях вирионов ВМАльт. Кроме того, исследование физико-химических свойств вирионов, ВПЧ, СЧ<sub>ВПЧ</sub> и СЧ<sub>вир</sub> (СЧ<sub>ВПЧ/вир</sub>) ВМАльт приводит к пониманию потенциала их практического применения.

### ***Цель и задачи исследования***

***Цель*** исследования заключалась в сравнении структуры и свойств вирионов и вирусоподобных частиц вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт), получении и характеристике структурно модифицированных частиц (СЧ) на их основе, а также в изучении потенциала их применения в биотехнологиях.

Для достижения цели были поставлены следующие ***задачи***:

1. Провести сравнительный анализ структуры вирионов и ВПЧ ВМАльт.
2. Получить и охарактеризовать структурно модифицированные частицы (СЧ) из вирионов (СЧ<sub>вир</sub>) и ВПЧ (СЧ<sub>ВПЧ</sub>) ВМАльт.
3. Исследовать процесс перехода вирионов и ВПЧ ВМАльт с образованием СЧ<sub>вир/ВПЧ</sub> и изменения в структуре белка оболочки в ходе перестройки.
4. Оценить прикладной потенциал вирионов, ВПЧ и СЧ<sub>вир/ВПЧ</sub> ВМАльт.

### ***Объект исследования***

Объектами исследования являются вирусные и вирусоподобные частицы ВМАльт, а также СЧ, формирующиеся в ходе термической перестройки вирионов и ВПЧ (СЧ<sub>вир/ВПЧ</sub>).

### ***Научная новизна***

В настоящей работе впервые получены данные о структуре вирионов и ВПЧ ВМАльт, а также построены их 3D-модели с разрешением 13 Å. Впервые выявлены структурные

отличия морфологически сходных вирионов и ВПЧ ВМАльт. Показаны различия диаметра частиц, диаметра центрального канала, а также разница в количестве субъединиц БО на виток спирали. Несмотря на сходство вторичной структуры БО в составе вирионов и ВПЧ и преобладании  $\alpha$ -спиральных участков, впервые было продемонстрировано, что укладка БО в составе ВПЧ отличается от укладки в вирионах, что приводит к различиям в репертуаре аминокислотных остатков БО, расположенных на поверхности частиц.

Впервые получены структурно модифицированные частицы из вирионов ВМАльт (СЧ<sub>вир</sub>). Показано, что условия их образования отличаются от условий получения СЧ из ВПЧ ВМАльт (СЧ<sub>ВПЧ</sub>) и условий получения СЧ из вирионов другого потексвируса – ХВК. Исследованы различия процесса термической перестройки вирионов и ВПЧ ВМАльт и установлено, что они согласуются с различиями структуры спирали вирионов и ВПЧ. Впервые проведено сравнение свойств СЧ, полученных из сходных морфологически и различных по структуре частиц – вирионов и ВПЧ ВМАльт. Исследованы изменения, происходящие во вторичной и третичной структуре БО, а также в составе экспонированных на поверхности аминокислотных остатков при перестройке вирионов и ВПЧ в СЧ<sub>вир/ВПЧ</sub>.

### ***Теоретическая и практическая значимость***

Получены новые знания о структуре вирусных и вирусоподобных частиц нитевидных вирусов растений. Сравнение свойств вирионов, содержащих РНК, и ВПЧ, состоящих только из БО, позволяют сделать выводы о влиянии РНК-белковых взаимодействий на стабильность и структуру образуемых частиц.

В рамках работы был оценен потенциал практического применения вирионов, ВПЧ и СЧ<sub>вир/ВПЧ</sub> ВМАльт в качестве основы для биотехнологических разработок. В частности, было установлено, что БО в составе ВПЧ ВМАльт может быть конъюгирован с рекомбинантным целевым белком массой 27 кДа, что позволяет получать химерные вирусоподобные частицы без существенных ограничений в размере добавляемого таргетного полипептида. Были продемонстрированы высокие адсорбционные свойства СЧ<sub>вир/ВПЧ</sub>, что указывает на возможность их применения как платформы для презентации целевых белков (антигенов) при разработке рекомбинантных вакцин. Также показано, что СЧ<sub>вир/ВПЧ</sub> потенциально могут быть использованы в качестве платформы для доставки лекарственных веществ в опухолевые клетки. Полученные результаты представляют научный интерес для специалистов в области вирусологии. Результаты, изложенные в диссертационной работе, могут быть использованы в образовательном процессе при чтении курсов лекций по вирусологии и структурной биологии в МГУ имени М.В. Ломоносова.

### ***Личный вклад автора***

Автор принимал непосредственное участие в работе с литературными данными, планировании и проведении экспериментальной части исследования, анализе и обработке полученных результатов. Автор внес вклад в подготовку научных публикаций по материалам диссертационной работы и представлял результаты исследований на конференциях. Автором написаны диссертация и автореферат к ней. Имена соавторов указаны в опубликованных работах. Участие соавторов отражено в тексте диссертации и автореферата. Вклад автора в представленную работу определяющий.

### ***Методология и методы исследования***

В исследовании были применены современные физико-химические методы, а также методы вирусологии, молекулярной биологии, биохимии, микроскопии, методы работы с культурами клеток, а также статистические подходы.

### ***Положения, выносимые на защиту***

1. Морфологически сходные вирионы и ВПЧ ВМАльт имеют структурные различия, которые влияют на их стабильность и состав аминокислотных остатков, экспонированных на поверхности белка оболочки в составе этих частиц.
2. Различия в структуре вирионов и ВПЧ ВМАльт влияют на условия их термической перестройки и образования на их основе структурно модифицированных частиц (СЧ<sub>вир</sub> и СЧ<sub>ВПЧ</sub>).
3. Условия образования СЧ<sub>вир</sub> ВМАльт отличаются от условий получения СЧ из других вирусов, что, по-видимому, связано с особенностями строения вирионов ВМАльт.
4. В процессе образования как СЧ<sub>вир</sub>, так и СЧ<sub>ВПЧ</sub> происходят значительные изменения в структуре белка оболочки.
5. СЧ<sub>вир/ВПЧ</sub> обладают адсорбционными свойствами и способны экспонировать на своей поверхности целевой антиген в отсутствии дополнительных фиксирующих агентов.
6. ВПЧ ВМАльт являются потенциальной платформой для конъюгации с таргетными молекулами.
7. СЧ<sub>вир/ВПЧ</sub> способны специфически сорбироваться на поверхности опухолевых клеток.

### ***Степень достоверности и апробация результатов***

Результаты были получены с применением актуальных методик и современного научного оборудования. Полученные в ходе работы данные были обработаны с привлечением методов статистического анализа. Результаты исследования опираются на результаты экспериментов, а также опубликованные в рецензируемых журналах литературные источники. По теме диссертационной работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в Диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.10 – Вирусология. Результаты диссертационной работы были представлены на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2017, 2019), на Конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (FEBS) (Краков, Польша, 6-11 июля 2019 г.); на Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 25-27 февраля 2019 г.); Международной конференции In Vitro Biology Meeting (виртуальная онлайн-конференция, 6-10 июня, 2020 г.)

### ***Структура и содержание работы***

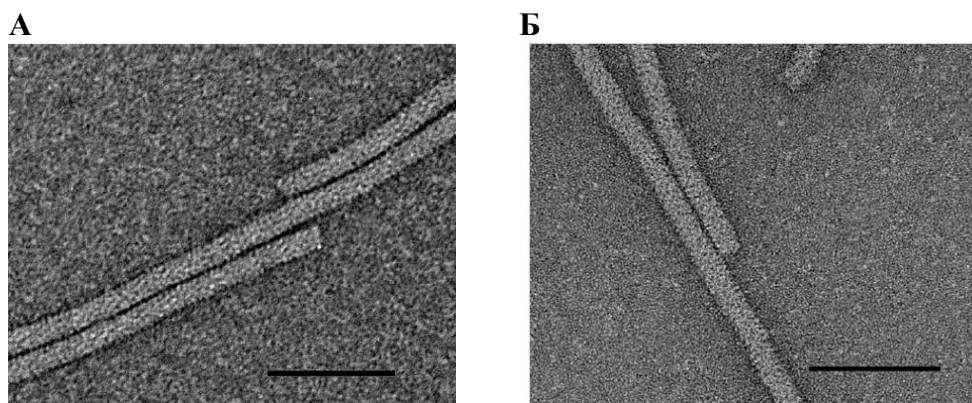
Диссертационная работа состоит из введения, трех разделов (Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 149 страницах. Содержит 8 таблиц, 34 рисунка и 1 приложение. Список цитируемой литературы включает 112 источников.



## РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

### 1. Структура вирионов и вирусоподобных частиц ВМАльт

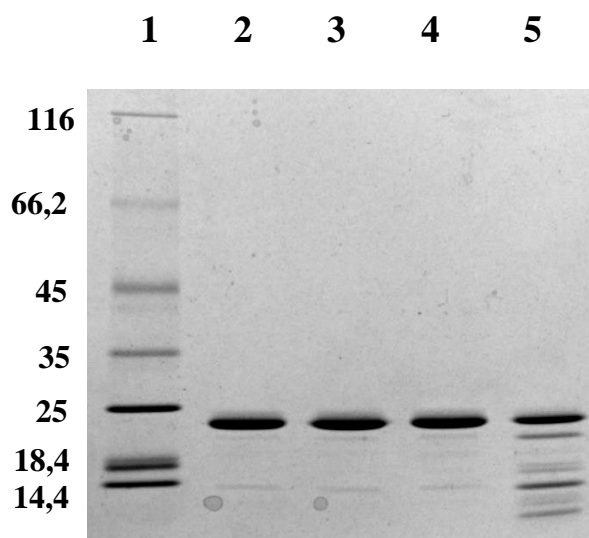
ВМАльт – представитель рода *Potexvirus* семейства *Alphaflexiviridae* (ICTV, релиз 2022). ВМАльт-MU – изолят, определенный на кафедре вирусологии МГУ имени М.В. Ломоносова. Геномная РНК ВМАльт-MU имеет длину 6606 нт и содержит 5 открытых рамок считывания, характерных для всех представителей рода *Potexvirus* (Ivanov *et al.*, 2011). Вирионы ВМАльт представляют собой частицы со спиральным типом симметрии, образованные белком оболочки (БО) и геномной РНК. Средняя длина вирионов составляет 570 нм, а диаметр – 13 нм. БО ВМАльт способен к самосборке *in vitro* в отсутствие РНК при pH 4.0 и 8.0 с образованием вирусоподобных частиц (ВПЧ) (**Рис. 1Б**), морфологически сходных с нативными вирионами ВМАльт (**Рис. 1А**) (Mukhamedzhanova *et al.*, 2011).



**Рис. 1. Микрофотографии вирионов и ВПЧ ВМАльт при pH 8.0.** А – вирионы ВМАльт, Б – ВПЧ ВМАльт. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), масштабная метка 100 нм.

Для сравнения структуры вирионов и ВПЧ ВМАльт были использованы подходы, позволяющие оценить различия в репертуаре аминокислотных остатков (а.о.) на поверхности БО в составе этих частиц. На первом этапе был применен трипсиновый тест, разработанный ранее в нашей лаборатории (Rodionova *et al.*, 2003). Этот подход основывается на том, что сайты гидролиза трипсина, содержащие а.о. лизина и аргинина, могут быть доступны для фермента, когда белок находится в свободном состоянии, или же экранированы от него, если белок уложен в спиральную структуру вирусного капсида. БО ВМАльт содержит 12 потенциальных сайтов гидролиза трипсина. По результатам трипсинолиза вирионов и ВПЧ ВМАльт (**Рис. 2**) фермент не гидролизует БО в составе вирионов (**Рис. 2, дорожки 2 и 3**). Напротив, обработка трипсином ВПЧ ВМАльт приводит к частичному протеолизу БО с образованием набора более коротких пептидов (**Рис. 2, дорожка 5**) по сравнению с необработанными ВПЧ (**Рис. 2, дорожка 4**). Следовательно,

репертуар аминокислотных остатков на поверхности БО ВМАльт изменяется в зависимости от того, в составе вирионов или ВПЧ находится БО.



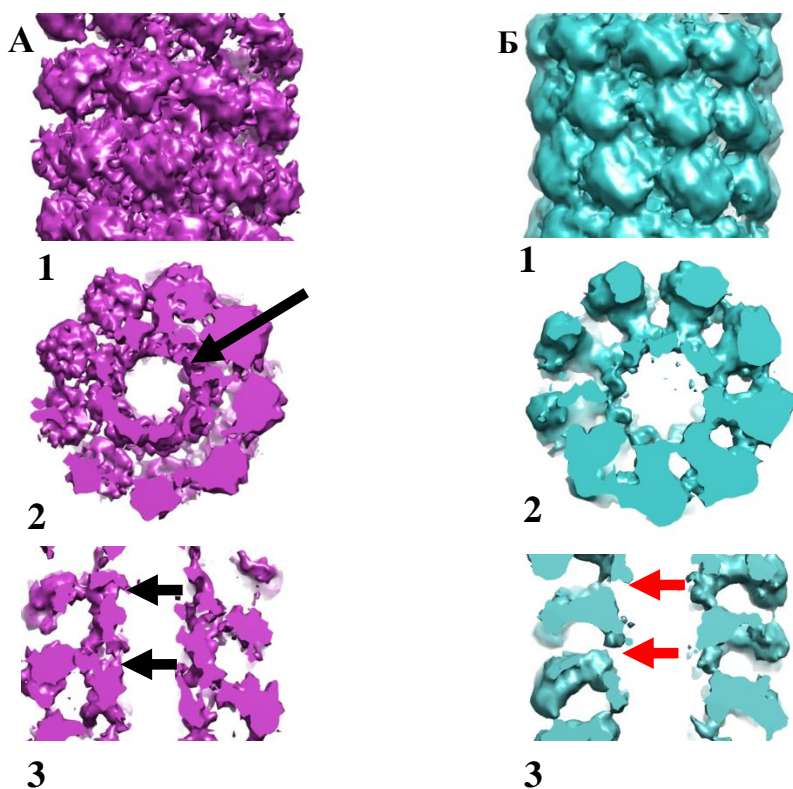
**Рис. 2.** Анализ структуры вирионов и ВПЧ ВМАльт методом трипсинового теста. 1 – маркеры молекулярной массы (кДа), 2 – вирионы ВМАльт, 3 – вирионы ВМАльт, обработанные трипсином 4 – ВПЧ ВМАльт 5 – ВПЧ ВМАльт, обработанные трипсином. Количество материала во всех пробах 2 мкг. Электрофорез в 8-20% ПААГ. Краситель – Кумасси бриллиантовый синий G-250.

Кроме того, различия в укладке БО в составе вирионов и ВПЧ были подтверждены путем сравнения эффективности мечения вирионов и ВПЧ по а.о. лизина и цистеина изотиоцианатом флуоресцеина и диацетатом флуоресцеин-малеимида. В обоих случаях более высокая интенсивность флуоресценции меченных ВПЧ по сравнению с вирионами указывала на то, что на поверхности БО в составе ВПЧ ВМАльт расположено большее, чем в вирионах, количество доступных для мечения остатков лизина и цистеина.

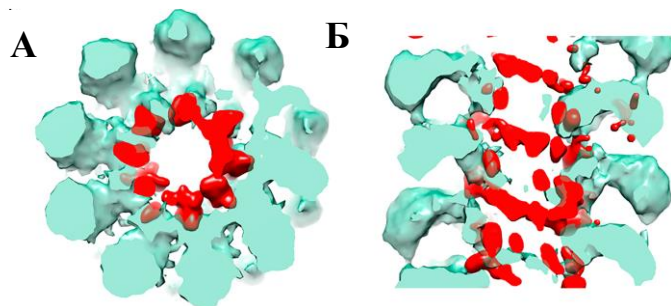
Окончательное подтверждение наличия структурных различий продемонстрировано с помощью метода криоэлектронной микроскопии, благодаря которому впервые были построены 3D-модели вирионов и ВПЧ ВМАльт с разрешением 13 Å. Согласно полученным результатам, диаметр вирионов ВМАльт составляет 135 Å, шаг спирали – 35,7 Å, количество субъединиц БО на виток – 8,75 (Табл. 1). Эти параметры структуры вириона ВМАльт согласуются с данными о структуре капсидов других представителей рода *Potexvirus*. По сравнению с вирионами ВПЧ ВМАльт имеют больший диаметр (152 Å) и при одинаковом шаге спирали (35,7 Å) содержат большее количество субъединиц БО на виток – 9,55. Центральный канал ВПЧ ВМАльт шире, чем у вирионов и составляет 30 Å (Табл. 1). Его стенки имеют выраженные промежутки, что можно объяснить отсутствием вирусной РНК (Рис. 3-3Б, красные стрелки). Для сопоставления структуры вирионов и ВПЧ ВМАльт была построена карта различий электронной плотности (the difference map) (Рис. 4). Отличия в плотности (выделены красным) соответствуют локализации вирусной РНК в составе вирионов.

**Таблица 1. Параметры вирионов и ВПЧ ВМАльт**

Параметры спирали	Вирионы	ВПЧ
Диаметр, Å	135	152
Шаг спирали, Å	35,7	35,7
Количество субъединиц БО на виток	8,75	9,55
Диаметр центрального канала, Å	20	30

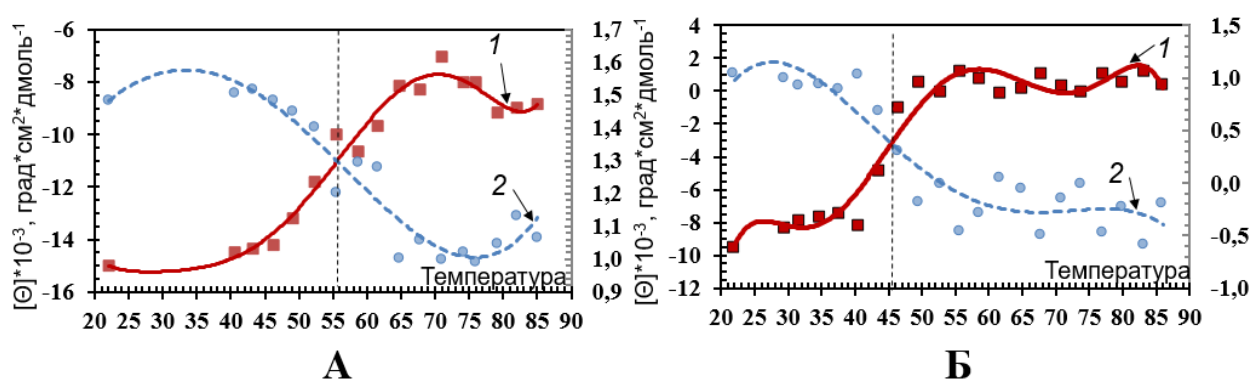


**Рис. 3. 3D модель структуры вирионов и ВПЧ ВМАльт. А – вирионы ВМАльт, Б – ВПЧ ВМАльт. 1. Структура поверхности, 2. Поперечный срез, 3. Сагиттальный срез. Черные стрелки указывают на локализацию РНК в вирионах, красные стрелки – на промежутки между субъединицами БО. Результаты получены совместно с к.б.н. Печниковой Е.В.**



**Рис. 4. Карта различий электронной плотности (the difference map) (выделены красным) между выровненными друг к другу картами электронной плотности вирионов и ВПЧ ВМАльт, наложенная на 3D структуру ВПЧ ВМАльт. А – поперечный срез, Б – сагиттальный срез. Результаты получены совместно с к.б.н. Печниковой Е.В.**

Помимо исследования структурных различий проведено сравнение стабильности белковой спирали вирионов и ВПЧ при их нагревании с отслеживанием изменений интенсивности отрицательных максимумов эллиптичности на 208 нм ( $[\theta]_{208}$ ) по спектрам кругового дихроизма (КД) (Рис. 5, кривые 1) и величин отношения эллиптичностей  $[\theta]_{208}/[\theta]_{218}$  (Рис. 5, кривые 2), характеризующих изменение содержания  $\alpha$ - и  $\beta$ -структур в белке. Согласно полученным данным, БО в составе ВПЧ денатурировал и агрегировал при нагревании в большей степени, что указывает, на меньшую упорядоченность БО в составе ВПЧ по сравнению с БО в составе вирионов. Плавление вирионов происходило при температуре  $T_{пл} \approx 57^\circ\text{C}$  (Рис. 5А), плавление ВПЧ при  $T_{пл} \approx 46^\circ\text{C}$  (Рис. 5Б). Увеличение стабильности БО в составе вирионов связано скорее всего со стабилизирующим РНК-белковым взаимодействием.



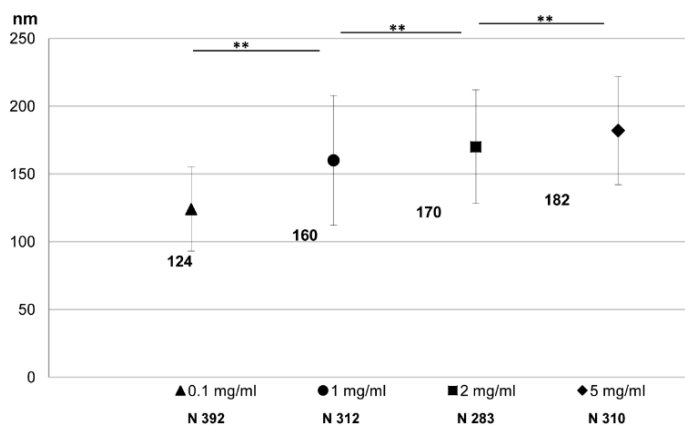
**Рис. 5. Термическая денатурация вирионов ВМАльт (А) и ВПЧ ВМАльт (Б) по данным КД-спектров.** Приведена температурная зависимость интенсивности отрицательных максимумов  $[\theta]_{208}$  при 208 нм (1) и величины отношения  $[\theta]_{208}/[\theta]_{218}$  (2).

## 2. Структурно модифицированные сферические частицы (СЧ), полученные из вирионов и ВПЧ ВМАльт при их термической перестройке

Ранее было показано, что условия образования структурно модифицированных частиц (СЧ) X вируса картофеля (ХВК) не подходят для образования СЧ из вирионов ВМАльт (Трифорова и др., 2017). В настоящей работе установлено, что для структурного перехода вирионов в СЧ (СЧ<sub>вир</sub>) ВМАльт строго необходимо присутствие в растворе NaCl. Таким образом, условия формирования СЧ<sub>вир</sub> (0.15 М NaCl) и СЧ<sub>ВПЧ</sub> (Milli-Q) отличаются, что скорее всего связано с различиями этих морфологически сходных частиц, а также с отсутствием РНК в составе ВПЧ. В то же время условия образования СЧ<sub>вир</sub> ВМАльт отличаются и от условий образования СЧ ХВК (Milli-Q), что также заставляет предположить наличие структурных различий между вирионами этих потексвирусов.

Исследована взаимосвязь между концентрацией исходного вирусного препарата и размерами образующихся СЧ<sub>вир</sub> ВМАльт. Повышение концентрации от 0.1 мкг/мкл до 1 мкг/мкл приводило к увеличению диаметра образуемых СЧ<sub>вир</sub> со  $124 \pm 31$  нм до  $160 \pm 48$  нм

(Рис. 6). Однако при последующем повышении концентрации исходного препарата вируса до 2 мкг/мкл и 5 мкг/мкл значительного увеличения размеров, как было описано ранее для СЧ ВТМ и СЧ вируса штриховатой мозаики долихоса (ВМД), не наблюдалось. Таким образом, диаметр СЧ<sub>вир</sub> ВМАльт аналогично СЧ ХВК и вируса штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ) практически не зависит от концентрации исходного вирусного препарата (Atabekov *et al.*, 2011; Nikitin *et al.*, 2016; Трифонова и др., 2017).

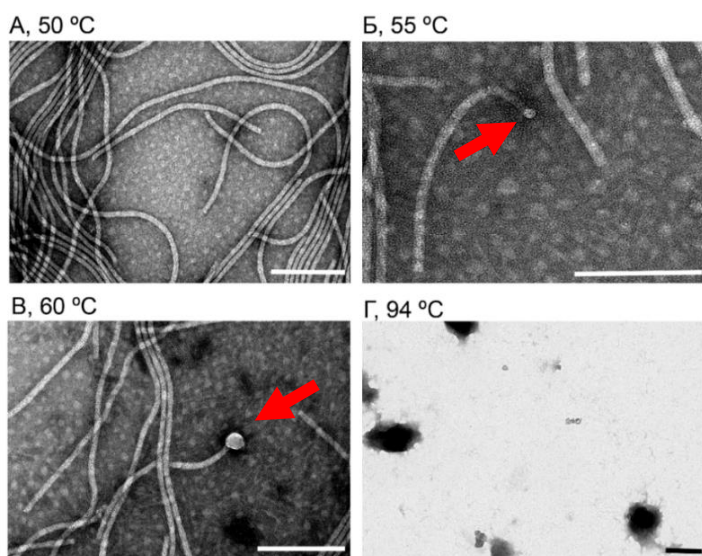


**Рис. 6. Средний диаметр СЧ<sub>вир</sub> ВМАльт, образованных из препаратов вируса с исходной концентрацией 0,1, 1, 2 и 5 мг/мл.** Сводные данные по четырем отдельным образцам СЧ<sub>вир</sub> для каждой из концентраций. Отрезки представляют собой стандартное отклонение. Статистические различия были проанализированы с использованием одностороннего ANOVA с использованием *post-hoc* Tukey HSD теста, \*\**p* < 0.01.

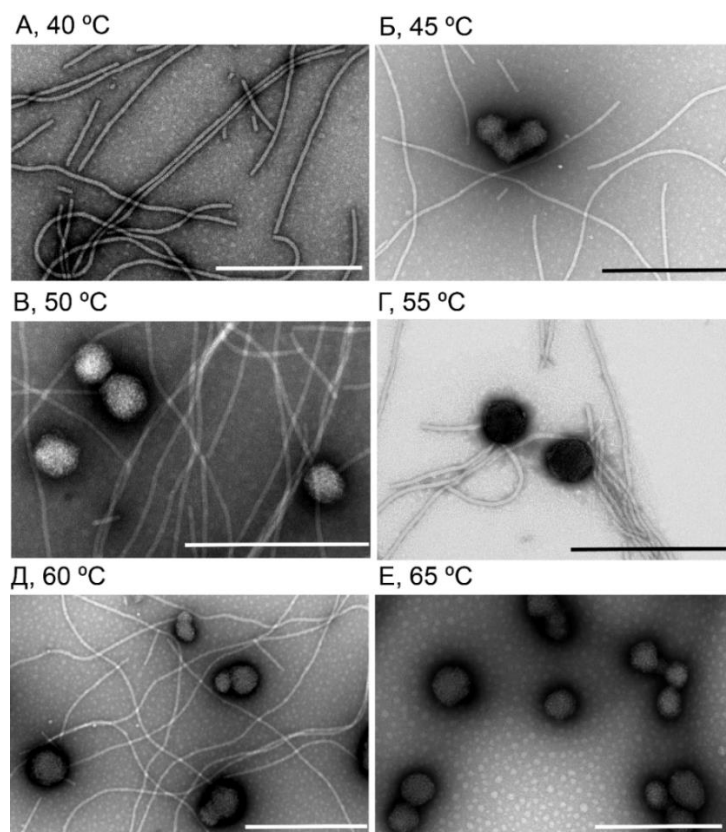
Проведено исследование стадий термического перехода вирионов ВМАльт. Согласно электронным микрофотографиям (Рис. 7), при нагревании от +50 °С до +55 °С происходит утолщение одного из торцов вириона (Рис. 7Б, указано стрелкой), что соответствует описанию промежуточных форм при термической перестройке ХВК, ВТМ, ВШМЯ, ВМД (Atabekov *et al.*, 2011; Nikitin *et al.*, 2016; Трифонова и др., 2017). При дальнейшем повышении температуры до 60°С наблюдается продолжение изменения морфологии торцов частиц (Рис. 7В, указано стрелкой), а при 94 °С происходит полное преобразование промежуточных форм в сферические частицы (Рис. 7Г). Температура структурного перехода двух гибких нитевидных вирусов, близких по морфологии (ХВК и ВМАльт) рода *Potexvirus*, различается. В отличие от ХВК интермедиаты термической перестройки ВМАльт формируются при более низкой температуре (55 °С, для ХВК – 70 °С) (Nikitin *et al.*, 2016), а полностью сформированные СЧ<sub>вир</sub> ВМАльт образуются только при нагревании до 94 °С, в то время как СЧ ХВК – при 90 °С (Nikitin *et al.*, 2016).

Анализ стадий структурной перестройки при формировании СЧ из ВПЧ ВМАльт (СЧ<sub>ВПЧ</sub>) показал, что переход ВПЧ в СЧ<sub>ВПЧ</sub> осуществляется последовательно, без образования промежуточных форм, аналогичных наблюдаемым при перестройке вирионов. Нагревание ВПЧ до 45 °С сопровождается формированием сферических частиц, но при этом в препарате сохраняются и немодифицированные ВПЧ (Рис. 8Б). При дальнейшем нагревании до 60 °С продолжают выявляться как ВПЧ, так и СЧ<sub>ВПЧ</sub> (Рис. 8В, Г, Д).

Нагревание до 65 °С сопровождается окончательным переходом всех ВПЧ в СЧ<sub>ВПЧ</sub> (Рис. 8Е).



**Рис. 7.** Стадии структурного перехода при образовании СЧ<sub>вир</sub> ВМАльт. А – вирионы ВМАльт, нагревание до 50 °С, Б – промежуточная форма, нагревание вирионов до 55 °С, В – промежуточная форма, нагревание вирионов до 60 °С, Г – сформированные СЧ<sub>вир</sub>, нагревание вирионов до 94 °С. Нагревание до указанной температуры проводили в течение 10 секунд. ПЭМ, контрастирование 2% уранилацетатом, масштабная метка 200 нм.



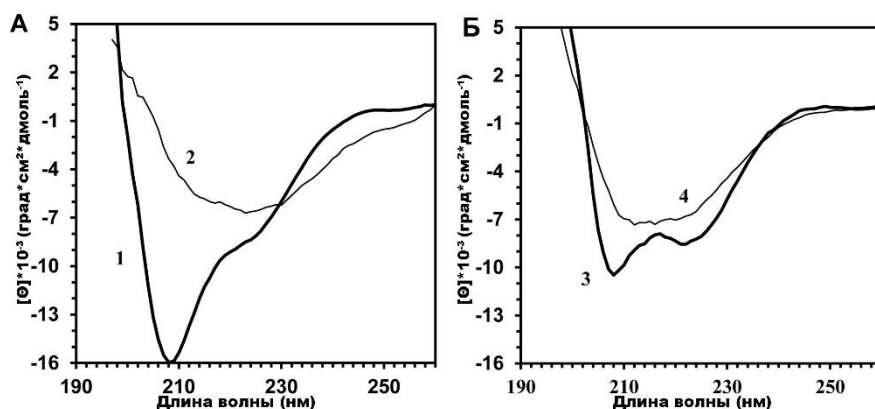
**Рис. 8.** Стадии структурного перехода при образовании СЧ<sub>ВПЧ</sub> ВМАльт А – ВПЧ ВМАльт при нагревании до 40 °С, Б, В, Г, Д – нагревание до 45 °С, 50 °С, 55 °С и 60 °С соответственно, Е – СЧ<sub>ВПЧ</sub> формируются при нагревании до 65 °С. Нагревание до указанной температуры проводили в течение 10 секунд. ПЭМ, контрастирование 2% уранилацетатом, масштабная метка 500 нм.



Различия в температуре структурного перехода  $СЧ_{ВПЧ}$  и  $СЧ_{вир}$ , по-видимому, напрямую связаны с отличиями в термической стабильности вирионов и ВПЧ по спектрам КД (Рис. 5). Более высокая термостабильность вирионов ВМАльт ( $T_{пл} \approx 57^\circ\text{C}$ ) коррелирует с более высокой температурой образования  $СЧ_{вир}$ , что в свою очередь связано со стабилизирующим влиянием РНК на структуру вирионов ВМАльт.

Проведено изучение биохимического состава  $СЧ_{вир}$  ВМАльт. Показано, что аналогично  $СЧ$  ВТМ и  $СЧ$  ХВК они образованы исключительно БО и не содержат вирусной РНК. Кроме того, также в ходе структурной перестройки при образовании  $СЧ_{вир}$  и  $СЧ_{ВПЧ}$  не происходит деградации полипептидных цепей БО.

С помощью метода кругового дихроизма проведен анализ изменения структуры БО при образовании  $СЧ$  ВМАльт. КД спектры  $СЧ_{вир}$  и  $СЧ_{ВПЧ}$  ВМАльт существенно отличаются от спектров вирионов и ВПЧ, для которых характерно присутствие выраженных отрицательных максимумов при 208 и 220 нм (Рис. 9А, Б, кривые 1, 3). Так, спектр  $СЧ_{вир}$  (Рис. 9А, кривая 2) и спектр  $СЧ_{ВПЧ}$  (Рис. 9Б, кривая 4) характеризуются гораздо более широкими и пологими минимумами в этой области по сравнению с исходными частицами. Кроме того, КД-спектры  $СЧ_{вир}$  и  $СЧ_{ВПЧ}$  лишены дополнительного плеча в области 215 нм. Снижение интенсивности пика при 208 нм для обоих типов  $СЧ$  указывает на снижение доли альфа-спиральных фрагментов в этих частицах (Homer&Goodman, 1975).



**Рис. 9. Спектры кругового дихроизма вирионов, ВПЧ,  $СЧ_{вир}$ ,  $СЧ_{ВПЧ}$ , ВМАльт в дальнем УФ. А – вирионы (1) и  $СЧ_{вир}$  (2); Б – ВПЧ (3) и  $СЧ_{ВПЧ}$  (4). Исходная концентрация вируса и ВПЧ 1 мг/мл. Измерения были проведены в воде Milli-Q при  $25^\circ\text{C}$ .**

Предсказание состава вторичной структуры БО в составе  $СЧ_{вир}$  и  $СЧ_{ВПЧ}$  с помощью программы K2D3 указывает на то, что при образовании  $СЧ_{ВПЧ}$  происходит уменьшение содержания  $\alpha$ -спиралей и увеличение доли  $\beta$ -структур по сравнению с БО в составе ВПЧ (Табл. 2). Аналогичные изменения были обнаружены и во вторичной структуры БО при образовании  $СЧ_{вир}$  из вирионов (Табл. 2).

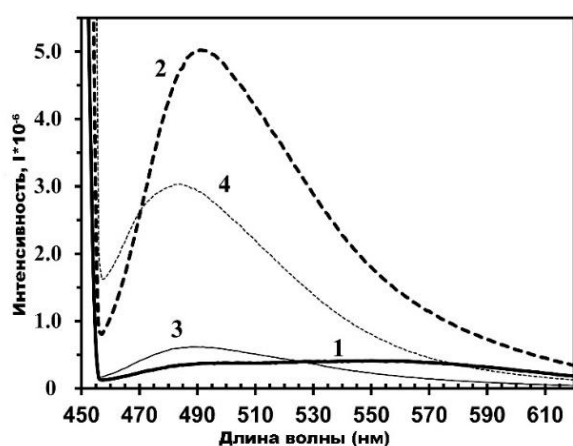
**Таблица 2. Сравнение вторичной структуры БО в составе ВПЧ, СЧ<sub>вир</sub>, СЧ<sub>ВПЧ</sub> ВМАльт по данным КД.**

Элементы вторичной структуры	$\alpha$ -спирали, %	$\beta$ -слои, %	Неструктурированные участки, %
ВПЧ	22	27*	51
СЧ <sub>ВПЧ</sub>	10 $\pm$ 3**	35 $\pm$ 1	54 $\pm$ 2
СЧ <sub>вир</sub>	3 $\pm$ 1	42 $\pm$ 1	55 $\pm$ 1

\* Высокая доля  $\beta$ -слоев обусловлена искажениями метода при измерении полимерных форм БО.

\*\*Значения для СЧ<sub>вир</sub> и СЧ<sub>ВПЧ</sub> выражены как среднее  $\pm$  SEM двух повторностей.

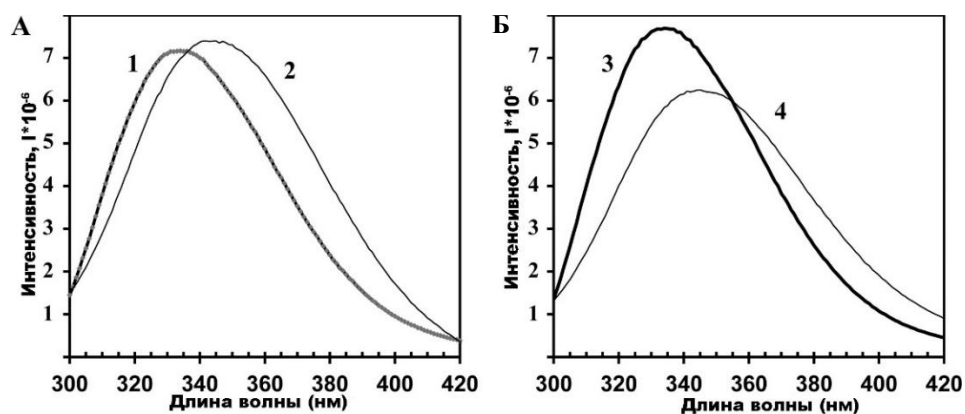
Для оценки возможности формирования кросс- $\beta$ -структур при образовании СЧ<sub>вир</sub> и СЧ<sub>ВПЧ</sub> был проведен тест на интенсивность флуоресценции тиофлавина Т. Спектры флуоресценции тиофлавина при взаимодействии с обоими типами СЧ характеризуются значительно более высокими максимумами в области 490 нм (Рис. 10, кривые 2, 4) по сравнению со спектрами вирионов и ВПЧ (Рис. 10, кривые 1, 3), что свидетельствует о присутствии кросс- $\beta$ -структур в СЧ<sub>вир</sub> и СЧ<sub>ВПЧ</sub>.



**Рис. 10. Спектр флуоресценции тиофлавина при взаимодействии с вирионами ВМАльт (1), ВПЧ (3), СЧ<sub>вир</sub> (2) и СЧ<sub>ВПЧ</sub> (4). Исходная концентрация частиц 1 мг/мл. Измерения были проведены в воде Milli-Q при 25°C.**

Проведено сравнение третичной структуры БО в СЧ<sub>вир</sub> и СЧ<sub>ВПЧ</sub> со структурой БО в исходных частицах. Для этого были получены спектры собственной флуоресценции в области 300–400 нм для каждого препарата. Согласно полученным данным, для СЧ<sub>ВПЧ</sub> (Рис. 11А, кривая 2) и СЧ<sub>вир</sub> (Рис. 11Б, кривая 4) характерно смещение максимума флуоресценции с 334 $\pm$ 2 нм к 344 $\pm$ 2 нм по сравнению со спектрами ВПЧ (Рис. 11А, кривая 1) и вирионов (Рис. 11Б, кривая 3). Смещение максимума флуоресценции при образовании СЧ указывает на переход а.о. триптофана и тирозина в более гидрофильное окружение.





**Рис. 11. Спектры собственной флуоресценции А – ВПЧ ВМАльт (1) и СЧ<sub>ВПЧ</sub> (2); Б – вирионов ВМАльт (3) и СЧ<sub>вир</sub> (4). Измерения были проведены в воде Milli-Q при 25°C.**

На основании полученных результатов можно утверждать, что образование СЧ ВМАльт как из ВПЧ, так и из вирионов сопровождается изменениями как вторичной, так и третичной структуры БО, что выражается в снижении доли  $\alpha$ -спиралей, увеличении доли  $\beta$ -слоев, формировании кросс- $\beta$ -структур и изменении состава окружения ароматических аминокислот.

Изменения вторичной и третичной структур БО, обнаруженные при термической перестройке, приводят к изменениям состава аминокислотных остатков на поверхности БО в составе СЧ по сравнению с исходными частицами. Это было продемонстрировано в экспериментах по связыванию СЧ<sub>вир</sub> с FITC и диацетатом флуоресцеин-малеимида. В то время как вирионы ВМАльт практически не связываются ни с одним из используемых агентов, что указывает на минимальное содержание а.о. лизина и цистеина на их поверхности, СЧ<sub>вир</sub> взаимодействуют с обоими метками. Таким образом, ранее не доступные для взаимодействия с FITC в составе вирионов а.о. лизина при образовании СЧ экспонируются на поверхности.

### **3. Потенциал прикладного применения вирионов, ВПЧ и СЧ ВМАльт**

Вирусы растений представляют собой перспективный объект для разработок в области биотехнологии и медицины. Они могут успешно применяться в качестве платформ для презентации антигенов или адъювантов в производстве вакцин (Nikitin *et al.*, 2016b; Venkataraman *et al.*, 2021), а также в области таргетной доставки лекарственных препаратов, в особенности к опухолевым клеткам пациентов (Chung *et al.*, 2020). Помимо терапевтического использования вирусы растений получают применения в области молекулярного контрастирования для визуализации биологических процессов *in vivo* (Steinmetz, 2010). В связи с этим проведено исследование потенциала применения вирионов, ВПЧ и СЧ ВМАльт при решении биотехнологических и медицинских задач.

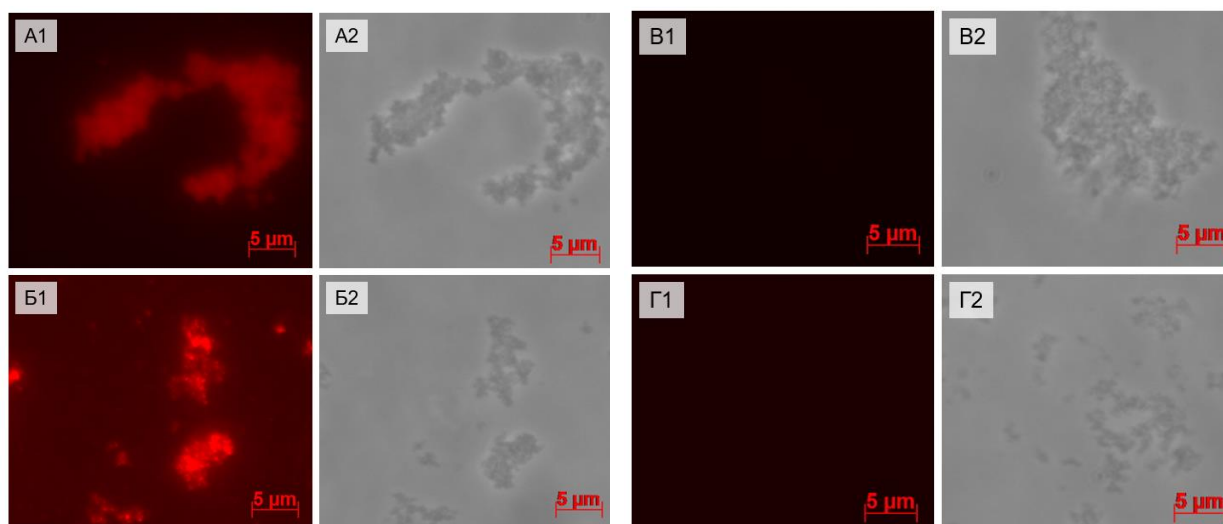
В первую очередь была проведена оценка стабильности вирионов и ВПЧ в условиях, приближенных к физиологическим. Продемонстрировано, что вирионы и ВПЧ сохраняют свою морфологию, размеры и агрегационное состояние независимо от условий инкубации, в том числе в сыворотке крови лабораторных животных. Это важно для успешного применения вирусных и вирусоподобных частиц при разработке вакцинных препаратов. Кроме того, показано, что вирионы, ВПЧ и СЧ ВМАльт могут быть лиофилизированы и в последующем перерастворены без изменения свойств частиц, что позволяет использовать лиофилизацию для их хранения и транспортировки, а также упрощает задачу концентрирования препаратов.

Для успешного использования вирионов, ВПЧ и СЧ ВМАльт важно иметь возможность получать значительные количества вируса из зараженных растений. Модифицирован протокол выделения ВМАльт из растений: была добавлена стадия повторного осаждения вируса ПЭГ, введены дополнительные стадии экстракции вируса и увеличена их продолжительность, а также увеличена длительность заключительного этапа высокоскоростного центрифугирования. В результате были получены следующие значения выхода ВМАльт:

✓ 57,3 мг вируса/100 г зеленого материала при накоплении и выделении ВМАльт на растениях табака (*Nicotiana benthamiana*), что в 6 раз превышает выходы Hammond с соавторами (2006);

✓ 20 мг вируса/100 г зеленого материала при накоплении и выделении ВМАльт на растениях портулака (*Portulaca grandiflora*), что в 6 раз превышает выходы Mukhamedzhanova с соавторами (2011).

Адсорбционные свойства СЧ обеспечивают возможность их применения в качестве платформы для презентации целевых белков, в том числе антигенов. Ранее было показано, что СЧ ВТМ с адсорбированным на поверхности рекомбинантным антигеном вируса краснухи активируют гуморальный иммунитет против этого заболевания (Trifonova *et al.*, 2017). Для исследования адсорбционных свойств СЧ<sub>ВПЧ</sub> и СЧ<sub>вир</sub> ВМАльт были получены комплексы СЧ с модельным антигеном (рекомбинантный белок ТМ2е, содержащий повторяющиеся последовательности высоко консервативного М2е-эпитопа структурного белка М2 вируса гриппа А,  $M_r=24$  кДа). Формирование комплексов СЧ<sub>вир</sub>-ТМ2е и СЧ<sub>ВПЧ</sub>-ТМ2е за счет нековалентных взаимодействий и сохранение антигенной специфичности белка в составе комплексов подтверждено методом иммунофлуоресцентной микроскопии с использованием полученной нами сыворотки к ТМ2е (**Рис. 12**).

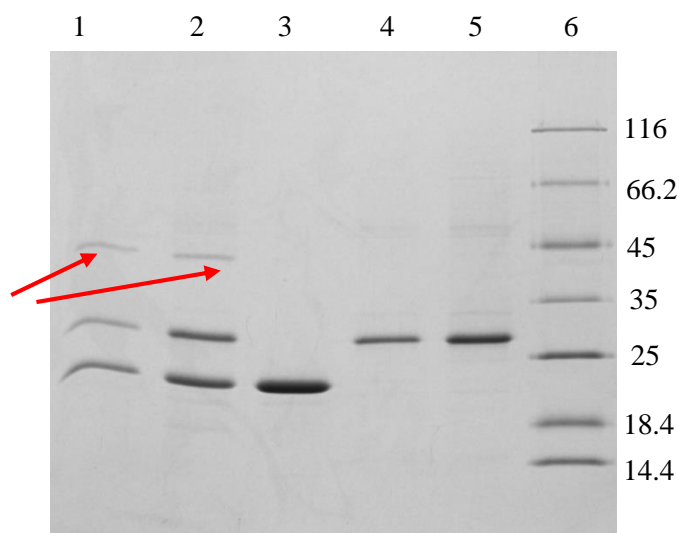


**Рис. 12.** Иммунофлуоресцентная микроскопия комплексов СЧ ВМАльт с адсорбированным на поверхности рекомбинантным белком ТМ2е. **А** – комплексы с СЧ<sub>вир</sub>-ТМ2е, **Б** – комплексы с СЧ<sub>ВПЧ</sub>-ТМ2е. Комплексы обработаны первичными антителами к ТМ2е и вторичными антивидовыми антителами, конъюгированными с флуорофором Alexa 546. **В** – негативный контроль: комплексы с СЧ<sub>вир</sub>-ТМ2е, без добавления первичных антител, **Г** – негативный контроль: комплексы с СЧ<sub>ВПЧ</sub>-ТМ2е, без добавления первичных антител. Иммунофлуоресцентная микроскопия в режиме флуоресценции (1) и фазового контраста (2).

В отличие от адсорбции, основанной на нековалентных взаимодействиях, конъюгация позволяет осуществлять направленное специфическое связывание платформы с молекулами интереса, например, активными компонентами лекарственных препаратов, контрастирующими веществами и др. Конъюгация используется для присоединения крупных целевых белков к поверхности носителя, что выгодно отличает этот подход от генно-инженерного решения, при котором для успешной сборки белка с образованием ВПЧ размер добавляемого пептида должен составлять не более 30 аминокислот (Chatterji *et al.*, 2004).

Продemonстрированное в рамках данной работы наличие на поверхности ВПЧ, СЧ<sub>вир</sub> и СЧ<sub>ВПЧ</sub> доступных для мечения а.о. лизина и цистеина указывает на потенциал применения этих частиц для биоконъюгации. Для проверки этой гипотезы была проведена химическая конъюгация по аминокруппам лизина БО ВМАльт в составе ВПЧ, СЧ<sub>вир</sub> и СЧ<sub>ВПЧ</sub> ВМАльт с модельным рекомбинантным белком Со1 ( $M_r=27$ кДа). Со1 представляет собой полипептид на основе рецептор-связывающего домена домена белка S (319–541 а.о.) коронавируса SARS-CoV-2, который был предложен в качестве антигена для разработки вакцины коллективом нашей лаборатории. В соответствии с данными электрофоретического анализа (Рис. 13) между БО ВМАльт в составе ВПЧ и рекомбинантным белком Со1 прошла успешная конъюгация с образованием продукта с молекулярной массой  $\sim 49$  кДа.

Экспериментальное значение молекулярной массы продукта конъюгации соответствует ожидаемому, являющемуся суммой молекулярных масс БО ВМАльт (22кДа) и Со1. Полученные результаты подтверждают потенциал применения ВПЧ ВМАльт для биоконъюгации по а.о. лизина.

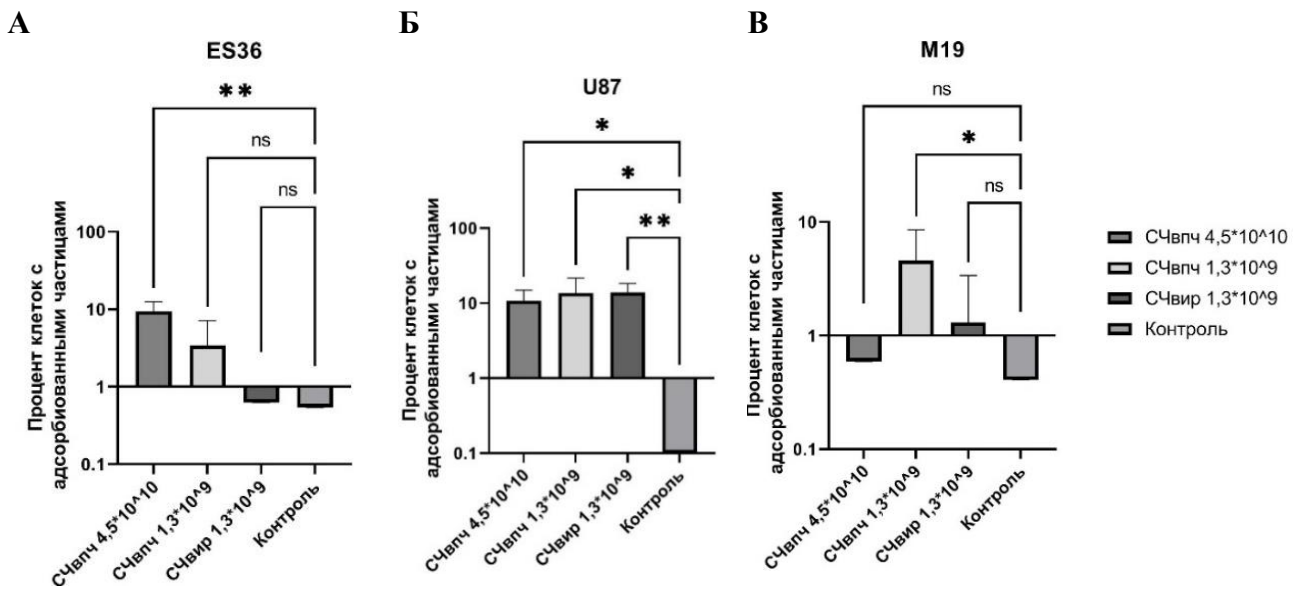


**Рис. 13. Анализ результатов конъюгации рекомбинантного белка Со1 с ВПЧ ВМАльт.** 1 – конъюгат ВПЧ+ Со1 1 мкл смеси, содержащей 1 мкг исходных белков, 2 – конъюгат ВПЧ+ Со1 2 мкл смеси, содержащей 1 мкг исходных белков, 3 – ВПЧ ВМАльт 3 мкг, 4, 5 – рекомбинантный белок Со1 ( $M_r=27$ кДа) 1 и 2 мкг соответственно, 6 – маркеры молекулярной массы (кДа). Электрофорез в 8-20% ПААГ. Краситель – Кумасси бриллиантовый синий G-250

Ранее на примере СЧ ВТМ была продемонстрирована возможность конъюгации с доксорубицином, а также таргетная доставка доксорубицина к клеткам культуры рака молочной железы (Bruckman *et al.*, 2016). Доксорубицин, конъюгированный с СЧ ВТМ, сохраняет противоопухолевую активность в экспериментах *in vitro*, что позволяет рассматривать конъюгаты с СЧ ВТМ как основу для разработки эффективных наночастиц для лекарственных препаратов. В связи с наличием доступных для конъюгации аминокислотных остатков на поверхности СЧ ВМАльт и успешными данными на СЧ ВТМ, были проведены предварительные исследования потенциала СЧ ВМАльт в качестве носителей лекарственных препаратов для доставки в опухолевые клетки. Оценка возможности адсорбции и захвата конъюгированных с FITC СЧ<sub>вир</sub> и СЧ<sub>ВПЧ</sub> ВМАльт была проведена в сотрудничестве с группой экспериментальной биотерапии и диагностики отдела современных биоматериалов Института регенеративной медицины первого МГМУ имени И.М. Сеченова.

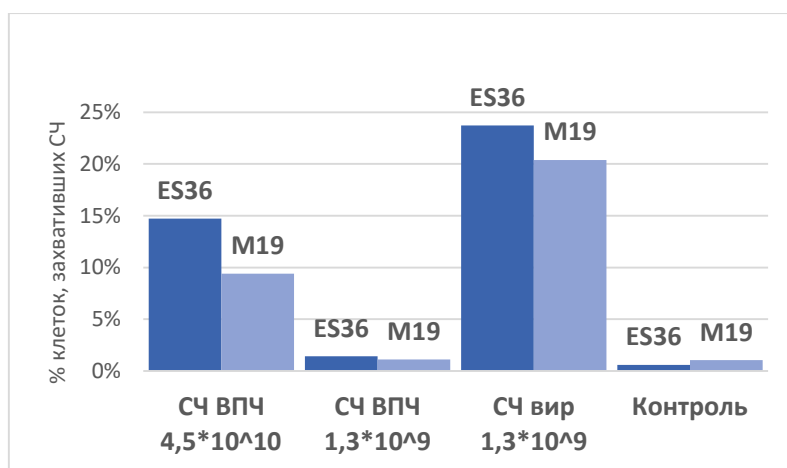
Для адсорбции использовали СЧ<sub>вир</sub> и СЧ<sub>ВПЧ</sub> в двух различных концентрациях ( $4.5 \cdot 10^{10}$  и  $1.3 \cdot 10^9$  частиц/лунка) и СЧ<sub>вир</sub> ( $1.3 \cdot 10^9$  частиц/лунка), которые инкубировали с клетками линий ES36 (саркома Юинга), U87 (глиобластома человека) и M19 (фибробласты человека). По данным флуоресцентной микроскопии СЧ<sub>ВПЧ</sub> в обеих концентрациях, а также СЧ<sub>вир</sub> адсорбируются на поверхности клеток глиобластомы человека (Рис. 14Б). При этом на

клетках саркомы Юинга линии ES36 видно, что СЧ<sub>ВПЧ</sub> в большей концентрации ( $4.5 \cdot 10^{10}$  частиц/лунка) эффективнее адсорбируются на поверхности клеток, чем СЧ<sub>ВПЧ</sub> в низкой концентрации ( $1.3 \cdot 10^9$  частиц/лунка) (Рис. 14А). Важно, что в то же время уровень адсорбции СЧ<sub>ВПЧ</sub> ( $4.5 \cdot 10^{10}$  частиц/лунка) и СЧ<sub>Вир</sub> на фибробластах не имеет значимых различий со значениями для контроля (клетки без добавления СЧ) (Рис. 14В), т.е. СЧ<sub>Вир</sub> и СЧ<sub>ВПЧ</sub> в концентрации  $4.5 \cdot 10^{10}$  частиц/лунка избирательно адсорбируются на разных линиях опухолевых клеток.



**Рис. 14.** Эффективность адсорбции СЧ<sub>Вир</sub> и СЧ<sub>ВПЧ</sub> ВМАльт на клетках саркомы Юинга (ES36) (А), глиобластомы человека (U87) (Б), фибробластах человека (M19) (В) при инкубации в течение 1 часа при +4°C. Контроль – клетки без добавления частиц. Статистические различия были проанализированы с использованием одностороннего ANOVA с использованием *post-hoc* Tukey HSD теста, \* $p < 0.05$ . Результаты были получены совместно с Д.Р. Файзуллиной.

Проведены предварительные исследования возможности проникновения СЧ ВМАльт в клетки первичной короткоживущей культуры саркомы Юинга (линия ES36). Согласно данным проточной цитофлуорометрии, проникновение СЧ<sub>ВПЧ</sub> в концентрации  $4.5 \cdot 10^{10}$  частиц/лунка и СЧ<sub>Вир</sub> в концентрации  $1.3 \cdot 10^9$  частиц/лунка в клетки линии ES36 выше значений для контроля (Рис. 15). Сравнение количества клеток, захвативших СЧ<sub>ВПЧ</sub>, показывает, что повышение концентрации частиц приводит к увеличению числа таких клеток (Рис. 15), аналогично результатам адсорбции на ES36 (Рис. 14). Кроме того, полученные предварительные данные указывают на то, что захват СЧ клетками линии саркомы Юинга выше, чем фибробластами.



**Рис. 15.** Уровень проникновения СЧ<sub>вир</sub> и СЧ<sub>ВПЧ</sub> ВМАльт в клетки саркомы Юинга (ES36) и фибробласты человека (M19). Результаты были получены совместно с Д.Р. Файзуллиной.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследованы различия в структуре морфологически сходных вирионов и вирусоподобных частиц (ВПЧ) вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт). Впервые для нитевидных вирусов растений показано, что укладка белка оболочки (БО) в составе ВПЧ отличается от укладки в составе вириона, что приводит к различиям в репертуаре аминокислотных остатков на поверхности БО. Кроме того, по данным криоэлектронной микроскопии вирионы и ВПЧ ВМАльт имеют различные параметры спирали, отличаются по диаметру частиц, диаметру центрального канала, количеству субъединиц БО на виток спирали. Разница в структуре спиральной оболочки также была подтверждена спектрами кругового дихроизма при термической денатурации – температура плавления ВПЧ ниже температуры плавления вирионов. Тем не менее, вирионы и ВПЧ ВМАльт имеют сходные спектры кругового дихроизма, демонстрирующие преобладание альфа-спиральных участков в молекуле БО.

Впервые получены структурно модифицированные частицы (СЧ) из вирионов ВМАльт (СЧ<sub>вир</sub>), условия формирования которых отличаются от условий образования СЧ из ВПЧ ВМАльт (СЧ<sub>ВПЧ</sub>). Также показано, что концентрация исходного препарата не влияет на размер образующихся частиц (СЧ<sub>ВПЧ</sub> и СЧ<sub>вир</sub>). Продемонстрированы различия в процессе структурного перехода при образовании СЧ<sub>вир</sub> и СЧ<sub>ВПЧ</sub>. Образование СЧ<sub>вир</sub> происходит дискретно через промежуточную форму (интермедиат) и требует нагревания до 94°C, в то время как переход ВПЧ в СЧ<sub>ВПЧ</sub> происходит постепенно при нагревании от 45 до 60 °C включительно. СЧ<sub>вир</sub> не содержат вирусную РНК и образованы, как и СЧ<sub>ВПЧ</sub> исключительно из БО, полипептидная цепь которого не деградирует при термическом

переходе. Однако, при образовании СЧ происходит изменение вторичной и третичной структуры БО. Показано, что увеличивается содержание  $\beta$ -слоев, формируются кросс- $\beta$ -структуры и одновременно снижается доля  $\alpha$ -спиральных участков. Также происходит переход а.о. триптофана и тирозина в более гидрофильное окружение. Репертуар аминокислотных остатков, экспонированных на поверхности БО в составе вирионов, также меняется при осуществлении структурного перехода. На примере СЧ<sub>вир</sub> и вирионов ВМАльт показано, что ранее недоступные для взаимодействия с флуоресцентными красителями а.о. лизина/цистеина БО в составе вирионов при образовании СЧ<sub>вир</sub> экспонируются на поверхности.

Продемонстрирована стабильность вирионов и ВПЧ ВМАльт в широком диапазоне условий, в том числе в физиологических условиях. Доказана стабильность вирионов, ВПЧ и СЧ ВМАльт при лиофилизации, что позволяет использовать эти частицы при разработке биомедицинских технологий. Для потенциального практического применения ВМАльт была усовершенствована методика выделения и очистки вируса. Предложенная модификация протокола позволила достичь увеличения выхода чистого вирусного препарата в 6 раз (57,3 мг вируса/100 г зеленого материала). Впервые показаны адсорбционные свойства СЧ<sub>вир</sub>/ВПЧ ВМАльт и сохранение антигенной специфичности модельного антигена (целевого белка) в составе комплекса с СЧ. Кроме того, продемонстрирована возможность биоконъюгации целевого рекомбинантного белка с БО в составе ВПЧ ВМАльт по а.о. лизина. Установлено, что СЧ<sub>вир</sub>/ВПЧ ВМАльт могут специфически адсорбироваться на поверхности различных линий опухолевых клеток и могут потенциально захватываться ими. В связи с этими данными можно утверждать, что вирионы, вирусоподобные и структурно модифицированные частицы ВМАльт могут стать инструментом для созданий современных биотехнологий.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые для нитевидных вирусов на примере ВМАльт продемонстрированы структурные различия морфологически сходных вирионов и ВПЧ – отличия в диаметрах частиц и центрального канала, а также в плотности укладки субъединиц белка оболочки.
2. Впервые путем термической перестройки созданы структурно модифицированные частицы (СЧ) из вирионов ВМАльт (СЧ<sub>вир</sub>).
3. Выявлены различия в условиях образования СЧ<sub>вир</sub> и СЧ<sub>ВПЧ</sub> (СЧ на основе ВПЧ ВМАльт). Образование СЧ<sub>вир</sub> происходит через переходные формы, в то время как СЧ<sub>ВПЧ</sub> формируются при более низкой температуре при отсутствии переходных форм.
4. При формировании СЧ из вирионов и ВПЧ ВМАльт происходят изменения во вторичной структуре БО: увеличивается содержание  $\beta$ -структур и снижается содержание  $\alpha$ -спиралей.
5. СЧ<sub>вир/ВПЧ</sub> ВМАльт обладают адсорбционными свойствами, вирионы, ВПЧ и СЧ<sub>вир/ВПЧ</sub> ВМАльт стабильны в различных условиях, в том числе и в физиологических.
6. Созданы конъюгаты ВПЧ ВМАльт с модельным белком.
7. Получены предварительные данные о возможности адсорбции и проникновения СЧ<sub>вир/ВПЧ</sub> ВМАльт в опухолевые клетки различных линий.



## Список публикаций по теме диссертации

1. **Manukhova T.I.**, Evtushenko E.A., Ksenofontov A.L., Arutyunyan A.M., Kovalenko A.O., Nikitin N.A., Karpova O.V. Thermal remodelling of Alternanthera mosaic virus virions and virus-like particles into protein spherical particles // PLoS ONE. 2021. V. 16. № 7, P. e0255378. JIF (WoS) 3.7. Доля участия 80%, 0.75 п.л.
2. Donchenko E.K., Pechnikova E.V., Mishyna M.Y., **Manukhova T.I.**, Sokolova O.S., Nikitin N.A., Atabekov J.G., Karpova O.V. Structure and properties of virions and virus-like particles derived from the coat protein of Alternanthera mosaic virus // PLoS ONE. 2017. V. 12. № 8. P. e0183824. JIF (WoS) 3.7. Доля участия 70%, 0.48 п.л.
3. Ксенофонтов А.Л., Петухов М.В., Матвеев В.В., Федорова Н.В., Семенюк П.И., Арутюнян А.М., **Манухова Т.И.**, Евтушенко Е.А., Никитин Н.А., Карпова О.В., Штыкова Э.В. Влияние структуры N-концевого домена белка оболочки X-вируса картофеля и вируса мозаики альтернантеры на структуру и физико-химические свойства вирионов // Биохимия. 2023. Т. 88. № 1. С. 68-82 IF (РИНЦ) 1.161. Доля участия 50%, 0.47 п.л.
4. Рябчевская Е.М., Евтушенко Е.А., Архипенко М.В., **Манухова Т.И.**, Донченко Е.К., Никитин Н.А., Атабеков И.Г., Карпова О.В. Новый подход к разработке кандидатной вакцины против ротавируса на основе двух вирусов растений в журнале // Сельскохозяйственная биология. 2020. Т. 55. № 5. С. 1004-1017. IF (РИНЦ) 1.467. Доля участия 30%, 0.26 п.л.