

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Манухова Татьяна Ивановна

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

1.5.10 – Вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1. ВИРИОНЫ И ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ ПОТЕКСВИРУСОВ	18
1.1. Структура вирионов потексвирусов	18
1.2. Структура белка оболочки (БО) потексвирусов и взаимодействие субъединиц БО при укладке в спиральную структуру	21
1.3. Характеристика вирусоподобных и нуклеокапсид-подобных частиц потексвирусов	23
2. ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА МОЗАИКИ АЛЬТЕРНАНТЕРЫ	28
2.1. Распространение ВМАльт и разнообразие изолятов	28
2.2. Таксономическое положение и характеристика ВМАльт	34
2.3. Вирусоподобные частицы на основе белка оболочки ВМАльт	35
3. СТРУКТУРНО МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЧАСТИЦЫ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ	38
3.1. Получение и свойства СЧ из вирионов и различных форм БО вирусов растений	39
3.2. Условия термической структурной перестройки	43
3.3. Структура БО в составе СЧ ВТМ и СЧ ХВК	45
3.4. Применение СЧ ВТМ при разработке вакцинных препаратов	49
3.5. Применение СЧ ВТМ в противоопухолевой терапии	51
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	54
1. Материалы	54
1.1. Реактивы	54

1.2. Клеточные линии	54
1.3. Питательные среды и антибиотики	55
1.4. Растворы и буферы	55
1.5. Коммерческие наборы, препараты и реактивы	56
2. Методы	57
2.1. Заражение растений ВМАльт	57
2.2. Выделение и очистка препарата ВМАльт	57
2.3. Выделение БО ВМАльт	58
2.4. Выделение РНК	59
2.5. Электрофоретический анализ белков в денатурирующем полиакриламидном геле	60
2.6. Электрофоретический анализ нуклеиновых кислот в агарозном геле	60
2.7. Просвечивающая электронная микроскопия	61
2.8. Криоэлектронная микроскопия	61
2.9. Обработка изображений для получения 3D реконструкций и определения параметров спирали вирионов и ВПЧ ВМАльт	62
2.10. Анализ стабильности вирионов и ВПЧ ВМАльт в различных условиях	63
2.11. Лиофилизация	63
2.12. Мечение изотиоцианатом флуоресцеина	64
2.13. Мечение диацетатом флуоресцеин-малеимида	64
2.14. Флуоресцентная микроскопия	64
2.15. Обработка вирусных и вирусоподобных частиц ВМАльт трипсином	65
2.16. Измерение спектров кругового дихроизма	65
2.17. Флуоресцентная спектроскопия	65
2.18. Получение структурно модифицированных частиц (СЧ) ВМАльт	66
2.19. Экспрессия рекомбинантных белков в бактериальной системе	66
2.20. Выделение рекомбинантных белков	67
2.21. Очистка рекомбинантных белков	69

2.22. Получение композиций СЧ ВМАльт с целевым белком	69
2.23. Иммунизация и получение сывороток	69
2.24. Иммунофлуоресцентная микроскопия	70
2.25. Биоконъюгация рекомбинантного белка к ВПЧ, СЧ _{вир} и СЧ _{ВПЧ}	71
2.26. Адсорбция СЧ ВМАльт на клетках	71
2.27. Проникновение СЧ ВМАльт в клетки	73
2.28. Иммуноцитохимическое окрашивание	74
2.29. Статистический анализ	74
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	76
1. СТРУКТУРА ВИРИОНОВ И ВПЧ ВМАЛЬТ	76
1.1. Сравнение структуры ВПЧ и вирионов ВМАльт на основании эффективности мечения их поверхности флуоресцентными красителями	77
1.2. Сравнение структуры ВПЧ и вирионов ВМАльт методом трипсинового теста	80
1.3. Сравнение структуры ВПЧ и вирионов ВМАльт с помощью методов электронной и криоэлектронной микроскопии	82
1.4. Сравнительный анализ структуры белка оболочки в составе ВПЧ и вирионов ВМАльт методом спектроскопии кругового дихроизма	87
2. СТРУКТУРНО МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЧАСТИЦЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ВИРИОНОВ И ВПЧ ВМАЛЬТ ПРИ ИХ ТЕРМИЧЕСКОЙ ПЕРЕЙСТРОЙКЕ	90
2.1. Получение СЧ из вирионов, условия их образования и сравнительная характеристика СЧ, полученных из вирионов и ВПЧ ВМАльт	91
2.2. Характеристика процесса структурного перехода частиц при образовании СЧ ВМАльт	95
2.3. Характеристика биохимического состава СЧ, образующихся при термической перестройке вирионов ВМАльт	99
2.4. Анализ изменения структуры БО при образовании СЧ ВМАльт	102

3. ПОТЕНЦИАЛ ПРИКЛАДНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ВИРИОНОВ, ВПЧ И СЧ ВМАЛЬТ	111
3.1. Стабильность вирионов, ВПЧ и СЧ ВМАЛЬТ в различных условиях	112
3.2. Оптимизация методики выделения ВМАЛЬТ	119
3.3. Адсорбционные свойства СЧ ВМАЛЬТ	124
3.4. Применение СЧ и ВПЧ ВМАЛЬТ в качестве платформы для химической конъюгации	126
3.5. Применение СЧ ВМАЛЬТ в качестве платформы для доставки в опухолевые клетки лекарственных препаратов	130
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	135
ВЫВОДЫ	137
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	138
ПРИЛОЖЕНИЯ	147

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- а.о. – аминокислотные остатки
- БО – белок оболочки
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ВМАльт – вирус мозаики альтернантеры
- ВМАльт-MU – вирус мозаики альтернантеры, изолят Moscow University
- ВМБ – вирус мозаики бамбука
- ВМД – вирус мозаики долихоса
- ВМКГ – вирусом мозаики коровьего горошка
- ВМН – вирус мозаики нарцисса
- ВМП – вирус мозаики папайи
- ВМПеп – вирус мозаики пепино
- ВПЧ – вирусоподобные частицы
- ВТМ – вирус табачной мозаики
- ВШМЯ – вирус штриховатой мозаики ячменя
- ДСН – додецилсульфат натрия
- ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозоид
- КД – круговой дихроизм
- кДНК – комплементарная ДНК
- крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия
- мм – миллимоль
- мкг/мкл – микрограмм в микролитре
- мг/мл – миллиграмм в миллилитре
- нм – нанометр
- НПЧ – нуклеокапсидподобные частицы
- нт – нуклеотиды
- об./мин. – обороты в минуту
- ОРС – открытая рамка считывания
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
СЧ – структурно-модифицированные частицы
СЧ_{вир} – структурно-модифицированные частицы из вирионов ВМАЛЬТ
СЧ_{ВПЧ} – структурно-модифицированные частицы из ВПЧ ВМАЛЬТ
СЧ_{ВПЧ/вир} – СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ}
ТАЕ – трис-ацетатный буфер
ТГБ – трис-глицериновый буфер
ТМ2е – рекомбинантный белок, содержащий повторяющиеся последовательности М2е-эпитопа вируса гриппа А
тРНК – транспортная РНК
УФ – ультрафиолет
ХВК – Х вирус картофеля
ЦФ – центрифугирование
μм – микрометр
Å – ангстрем
Со1 – рекомбинантный белок, который содержит последовательность рецептор-связывающего домена S-белка (319–541 а.о.) SARS-CoV-2
FBS – fetal bovine serum, фетальная бычья сыворотка
FITC – fluorescein isothiocyanate, изотиоцианат флуоресцеина
NHS – N-hydroxysuccinimide, N-гидроксисукцинимид
Ni-NTA – Ni²⁺-нитрилоацетат
PBS – phosphate buffer saline (фосфатно-солевой буфер)
XRD – X-ray diffraction, дифракция рентгеновских лучей

ВВЕДЕНИЕ

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). По сравнению с многочисленными данными о структуре палочковидных вирусов растений исследование нитевидных вирусных частиц долгое время было ограничено техническими возможностями (Parker *et al.*, 2002). Лишь в последние годы были опубликованы работы, посвященные структурной биологии различных 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 (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 определять сайты модификации поверхности вирионов и аминокислотные остатки, взаимодействующие с иммунными клетками, 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 настоящей 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 полимеризуется до олигомеров 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, соразмерных по длине с вирионами 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; Erickson с соавторами (1976) подчеркивают, что различий с вирионами, аналогичных ВПЧ ВМН, обнаружено не было. Помимо ВПЧ потексвирусов, не содержащих какую-либо нуклеиновую кислоту, 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. 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) (Hart, 1956; Atabekov *et al.*, 2011), вируса штриховатой мозаики ячменя, вируса мозаики долихоса (Трифонова *и др.*, 2017), а также нитевидных вирионов ХВК (Nikitin *et al.*, 2016a) – была продемонстрирована возможность образования при термической перестройке структурно модифицированных частиц (СЧ). Установлено, что образование СЧ сопровождается изменениями структуры БО, а также деградацией геномной РНК. Условия структурного перехода с образованием СЧ отличаются для ВТМ и ХВК (Atabekov *et al.*, 2011; Nikitin *et al.*, 2016a), что, по-видимому, отражает различия структуры их вирионов. И СЧ ВТМ, и СЧ ХВК обладают адсорбционными свойствами (Atabekov *et al.*, 2011; Dobrov *et al.*, 2014; Nikitin *et al.*, 2016a). Перспективные результаты были получены при исследовании свойств и возможностей биотехнологического применения СЧ ВТМ. На данный момент на их основе были разработаны кандидатные вакцины 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 при нагревании до 65°C (Atabekov *et al.*, 2011), а также из ВПЧ ВМАльт при нагревании до 94°C (СЧ_{ВПЧ}) (Трифонова *и др.*, 2017). Однако до настоящего времени получить СЧ из вирионов (СЧ_{вир}) ВМАльт не удавалось (Трифонова *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 $СЧ_{\text{вир}}$ ВМАльт и сравнение условий термической перестройки, необходимых для образования $СЧ_{\text{вир}}$, с условиями образования $СЧ_{\text{ВПЧ}}$ и $СЧ$ других вирусов, позволяет получить дополнительную информацию о структурных особенностях вирионов ВМАльт. Кроме того, исследование физико-химических свойств вирионов, ВПЧ, $СЧ_{\text{ВПЧ}}$ и $СЧ_{\text{вир}}$ ($СЧ_{\text{ВПЧ/вир}}$) 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 ($СЧ_{\text{вир}}$) и ВПЧ ($СЧ_{\text{ВПЧ}}$) ВМАльт.
3. Исследовать процесс перехода вирионов и ВПЧ ВМАльт с образованием $СЧ_{\text{вир/ВПЧ}}$ и изменения в структуре белка оболочки в ходе перестройки.
4. Оценить прикладной потенциал вирионов, ВПЧ и $СЧ_{\text{вир/ВПЧ}}$ ВМАльт.

Объект исследования

Объектами исследования являлись вирусные и вирусоподобные частицы ВМАльт, а также $СЧ$, формирующиеся в ходе термической перестройки вирионов и ВПЧ ($СЧ_{\text{вир/ВПЧ}}$).

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 α -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_{вир}). Показано, что условия их образования отличаются от условий получения СЧ из ВПЧ ВМАльт (СЧ_{ВПЧ}) 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_{вир/ВПЧ}.

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_{вир/ВПЧ} 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_{вир/ВПЧ}, что указывает на возможность их применения как платформы для презентации целевых белков (антигенов) при разработке рекомбинантных вакцин. Также показано, что СЧ_{вир/ВПЧ} 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 ($СЧ_{\text{вир}}$ и $СЧ_{\text{ВПЧ}}$).
3. Условия образования $СЧ_{\text{вир}}$ ВМАльт отличаются от условий получения $СЧ$ из других вирусов, что, по-видимому, связано с особенностями строения вирионов ВМАльт.
4. В процессе образования как $СЧ_{\text{вир}}$, так и $СЧ_{\text{ВПЧ}}$ происходят значительные изменения в структуре белка оболочки.
5. $СЧ_{\text{вир/ВПЧ}}$ обладают адсорбционными свойствами и способны экспонировать на своей поверхности целевой антиген в отсутствие дополнительных фиксирующих агентов.
6. ВПЧ ВМАльт являются потенциальной платформой для конъюгации с таргетными молекулами.
7. $СЧ_{\text{вир/ВПЧ}}$ 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.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Представители рода *Potexvirus* семейства *Alphaflexiviridae* – это вирусы растений гибкой нитевидной формы, вирионы которых образованы белком оболочки (БО) и одноцепочечной геномной РНК положительной полярности длиной 5900-7000 нт. Вирионы потексвирусов представляют собой нитевидные частицы длиной 470-580 нм и диаметром ~13 нм (ICTV, релиз 2022). Изучение структуры вирионов потексвирусов длительное время осложнялось методологическими ограничениями (Parker *et al.*, 2002). Невозможность получения высоко структурированных кристаллов как индивидуального БО, так и вирионов потексвирусов (Atabekov *et al.*, 2007) не позволяла использовать метод дифракции рентгеновских лучей (X-ray diffraction, XRD) для расшифровки их структуры. Лишь в 2020 году на основе данных криоэлектронной микроскопии была получена реконструкция спирали вирионов типового представителя рода – X вируса картофеля (ХВК) в высоком разрешении (Grinzato *et al.*, 2020). Кроме того, существуют данные о структуре следующих потексвирусов: вирус мозаики бамбука (ВМБ), вирус мозаики пегино (ВМПеп), вирус мозаики нарцисса (ВМН), вирус мозаики папайи (ВМП).

В 1999 году в Австралии был выделен и описан новый потексвирус, близкий по нуклеотидной последовательности к ВМП. A.D.W. Geering и J.E. Thomas назвали этот изолят вирусом мозаики альтернантеры (ВМАльт) (Geering and Thomas, 1999). Позднее ВМАльт был обнаружен на растениях-хозяевах различных семейств по всему миру. Данная работа выполнена на изоляте ВМАльт-MU (Moscow University), определенного на кафедре вирусологии МГУ имени М.В. Ломоносова из образцов зараженных растений немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig) (Ivanov *et al.*, 2011). Как представитель рода *Potexvirus* ВМАльт имеет нитевидные вирионы, представляющие собой геномную РНК, упакованную в спирально уложенные

молекулы БО. Средняя длина вирионов ВМАльт-МУ составляет 570 нм, диаметр – 13 нм (Mukhamedzhanova *et al.*, 2011).

При исследовании свойств БО ВМАльт было обнаружено, что он полимеризуется *in vitro* в отсутствие РНК при рН 4.0, а также при рН 8.0 с образованием вирусоподобных частиц (ВПЧ), морфологически сходных с нативными вирионами ВМАльт. При этом было замечено, при рН 4.0 ВПЧ ВМАльт образуют обширные волокнообразные пучки, в то время как при рН 8.0 были обнаружены отдельные нити ВПЧ (Mukhamedzhanova *et al.*, 2011). В отличие от БО ВМАльт белок оболочки ВМП способен к самосборке с образованием ВПЧ в отсутствие геномной РНК в условиях *in vitro* исключительно при рН 4.0 (Erickson *et al.*, 1976). В условиях, приближенных к физиологическим (рН 6-8) сборка БО ВМП ограничивается образованием олигомеров с коэффициентом седиментации до 25S (Erickson *et al.*, 1976). Помимо БО ВМАльт и ВМП, способность к самосборке 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. Известно, что БО ХВК может образовывать при длительной инкубации однослойные и двухслойные диски при длительной инкубации в определенных условиях, однако в отличие от БО ВМП и ВМАльт частиц соразмерных по длине с вирионами получено не было (Kaftanova *et al.*, 1975).

Ранее на примере палочковидных вирионов вируса табачной мозаики (ВТМ, сем. *Virgaviridae*, род *Tobamovirus*) (Hart, 1956; Atabekov *et al.*, 2011), вируса штриховатой мозаики ячменя (сем. *Virgaviridae*, род *Hordeivirus*), вируса мозаики долихоса (сем. *Virgaviridae*, род *Tobamovirus*) (Трифонова *и др.*, 2017), а также нитевидных вирионов ХВК (Nikitin *et al.*, 2016a) была продемонстрирована возможность образования структурно модифицированных частиц (СЧ). Установлено, что образование СЧ сопровождается изменениями структуры БО, а также деградацией геномной РНК. Условия структурного перехода с образованием СЧ отличаются для

ВТМ и ХВК (Atabekov *et al.*, 2011; Nikitin *et al.*, 2016a), что, по-видимому, отражает различия структуры их вирионов. СЧ ВТМ и СЧ ХВК обладают адсорбционными свойствами (Atabekov *et al.*, 2011; Dobrov *et al.*, 2014; Nikitin *et al.*, 2016a). На данный момент на основе СЧ ВТМ были разработаны кандидатные вакцины 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 РНК-содержащих вирионов СЧ могут быть получены из любых форм БО ВТМ при нагревании до 65°C (Atabekov *et al.*, 2011), а также из ВПЧ ВМАльт при нагревании до 94°C (СЧ_{ВПЧ}) (Трифонова *и др.*, 2017). При этом было установлено, что для получения СЧ из вирионов (СЧ_{вир}) ВМАльт условия, подобранные для СЧ ХВК, не подходят (Трифонова *и др.*, 2017). Таким образом, получение СЧ_{вир} ВМАльт, исследование процесса структурного перехода и физико-химических свойств СЧ_{ВПЧ/вир} имеет как фундаментальное значение и позволяет получить информацию о структуре и стабильности вирионов и ВПЧ ВМАльт, так и приводит к пониманию потенциала практического применения вирионов, ВПЧ и СЧ_{ВПЧ/вир} ВМАльт.

Первая часть литературного обзора посвящена описанию структуры вирионов потексвирусов, а также свойств их ВПЧ. Далее представлены известные к моменту начала работы свойства вирионов и ВПЧ ВМАльт, а также характеристика известных изолятов ВМАльт. В третьей части литературного обзора обсуждаются свойства структурно модифицированных частиц ряда вирусов растений.

1. ВИРИОНЫ И ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ ПОТЕКСВИРУСОВ

1.1. Структура вирионов потексвирусов

Вирусы рода *Potexvirus* семейства *Alphaflexiviridae* – это вирусы растений с гибкой структурой, вирионы которых образованы единственным структурным белком оболочки (БО) с молекулярной массой 21-27 кДа и одноцепочечной геномной РНК положительной полярности длиной 5900-7000 нт. Вирионы представляют собой нитевидные частицы со спиральной симметрией длиной 470-580 нм и диаметром ~13 нм (Atabekov *et al.*, 2007).

В отличие от вирусов растений с жесткой палочковидной или икосаэдрической формой изучение тонкой структуры гибких нитевидных вирионов потексвирусов в течение длительного времени было осложнено методологическими ограничениями (Parker *et al.*, 2002). Для построения моделей атомной структуры вирионов преимущественно использовали метод дифракции рентгеновских лучей (X-ray diffraction, XRD), с помощью которого еще в 1986 году были получены модели структуры вирионов вируса табачной мозаики (ВТМ) с разрешением 3.6 Å (Namba&Stubbs, 1986). Однако в отличие от ВТМ ни индивидуальный БО, ни вирионы потексвирусов не образуют кристаллы, подходящие для исследования методом XRD высокого разрешения. Так вирионы ХВК формируют ориентированные золи, но степень ориентации частиц настолько низка, что на дифракционных картинах можно различить лишь некоторые особенности поверхности вирусных частиц (Atabekov *et al.*, 2007). Тем не менее в связи с отсутствием подходов, альтернативных XRD, его, а также метод тритиевой планиграфии и иммунологические данные активно применяли и для исследования структуры вирионов вирусов с нитевидной морфологией (Grinzato *et al.*, 2020).

Первые исследования структуры X вируса картофеля (ХВК) как типового представителя рода были проведены Bernal и Fankuchen в 1941 году. С

помощью XRD низкого разрешения авторы установили, что шаг спирали вирионов составляет около 33 Å. Позднее методом XRD в комбинации с электронной микроскопии были определены приблизительные параметры спирали ХВК (Tollin *et al.*, 1980), вируса мозаики нарцисса (ВМН) (Tollin *et al.*, 1975; Bancroft *et al.*, 1980; Low *et al.*, 1985) и вируса мозаики папайи (ВМП) (Tollin *et al.*, 1979). В статье 1981 года Richardson с соавторами делают вывод о том, что все потексвирусы обладают общей архитектурой, в частности на один виток спирали приходится чуть менее 9 субъединиц БО.

Применение криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) в сочетании с методами обработки изображений и построения реконструкций на их основе позволило повысить разрешающую способность до ~10 Å. В 2008 году с помощью крио-ЭМ была получена реконструкция вирионов ХВК с разрешением 14 Å (Kendall *et al.*, 2008). Совершенствование метода позволило к 2020 году улучшить разрешающую способность до 2.2 Å и получить реконструкцию вирионов ХВК с наилучшим разрешением среди вирусов растений с нитевидной морфологией (Grinzato *et al.*, 2020). На данный момент методом крио-ЭМ определены параметры спирали ХВК, ВМП, вируса мозаики бамбука (ВМБ), вируса мозаики пепино (ВМПеп), ВМН (**Табл. 1**).

Согласно последним данным, вирионы ХВК представляют собой левозакрученную спираль с диаметром 130 Å, диаметр центрального канала – 16 Å, шаг спирали – 35.2 Å, на 1 виток приходится 8.8 субъединиц БО (Grinzato *et al.*, 2020) (**Табл. 1**). Параметры вирионов ВМПеп, ВМН, ВМБ близки к параметрам ХВК: шаг спирали составляет ~34.5-35.56 Å, диаметр – 130 Å, 8.7-8.8 субъединиц БО на виток (**Табл. 1**). Однако параметры спирали вирионов ВМП, определённые двумя независимыми исследовательскими группами существенно отличаются как между собой, так и от параметров других представителей рода (**Табл. 1**). Количество субъединиц на виток по данным Yang с соавторами (2012) – 10, этот параметр сильно расходится со значением для других представителей рода ~8.7-8.8. В то же время по данным Kendall с

соавторами (2013) диаметр вирионов ВМП составляет 120 Å, что также значительно отличается от определенных диаметров других потексвирусов (Табл. 1).

Таблица 1. Параметры структуры спирали вирионов некоторых представителей рода *Potexvirus*, определенные методом криоэлектронной микроскопии

Представители рода <i>Potexvirus</i>	Диаметр вириона, Å	Диаметр центрального канала, Å	Шаг спирали, Å	Количество субъединиц БО на виток	Разрешение метода, Å
ВМПеп (Agirrezabala <i>et al.</i> , 2015)	130	13	34.6	8.7	3.9
ВМБ (DiMaio <i>et al.</i> , 2015)	-	-	35	8.8	5.6
ВМП (Yang <i>et al.</i> , 2012)	135	25	36	~10	21
ВМП (Kendall <i>et al.</i> , 2013)	120	-	33.7	8.74-8.77	20-22
ХВК (Grinzato <i>et al.</i> , 2020)	130	16	35.2	8.8	2.2
ВМН (Kendall <i>et al.</i> , 2013)	130	-	34.47- 34.56	8.77-8.78	20-22

3D-реконструкция и параметры спирали вирионов ВМП на основе данных крио-ЭМ с разрешением 21 Å, полученные Yang с соавторами (2012), не совпадают с результатами, опубликованными в работе Kendall с соавторами (2013) (Табл. 1). Yang с соавторами (2012) предполагают, что различия могут быть обусловлены меньшими размерами БО ВМП (215 а.о.), в то время как БО ХВК образован 237 а.о. Однако Kendall с соавторами (2013) указывают на некорректно выполненную реконструкцию, не учтенные параметры, известные из XRD, а также сканирующей электронной микроскопии. Кроме того, БО ВМП, ХВК, ВМН сходны по аминокислотной последовательности: 68% сходства между БО ХВК и ВМП, 62% между ХВК и ВМН, 59% между

ВМП и ВМН, что указывает на ожидаемое сходство спирали вирионов этих вирусов (Kendall *et al.*, 2013).

1.2. Структура белка оболочки (БО) потексвирусов и взаимодействие субъединиц БО при укладке в спиральную структуру

Исследование структуры и укладки БО потексвирусов классическими методами осложнено в связи с трудностями его кристаллизации. На данный момент с помощью криоэлектронной микроскопии высокого разрешения и моделирования получены структуры БО ХВК (Grinzato *et al.*, 2020), ВМПеп (Agirrezabala *et al.*, 2015), ВМБ (DiMaio *et al.*, 2015) и ВМАльт (Thuenemann *et al.*, 2021). Структура укороченного на N-конце БО ВМП определена методом рентгеновской кристаллографии (Yang *et al.*, 2012). Несмотря на различия применяемых подходов свойства укладки БО являются общими для перечисленных потексвирусов – это белок, обогащенный α -спиралями и имеющий довольно протяженные неструктурированные участки, с меньшей плотностью укладки, чем БО ВТМ (DiMaio *et al.*, 2015).

БО ХВК состоит из трех доменов: короткого N-концевого I (а.о. 29-50), центрального корового II (а.о. 51-185) и C-концевого III (а.о. 186-237). N-концевой домен расположен на поверхности вириона и варьируется у различных представителей рода. Домен II включает 6 α -спиралей и протяженный неструктурированный участок (а.о. 170-185), который взаимодействует с пятью нуклеотидами геномной РНК. Домены I и II БО в вирионе экспонированы на поверхности, в то время как домен III образует выстилку центрального канала. Каждая субъединица (l) БО в вирионе взаимодействует с предыдущей ($l-1$) и последующей ($l+1$) субъединицами, а также с субъединицами, расположенными выше ($l+7, l+8, l+9$) и ниже ($l-7, l-8, l-9$) в спирали за счет водородных, гидрофобных, Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий и солевых мостиков. Контакт между последовательно расположенными субъединицами БО осуществляется за счет N-концевого

домена *I*-молекулы БО, которая взаимодействует со II доменом БО *I+I* молекулы (Grinzato *et al.*, 2020).

Как и БО ХВК БО ВМП образован 7 α -спиралями. Показано, что N-концевой участок критически важен для полимеризации: в случае делеции N-концевых 26 а.о. (БО₂₇₋₂₁₅) рекомбинантный БО, экспрессированный в *E. coli*, представлен в форме мономеров. Кроме того, было показано что БО₂₇₋₂₁₅ не связывает РНК несмотря на сохранение РНК-связывающего домена, расположенного между 90 и 130 а.о. Это, по мнению авторов, свидетельствует о взаимосвязи процессов полимеризации молекул БО и их взаимодействия с нуклеиновой кислотой (Lescours *et al.*, 2006). Позднее было показано, что делеция даже 13 N-концевых а.о. (БО₁₃₋₂₁₅) приводит к невозможности сборки БО ВМП и их взаимодействия с РНК. При этом ключевую роль авторы отводят аминокислоте в позиции 13. В БО ВМП дикого типа в этой позиции расположен фенилаланин (F13). При точечной мутации замены фенилаланина на тирозин (F13Y) или лейцин (F13L) способность БО к сборке сохраняется. Однако замена на аланин (F13A), глицин (F13G), аргинин (F13R), серин (F13S) или глутамат (F13E) приводила к нарушению взаимодействия молекул БО между собой. Авторы предполагают, что F13 важен для образования гидрофобных связей, в отсутствии которых сборка вириона невозможна (Gagné *et al.*, 2008). Аналогично замена фенилаланина в позиции 28 на аланин (F28A) в БО ВМПеп приводила к нарушению сборки вирионов (Agirrezabala *et al.*, 2015). В свою очередь, по данным выравнивания соответствующий фенилаланин БО ХВК располагается в позиции 33 (F33). Делеция N-концевых 22 а.о. БО ХВК не влияет на сборку вируса (Donini *et al.*, 2005), что подтверждает отсутствие вклада расположенного выше F33 участка во взаимодействие между молекулами БО. Gagné с соавторами (2008) предполагают, что гидрофобный а.о., соответствующий F13 БО ВМП, является характерной чертой БО потексвирусов и играет значимую роль во взаимодействии субъединиц БО при формировании вирусных частиц (Gagné *et al.*, 2008).

С помощью метода точечного мутагенеза было показано, что помимо N-концевых аминокислот значимую роль во взаимодействии субъединиц БО ВМП друг с другом играют а.о. лизина в позиции 97 (K97) и глутамина в позиции 128 (E128). K97 – консервативный а.о. потексвирусов, замена K97A приводила к тому, что БО не взаимодействовал с РНК, в растворе были обнаружены неструктурированные агрегаты 15-50 нм в диаметре. Напротив, афинность к РНК БО с заменой E128A была выше, чем у БО дикого типа (Tremblay *et al.*, 2006). Позднее при исследовании кристаллической структуры БО ВМП Yang с соавторами (2012) установили, что положительно заряженный лизин (K97) взаимодействует с молекулой РНК.

1.3. Характеристика вирусоподобных и нуклеокапсид-подобных частиц потексвирусов

В данной работе под **вирусоподобными частицами (ВПЧ)** подразумеваются частицы, образованные БО в отсутствии геномной РНК или любой другой гетерологичной РНК, морфологически сходные с нативными вирионами.

Впервые среди потексвирусов образование ВПЧ из БО было описано для вируса мозаики нарцисса (ВМН) (Robinson *et al.*, 1975). Авторы сообщают, что выделенный БО ВМН при инкубации в течение 10 дней при комнатной температуре в Трис-НСl, рН 8.0, 0.3М (NH₄)₂SO₄ агрегирует с образованием длинных частиц с диаметром, аналогичным нативным вирионам ВМН по данным просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (Robinson *et al.*, 1975).

Способность БО ХВК к сборке *in vitro* была исследована в ряде работ. Было показано, что выделенный из вирионов БО ХВК существует в виде компонентов с коэффициентами седиментации 3–5S и 10–15S. Все попытки получить реполимеры белка ХВК были безуспешны. Частичная полимеризация БО ХВК с образованием однослойных и двухслойных дисков

была продемонстрирована при инкубации белка в фосфатном буфере 0.2 М рН 7.0-7.5 в течение 24 часов при температуре 4-20°C. Диаметр полученных дисков по данным электронной микроскопии соответствовал диаметру интактных вирионов, диаметр центрального канала составлял 4 нм. При длительной инкубации диски агрегировали с образованием стопок (Kaftanova *et al.*, 1975).

Позднее было продемонстрировано, что БО ВМП способен к самосборке *in vitro* в отсутствие геномной РНК с формированием длинных полимеров со спиральным типом симметрии – ВПЧ. Согласно дифракционным картинам вирионы и ВПЧ ВМП имеют сходный диаметр ~130 Å и шаг спирали ~36 Å (Erickson *et al.*, 1976). При этом образование ВПЧ в значительной степени определяется условиями инкубации (значение рН, ионная сила, температура). Было установлено, что при рН 3.0 БО ВМП представлен димерами с коэффициентом седиментации 2.7S; при повышении рН до 4.0 и низкой температуре, а также при рН 5.0-6.5 независимо от температуры 18-20 субъединиц БО ВМП полимеризуются с образованием двухслойных дисков коэффициентом седиментации 14S. При рН 4.0 и температуре выше 5°C в отсутствие геномной РНК БО ВМП формирует *in vitro* гибкие нитевидные ВПЧ со спиральной структурой и с коэффициентами седиментации в диапазонах от 100-120S и 230-250S (**Рис. 1**). Было показано, что добавление к цитратному буферу (рН 4.0) NaCl до конечной концентрации 0.2М приводит к уменьшению коэффициента седиментации образуемых частиц с 117-248S до 73S (Erickson *et al.*, 1976). Аналогично, NaCl в концентрации 0.025-0.2М ингибирует реконструкцию вирионов ВМП из РНК и БО. При рН 8.0 сборка БО ВМП ограничивается образованием небольших агрегатов со спиральной структурой с коэффициентами седиментации 13-33S. Между значениями рН от 6.5 до 9.5 существуют другие промежуточные формы БО с коэффициентами седиментации от 14S до 25S (Erickson *et al.*, 1976, 1981).

Помимо pH среды и температуры на образование ВПЧ ВМП влияет концентрация БО в растворе. В 0.01 М Трис-НСl, pH 8.0 при температуре 25°C и концентрации БО ВМП 0.1 мг/мл белок находится в форме мономеров и димеров с коэффициентами седиментации 2-3S, при концентрации 0.25 мг/мл появляются агрегаты с коэффициентами седиментации 14S, а при концентрации более чем 1 мг/мл они преобразуются в агрегаты с коэффициентами седиментации 27-30S (Erickson *et al.*, 1976, 1978).

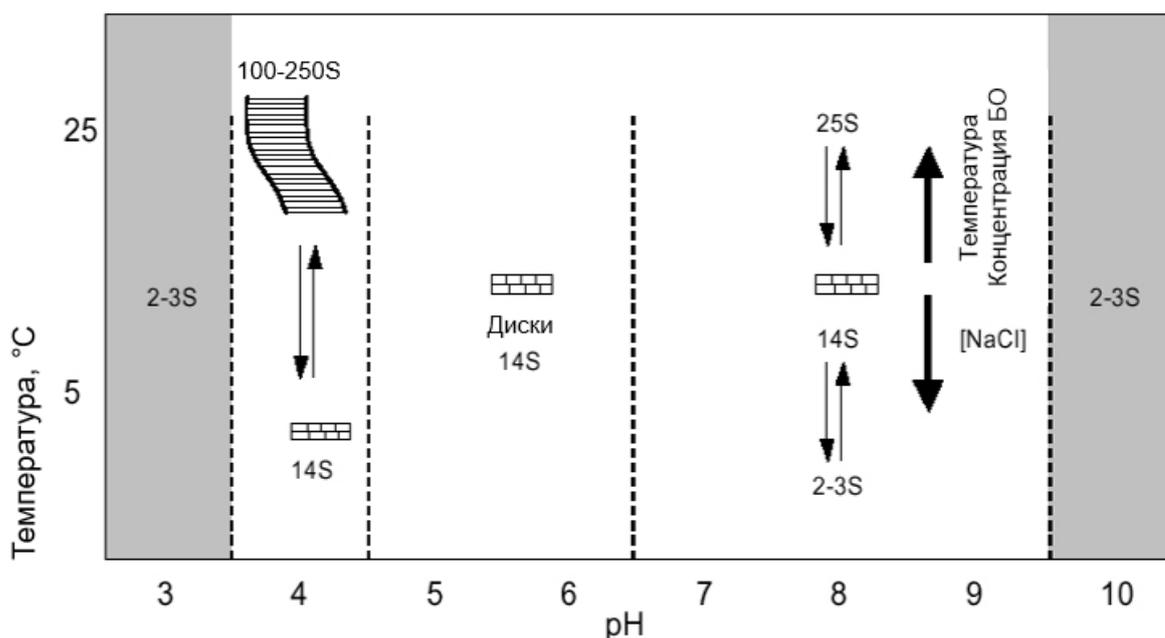


Рис. 1. Влияние условий инкубации на полимеризацию БО ВМП *in vitro*, адаптировано из Erickson *et al.*, 1981.

В отличие от ВПЧ, не содержащих какую-либо нуклеиновую кислоту, **нуклеокапсид-подобные частицы (nucleocapsid-like particles, НПЧ)** образованы нативным или модифицированным БО и РНК (геномной или гетерологичной).

Tremblay с соавторами (2006) исследовали возможность самосборки БО ВМП при его экспрессии в клетках *Escherichia coli*. В качестве дикого типа БО ВМП был экспрессирован БО с пятью ваннами а.о. на N-конце (CPAN5). БО ВМП имеет два старт-кодона (в позициях 1 и 6). В ходе естественной инфекции ВМП транслируются обе формы белка. Для обеспечения экспрессии

одной формы рекомбинантного белка участок до второго старт-кодона был делетирован (CPAN5). Было показано, что очищенный CPAN5 в 0.01 М Трис-HCl pH 8.0 образует НПЧ, содержащие гетерологичную бактериальную РНК (Mathieu *et al.*, 2013), однако большая часть белка (~80%) остается в виде дисков из 20 субъединиц массой 450 кДа. Длина НПЧ, полученных из CPAN5, составляла около 1/10 длины (50 нм) нативного вируса. Авторы предполагают, что меньшая длина таких НПЧ связана с тем, что CPAN5 упаковывает короткие фрагменты неструктурированной бактериальной РНК. При инкубации *in vitro* дисков, содержащих 20 субъединиц БО, с РНК происходило формирование 150 нм НПЧ, соответствующих по длине РНК, использованной для реконструкции. Помимо CPAN5 были получены другие мутантные варианты БО ВМП: показано, что БО, содержащий замену E128A, способен формировать более протяженные НПЧ (~150 нм), при этом 100% белка, находящегося в растворе, участвует в сборке. По-видимому, замена E128A усиливает аффинность БО ВМП к РНК и, таким образом, повышает эффективность сборки (Tremblay *et al.*, 2006). Важно отметить, что в более поздних работах по исследованию потенциала применения НПЧ ВМП в качестве матрицы для сборки частиц была использована не бактериальная РНК, а синтетический некодирующий РНК транскрипт (Mathieu *et al.*, 2013). Тем не менее именно РНК-содержащие НПЧ ВМП, как более стабильные в широком диапазоне условий частицы, а не ВПЧ, стали основой для последующих исследований (Leclerc *et al.*, 2007; Denis *et al.*, 2008; Savard *et al.*, 2011; Babin *et al.*, 2013; Carignan *et al.*, 2015; Lebel *et al.*, 2016; Therien *et al.*, 2017).

Исследования, посвященные структуре ВПЧ потексвирусов и ее сравнению со структурой вирионов, немногочисленны. Robinson с соавторами (1975) по данным XRD установили, что вирионы и ВПЧ ВМН имеют структурные отличия. Напротив, по результатам Erickson с соавторами (1976) ВПЧ ВМП имеют сходные с вирионами параметры спирали, авторы

подчёркивают, что различий с вирионами, аналогичных ВПЧ ВМН, обнаружено не было. При изучении структуры НПЧ ВМП Tremblay с соавторами (2006) применили метод сравнительного анализа БО в составе спирали вирионов и в свободной форме при обработке трипсином, разработанный ранее в нашей лаборатории (Rodionova *et al.*, 2003). Путем сравнения результатов трипсинолиза авторы установили, что в то время как БО в составе вирионов ВМП устойчив к обработке трипсином БО в составе НПЧ, содержащих CPΔN5, подвергается протеолизу. При этом НПЧ на основе БО с заменой E128A были устойчивы к трипсинолизу, однако в то же время были более чувствительны к термической денатурации, чем нативные вирионы или даже НПЧ на основе CPΔN5 (Tremblay *et al.*, 2006).

Таким образом, в главе рассмотрены данные об известных структурах вирионов потексвирусов, а также структура БО ХВК и ВМП. Описаны участки БО ВМП, значимые для взаимодействия с РНК и сборки вирионов. Кроме того, в главе обсуждены условия сборки ВПЧ и НПЧ ВМП, а также различия в их структуре и структуре вирионов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА МОЗАИКИ АЛЬТЕРНАНТЕРЫ

ВМАльт – вирус, который был выделен и определен в 1999 году. Существует лишь небольшой ряд работ, посвященных молекулярно-биологической и вирусологической характеристике вируса, однако обзоров, системно рассматривающих все аспекты биологии ВМАльт за исключением работы коллектива нашей лаборатории (Donchenko *et al.*, 2018), опубликовано не было. Тем не менее, важно привести подробную характеристику ВМАльт как основного объекта исследования данной работы. В связи с этим, вторая глава посвящена обсуждению всех известных к моменту начала над работой данных о ВМАльт.

2.1. Распространение ВМАльт и разнообразие изолятов

ВМАльт был впервые выделен в Австралии из растений альтернантеры *Alternanthera pungens* (сем. *Amaranthaceae*) – изолят 451/1. Методом электронной микроскопии была охарактеризована структура вирионов, проведен серологический анализ, а также определена полная нуклеотидная последовательность геномной РНК вируса и последовательность аминокислотных остатков БО. На основании полученных данных была показана принадлежность выделенного изолята к роду *Potexvirus* и его филогенетическая близость к ВМП (Geering and Thomas, 1999). При сравнении аминокислотной последовательности БО нескольких видов рода *Potexvirus* X вирус картофеля (ХВК), вирус мозаики цимбидиума, вирус мозаики белого клевера было установлено, что наибольшее сходство проявляют последовательности корового региона БО ВМП и ВМАльт (идентичность – 74,2%). На основании этих данных Geering и Thomas (1999) отнесли выделенный изолят 451/1 к близкому к ВМП, но новому виду (Geering and Thomas, 1999).

Для ВМАльт характерен широкий круг растений-хозяев, входящих в более чем 12 семейств: *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Plantaginaceae*, *Polemionaceae*, *Solanaceae*. К настоящему времени, известно 19 изолятов ВМАльт, выделенных по всему миру (Табл. 2). Вирус был обнаружен на многих декоративных растениях, включая портулак крупноцветковый *P. gradiflora*, флокс ползучий *P. stolonifera*, шлемник *S. spp*, кроссандру воронковидную *C. infudibuliformis*, ангелонию узколистую *A. angustifolia*, торения *T. spp*, гелихризум *Helichrysum spp.*, шалфей сверкающий *Salvia splendens*, циннию изящную *Zinnia elegans* (Baker *et al.*, 2006; Hammond *et al.*, 2006b; Duarte *et al.*, 2008; Lockhart&Daughtrey, 2008). Помимо декоративных видов растений, наличие системной вирусной инфекции было показано на ряде сельскохозяйственных культур: помидоре *Lycopersicon esculentum*, фасоли *Vicia faba*, подсолнухе *Helianthus annuus*, арбузе *Citrullus lanatus*, огурце *Cucumis sativus* и коровьем горошке *Vigna unguiculata* (Geering and Thomas, 1999). Большинство зараженных растений было получено из частных питомников (Ciuffo and Turina, 2004; Baker *et al.*, 2006; Hammond *et al.*, 2006b; Duarte *et al.*, 2008; Lockhart&Daughtrey, 2008; Vitoreli *et al.*, 2011; Iwabuchi *et al.*, 2016). Впервые вирус был выделен из растений нандины домашней *Nandina domestica*, обнаруженных в естественной среде в США 2010 году (Tang *et al.*, 2010).

Все виды растений из семейства *Amaranthaceae*, к которому принадлежит *Alternanthera pungens*, проявляют симптомы заболевания при заражении их ВМАльт (Geering and Thomas, 1999). На растениях семейств *Caesalpinaceae* и *Caricaceae* инфекция не развивается. Примечательно, что ВМАльт не размножается на папайе *Carica papaya* – основном хозяине ВМП, что также подтверждает принадлежность этих вирусов к разным видам (Geering and Thomas, 1999). Симптомы заражения ВМАльт разнообразны: хлоротическая пятнистость разного размера, хлорозы, хлоротические локальные

повреждения, деформации и скручивания листьев, мозаика, крапчатость, некротическая пятнистость разного размера, некротическая кольцевая пятнистость, морщинистость, прижилковые некрозы, межжилковое пожелтение (Geering and Thomas, 1999; Baker *et al.*, 2006; Hammond *et al.*, 2006b; Duarte *et al.*, 2008; Lockhart&Daughtrey, 2008). Полный список растений-хозяев ВМАльт и симптомы инфекции представлены в **Приложении 1**. Показано, что симптомы заражения зависят не только от растения-хозяина, но и от длительности инфекции, штамма вируса и от внешних условий. Например, симптомы заболевания, наиболее отчетливо выраженные у растений, выращенных на ярком свете при умеренной температуре, могут быть незаметны у растений, выращенных при слабом освещении и высокой температуре (Hammond *et al.*, 2006а, б). На примере различных кДНК клонов полного генома изолята ВМАльт-SP была продемонстрирована зависимость тяжести симптомов инфекции на табаке *Nicotiana benthamiana* от аминокислотной последовательности РНК-зависимой РНК-полимеразы и транспортного белка 1 тройного блока генов (Lim *et al.*, 2010). Для кДНК клонов изолята ВМАльт-Ро также установлена связь между аминокислотной последовательностью БО и степенью тяжести заболевания (Hammond and Reinsel, 2015). ВМАльт заражает многие растения бессимптомно, а, кроме того, может быть легко спутан с инфекцией ВМП на основании серологического анализа или анализа методом полимеразной цепной реакции. Кроме того, ВМАльт способен инфицировать широкий круг растений, что делает возможной кросс-контаминацию. На основании этих фактов можно предположить, что ВМАльт распространен гораздо шире, чем описано в литературе, в особенности на территории оранжерей и теплиц (Baker *et al.*, 2006; Hammond and Reinsel, 2015).

К настоящему времени полногеномные последовательности известны для трех изолятов: ВМАльт-РА (Hammond *et al.*, 2006а, 2006b), ВМАльт-MU (Ivanov *et al.*, 2011) и ВМАльт-Ас (Iwabuchi *et al.*, 2016). Для остальных

описанных изолятов присутствуют данные о последовательности гена РНК-зависимой РНК-полимеразы (Табл. 2).

Разнообразие выделенных изолятов как с точки зрения заражаемых растений-хозяев, так и с позиции географического распространения дает основание предположить, что, возможно, внутри рода ВМАльт существуют определенные разошедшиеся эволюционные линии (Ivanov *et al.*, 2011; Hammond and Reinsel, 2015). На основании сравнения последовательностей аминокислотных остатков РНК-зависимой-РНК-полимеразы и БО Ivanov и соавторы (2011) выделили две группы внутри вида ВМАльт: изоляты флокс-типа и изоляты портулак-типа. В работе Hammond и Reinsel (2015) это разделение было подтверждено при анализе аминокислотных последовательностей трех транспортных белков – продуктов «тройного блока генов». К изолятам портулак-типа были отнесены ВМАльт-IT, ВМАльт-MU, ВМАльт-Port, ВМАльт-Ро, ВМАльт-PLR, ВМАльт-CIN (Hammond and Reinsel, 2015). В работе Ivanov с соавторами (2011) отмечено особо близкое родство изолятов внутри этой группы. По аминокислотной последовательности БО ВМАльт-IT, ВМАльт-MU, ВМАльт-Ро отличаются заменой в двух положениях – 106 метионин/изолейцин, 185 серин/фенилаланин (Ivanov *et al.*, 2011). К изолятам флокс-типа были отнесены ВМАльт-Au, ВМАльт-PA, ВМАльт-SP, ВМАльт-BR, ВМАльт-NAN, AltMV-BW, AltMV-LGB, AltMV-PGL (Hammond and Reinsel, 2015). Между ВМАльт-MU и ВМАльт-PA существует 12 аминокислотных замен, преимущественно на N-конце БО (Ivanov *et al.*, 2011).

Таблица 2. Изоляты ВМАЛЬТ

Название изолята	Идентификатор записи в GenBank, отсеквенированный участок	Авторы работы и год публикации	Растение, из которого был выделен изолят	Регион, в котором были обнаружены зараженные растения
<i>Неклассифицированные изоляты</i>				
ВМАЛЬТ Florida isolate	DQ393785 (РНК-полимераза)	Baker <i>et al.</i> , 2006	<i>Portulaca sp.</i> <i>Scutellaria longifolia</i> <i>Crossandra infundibuliformis</i>	США (штат Флорида)
ВМАЛЬТ-T	FJ232066, FJ232067 (РНК-полимераза)	Duarte <i>et al.</i> , 2008	<i>Torenia sp.</i>	Бразилия (Сан-Паулу)
ВМАЛЬТ-angelonia isolate	EU679363 (РНК-полимераза)	Lockhart&Daughtrey, 2008	<i>Angelonia angustifolia</i>	США (Нью-Йорк)
ВМАЛЬТ-isolate G10-00982	JQ687034 (РНК-полимераза)	Vitoreli <i>et al.</i> , 2011	<i>Thunbergia laurifolia</i>	США (штат Флорида)
<i>Изоляты флокс-типа</i>				
ВМАЛЬТ-Au	AF080448 (Белок оболочки)	Geering and Thomas, 1999	<i>Alternanthera pungens</i>	Австралия (штат Квинсленд)
ВМАЛЬТ-PA	AU863024 (полный геном)	Hammond <i>et al.</i> , 2004	<i>Phlox stolonifera</i>	США(штат Пенсильвания)
ВМАЛЬТ-SP	AU850931 (транспортные белки 2 и 3; белок оболочки)	Hammond <i>et al.</i> , 2004	<i>Phlox stolonifera</i> cv. «Sherwood Purple»	США (штат Мэрилэнд)
ВМАЛЬТ-BR	AU850928 (транспортные белки 2 и 3; белок оболочки)	Hammond <i>et al.</i> , 2004	<i>Phlox stolonifera</i> cv. «Blue Ridge»	США (штат Мэрилэнд)
ВМАЛЬТ-NAN	GU126686 (РНК-полимераза)	Tang <i>et al.</i> , 2010	<i>Nandina domestica</i>	США (штат Оклахома)
AltMV-BW	JX457329 (транспортные белки 2 и 3; белок оболочки)	Hammond and Reinsel, 2015	<i>Phlox stolonifera</i> cv. Bruce's White	США, (штат Мэрилэнд)

AltMV-LGB	JX457330 (транспортные белки 2 и 3; белок оболочки)	Hammond and Reinsel, 2015	<i>Phlox divaricata</i> cv. London Grove Blue	США, (штат Мэрилэнд)
AltMV-PGL	JQ405265 (транспортные белки 2 и 3; белок оболочки)	Hammond and Reinsel, 2015	<i>Phlox carolina angusta</i>	США
Изоляты портулак-типа				
ВМАль-IT	AУ566288 (Белок оболочки)	Ciuffo and Turina, 2004	<i>Portulaca grandiflora</i>	Италия (Лигурия, Альбенго)
ВМАльт-Ро	AУ850930 (транспортные белки 2 и 3; белок оболочки)	Hammond <i>et al.</i> , 2004	<i>Portulaca grandiflora</i>	США (штат Мэрилэнд)
ВМАльт-MU	FJ822136 (полный геном)	Ivanov <i>et al.</i> , 2011	<i>Portulaca grandiflora</i>	Юго-Восточная Европа
ВМАльт-Port	JQ405269 (транспортные белки 2 и 3; белок оболочки)	Hammond and Reinsel, 2015	<i>Portulaca grandiflora</i>	США
ВМАльт-PLR	JQ405266 (транспортные белки 2 и 3; белок оболочки)	Hammond and Reinsel, 2015	<i>Phlox</i> гибрид	США
ВМАльт-CIN	JQ405268 (транспортные белки 2 и 3; белок оболочки)	Hammond and Reinsel, 2015	<i>Pericallis</i>	США
Азиатский изолят				
ВМАльт-As	LC107515 (полный геном)	Iwabuchi <i>et al.</i> , 2016	<i>Achyranthes bidentata</i>	Япония (Токио)

Возможные причины такого распределения изолятов могут быть связаны с особенностями выращивания растений-хозяев. Флокс однолетний, цинерария, ангелония, торения, тунбергия и портулак – растения, выращиваемые преимущественно в теплицах в качестве декоративных культур, в то время как флокс многолетний и нандина, размножающиеся

вегетативно, выращивают в открытом грунте. Наиболее вероятно, что именно в связи со схожими условиями содержания растений ВМАльт портулак-типа обнаруживается на растениях, культивируемых в условиях теплиц и оранжерей, и, по-видимому, портулак был источником инфекции для культур этого типа. Аналогично ВМАльт флокс-типа, обнаруженный на растениях открытого грунта, был распространен путем кросс-контаминации инфицированными растениями флокса многолетнего (Hammond and Reinsel, 2015).

2.2. Таксономическое положение и характеристика ВМАльт

ВМАльт относится к роду *Potexvirus* семейства *Alphaflexiviridae* (порядок *Tymovirales*, класс *Alsuviricetes*, тип *Kitrinoviricota*, царство *Orthornavirae*, реалм *Riboviria* (ICTV, релиз 2022). Для работы был использован изолят ВМАльт-MU (Moscow University), определенный на кафедре вирусологии МГУ имени М.В. Ломоносова из образцов зараженных растений, обнаруженных на территории Юго-Восточной Европы, немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig) (Ivanov *et al.*, 2011).

ВМАльт-MU относится к группе изолятов портулак-типа. Геномная РНК ВМАльт-MU имеет длину 6606 нт и содержит 5 открытых рамок считывания (ОРС), характерных для всех представителей рода *Potexvirus*. 5'-проксимальная ОРС кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу (174 кДа). ОРС2, ОРС3 и ОРС4 кодируют три транспортных белка тройного блока генов (молекулярные массы 26 кДа, 12 кДа, 7 кДа), обеспечивающих перемещение вируса через плазмодесмы клеток растений. ОРС5 кодирует БО вируса (22 кДа) (Ivanov *et al.*, 2011).

Как и другие представители рода *Potexvirus* ВМАльт имеет нитевидные вирионы, представляющие собой комплекс геномной РНК, упакованной в спирально уложенные молекулы БО. Средняя длина вирионов ВМАльт-MU

составляет 570 нм, диаметр – 13 нм (Mukhamedzhanova *et al.*, 2011). По данным Geering и Thomas (1999) средняя длина вирионов ВМАльт (изолят ВМАльт-Au) составляет 554 нм, по данным Hammond с соавторами (2006b, изолят ВМАльт-РА) – 536 нм.

2.3. Вирусоподобные частицы на основе белка оболочки ВМАльт

Показано, что БО ВМАльт способен к самосборке в отсутствие РНК *in vitro* при pH 4.0 (0.01 М цитратный буфер) и 8.0 (0.01 М Трис-НСl). При этом образуются нитевидные полимеры – вирусоподобные частицы (ВПЧ) длиной от 60 до 2000 нм. При pH 4.0 большая часть ВПЧ организуется в крупные волокнообразные структуры (Mukhamedzhanova *et al.*, 2011). Самосборка БО ВМАльт в широком диапазоне условий отличает БО ВМАльт от БО других потексвирусов:

- БО ВМП, который формирует ВПЧ *in vitro* в отсутствие РНК только при pH 4.0 (Erickson *et al.*, 1976),
- БО ХВК, который не образует ВПЧ (Kaftanova *et al.*, 1975).
- ВПЧ вируса мозаики нарцисса (ВМН), которые формируются при инкубации в течение 10 дней при комнатной температуре в Трис-НСl, pH 8.0, 0.3М (NH₄)₂SO₄ (Robinson *et al.*, 1975), однако работ, посвященных самосборке и стабильности БО ВМН при других условиях, проведено не было.

Продемонстрировано антигенное родство между вирионами и ВПЧ ВМАльт (Mukhamedzhanova *et al.*, 2011). Антисыворотка к ВМАльт реагирует с ВПЧ ВМАльт и наоборот, антисыворотка к ВПЧ ВМАльт реагирует с нативным вирусом, но серологическая реакция при этом выражена слабее, чем при реакции с гомологичным антигеном. Авторами было высказано предположение, что антигенные детерминанты вирионов и ВПЧ ВМАльт сходны, но не идентичны. Это по мнению авторов может быть связано с тем, что ВПЧ, формирующиеся в отсутствие вирусной РНК, отличаются по своей структуре от нативных вирусных частиц ВМАльт, в результате чего на

поверхности вирусных и вирусоподобных частиц доступны различные для связывания с сывороткой эпитопы БО (Mukhamedzhanova *et al.*, 2011).

В 2021 году была опубликована работа, посвященная сравнению эффективности сборки рекомбинантных БО потексвирусов в растениях в зависимости от используемой РНК-матрицы – нереплицирующегося вектора рEAQ-НТ или реплицирующегося вектора рEff на основе ХВК (Thuenemann *et al.*, 2021). Помимо вывода о большей эффективности рEff вектора для продукции в растениях нуклеокапсидподобных частиц (НПЧ), авторы определили параметры спирали НПЧ ВМАльт на основе рекомбинантного БО и РНК рEff. Важно отметить, что в оригинальной публикации Thuenemann с соавторами используют термин «virus-like particles, вирусоподобные частицы» для частиц, включающих РНК. Для разграничения терминов и удобства читателя в тексте диссертации для содержащих РНК вирусоподобных частиц использовано понятие «нуклеокапсидподобные частицы, НПЧ». С помощью криоэлектронной микроскопии с разрешением 3.3 Å были определены параметры спирали НПЧ ВМАльт: диаметр НПЧ составляет 120 Å, шаг спирали – 41.1 Å, в то время как число субъединиц БО на виток в НПЧ сходно с параметрами для вирионов – 8.8 субъединиц (Thuenemann *et al.*, 2021). Важно отметить, что полученные НПЧ ВМАльт представляют собой искусственную систему, свойства которой могут в значительной степени отличаться от нативных виринов ВМАльт и ВПЧ в отсутствие любой гетерологичной РНК.

На основе данных криоэлектронной микроскопии Thuenemann с соавторами (2021) предложили модель структуры БО ВМАльт, которая согласуется с данными по структуре БО ХВК, БО ВМПеп, БО ВМБ, БО ВМП. БО ВМАльт образован тремя доменами: N-концевой I (а.о. 5-26), коровый II (а.о. 27-155), C-концевой III (а.о. 156-203). Домен I образует структуру типа ручки и участвует во взаимодействии с последующей субъединицей БО. Домен II образован четырьмя α -спиралями и соединяется с доменом III через длинную петлю (а.о. 107-155) с доменом III, содержащим еще одну α -спираль

(а.о. 156-177) и неструктурированный С-концевой регион (а.о. 178-203). Петля между доменами II и III образует пространство для укладки РНК, а протяженный С-концевой участок обращен во внутреннюю поверхность вириона и участвует во взаимодействии БО с другими субъединицами БО в спирали (Thuenemann *et al.*, 2021).

3. СТРУКТУРНО МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЧАСТИЦЫ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ

В 1956 Hart впервые продемонстрировал феномен термической перестройки палочковидных вирионов ВТМ (род *Tobamovirus* семство *Virgaviridae*) в «шарообразные частицы» («ball-like particles»). Продолжение исследований процесса термической перестройки и свойств образующихся структурно модифицированных частиц (СЧ) ВТМ было продолжено только 2010 г. на кафедре вирусологии МГУ имени М.В. Ломоносова (Atabekov *et al.*, 2011). Позднее были опубликованы работы, посвященные образованию СЧ на основе других вирусов растений со спиральным типом симметрии (вирус мозаики долихоса (ВМД), вирус штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ), ХВК (Nikitin *et al.*, 2016a; Трифонова и др., 2017). Кроме того, на примере вируса мягкой мозаики фасоли (род *Carmovirus*, сем. *Tombusviridae*), а также вируса мозаики цветной капусты (род *Caulimavirus*, сем. *Caulimaviridae*) было установлено, что СЧ на основе вирусов растений с икосаэдрическим типом симметрии не образуются (Трифопова и др., 2017). Показано, что СЧ могут быть получены не только из вирионов, но и из белковых структур в отсутствие РНК: из различных форм БО ВТМ (мономеры, димеры, 4S тримеры, 20S диски и реполимеры) (Atabekov *et al.*, 2011), из ВПЧ ВМАльт (Трифопова и др., 2017). Несмотря на разнообразие вирусов, используемых для получения СЧ, часть свойств получаемых частиц (отсутствие РНК, характерные изменения вторичной и третичной структуры БО) не зависит от природы исходного вируса. Тем не менее для разных типов СЧ характерны различные условия получения, наличие связи диаметра с концентрацией исходного вирусного препарата, особенности структурного перехода, которые подробно рассмотрены в этой главе. Кроме того, в главе описаны существующие подходы к применению СЧ ВТМ в области разработки вакцин, платформ для таргетной доставки противоопухолевых препаратов, а также для повышения эффективности контрастирования в магнитно-резонансной томографии.

3.1 Получение и свойства СЧ из вирионов и различных форм БО вирусов растений

В работе Hart для получения СЧ ВТМ был использован водный препарат вирионов ВТМ с концентрацией около 0.5 мг/мл, который был нагрет при температурах в диапазоне 80-98°C (Hart, 1956). В работах, выполненных на кафедре вирусологии, СЧ ВТМ был получен из препарата вирионов различной концентрации (от 0.1 мг/мл до 10 мг/мл) в 0.01 М Трис-НСl буфере рН 7.8 при нагревании до 94°C (Atabekov *et al.*, 2011; Карпова *et al.*, 2012; Трифонова *и др.*, 2015). Показано, что размер образующихся в ходе нагревания СЧ ВТМ строго зависит от исходной концентрации вирусного препарата (Табл. 3), что позволяет получить частицы с требуемым размером от 50 нм до более 1 мкм (Atabekov *et al.*, 2011, Трифонова *и др.*, 2015).

Таблица 3. Зависимость среднего диаметра СЧ от концентрации исходного препарата вирионов различных вирусов растений со спиральным типом симметрии по результатам ПЭМ

Диаметр СЧ, полученных из различных вирусов, нм	Исходная концентрация вируса, мкг/мкл		
	0.1	1	10
СЧ ВТМ (Трифопова, 2013)	100±26	225±56	568±90
СЧ ХВК (Nikitin <i>et al.</i> , 2016a)	48	77	*
СЧ ВШМЯ (Трифопова <i>и др.</i> , 2017)	265±18	280±16	*
СЧ ВМД (Трифопова <i>и др.</i> , 2017)	60±8	310±15	690±60

**Повышение концентрации не приводило к значимому увеличению среднего диаметра СЧ.*

Предположительно, при низкой концентрации исходного вирусного препарата в образовании СЧ принимают участие единичные вирионы, что приводит к формированию СЧ, построенных из молекул белка одной вирусной частицы с объемом, соответствующим объему вириона ВТМ (Hart, 1956;

Atabekov *et al.*, 2011). Размер таких СЧ составляет около 52.6 нм. Вероятно, это минимальный размер СЧ, который можно получить из единичной полноразмерной вирусной частицы ВТМ. Обнаруживаемые в препаратах СЧ с диаметром менее 50 нм, по-видимому, были образованы из обломков вирионов (Atabekov *et al.*, 2011). Из препаратов ВТМ с большей концентрацией (1-10 мг/мл) были получены СЧ бóльшего размера: из препарата ВТМ с концентрацией 1 мг/мл – СЧ с максимальным диаметром 500 нм, из препарата ВТМ с концентрацией 10 мг/мл – до 1300 нм (Трифенова и др., 2015). Вероятно, при повышении концентрации вирусного препарата увеличивается вероятность взаимодействия вирионов друг с другом, что приводит к образованию СЧ большего размера из нескольких вирионов (Atabekov *et al.*, 2011). В различных исследованиях размеры СЧ ВТМ определяли с помощью методов ПЭМ, атомно-силовой микроскопии, динамического рассеяния света и анализа траектории наночастиц (Atabekov *et al.*, 2011; Трифенова и др., 2015). Диаметры СЧ, полученных из одного препарата вируса, которые были определены перечисленными методами, были сопоставимы друг с другом. Было показано, что СЧ на основе вирионов ВТМ, как правило, имеют достаточно узкое распределение по диаметру (Трифенова и др., 2015). Таким образом, изменяя исходную концентрацию вирусного препарата можно получить СЧ требуемого диаметра. Однако помимо концентрации вируса на размер образующихся СЧ ВТМ влияет агрегационное состояние исходного вирусного препарата, а также состав буфера для дифференциального центрифугирования, который был использованы на этапе выделения вируса, и буфера для хранения. При использовании фосфатного буфера практически невозможно получить СЧ диаметром более 70 нм из препарата с концентрацией более 0.1 мг/мл. При термической обработке ВТМ с концентрацией от 1 мг/мл в фосфатном буфере, или ВТМ, при выделении которого на стадии дифференциального центрифугирования использовался фосфатный буфер, структурный переход вирионов ВТМ проходил не полностью, а препараты СЧ были высоко

полидисперсны по размерам. Вероятность агрегации ВТМ в фосфатном буфере выше, что, по-видимому, обуславливает наблюдаемую разницу в размерах. Кроме того, агрегационное состояние зависит от длительности хранения препарата вируса – длительное хранение увеличивает вероятность агрегации и приводит к сдвигу среднего диаметра получаемых СЧ в бóльшую сторону (Трифонова и др., 2015).

При изучении СЧ других вирусов растений с вирионами спирального типа симметрии в виде жесткой палочки были выявлены следующие особенности. Увеличение исходной концентрации ВМД приводит к увеличению диаметра образующихся СЧ ВМД (Табл. 3) (Трифонова и др., 2017). Важно, что зависимость размера СЧ от концентрации исходного препарат сохраняется даже в случае ВМД, препараты которого характеризуются неоднородностью по длине. В препарате помимо длинных вирионов длиной ~300 нм содержатся короткие частицы (~40 нм), несущие в своем составе субгеномную РНК, которая кодирует БО (Трифонова и др., 2017). По-видимому, структурные характеристики вирусов рода *Tobamovirus* определяют существование прямой зависимости диаметра СЧ и концентрации вирионов. В то же время диаметр СЧ ВШМЯ, палочковидного вируса, относящегося к роду *Hordeivirus*, в отличие от СЧ ВТМ и ВМД практически не зависят от изначальной концентрации вируса (Табл. 3) (Трифонова и др., 2017). Авторы предполагают, что это обусловлено гораздо большей гетерогенностью препарата вирионов ВШМЯ по длине и диаметру (Трифонова и др., 2017). 3 молекулы одноцепочечной геномной РНК ВШМЯ упакованы по разным жестким палочковидным вирусным частицам с длиной 110-150 нм. Кроме того, в составе препаратов ВШМЯ присутствуют вирионы с широким (22.4 нм) и узким диаметром (21.6 нм) (Clare *et al.*, 2015).

СЧ были получены не только из вирионов в форме жесткой палочки вирусов семейства *Virgaviridae*, но и из гибких нитевидных вирионов ХВК длиной ~500 нм (Nikitin *et al.*, 2016a). Показано, что при термической

перестройке образуются СЧ ХВК, диаметр которых также практически не зависит от исходной концентрации вируса (Табл. 3). Интересно отметить, что СЧ ХВК при исходной концентрации вируса 0.1 мг/мл имеют наименьший диаметр из всех рассмотренных частиц (Табл. 3), т.е. длина исходного вириона не влияет напрямую на размер полученных структурно-модифицированных частиц.

Продемонстрировано, что СЧ могут быть образованы не только из вирионов, но и из различных вариантов структур на основе БО в отсутствии РНК. СЧ ВТМ были получены из ВПЧ, двуслойных 20S-дисков, А-белка (4S форма), а также мономеров БО ВТМ (Atabekov *et al.*, 2011). В связи с тем, что СЧ могут быть получены при термоденатурации БО ВТМ в форме А-белка или 2S белка, можно сделать вывод, что спиральная структура БО в вирионе или вирусоподобных частицах не является необходимой для преобразования белка оболочки в сферическую частицу (Трифенова, 2013). Установлено, что в результате термической перестройки препаратов различных форм БО ВТМ образуются частицы с широким распределением по размерам – от 35 до 800 нм. По-видимому, это связано с гетерогенностью форм БО ВТМ в растворе: на основе высокомолекулярных ВПЧ ВТМ образуются СЧ большего диаметра, а из мономеров БО формируются наименьшие по размеру СЧ. Исследование диаметра СЧ ВТМ, полученных из препаратов, содержащих БО в форме ВПЧ различной концентрации, показало, что увеличение концентрации с 0.1 мкг/мкл до 1 мкг/мкл практически не приводит к увеличению диаметра образуемых СЧ (Atabekov *et al.*, 2011; Трифенова, 2013). Термическая перестройка мономеров БО ХВК также приводит к образованию СЧ (неопубликованные данные). Образование СЧ из структур, лишенных РНК, было показано для ВПЧ ВМАльт (Трифенова и др., 2017). Известно, что БО ВМАльт не существует в форме мономеров в растворах и присутствует *in vitro* в виде лишенных РНК полимеров – ВПЧ (Mukhamedzhanova *et al.*, 2011).

Аналогично СЧ из ВПЧ ВТМ зависимость размеров СЧ ВМАльт от исходной концентрации ВПЧ ВМАльт не обнаружена (Трифонова и др., 2017).

3.2. Условия термической структурной перестройки

Для термической перестройки ВТМ и получения СЧ необходимо нагревание вирусного препарата до 94°C. При этом успешное формирование СЧ происходит как в водном растворе, так и в буферных системах – 0.01 М Трис-НСl, рН 7.5-8 и в фосфатном рН 7.8 буферах (Трифонова и др., 2015). Тем не менее, предпочтительным для получения СЧ является Трис-НСl буфер, который помогает продлить срок хранения вирусного препарата ВТМ, а также более эффективно контролировать диаметр образующихся СЧ (Трифонова и др., 2015). Большинство последующих работ по исследованию СЧ ВТМ были выполнены по методике, предполагающей использование растворов на основе Трис-НСl буфера (Трифонова и др., 2015; Trifonova *et al.*, 2017; Nikitin *et al.*, 2018b; Ksenofontov *et al.*, 2019; Evtushenko *et al.*, 2020; Ryabchevskaya *et al.*, 2022; Granovskiyy *et al.*, 2022). Было обнаружено, что процесс образования СЧ ВТМ является двухстадийным. На первой стадии, при нагревании вируса до 90°C, происходит сворачивание вириона ВТМ с одного или двух концов и образование промежуточной формы. Последующее повышение температуры до 94°C приводит к 100% преобразованию промежуточных форм в сферические частицы. При дальнейшем нагревании раствора и увеличении температуры инкубации от 94°C до 98°C, получаемые СЧ не изменяли своей морфологии и размеров (Atabekov *et al.*, 2011; Трифонова, 2013). Для получения СЧ из ВШМЯ и ВМД был использован протокол, разработанный ранее для ВТМ, т.е. СЧ ВШМЯ и СЧ ВМД также были получены из препаратов вирионов в буфере Трис-НСl (Трифонова и др., 2017). Было продемонстрировано, что, как и в случае с ВТМ, процесс получения СЧ из ВМД и ВШМЯ является двухстадийным с образованием промежуточной формы при 90°C. Окончательное формирование СЧ ВМД и ВШМЯ происходит при 94°C. При нагревании ВМД и ВШМЯ до 70°C

морфологических изменений вирионов отмечено не было (Трифонова и др., 2017).

СЧ ХВК были получены как из водных растворов вируса, так и из препаратов в Трис-НСl буфере (Nikitin *et al.*, 2016a). Термическая перестройка нитевидных вирионов ХВК начинается при более низких температурах: сворачивание терминальных участков вирионов происходит уже при 70°C, а полностью сформированные СЧ ХВК обнаруживаются при нагревании препарата до 90°C. Таким образом, аналогично ВТМ термическая перестройка ХВК сопровождается переходом через промежуточную форму, представляющую собой частицы гантелевидной формы, однако эта промежуточная форма регистрируется при гораздо более низкой температуре 70°C (Nikitin *et al.*, 2016a). Предполагается, что наблюдаемые температурные различия обусловлены разницей в структуре исходных вирионов. Гибкие длинные вирионы ХВК термически менее стабильны, чем короткие жесткие палочковидные частицы ВТМ (Nikitin *et al.*, 2016a).

Образование СЧ ВТМ из белковых структур (ВПЧ, двуслойных 20S-дисков, А-белка, мономеров БО) происходит при более низкой чем образование СЧ из вируса температуре, 65°C. Авторы объясняют эту особенность тем, что различные формы БО ВТМ являются менее стабильными, чем нативный вирус. СЧ ВТМ из различных форм БО были образованы в условиях, при которых эти формы были получены: СЧ из А-белка в 0.01 М Трис-НСl рН 7.8-8.0; СЧ из 20S дисков в 0.05 М Na-фосфатном буфере рН 7.0; СЧ из ВПЧ в 0.1 М Na-фосфатном буфере рН 5.5-6.0; СЧ из 2S-формы БО при рН 13. Таким образом, получение СЧ ВТМ из различных форм БО не зависит от состава буферного раствора. Кроме того, СЧ ВТМ из различных форм БО образуются одностадийно, переходная форма не была обнаружена (Atabekov *et al.*, 2011; Трифонова, 2013).

Минимальная температура, достаточная для получения СЧ на основе ВПЧ ВМАльт не была установлена. СЧ из ВПЧ были получены в водном растворе по методике, разработанной для СЧ ХВК, предполагающей нагревание до 94°C. Данные о присутствии или отсутствии переходной формы не были получены (Трифонова и др., 2017).

3.3. Структура БО в составе СЧ ВТМ и СЧ ХВК

Биохимический анализ состава СЧ ВТМ показал, что РНК ВТМ не входит в состав частиц, и, вероятно, деградирует в процессе образования сферических частиц (Atabekov *et al.*, 2011). Кроме того, было установлено, что при термической обработке ВТМ белок оболочки вируса не деградирует, а полипептидная цепь БО СЧ соответствует по размеру полипептидной цепи БО в составе ВТМ (Трифонова, 2013). Однако БО, выделенный из СЧ, теряет способность к реполимеризации в Na-фосфатном буфере, что указывает на необратимые изменения в структуре БО при термической перестройке.

Структурные различия БО в составе СЧ и вирионов ВТМ были продемонстрированы с помощью различных подходов. Были установлены различия в устойчивости к обработке ферментами. Так, в отличие от вирионов ВТМ, устойчивых к действию протеолитических ферментов (Fraenkel-Conrat and Singer, 1999), СЧ биodeградируемы (Nikitin *et al.*, 2011), при их обработке протеиназой К происходит протеолиз белка, в то время как вирионы ВТМ устойчивы к действию фермента (Трифонова, 2013). Методом непрямого иммуноферментного анализа были выявлены различия в антигенных свойствах вирионов и СЧ ВТМ. Сыворотка, полученная к СЧ, взаимодействует с вирионами ВТМ, однако с меньшей эффективностью, чем непосредственно с СЧ. Это свидетельствует об изменении антигенных свойств белка в составе СЧ. Тем не менее сферические частицы частично сохраняют возможность взаимодействия с антисывороткой к нативному вирусу, что указывает на сохранение общих поверхностных антигенных детерминант вирионов и СЧ

ВТМ (Atabekov *et al.*, 2011; Трифонова, 2013). Различия в плотности частиц (СЧ ВТМ 1.43 г/см³, вирионы 1.31 г/см³, реполимеры БО 1.19 г/см³), чувствительность к действию протеаз, антигенная специфичность и потеря способности БО в составе СЧ образовывать реполимеры позволяют предположить, что в процессе получения СЧ происходит перестройка вторичной структуры БО, которая в том числе отражается в изменении аминокислотного состава белка, экспонированного на поверхности СЧ.

Исследование вторичной структуры БО СЧ методами кругового дихроизма (КД), флуоресцентной спектроскопии и рамановской спектроскопии показало, что при термической перестройке происходит снижение доли α -спиралей, характерных для БО ВТМ, увеличение содержания β -структуры, а также возрастание доли неупорядоченной структуры (Трифопова, 2013; Dobrov *et al.*, 2014) (Табл. 4). Предсказанная на основе спектра КД вторичная структура БО в составе СЧ ВТМ содержит 14% α -спиралей, 34% β -структуры, 54% неупорядоченной структуры (Табл. 4). Кроме того, по результатам тиофлавинового теста БО в составе СЧ ВТМ имеет амилоидоподобные кросс- β -структуры (Dobrov *et al.*, 2014).

Таблица 4. Изменения вторичной структуры БО в результате термической перестройки

	ВТМ		ХВК	
	БО вирионов	белок СЧ	БО вирионов	белок СЧ
% α -спиралей	50	14	57	14-19
% β -слоев	5	32	16-20	28-33
% неупорядоченных участков	45	54	23-27	48-58

Спектры собственной флуоресценции СЧ характеризуются сдвигом максимума флуоресценции в область более длинных волн по сравнению с вирионами, что свидетельствует о переходе а.о. тирозина и триптофана в более гидрофильное окружение и, следовательно, изменению третичной структуры белка (Dobrov *et al.*, 2014).

Известно, что вирионы ВТМ не имеют на поверхности функционально активных остатков лизина (McCormick & Palmer, 2008), а экспонированный на поверхности N-конец БО ацетилован (Fraenkel-Conrat & Singer, 1999). Это не позволяет модифицировать БО в составе вирионов ВТМ изотиоцианатом флуоресцеина (Fluorescein isothiocyanate, FITC). Напротив, было обнаружено, что СЧ ВТМ эффективно метятся FITC, что подтверждает наличие доступных для взаимодействия а.о. лизина на поверхности СЧ. Таким образом, структура БО в составе вирионов и СЧ различна, что приводит к изменению репертуара аминокислотных остатков, экспонированных на поверхности белка. Эти данные также подтверждаются результатами тритиевой планиграфии (Ksenofontov *et al.*, 2019).

Изучение структуры СЧ, полученных на основе нитевидных вирусов растений, было продолжено на примере СЧ ХВК. Было подтверждено, что, как и в случае с СЧ ВТМ, СЧ ХВК не содержат вирусную РНК. При этом деградации или фрагментации БО ХВК не происходит (Nikitin *et al.*, 2016a). Было установлено, что плотность СЧ ХВК (1.40 г/см³) заметно отличается от полученного значения плотности нативного ХВК (1.29 г/см³). По

предсказанию состава вторичной структуры БО в составе СЧ на основе данных КД-спектров происходят изменения содержания α - и β -структуры, аналогичные наблюдаемым в случае СЧ ВТМ (Табл. 4). Доля α -спиралей БО в составе СЧ ХВК составила от 14 до 19% для разных образцов, а содержание β -структуры - от 28 до 33% (Табл. 4). Результаты теста по взаимодействию тиофлавина Т с СЧ ХВК были очень близки к результатам, полученным для СЧ ВТМ (Dobrov *et al.*, 2014). В случае СЧ ХВК наблюдалось увеличение пиков флуоресценции при 490 нм, подтверждающее наличие в белке СЧ ХВК кросс- β -структур. Сходство показанные свойств СЧ ХВК и СЧ ВТМ позволяет сделать вывод об общей природе структурных изменений, происходящих с БО вирусов при термической перестройке (Nikitin *et al.*, 2016a).

Полученные данные о структурных различиях вирионов и СЧ ХВК свидетельствуют о том, что трансформация вириона в СЧ сопровождается изменениями состава аминокислотных остатков на поверхности СЧ, что должно выражаться в изменении антигенной специфичности СЧ ХВК. С использованием метода непрямого иммунофлуоресцентного анализа было показано, что СЧ ХВК и вирионы являются антигенно близкими. Следовательно, несмотря на конформационные изменения БО в составе СЧ ХВК, большая часть эпитопов сохраняется неизменными, что отличает СЧ ХВК от СЧ ВТМ, где только часть эпитопов вирионов остаются на поверхности СЧ (Nikitin *et al.*, 2016a).

Таким образом, СЧ, полученные из палочковидных вирионов ВТМ, имеют ряд отличий от СЧ, полученных из нитевидных вирионов ХВК. По-видимому, это является отражением различий свойств исходных частиц.

3.4. Применение СЧ ВТМ при разработке вакцинных препаратов

СЧ ВТМ обладает высокой стабильностью в различных условиях (Atabekov *et al.*, 2011). СЧ ВТМ стабильны при лиофилизации (Ksenofontov *et al.*, 2019). При этом также была доказана возможность частичного протеолиза СЧ ВТМ при воздействии протеинкиназы К, что подтверждает их биodeградируемость (Nikitin *et al.*, 2011). Перечисленные свойства являются преимуществом этих частиц с точки зрения их применения в качестве компонента вакцин.

Поверхность СЧ ВТМ обладает высокими адсорбционными свойствами (Karova *et al.*, 2012). Для СЧ ВТМ продемонстрирована возможность связывания целевых полипептидов размером от 17 до 66.5 кДа (Atabekov *et al.*, 2011; Karova *et al.*, 2012). Предположительно связывание с поверхностью СЧ происходит за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий (Atabekov *et al.*, 2011). Также продемонстрирована способность СЧ к адсорбции икосаэдрических вирусов растений и животных со средним диаметром от 26 до 50 нм (Trifonova *et al.*, 2014). СЧ ХВК, как и СЧ ВТМ, обладают адсорбционными свойствами. Методом иммунофлуоресцентной микроскопии было подтверждено образование комплексов СЧ ХВК с БО ВТМ (Nikitin *et al.*, 2016a). Важно, что для всех перечисленных комплексов было продемонстрировано сохранение антигенной специфичности адсорбированных белков или вирусов (Karova *et al.*, 2012, Trifonova *et al.*, 2014; Nikitin *et al.*, 2016a). Возможность адсорбции молекул интереса на поверхности СЧ и сохранение их антигенной специфичности в составе комплексов с СЧ стали основой для исследования потенциала применения СЧ в качестве платформы-адьюванта.

В 2017 году на основе комплексов антигена вируса краснухи с СЧ ВТМ был создан прототип вакцины против краснухи (род *Rubivirus*, семейство *Togaviridae*) (Trifonova *et al.*, 2017). Было доказано, что уровень антител к

антигену после иммунизации комплексом (СЧ + белок) как минимум в 10 раз превышает уровень антител после иммунизации свободным белком или смесью белка с адьювантом на основе гидроксида алюминия. Важно отметить, что предложенная кандидатная вакцина на основе СЧ ВТМ абсолютно безопасна, не реактогенна по сравнению с вакциной, содержащей аттенуированные вирионы вируса краснухи (Karova&Nikitin, 2022). Помимо адьювантных свойств было показано, что СЧ ВТМ могут усиливать протективный эффект вакцины. На примере широко применяемой ветеринарной вакцины против бешенства «Рабикан» было продемонстрировано увеличение протективного эффекта при добавлении СЧ к препарату вакцины (Nikitin *et al.*, 2018a). На основе полученных данных об иммуностимулирующих свойствах СЧ ВТМ и их способности повышать протективность вакцинных препаратов были предложены кандидатные вакцины против вируса гриппа птиц (Кондакова и др., 2017), ротавирусной инфекции, COVID-19 на основе комплексов сферических частиц с тремя рекомбинантными белками, содержащими различные последовательности S-белка SARS-CoV-2. Иммуностимулирующий эффект СЧ ВТМ был изучен в рамках сравнения различных адьювантов в смеси с инактивированным вирусом Пуумала (семейство *Orthohantavirus*, порядок *Bunyavirales*). Было показано, что в отличие от гидроксида алюминия, который не оказал влияния на иммунный ответ, СЧ ВТМ значительно усиливали выработку антител (Kurashova *et al.*, 2020).

СЧ ВТМ могут быть использованы не только как адьюванты, но также и в качестве стабилизирующего компонента вакцинного препарата. Так, на примере рекомбинантного протективного антигена (РА, $M_r=83$ кДа) *Bacillus anthracis*, который в свободном виде характеризуется низкой стабильностью, было показано увеличение стабильности белка в комплексе с СЧ ВТМ (Ryabchevskaya *et al.*, 2021). Позже на основе комплексов модифицированного РА (rРА) с СЧ ВТМ была предложена кандидатная вакцина против сибирской

язвы (Granovskiy *et al.*, 2022). Таким образом, на примере широкого круга антигенов различной природы и физико-химических характеристик была доказана эффективность применения СЧ ВТМ в качестве компонента вакцинных препаратов.

3.5. *Применение СЧ ВТМ в противоопухолевой терапии*

Исследование потенциала применения СЧ ВТМ в качестве системы таргетной доставки препаратов к опухолевым клеткам было начато в западном резервном университете Кейза США (Bruckman *et al.*, 2016). На примере СЧ ВТМ и доксорубицина были получены 2 варианта композиций: 1) конъюгат СЧ с доксорубицином и 2) доксорубицин, инкапсулированный в СЧ при термической перестройке. Для получения второго варианта композиций исходные вирионы ВТМ были смешаны с доксорубицином и нагреты в течение 30 секунд при 96°C. В результате были получены СЧ, содержащие нековалентно связанный доксорубицин. По результатам спектроскопии в обоих случаях с одной сферической частицей было связано от 800 до 1800 молекул доксорубицина. В экспериментах с клеточными линиями рака молочной железы MDA-MB-231 и MCF-7 было подтверждено, что доксорубицин сохраняет противоопухолевую активность. Несмотря на отсутствие в *in vitro* экспериментах статистически значимых различий между активностью свободного и инкапсулированного/конъюгированного с СЧ доксорубицина, по мнению авторов исследования, можно ожидать, что белковая платформа-носитель (СЧ) сможет обеспечить преимущество при доставке доксорубицина *in vivo* (Bruckman *et al.*, 2016). Авторы предлагают модифицировать поверхность СЧ для обеспечения тканеспецифической доставки, а также оптимизации фармакокинетических параметров, что в результате позволит снизить дозировку препарата (Bruckman *et al.*, 2016).

Способность СЧ инкапсулировать целевые вещества была использована Сарарсо с соавторами (2023) для получения СЧ из вируса мягкой зеленой

мозаики табака (Tobacco mild green mosaic virus, сем. *Virgaviridae*, род *Tobamovirus*), содержащих пестицид (ивермектин), токсичный для нематод. Известно, что свободный препарат сорбируется в поверхностных слоях почвы и не достигает зоны обитания нематод. Однако при упаковке ивермектина в СЧ вируса мягкой зеленой мозаики табака происходит повышение эффективности проникновения пестицида в ризосферу (Carasco *et al.*, 2023). Таким образом, СЧ могут быть использованы для совершенствования подходов борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур.

Помимо применения СЧ ВТМ в качестве платформы для доставки предлагается использовать сферические частицы без дополнительных модификаций для индукции противоопухолевого иммунитета. Murray с соавторами (2018) на примере клеточных линий меланомы исследовали способность СЧ индуцировать противоопухолевый иммунитет при непосредственном введении в опухоль (*in situ* вакцинация). Аналогичный эксперимент был проведён с вирионами ВТМ, короткими фрагментами вирионов ВТМ (длина 50 нм), со свободным БО ВТМ и вирусом мозаики коровьего горошка (ВМКГ). Было обнаружено, что наиболее эффективно индукцию противоопухолевого иммунитета стимулирует ВМКГ. Тем не менее, для СЧ, полноразмерных вирионов ВТМ и укороченного ВТМ было продемонстрировано замедление роста опухоли и увеличение общей выживаемости. Авторы предполагают, что мультивалентная структура вирионов и ВПЧ вирусов растений вне зависимости от их формы и размера имеет ключевую роль в активации врождённого иммунитета путём стимуляции паттерн-распознающих рецепторов (Pattern recognition receptors) (Murray *et al.*, 2018).

Таким образом, структурно модифицированные частицы на основе вирусов растений представляют собой перспективный инструмент для решения разнообразных задач в области биомедицины, в том числе вакцинологии и диагностики в связи с простотой их получения,

биodeградируемостью, безопасностью для человека и млекопитающих, уникальными адсорбционными свойствами, возможностью различных модификаций, а также высоким иммуностимулирующим потенциалом. Получение и изучение новых типов СЧ на основе ВМАльт поможет расширить область применения СЧ. Кроме того, исследование СЧ на основе вирионов и ВПЧ ВМАльт позволит получить новые данные о структуре вирусных и вирусоподобных частиц и о влиянии их строения на структурный переход и свойства получаемых СЧ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Материалы

1.1. Реактивы

В работе использовали следующие химические реактивы и коммерческие препараты: бромистый этидий, бромфеноловый синий, Кумасси бриллиантовый синий (G-250), полиэтиленгликоль (ПЭГ, M_r 6000), N,N'-метиленбисакриламид, уранилацетат, β -меркаптоэтанол – производства фирмы «Serva» (Германия). Сульфит натрия, глицерин, ацетат калия – производства фирмы «Лаверна строй инжиниринг» (Россия). Уксусная кислота – производства фирмы ЗАО «Мосреактив» (Россия). Додецилсульфат натрия (ДСН), фотозащитная добавка 1,4 диазобикакло-[2,2,2]октан, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , NaCl и NaOH, агароза (low celling temperature), флуоресцеин изотиоционат (Fluorescein isothiocyanate, FITC), HEPES – фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Персульфат аммония – фирмы «ICN» (США). Трипсин – фирмы «Promega» (США). Глицин, Трис, ЭДТА (натриевая соль), сахароза, триптон – фирмы «Gerbu» (Германия). Хлорид натрия, хлорид лития, твин-20, Тритон X-100 – фирмы «Helicon» (Россия). Целит, бычий сывороточный альбумин (БСА) – фирмы «MP Biomedicals» (США). Фенол водный, N,N,N,N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED) – фирмы «Acros organics» (США). Хлороформ, уксусная кислота – фирмы «Химмед» (Россия). Формвар – фирмы «SPI-Chem» (США). Малеимид – фирмы Chem-Impex Int'L Inc (США). Акриламид, гидрохлорид гуанидина, дезоксихолат натрия, мочевины, имидазол – фирмы «PanReac AppliChem ITW Reagents» (Испания). Изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) – фирмы «Anatrace» (США). Дитиотреитол – фирмы Fluka (Швейцария). Дрожжевой экстракт – фирмы Диаэм (Россия).

1.2. Клеточные линии

U87MG – клетки линии глиобластомы человека

(<https://www.atcc.org/products/htb-14>)

M19 – клеточная линия нормальных фибробластов (Dudich *et al.*, 1998).

Также в работе использовали первичные короткоживущие линии клеток саркомы Юинга ES36 и T46, полученные в процессе резекции.

Для накопления рекомбинантных белков использовали штамм SG13009 (Qiagen) *Escherichia coli*.

1.3. Питательные среды и антибиотики

Клетки опухолевых линий культивировали на среде DMEM (ПанЭко, Россия) с 10% содержанием фетальной бычьей сыворотки (FBS, Fetal bovine serum, HyClone/Termofisher, США) и добавлением 1% стрептомицина и пенициллина (ПанЭко, Россия).

Клетки *E. coli* выращивали в жидкой среде 2YT (1.6% триптон, 1% дрожжевой экстракт, 0.5% NaCl). Для приготовления селективных питательных сред использовали антибиотики ампициллин и канамицин (61-176-RG, Corning) в конечной концентрации 100 мкг/мл и 50 мкг/мл, соответственно.

1.4. Растворы и буферы

Трис-ацетатный буфер (ТАЕ) для проведения электрофореза в агарозном геле: 40 мМ Трис-ацетатный буфер (pH 8,0), содержащий 2 мМ ЭДТА и бромистый этидий в концентрации 0.5 мг/л.

Трис-глициновый буфер (ТГБ) для проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле (pH 8,4): 25 мМ Трис, 192 мМ глицин, 0.1% ДСН.

Буфера для нанесения образцов на ПААГ-гель (62.5 мМ Трис-HCl pH 6.8, 15% глицерин, 2.26% ДСН, 713 мМ β-меркаптоэтанол, 0.04% краситель бромфеноловый синий),

Раствор для окрашивания белковых гелей: 0.22% Кумасси бриллиантовый синий G-250, 40% этанол, 8% уксусная кислота.

PBS (pH 7.4): 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1.76 мМ KH₂PO₄.

Буферы для выделения белков в градиенте рН:

Буфер А (рН 8.0) – 6 М Гуанидин-НСl, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Трис-НСl;

Буфер В (рН 8.0) – 8 М мочеви́на, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Трис-НСl;

Буфер С (рН 6.3) – 8 М мочеви́на, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Трис-НСl;

Буфер D (рН 5.9) – 8 М мочеви́на, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Трис-НСl;

Буфер E (рН 4.5) – 8 М мочеви́на, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Трис-НСl;

Буфер F (без доведения рН) – 8 М мочеви́на, 200 мМ уксусная кислота.

Буферы для выделения белков в градиенте имидазола:

Стартовый буфер – 0.05 М Трис-НСl, рН 7,8; 0.3 М NaCl;

Буфер с 0.03 М имидазолом – 0.05 М Трис-НСl, рН 8,0; 0.3 М NaCl; 0.03 М имидазол;

Буфер с 0.25 М имидазолом – 0.05 М Трис-НСl, рН 8,0; 0.3 М NaCl; 0.25 М имидазол);

Буфер с 0.5 М имидазолом – 0.05 М Трис-НСl, рН 8.0; 0.3 М NaCl; 0.5 М имидазол.

Для приготовления большинства растворов использовали деионизованную воду Milli-Q (Simplicity UV, Merck Millipore, Дармштадт, Германия)

1.5. Коммерческие наборы, препараты и реактивы

В работе использовали антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с флуорофором Alexa 546 фирмы «Invitrogen» (США).

Наборы маркерных белков фирмы «Thermo scientific» 14.4-116.0 кДа (#26610) и 10-250 кДа (#26620).

2. Методы

2.1. Заражение растений ВМАльт

Для заражения растений в качестве инокулюма использовали сок инфицированных ВМАльт замороженных побегов *Portulaca grandiflora*, которые растирали в 0.01 М Трис-НСl, рН 7.5. При заражении растений *Nicotiana benthamiana* один лист (размером ~7-8 см) механически натирали инокулюмом в присутствии целита в качестве абразива. В случае заражения растений портулака *P. grandiflora* поверхность листа натирали жесткой щеткой, смоченной в инокулюме. Накопление вируса в растениях осуществляли в течение 30 дней.

2.2. Выделение и очистка препарата ВМАльт

Для выделения ВМАльт зараженные растения *P. grandiflora* или листья заражённых растений *N. benthamiana* замораживали на -20°С. Все операции по выделению вируса проводили на льду.

Гомогенизировали замороженный зеленый материал с помощью ножевого гомогенизатора в буфере, содержащем 0.3 М глицин-КОН, 1% Na₂SO₃, рН 7.5 (3 мл буфера на 1 г листьев). После гомогенизации отжатый через марлю сок осветляли при 12 000 об./мин., в течение 30 минут (центрифуга Beckman J2-21, ротор JA-14, Beckman Coulter, Брея, Калифорния, США). После осветления фильтровали сок через синтетический материал Miracloth фирмы Millipore (США). К осветлённому соку добавляли тритон Х-100 до конечной концентрации 1% и выдерживали в течение 20 минут, после чего добавляли ПЭГ (M_r 6000) до конечной концентрации 5% и NaCl до конечной концентрации 2%.

После растворения компонентов раствор выдерживали в течение ночи при +4°С. Образовавшийся осадок вируса отделяли центрифугированием при 10 000 g в течение 20 минут и сохраняли при +4°С. К супернатанту добавляли

ПЭГ (M_r 6000) до конечной концентрации 8% и оставляли на ночь в холодильнике при +4°C. Образовавшийся осадок вируса отделяли центрифугированием при 10 000g в течение 20 минут и объединяли его с полученным накануне осадком вируса.

Экстракцию полученного осадка проводили 2-3 раза в течение 2-6 часов на качалке во льду (до полного растворения осадка) буфером, содержащим 0.05 М Трис-НСl, 0.01 М ЭДТА, рН 8.0. Полученный экстракт осветляли центрифугированием при 10 000g в течение 20 минут. Супернатанты сохраняли и в дальнейшем проверяли наличие вируса методом 8-20% ПААГ-ЭФ.

Раствор вируса ультрацентрифугировали (центрифуга Hitachi CP100WX, Япония) в роторе P70AT при 40 000 об./мин. или в роторе P50AT при 35 000 об. /мин. в течение 3 часов. Полученный осадок растворяли в буфере для экстракции и осветляли центрифугированием (10 000 g, 20 минут).

Второй цикл дифференциального центрифугирования проводили с использованием сахарозной подушки (30 %, по 2 мл, приготовленной на буфере для экстракции) в роторе P70AT при 40 000 об./мин. в течение 4 часов. Вирусный осадок растворяли в 0.025 М Трис-НСl буфере, рН 8.0. Полученный раствор вируса осветляли центрифугированием при 10 000 g в течение 20 мин. Концентрацию вируса определяли спектрофотометрически ($E_{260\text{нм}} 0.1\% = 3.0$, $OD_{260}/OD_{280} = 1.3-1.4$) на бесцветном спектрофотометре NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, США). Вирусный препарат хранили при +4°C в течение месяца, для длительного хранения препараты замораживали при -20°C.

2.3. Выделение БО ВМАльт

БО ВМАльт выделяли с помощью метода солевой депротеинизации в 2М LiCl. После добавления LiCl раствор перемешивали и помещали на -20°C на

ночь, после чего проводили центрифугирование на холоду при 10 000 об./мин. в течение 15 минут (центрифуга «Eppendorf 5415D», Германия). Полученный супернатант диализовали против Milli-Q в течение 4 часов, проводя смену воды каждый час. Отдиализованный белок осветляли при +4°C при 10 000 об./мин. в течение 15 минут. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции $E_{260\text{nm}} 0.1\% = 1.2$.

2.4. Выделение РНК

РНК выделяли методом стандартной фенольной депротеинизации по Френкель-Конрату с соавторами (Fraenkel-Conrat *et al.*, 1961) с некоторыми модификациями. Перед началом работы сферические частицы, полученные при нагревании препарата вирионов ВМАльт с концентрацией 1 мг/мл, осаждали при помощи низкоскоростного центрифугирования (ЦФ) (2800 об./мин., Microspin FV-2400, Biosan, Латвия) в течение 5 минут. Далее осадок СЧ_{вир} (структурно модифицированных частиц из вирионов ВМАльт) ресуспендировали в равном объеме Milli-Q и использовали для выделения РНК. К 500 мкл препаратов ВМАльт или СЧ с концентрацией 1 мг/мл добавляли равный объем фенола, смесь тщательно перемешивали в течение 15 минут на шейкере Eppendorf Mixer 5432 (Германия) и центрифугировали 15 минут при 10 000 об./мин. при комнатной температуре (Minispin, Eppendorf, Германия). После центрифугирования супернатант сохраняли, а интерфазу и осадок промывали небольшим объемом воды (около 300 мкл) и повторяли первый этап очистки фенолом. Супернатант, полученный после второго центрифугирования объединяли с полученным ранее. К объединенным супернатантам добавляли равный объем фенола, вновь перемешивали, центрифугировали. К образовавшемуся супернатанту добавляли три объема спирта с 0.03 М ацетатом натрия рН 5.0 и оставляли на ночь при -20°C. Далее РНК переосаждали три раза (10 000 об./мин. в течение 15 минут), осадок высушивали и растворяли в Milli-Q. Спектрофотометрический анализ РНК проводили,

используя коэффициент экстинкции $E_{260\text{нм}} 0,1\% = 25.0$, при соотношении $E_{260\text{нм}} 0,1\% / E_{280\text{нм}} 0,1\% = 2.0$.

2.5. Электрофоретический анализ белков в денатурирующем полиакриламидном геле

К препарату анализируемого белка добавляли 3-4 объёма буфера для нанесения, после чего пробу нагревали в течение 5 минут при 96°C в настольном термостате Термит (ДНК-Технология, Россия).

Электрофорез проводили в пластинах ПААГ в соответствии с методом Лэммли (Laemmli, 1970). Концентрирующий гель содержал 3.8% акриламид, 0.1% N,N'-метиленабисакриламид, 125 мМ ТрисHCl pH 6.8, 0.1% ДСН в качестве денатурирующего агента. С целью улучшения разрешающей способности использовали пластины разделяющего геля с линейным градиентом концентрации акриламида 8-20% и N,N'-метиленабисакриламида 0.08-0.2%, гель также содержал 375 мМ Трис-HCl pH 8.8 и 0.1% ДСН.

Пробы вносили в лунки верхнего геля. В качестве стандартов молекулярной массы использовали наборы маркерных белков фирмы «Thermo scientific» 14.4-116.0 кДа (#26610) и 10-250 кДа (#26620). Электрофорез проводили в приборе Mini-PROTEAN Tetra Cell фирмы «Bio-Rad» (размер геля 83x73x1 мм) в ТГБ-буфере, pH 8.4 при постоянном напряжении 200В в течение часа. Гель окрашивали Кумасси G-250 в течение 20 минут. Отмывку проводили путем кипячения геля в воде, после чего гель фотографировали с помощью системы документирования ChemiDoc XRS+; молекулярные массы белков оценивали методом линейной регрессии с помощью программного обеспечения ImageLabTM (версия 2.0.1) («Bio-Rad», США).

2.6. Электрофоретический анализ нуклеиновых кислот в агарозном геле

Анализ нуклеиновых кислот осуществляли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, приготовленном на буфере TAE. Для подготовки образца

раствор исследуемой нуклеиновой кислоты смешивали с бх буфером для нанесения (R0611, Thermo Fisher Scientific). Электрофорез проводили в мини-камере для горизонтального электрофореза SE-1 (Helicon, Россия) при постоянном напряжении 70 В. После завершения электрофореза для выявления РНК гель визуализировали с помощью системы детекции ChemDOC XRS+ («Bio-Rad», США).

2.7. Просвечивающая электронная микроскопия

Исследуемые препараты сорбировали на медных сетках для электронной микроскопии, покрытых коллодиевой пленкой с углеродным напылением, в течение 45 секунд, после чего сетки негативно контрастировали 2% раствором уранилацетата в течение 8 секунд. Наблюдения проводили с помощью электронного микроскопа JEM-1400 (JEOL, Япония) при напряжении 80 кВ с цифровой фотокамерой Olympus Quemesa, используя программное обеспечение Olympus Soft Imaging Solutions GmbH (Германия). Анализ размеров вирионов, вирусоподобных частиц (ВПЧ) и СЧ ВМАльт проводили с помощью программы Image J (Национальный институт здоровья, США).

Изображения, которые в дальнейшем использовались для построения 3D реконструкций, получали с помощью аналитического просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 (JEOL, Япония) и цифровой камеры ULTRASCAN-1000 (GATAN, США) при увеличении 40 000 и дефокусе 1,5-2,8 мкм.

2.8. Криоэлектронная микроскопия

Препараты вирионов и ВМАльт разводили в 0.025 М Трис-НСl, рН 7.5 до конечной концентрации 1.5 мг/мл. Разведенные препараты в объеме 3.5 мкл наносили на предварительно гидрофилизированные сетки для криоэлектронной микроскопии Quantifoil 1.2/1.3 (Quantifoil Micro Tools GmbH, Германия), покрытые углеродной подложкой. Сетки промакивали с помощью фильтровальной бумаги, чтобы удалить излишки жидкости и

замораживали в жидком этане, используя систему экспресс заморозки Vitrobot (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы анализировали с помощью электронного микроскопа Tecnai G12 Spirit Twin (Thermo Fisher Scientific, США) и CCD камеры 4x4 Eagle (Thermo Fisher Scientific, США) при ускоряющем напряжении 120кВ в режиме низкой дозы ($20-25 \text{ e}^- / \text{Å}^2$) с дефокусом 0.8-3.5 мкм.

2.9. Обработка изображений для получения 3D реконструкций и определения параметров спирали вирионов и ВПЧ ВМАльт

Обработку изображений, полученных как в условиях негативного контрастирования, так и изображений, полученных в условиях криоэлектронной микроскопии, проводили с помощью пакета программного обеспечения SPRING (Desfosses *et al.*, 2014). Полученные в ходе электронной микроскопии одиночных частиц снимки были разрезаны в программе EMAN helixboxer (Tang *et al.*, 2007) были разрезаны на квадратные сегменты размером 100*100 пикселей с перекрытием 360 Å. Частотно-контрастная характеристика (CTF, contrast transfer function) была определена для каждой микрофотографии с использованием программы CTFFIND3 (Mindell & Grigorieff, 2003). Таким образом было получено 1180 кадров для ВПЧ и 230 для вирионов ВМАльт. Далее все вирионы были разделены на 10 классов (~ 22 частицы в каждом классе), а ВПЧ – на 50 классов (~ 22 частицы в каждом). Для всех сумм классов было проведено преобразование Фурье.

Чтобы определить параметры вирусной спирали, были построены трехмерные реконструкции с низким разрешением при использовании различных значений углов (от 34 до 44 Å с шагом 0.1 Å) и подъема спирали (от 8 до 10 Å с шагом 0.01 Å).

Шаг спирали оценивали по 50 лучшим реконструкциям, основываясь на среднем индексе взаимной корреляции. Определение количества субъединиц на спираль проводили на основе анализа амплитуды корреляции между средним по классу и повторным проецированием трехмерных моделей.

Последующее улучшение реконструкции проводилось в 50 итерациях, пока разрешение карты электронной плотности не перестало улучшаться.

Разрешение окончательных трехмерных реконструкций оценивалось с помощью объемной корреляции Фурье (FSC, Fourier shell correlation) с использованием критерия 0.143. Визуализацию карт электронной плотности (3D реконструкция) проводили с помощью программы Chimera 1.9 (Goddard *et al.*, 2007). Для получения карты различий электронной плотности 3D реконструкции вирионов и ВПЧ ВМАльт были выровнены относительно их оси симметрии, после чего проводилось вычитание. Полученная карта различий была наложена на 3D реконструкцию ВПЧ ВМАльт в Chimera 1.9 (Goddard *et al.*, 2007).

2.10. Анализ стабильности вирионов и ВПЧ ВМАльт в различных условиях

Для изучения стабильности вирионов и ВПЧ ВМАльт они были проинкубированы при комнатной температуре в течение 30 минут в:

- 1) Milli-Q
- 2) 0.15 М NaCl
- 3) 0.01 М Трис-НСl, рН 7,5
- 4) 0.01 М Трис-НСl, 0,15 М NaCl, рН 7,5
- 5) сыворотке крови лабораторных животных

Затем проинкубированные в различных условиях частицы сорбировали на медных сетках для электронной микроскопии, покрытых коллодиевой пленкой, и проводили анализ морфологии и степени агрегации вирионов и ВПЧ ВМАльт методом ПЭМ.

2.11. Лиофилизация

Образцы для лиофилизации объемом ~200 мкл замораживали при -70°C в пробирках на 1.5 мл. ВПЧ и СЧ_{ВПЧ} были заморожены в Milli-Q, СЧ_{вир} – в 15 mM NaCl, вирионы – в 12.5 mM Трис-НСl, рН 8. Лиофилизацию проводили до полной возгонки растворителя на вакуумном центробежном охлаждаемом концентраторе CentriVar (Labconco, США).

2.12. Мечение изотиоцианатом флуоресцеина

Мечение частиц FITC (46950 Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 мг/мл проводили на основе стандартной методики рекомендованной производителем. Реакцию связывания проводили в течение ночи при +4°C. Для удаления несвязанной метки полученную смесь диализовали в течение 4 часов против PBS, а затем 1 час против воды.

2.13. Мечение диацетатом флуоресцеин-малеимида

Мечение частиц проводили в соответствии с методикой, описанной Nanda&Lorsch (2014). Частицы, для которых проводили реакцию мечения, на первом этапе переводили в реакционный буфер путем диализа (20 мМ HEPES–KOH, pH 7.4; 100 мМ ацетат калия, pH 7.4). К частицам добавляли метку в молярном соотношении 10:1 и инкубировали в отсутствии света при +4°C в течение ночи при аккуратном перемешивании. Для удаления несвязанной метки проводили диализ при +4°C сначала в течение 3 часов против буфера для хранения, а затем после смены буфера в течение ночи (20 мМ HEPES–KOH, pH 7.4; 100 мМ ацетат калия, pH 7.4; дитиотреитол 2мМ; глицерин 10%).

2.14. Флуоресцентная микроскопия

Помеченные флуоресцентной меткой частицы наносили на покровные стекла, предварительно покрытые формваровой подложкой. Для устойчивой флуоресценции использовали фотозащитную добавку 1,4-диазобицикло-[2,2,2]октан (DABCO). Анализ проводили с помощью флуоресцентного микроскопа «Axiovert 200M» (Carl Zeiss, Германия) с интегрированной камерой «ORCAII-ERG2» (Hamamatsu, Япония). Для визуализации клеток использовали систему EVOS M5000, (Thermo Fisher Scientific, США).

2.15. Обработка вирусных и вирусоподобных частиц ВМАльт трипсином

Для трипсинолиза вирусных и вирусоподобных частиц ВМАльт использовали следующее соотношение вирионов или ВПЧ и фермента: на 1 мг белка – 10 нг фермента. Реакцию проводили в 0.01 М Трис-НСl, рН 8.0 (в объеме 30 мкл) в течение 1 часа при 37 °С согласно Rodionova с соавторами (2003). Реакцию останавливали добавлением двухкратного объема буфера для нанесения на ПААГ. После чего пробы прогревали 5 минут при +96 °С и проводили электрофорез в пластинах ПААГ в соответствии с методом Лэммли (Laemmli, 1970).

2.16. Измерение спектров кругового дихроизма

Спектры кругового дихроизма (КД) и внутренней флуоресценции ВПЧ, СЧ_{ВПЧ} измеряли в Milli-Q, СЧ_{вир} – в 15 мМ NaCl, вирионов – в 12.5 мМ Трис-НСl, рН 8.0 с использованием дихрографа «Chiroscan» (Applied Photophysics, Великобритания). КД спектр регистрировали в области 200-260 нм в кюветах толщиной 1-2 мм при температуре 25°С. Концентрация препаратов для анализа составляла 0.1-0.3 мкг/мкл. Спектры КД записывались со скоростью 0.5-1.0 нм/с вычитанием базовой линии и отображали в величинах молярной эллиптичности. Полученные спектры были сглажены с использованием программного обеспечения Pro Data. Расчет значений $[\theta]$ проводили, принимая молекулярную массу аминокислоты за 110. Для термического анализа каждый препарат нагревали в кюветном отделении дихрографа от 40 до 85 °С со скоростью 1 °С в минуту. Регистрацию каждого нового спектра начинали после увеличения температуры на 3 °С.

2.17. Флуоресцентная спектроскопия

Спектры внутренней флуоресценции регистрировали в 1 см кюветах с помощью спектрофотометра FluoroMax (HORIBA Jobin Yvon, США) при 25°С.

Возбуждение флуоресценции проводили при 280 нм, а спектры излучения регистрировали в диапазоне 300-400 нм.

В экспериментах с тиофлавином Т к препаратам вирионов, ВПЧ, СЧ_{ВПЧ} и СЧ_{вир} добавляли свежеприготовленный тиофлавин Т до конечной концентрации 0.05 М. Для измерения спектров эмиссии в области 450-600 нм использовали свет с длиной волны 445 нм. Измерения проводили с помощью спектрофотометра «FluoroMax» (HORIBA Jobin Yvon, США).

2.18. Получение структурно модифицированных частиц (СЧ) ВМАльт

Для получения СЧ_{ВПЧ} и СЧ_{вир} ВМАльт 50 мкл исходного препарата вирионов или ВПЧ в заданной концентрации нагревали в пробирках объемом 0.5 мл в термоциклере «Терцик» (ДНК-Технология, Россия) с использованием программного обеспечения «TherCус» версии 2.4 (ДНК-Технология, Россия), регулируемую температуру стадий термообработки:

1. В течение 90 секунд ячейка плавно нагревается с 10 до 98 °С.
2. Поддержание в ячейке температуры 98°С в течение 30 секунд.
3. Плавное охлаждение ячейки термоциклера в течении 90 секунд до 10°С.

Для получения СЧ_{ВПЧ} использовали водный раствор ВПЧ ВМАльт, для получения СЧ_{вир} – раствор вирионов в 0.15 М NaCl.

2.19. Экспрессия рекомбинантных белков в бактериальной системе

Для экспрессии генов, кодирующих рекомбинантные белки, использовали штамм *E. coli* SG13009. Для этого использовали трансформированные бактериальные клоны, содержащие целевую плазмиду pQE-Co1 для экспрессии белка Co1 и pTM для экспрессии белка TM2e. Конструкции pQE-Co1 и pTM были получены ранее в нашей лаборатории.

Плазмида pTM получена путем клонирования нуклеотидных последовательностей, кодирующих консервативные M2e-эпитопы

структурного белка М2 различных штаммов вируса гриппа А, специфических для птиц и человека, в вектор pQE30 (Qiagen, Германия). Продуцент высевали в объеме 6 мл культуральной среды 2YT с добавлением селективных антибиотиков. Клетки инкубировали на качалке c24 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, США) в течение 14-16 часов при +37°C (180 об./мин.). Полученную ночную культуру пересеивали в больший объем питательной среды (200 мл 2YT с добавлением ампициллина и канамицина) и культивировали на качалке при +37°C в течение 3 часов. Затем к культуре клеток добавляли индуктор биосинтеза целевого белка – ИПТГ (00194, Chem-Impex Int'l Inc., Вуд Дейл, Иллинойс, США) до концентрации 2 мМ. Индуцированную культуру выращивали в течение 4 часов на качалке при +37°C. Далее клеточную культуру центрифугировали при 5000 об./мин. в течение 10 минут (ротор JA-14, центрифуга Beckman J2-21, Beckman Coulter, Брея, Калифорния, США) при +4°C. Полученные осадки использовали для выделения рекомбинантного белка.

2.20. Выделение рекомбинантных белков

2.20.1. Выделение TM2e

Осадки суспендировали в 0.05 М Трис-НСl рН 7.8 (10 мл буфера на 1 г осадка), содержащем фенилметилсульфонил фторид в концентрации 0.001 М в качестве ингибитора сериновых протеаз. Полученную суспензию клеток подвергали ультразвуковой дезинтеграции на ультразвуковом гомогенизаторе Q500 (QSonica, США), параметры: 150 циклов с продолжительностью работы 2 секунды и интервалами 6 секунд. Лизат клеток осветляли низкоскоростным центрифугированием 20 минут при 12 000 об./мин. (ротор JA-14, центрифуга Beckman J2-21, Beckman Coulter, Брея, Калифорния, США) при +4°C. Согласно результатам электрофореза в 8-20% ПААГ целевой белок TM2e содержится преимущественно в супернатанте, образующемся после низкоскоростного центрифугирования, что свидетельствует о том, что целевой белок экспрессируется в растворимой форме. Для последующих стадий выделения и

очистки использовали полученный описанным способом супернатант с добавлением NaCl до итоговой концентрации 0.3 М.

Для выделения и очистки TM2e из супернатанта проводили металл-хелатную хроматографию с применением Ni²⁺-нитрилотриацетатной агарозы (Ni-NTA) в качестве сорбента. Супернатант был нанесен на колонку, содержащую 0.8 мл сорбента, предварительно уравновешенного стартовым буфером (0.05 М Трис-НСl, рН 7,8; 0.3 М NaCl). Сорбцию белка на Ni-NTA агарозе осуществляли не менее часа. Далее промывали агарозу стартовым буфером (объемом не менее десятикратного объема сорбента), затем буфером, содержащем 0.03 М имидазол (0.05 М Трис-НСl, рН 8,0; 0.3 М NaCl; 0.03 М имидазол) объемом не менее пятикратного объема сорбента. Элюцию проводили буфером, содержащем 0.25 М имидазол (0.05 М Трис-НСl, рН 8,0; 0.3 М NaCl; 0.25 М имидазол), в объеме 1-1.5 объемов сорбента. Инкубировали Ni-NTA агарозу с элюирующим буфером в течение 10 минут, затем собирали целевую фракцию. Наиболее прочно связанные с сорбентом молекулы белка были элюированы буфером с 0.5 М имидазолом (0.05 М Трис-НСl, рН 8,0; 0.3 М NaCl; 0.5 М имидазол) в объеме равным двум объемам сорбента.

2.20.2. Выделение Co1

Собранный клеточный осадок суспендировали в 5 мл буфера А с добавлением дезоксихолата натрия до концентрации 0.2% и лизировали при комнатной температуре при перемешивании 140 об./мин. на качалке Biosan PSU-10i (Латвия) при комнатной температуре в течение 1 часа. Полученный лизат центрифугировали при 9000 об./мин. в течение 15 минут (ротор JA-14, центрифуга Beckman J2-21, Beckman Coulter, Брея, Калифорния, США). Полученный супернатант наносили на колонку с сорбентом Ni-NTA агарозой объемом 0.8 мл, уравновешенную буфером А. Проводили сорбцию белка в течение 1 часа. Далее промывали колонку буфером А с дезоксихолатом натрия (0.2%) (10 мл) и затем буфером А без дезоксихолата натрия (10 мл). Белок элюировали понижением рН, последовательно промывая колонку буфером В

(8 мл), буфером С (10 мл), буфером D (2 мл), буфером E (5 мл) и буфером F (6 мл), собирая фракции объемом 1 мл. По окончании хроматографии фракции анализировали на наличие целевого белка с помощью ПААГ-ЭФ по методу Лэммли (Laemmli, 1970).

2.21. Очистка рекомбинантных белков

Выделенные путем металл-хелатной хроматографии белки переводили в водный раствор путем диализа. Для диализа использовали диализные мешки Servapor (SERVA Electrophoresis GmbH, Германия) диаметром 6 и 12 мм и порами, пропускающими молекулы с массой 12-14 кДа. Диализ проводили против MilliQ (соотношение раствор белка/вода 1:250) в течение 4 часов, при этом смена воды осуществлялась каждый час. Отдиализованный белок был осветлен низкоскоростным центрифугированием при +4°C (13,2 тыс. об./мин., 15 мин; центрифуга Eppendorf 5415D, Германия).

Теоретические молекулярные массы (M_r , кДа), изоэлектрические точки (pI) и коэффициенты экстинкции ($E_{0,1\%}$) рекомбинантных белков рассчитывали с использованием веб-сервиса PROTPARAM (Swiss Institute of Bioinformatics, <http://expasy.org/>).

2.22. Получение композиций СЧ ВМальт с целевым белком

Комплексы СЧ_{вир}-ТМ2е и СЧ_{ВПЧ}-ТМ2е были приготовлены путем простого смешивания СЧ с белком в массовом соотношении 10:1 в воде Milli-Q; смесь была проинкубирована в течение ночи при комнатной температуре. Формирование комплексов СЧ_{вир}-ТМ2е и СЧ_{ВПЧ}-ТМ2е детектировали с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии.

2.23. Иммунизация и получение сывороток

Для получения поликлональной мышинной антисыворотки к белку интереса ТМ2е проводили трёхкратную иммунизацию белой беспородной мыши с промежутком в две недели. Препарат вводили внутривентрально,

проба содержала 10 мкг белка интереса в 100 мкл PBS, а также равный объем адьюванта Фрейнда. Для первой иммунизации использовался полный адьювант Фрейнда, для двух последующих – неполный адьювант Фрейнда. Через две недели после третьей иммунизации проводили отбор крови из хвостовой вены. Отобранный образец крови инкубировали два часа при комнатной температуре, затем – ночь при +4°C. На следующий день сыворотку центрифугировали на максимальной скорости в течение 5 минут (Minispin, Eppendorf, Германия). Супернатант отбирали и использовали для иммунофлуоресцентной микроскопии.

2.24. Иммунофлуоресцентная микроскопия

Комплексы СЧ с ТМ2е наносили на покровные стекла, предварительно покрытые формваровой подложкой. Инкубировали с блокирующим раствором (PBS с 1% БСА, содержащий 0.05% твин-20) в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем стёкла обрабатывали первичными антителами – мышиной поликлональной антисывороткой к ТМ2е. Разведение первичных антител в блокирующем растворе составляло 1:100. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение часа. Не связавшиеся антитела удаляли путем трехкратной отмывки в течение 5 минут в растворе PBS с 0.25% бычий сывороточный альбумин (БСА), 0.05% твин-20 на качалке Biosan PSU-10i (Латвия) (80 об/мин). Далее наносили вторичные антитела, конъюгированные с флуорофором Alexa 546 («Invitrogen», США) и разведенные в блокирующем растворе в соотношении 1:100. Инкубацию со вторичными антителами проводили в течение 30 минут, после чего не связавшиеся антитела отмывали аналогично тому, как это проводили после инкубации с первичными антителами. После чего комплексы инкубировали в PBS на качалке в течение дополнительных 5 минут и ополаскивали стекла Milli-Q. Покровные стекла с препаратами монтировали поверх предметных стёкол. Между предметным стеклом и препаратом наносили фотозащитную добавку 1,4 диазобицикло-[2,2,2]октан и затем анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа

«Axiovert 200M» (Carl Zeiss, Германия), снабжённого интегрированной камерой «ORCAII-ERG2» (Hamamatsu Photonics, Япония).

2.25. Биоконъюгация рекомбинантного белка к ВПЧ, СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ}

К 100 мкл очищенного рекомбинантного белка Со1 с концентрацией 1 мкг/мкл, растворенном в 0.1-кратном PBS буфере добавляли последовательно 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид (EDC) и N-гидроксисукцинимид (NHS) до конечной концентрации 2мМ и 5мМ соответственно. Далее в пробирку добавляли равный объем частиц для конъюгации – ВПЧ (3 мкг/мкл), СЧ_{вир} (1мкг/мкл) и СЧ_{ВПЧ} (1 мкг/мкл). Смесь инкубировали в течение часа при комнатной температуре, после чего переставляли на +4°C и инкубировали при энергичном перемешивании в течение 2 часов. Результаты конъюгации оценивали с помощью электрофореза в ПААГ.

2.26. Адсорбция СЧ ВМАльт на клетках

Адсорбцию проводили на четырех линиях клеток ES36, T46 (саркома Юинга), U87 (глиобластома человека) и M19 (фибробласты человека) в планшете (Biologix Europe GmbH, Германия) на 48 лунок. Для этого за сутки до начала эксперимента планшет засеивали клетками (рабочий объем 500 мкл, концентрация клеток 20 000 клеток на лунку) с предварительным подсчетом количества живых клеток в камере Нойбауэра.

Для этого из суспензии клеток отбирали аликвоту объемом 10 мкл, к которой добавляли 10 мкл 0.4% трипанового синего (ПанЭко, Россия), реактива, окрашивающего погибшие клетки. Клетки с красителем аккуратно пипетировали, затем отбирали 8-10 мкл для создания мокрого препарата в камере Нойбауэра. Камера Нойбауэра представляет собой специальное предметное стекло с нанесенной разметкой: четыремя большими квадратами, каждый из которых разделен на 16 квадратов меньшего размера. В каждом из больших квадратов подсчитывали общее количество клеток и количество

погибших клеток. Полученные данные усредняли по большим квадратам камеры, которые принимали за повторный подсчет. Общее количество клеток в изначальной пробе рассчитывали по формуле:

$$((n_1+n_2+n_3+n_4)/4) * 2 * 10^4 * 2$$

где n_1 - n_4 – количество живых клеток в каждом из четырех больших квадратов камеры.

Для адсорбции использовали помеченные FITC СЧ_{ВПЧ} в количестве $1,3 \cdot 10^9$ и $4,5 \cdot 10^{10}$ частиц/лунка, СЧ_{вир} – в количестве $1,3 \cdot 10^9$ частиц/лунка. Размеры и концентрацию СЧ определяли методом анализа траекторий наночастиц (Nanoparticle tracking analysis) с использованием прибора NanoSight NS500 и программным обеспечением NanoSight NTA 2.3 (NanoSight, Великобритания). Разведения частиц готовили в безсыывороточной среде для уменьшения агрегации нано частиц и предотвращения конкурентного связывания сыыворотки с клеточными рецепторами. Перед добавлением СЧ клетки также отмывали безсыывороточной средой. Адсорбцию проводили в течение часа при температуре $+4^\circ\text{C}$ в отсутствии света в стерильном ламинаре по стандартному протоколу для адсорбции СЧ на клетках (Shukla *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021). В данных условиях не происходит эндоцитоз, за счет чего становится возможным наблюдать результат адсорбции без вклада других типов взаимодействия (Shukla *et al.*, 2020). Далее среду, содержащую СЧ, отбирали, клетки трижды отмывали стерильным PBS в объеме 500 мкл/лунка и добавляли безсыывороточную среду в объеме 500 мкл.

Регистрацию результатов адсорбции проводили с использованием зеленого лазера (длина волны 561нм) на флуоресцентном микроскопе EVOS M5000 (ThermoFisher, США). Для каждой лунки снимали 5 полей в двух каналах: оптической микроскопии и флуоресцентной микроскопии с зеленым лазером, результаты обсчитывали при помощи программного обеспечения

ImageJ (Национальный институт здоровья, США). Эксперимент проводили в двух биологических повторностях.

2.27. Проникновение СЧ ВМАльт в клетки

Эксперимент по изучению возможности проникновения СЧ в опухолевые клетки проводили на первичной короткоживущей культуре клеток саркомы Юинга (ES36) и фибробластах человека (M19) в качестве контроля. Для этого за сутки до начала эксперимента клетки засеивали в 24-х луночный планшет (Biologix Europe GmbH, Германия) (рабочий объем 500 мкл, концентрация клеток 40 000 клеток на лунку) с предварительным подсчетом количества живых клеток в камере Нойбауэра по описанной выше методике. В эксперименте использовали помеченные FITC СЧ_{ВПЧ} в количестве $1,3 \cdot 10^9$ и $4,5 \cdot 10^{10}$ частиц/лунка, СЧ_{вир} – в концентрации $1,3 \cdot 10^9$ частиц/лунка. Разведения частиц готовили в безсыывороточной среде. Перед добавлением разведенных СЧ клетки также отмывали 500 мкл безсыывороточной среды.

К клеткам добавляли 250 мкл СЧ_{ВПЧ} и СЧ_{вир} и инкубировали в CO₂-инкубаторе BD Avantgarde Line (Binder, Германия) при температуре 37°C в течение 5 часов, что соответствует модифицированному проколу, описанному в работе Bruckman с соавторами (2016). После инкубации отбирали среду, содержащую свободные СЧ, и трижды отмывали клетки 500 мкл PBS. Клетки снимали с лунок по стандартной методике с использованием 0.25% раствора трипсина (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) в растворе Версена (ПанЭко, Россия). Полученную суспензию клеток центрифугировали 5 минут на скорости 500 об./мин. (Minispin, Eppendorf, Германия). Осадок клеток переводили в PBS. Результаты трансдукции фиксировали с использованием зеленого лазера (длина волны 561 нм) на проточном цитофлуориметре Sony SH800 (Sony Biotechnology, США). Анализ каждого образца останавливали по достижении 10 000 событий, зафиксированным прибором.

2.28. Иммуноцитохимическое окрашивание

Культуру клеток саркомы Юинга ES36 после инкубации в течение 5 часов с $СЧ_{\text{вир}} 1,3 \cdot 10^9$ частиц/лунка и последующей отмывки фиксировали в 4% растворе параформальдегида в PBS 1.5 часа. Затем проводили трехкратную отмывку 0.01M PBS и обрабатывали клетки 0.1% Тритон X-100 в течение 10 минут для пермеабиллизации мембран. Затем отмывали детергент и обрабатывали культуру блокирующим раствором на основе 0.01 M PBS, содержащим 3% козьей сыворотки и 0.1% Tween. Инкубировали клетки с блокирующим раствором в течение 1 часа и проводили стандартную отмывку. Для окрашивания ядер и полимерных актиновых структур использовали Hoechst 33342 (R37605, Thermo Fisher Scientific, США) родамин-фаллоидин (R415, Thermo Fisher Scientific, США) соответственно. Анализ окрашенных препаратов проводили с помощью системы визуализации EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве контролей использовали клетки без добавления $СЧ_{\text{вир}}$, а также клетки, окрашенные Hoechst.

2.29. Статистический анализ

Статистические различия в размерах $СЧ_{\text{ВПЧ}}$ и $СЧ_{\text{вир}}$, полученных в различных концентрациях, были проанализированы с использованием одностороннего ANOVA с использованием *post-hoc* Tukey HSD теста. Вероятности (p-value) менее 0.05 считались значимыми. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

Спектры КД записывались три-пять раз, усреднялись и сглаживались с помощью программного обеспечения Pro Data. Были проведены два независимых эксперимента. Данные о составе вторичных структур рассчитывались как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего в двух экспериментах.

В случае анализа внутренней флуоресценции и тиофлавинового теста было проведено три независимых эксперимента. Максимумы флуоресценции рассчитывались как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

Анализ результатов адсорбции проводили при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ordinary one-way ANOVA, GraphPad Prism 9.5.1) с тестом множественного сравнения Тьюки. Значения вероятности (p-value) менее 0.05 считали значимыми. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. СТРУКТУРА ВИРИОНОВ И ВПЧ ВМАЛЬТ

Объектом данного исследования является вирус мозаики альтернантеры (ВМАЛЬТ) – представитель рода *Potexvirus* семейства *Alphaflexiviridae* (порядок *Tymovirales*, класс *Alsuviricetes*, тип *Kitrinoviricota*, царство *Orthornavirae*, реалм *Riboviria*) (ICTV, релиз 2022). Для работы был использован изолят ВМАЛЬТ-MU (Moscow University), определенный на кафедре вирусологии МГУ имени М.В. Ломоносова из образцов зараженных растений Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig). Предположительно, растительный материал был заражен вирусом мозаики папайи (ВМП), однако при секвенировании кДНК было установлено, что последовательность геномной РНК относится к ВМАЛЬТ (Ivanov *et al.*, 2011).

Средняя длина вирионов ВМАЛЬТ-MU составляет 570 нм, диаметр – 13 нм (Mukhamedzhanova *et al.*, 2011). Вирион ВМАЛЬТ представляет собой спиральную структуру, образованную белком оболочки (БО), между витками которой упакована молекула геномной РНК. Показано, что БО ВМАЛЬТ способен к самосборке *in vitro* в отсутствие РНК при pH 4.0 и 8.0 с образованием нитевидных полимеров – вирусоподобных частиц (ВПЧ), морфологически сходных с нативными вирионами ВМАЛЬТ. Было продемонстрировано антигенное родство между вирионами и ВПЧ ВМАЛЬТ и высказано предположение, что антигенные детерминанты вирионов и ВПЧ ВМАЛЬТ сходны, но не идентичны. Авторы предположили, что ВПЧ, формирующиеся в отсутствие вирусной РНК, отличаются по своей структуре от нативных вирусных частиц ВМАЛЬТ, в результате чего на поверхности вирусных и вирусоподобных частиц доступны различные эпитопы БО (Mukhamedzhanova *et al.*, 2011).

Нитевидные частицы вируса мозаики папайи (ВМП), образованные БО ВМП и гетерологичной РНК были получены ранее при экспрессии мутантных

форм БО (БО с пятью делетированными аминокислотными остатками на N-конце – CPAN5; БО с заменой E128A) в клетках *Escherichia coli*. Для описания этих частиц Tremblay с соавторами (2006) использовали термин «нуклеокапсидподобные частицы» (НПЧ, nucleocapsid-like particles). На примере вирионов и НПЧ ВМП было косвенно продемонстрировано, что вирусные частицы дикого типа и НПЧ морфологически сходны по данным электронной микроскопии – характеризуются одинаковым диаметром и формой. Однако по результатам трипсинолиза НПЧ на основе CPAN5 деградируют при обработке ферментом в отличие от вирионов ВМП. НПЧ на основе БО с заменой E128A стабильны в экспериментах с трипсинолизом, однако отличаются от вирионов по спектрам кругового дихроизма при термической денатурации (Tremblay *et al.*, 2006). Таким образом, Tremblay с соавторами (2006) продемонстрировали различия в структуре между вирионами и НПЧ ВМП, образованными гетерологичной РНК и мутантной формой БО. Эти данные могли служить лишь косвенным указанием на структурные различия между вирионами и НПЧ ВМАльт, которые в отличие от НПЧ ВМП образованы БО дикого типа и не включают нуклеиновую кислоту.

На первом этапе работы была поставлена задача исследования структурных различий морфологически сходных вирионов и НПЧ ВМАльт.

1.1. Сравнение структуры НПЧ и вирионов ВМАльт на основании эффективности мечения их поверхности флуоресцентными красителями

Для сравнения структуры поверхности вирионов и НПЧ ВМАльт было проведено их мечение по а.о. лизина и цистеина изотиоцианатом флуоресцеина (Fluorescein isothiocyanate, FITC) и диацетатом флуоресцеин-малеимида (5-(N-Maleimido)-fluorescein diacetate) соответственно.

В составе БО ВМАльт присутствует восемь остатков лизина, доступных для мечения FITC и два остатка цистеина, доступных для мечения диацетатом флуоресцеин-малеимида. Мечение целевых аминокислотных остатков БО в

составе вирионов и ВПЧ позволяет сделать вывод о том, что эти аминокислотные остатки экспонированы на поверхности БО. В то же время, различия в эффективности мечения БО вирионов и ВПЧ могут свидетельствовать о сходстве или различии в составе исследуемых аминокислотных остатков, расположенных на поверхности морфологически сходных белковых спиралей ВПЧ и вирионов.

При проведении электрофореза с последующей детекцией 1) в УФ-свете флуоресценции меченного БО в составе вирионов и ВПЧ ВМАльт и 2) окрашиванием Кумасси G-250 были получены следующие результаты. При мечении FITC БО в составе ВПЧ ВМАльт (**Рис. 2А, дорожки 2, 3**) метится эффективнее чем, в вирионах (**Рис. 2А, дорожки 4, 5**). Аналогичные результаты были получены при мечении диацетатом флуоресцеин-малеимида (**Рис. 3**): интенсивность флуоресценции БО в составе ВПЧ ВМАльт (**Рис. 3А, дорожка 4**) выше уровня флуоресценции БО в составе вирионов (**Рис. 3А, дорожка 3**). Данные результаты указывают, что на поверхности БО в составе ВПЧ ВМАльт расположено большее количество доступных для мечения остатков лизина и цистеина. Таким образом, БО, в составе морфологически сходных вирионов и ВПЧ ВМАльт, имеет различную конформацию и различный состав экспонированных на поверхности аминокислотных остатков.

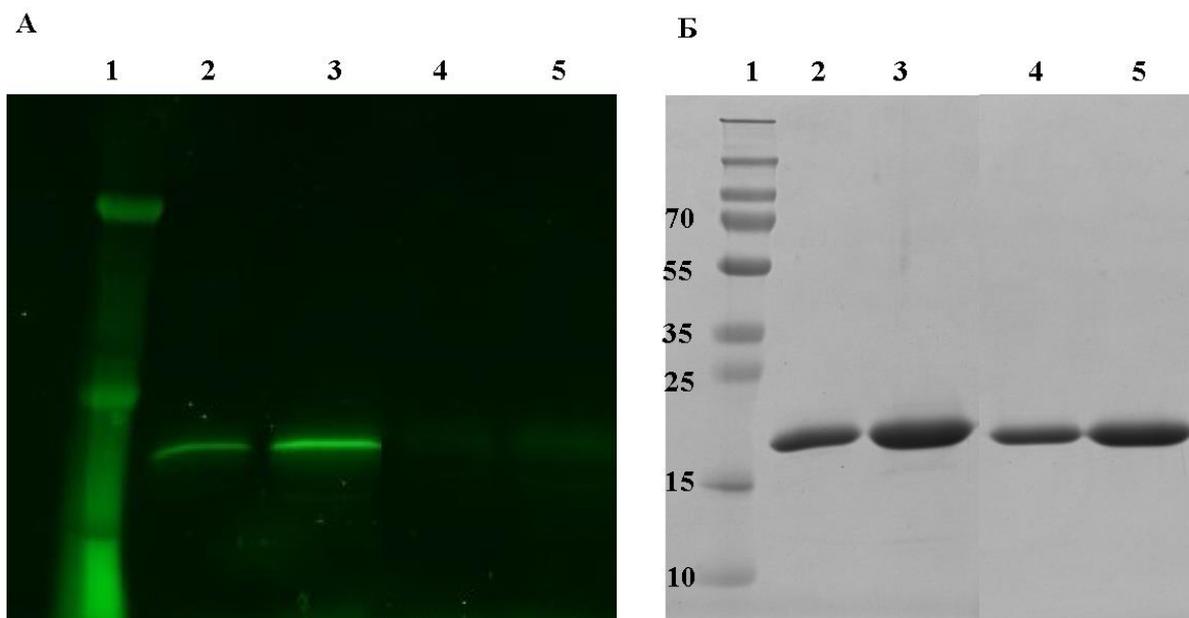


Рис. 2. Сравнение эффективности мечения вирионов и ВПЧ ВМАльт FITC. А – детекция в УФ, Б – окрашивание Кумасси G-250. 1 – маркеры молекулярной массы (кДа), 2, 3 – ВПЧ ВМАльт, 4, 5 – вирионы ВМАльт. Анализ методом электрофореза в 8-20% ПААГ.

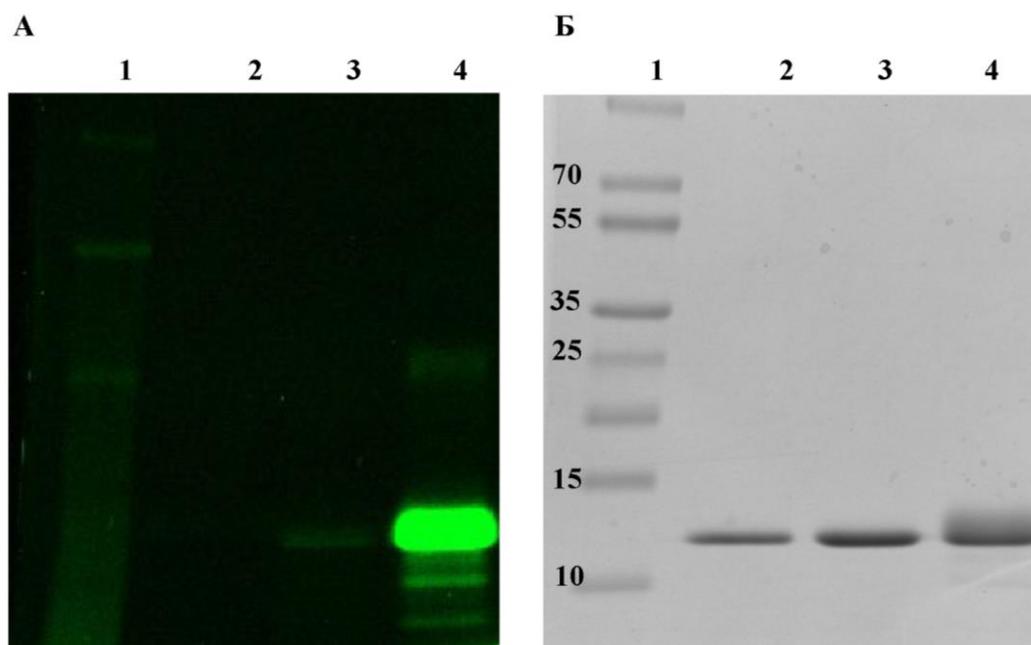


Рис. 3. Сравнение эффективности мечения вирионов и ВПЧ ВМАльт диацетатом флуоресцеин-малеимида. А – детекция в УФ, Б – окрашивание Кумасси G-250. 1 – маркеры молекулярной массы (кДа), 2 – немеченные вирионы ВМАльт, 3 – меченные вирионы ВМАльт, 4 – ВПЧ ВМАльт. Анализ методом электрофореза в 8-20% ПААГ.

1.2 Сравнение структуры ВПЧ и вирионов ВМАльт методом трипсинового теста

Дополнительным подходом, позволяющим подтвердить существование различий в структуре белковой спирали вирионов и ВПЧ ВМАльт, является трипсиновый тест, разработанный ранее в нашей лаборатории (Rodionova *et al.*, 2003). Известно, что трипсин гидролизует пептиды по участкам полипептидной цепи, содержащим а.о. лизина и аргинина, которые могут быть экранированы от воздействия фермента, когда белок уложен в спиральную структуру вирусного капсида. Поэтому ранее метод обработки трипсином был использован для анализа состояний БО ХВК: этот подход позволял четко определить, находится ли БО в свободном состоянии, в виде мономеров или димеров, или же собран в спиральный вирусный капсид (Rodionova *et al.*, 2003). Позднее этот подход был применен для сравнения вирионов ВМП и НПЧ из различных мутантных БО (Tremblay *et al.*, 2006), что позволило авторам подтвердить структурные различия между морфологически сходными НПЧ из БО с делетированным N-концом (CPAN5) и НПЧ из БО с заменой E128A.

В настоящей работе трипсиновый тест впервые был использован для сравнительного анализа структуры морфологически идентичных вирионов и ВПЧ ВМАльт. Согласно расчетам сервиса, PeptideCutter SIB Swiss Institute of Bioinformatics (<https://www.expasy.org/resources/peptidecutter>) в составе БО ВМАльт (Ivanov *et al.*, 2011) присутствует 12 потенциальных сайтов гидролиза трипсина. В соответствии с полученной электрофореграммой (**Рис. 4**), БО в составе необработанных (**Рис. 4, дорожка 2**) и обработанных трипсином вирионов (**Рис. 4, дорожка 3**) имеет одинаковую молекулярную массу. Следовательно, трипсин не гидролизует БО в составе вирионов ВМАльт, что, по-видимому, обусловлено недоступностью свободных сайтов протеолиза для фермента. Напротив, обработка трипсином ВПЧ ВМАльт приводит к частичному гидролизу БО с образованием набора более коротких пептидов

(Рис. 4, дорожка 5) по сравнению с необработанными ВПЧ ВМАльт (Рис. 4, дорожка 4).

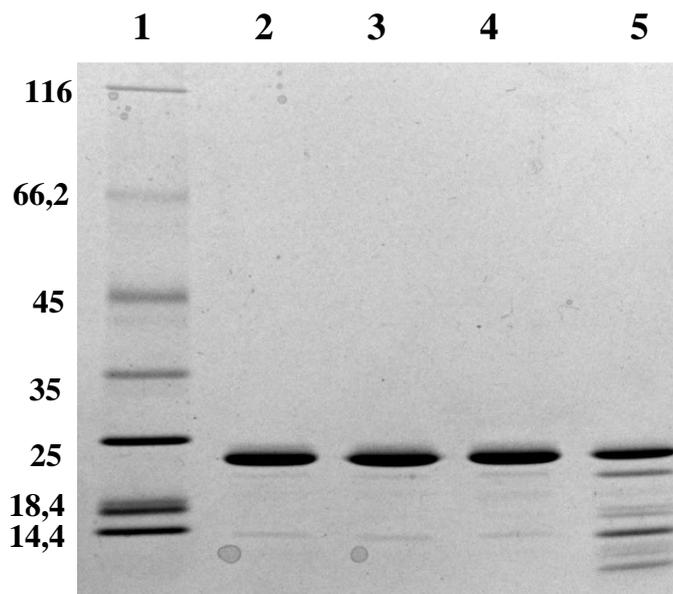


Рис. 4. Анализ структуры вирионов и ВПЧ ВМАльт методом трипсинового теста. 1 – маркеры молекулярной массы (кДа), 2 – вирионы ВМАльт, 3 – вирионы ВМАльт, обработанные трипсином 4 – ВПЧ ВМАльт 5 – ВПЧ ВМАльт, обработанные трипсином. Количество материала во всех пробах 2 мкг. Электрофорез в 8-20% ПААГ.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

При исследовании необработанных и обработанных трипсином вирионов и ВПЧ ВМАльт методом ПЭМ визуальных морфологических различий не обнаружено (Рис. 5). Обработанные трипсином в течение часа ВПЧ по-прежнему идентичны морфологически необработанным вирусным частицами.

Тем не менее, результаты электрофоретического анализа обработанных трипсином вирионов и ВПЧ ВМАльт подтверждают, что укладка БО в составе ВПЧ отличается от укладки в нативном вирионе, несмотря на сходную морфологию частиц. Репертуар доступных для гидролиза трипсином аминокислотных остатков БО ВМАльт изменяется в зависимости от структуры белковой спирали – вирионов или ВПЧ.

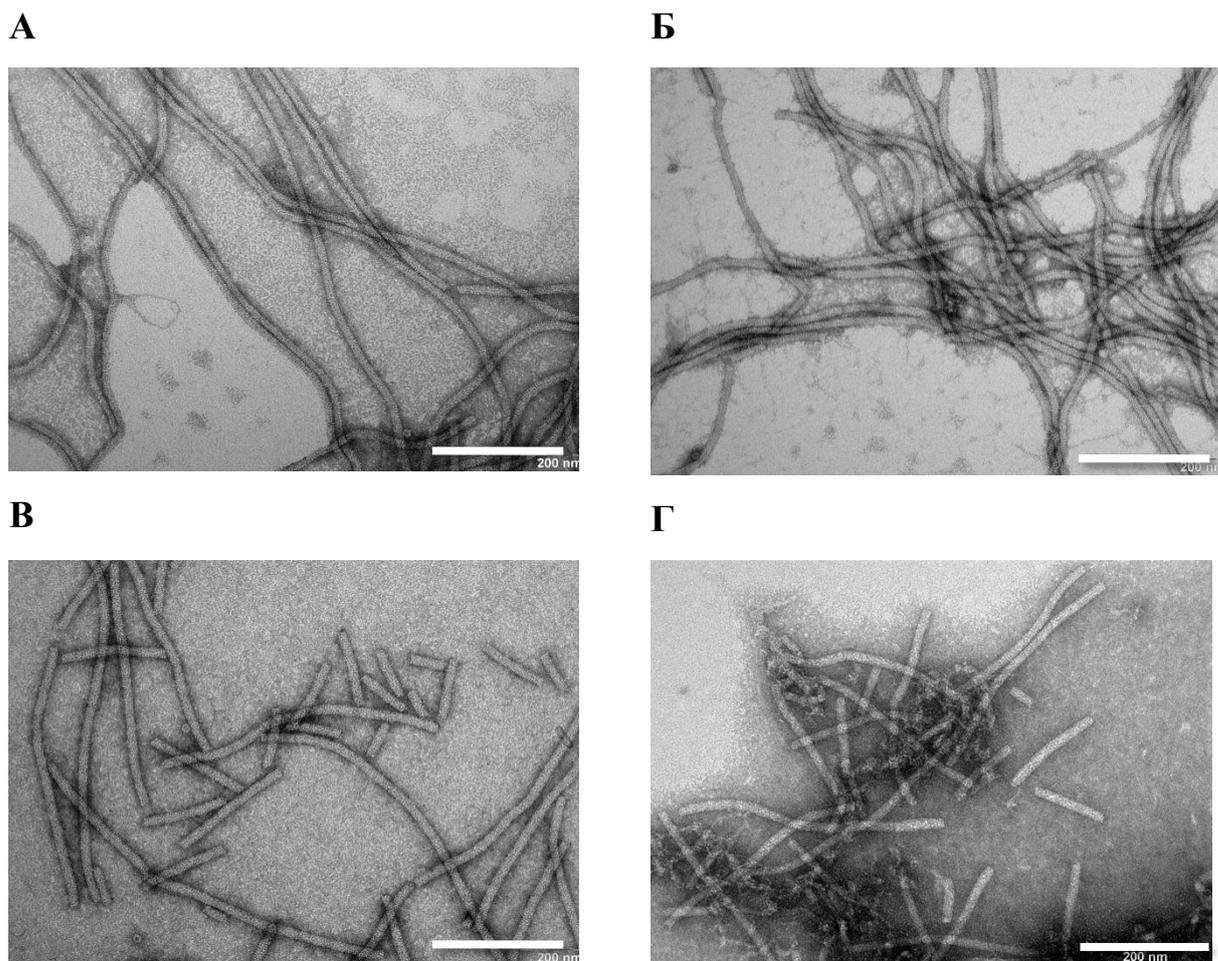


Рис. 5. Сравнение морфологии необработанных и обработанных трипсином вирионов и ВПЧ ВМАльт. А – вирионы ВМАльт, Б – вирионы ВМАльт, обработанные трипсином, В – ВПЧ ВМАльт, Г – ВПЧ ВМАльт, обработанные трипсином. ПЭМ, контрастирование 2% уранилацетатом, масштабная метка 200 нм.

1.3 Сравнение структуры ВПЧ и вирионов ВМАльт с помощью методов электронной и криоэлектронной микроскопии

Для прямого подтверждения продемонстрированных выше косвенными методами структурных различий вирионов и ВПЧ ВМАльт было проведено исследование их тонкой структуры с помощью метода криоэлектронной микроскопии.

Согласно полученным результатам, диаметр вирионов ВМАльт, измеренный, как после негативного контрастирования, так и в условиях криоэлектронной микроскопии, составляет 135 Å (Рис. 6А, Б). С помощью

программного обеспечения SPRING были определены параметры спирали капсида: шаг спирали – 35,7 Å, количество субъединиц БО на виток – 8,75. В области, соответствующей диаметру 60 Å, локализуется вирусная РНК (Табл. 5). РНК связана с субъединицами БО и уложена между ними (Рис. 7А).

Таблица 5. 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

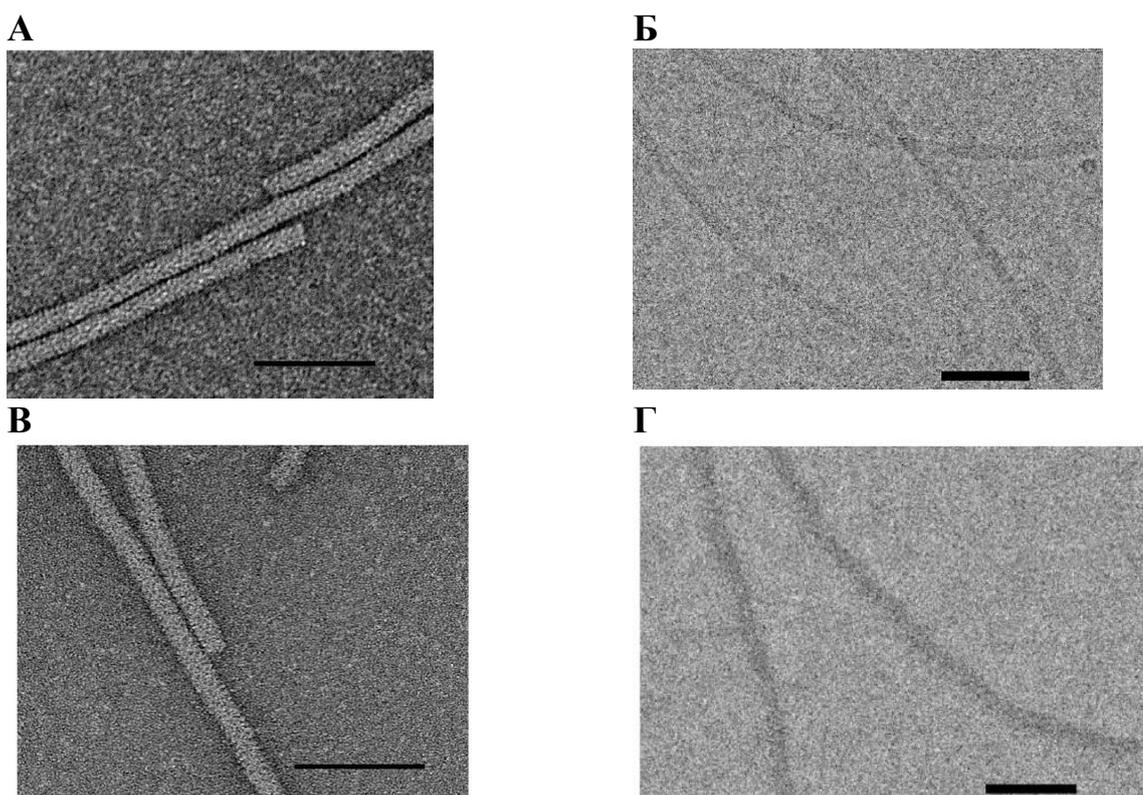


Рис. 6. Микрофотографии вирионов и ВПЧ ВМАльт. А – вирионы ВМАльт, ПЭМ. Б – вирионы ВМАльт, крио-ЭМ, В – ВПЧ ВМАльт, ПЭМ, Г – ВПЧ ВМАльт, крио-ЭМ. Масштабная метка 100 нм.

ВПЧ ВМАльт имеют больший диаметр (152 Å) по сравнению с вирионами (135 Å) (Рис. 7Б, Г; Табл. 5). При одинаковом шаге белковой

спирали (35,7 Å) ВПЧ содержат большее количество субъединиц БО на виток – 9,55 (Табл. 5). Центральный канал ВПЧ ВМАльт шире, чем у вирионов, и составляет 30 Å. Стенки центрального канала имеют выраженные промежутки, что, по-видимому, обусловлено отсутствием вирусной РНК (Рис. 7-3Б, красные стрелки). Несмотря на это, субъединицы БО формируют достаточно стабильные ВПЧ (см. раздел 3.1). Для сопоставления структуры вирионов и ВПЧ ВМАльт была построена карта различий электронной плотности (the difference map) (Рис. 8). Отличия в плотности (выделены красным) соответствуют локализации вирусной РНК в составе вирионов.

Таким образом, с помощью метода криоэлектронной микроскопии одиночных частиц (single particle cryoelectron microscopy) впервые были построены 3D-реконструкции для вирионов и ВПЧ ВМАльт с разрешением 13 Å. Результаты по структуре вириона ВМАльт согласуются с данными для структуры капсидов других представителей рода *Potexvirus* (Табл. 6), полученных с помощью метода криоэлектронной микроскопии. Спустя три года после публикации результатов данной работы была опубликована структура вирионов ХВК с высоким разрешением 2.2 Å (Grinzato *et al.*, 2020).

Таблица 6. Параметры структуры спирали вирионов некоторых представителей рода *Potexvirus*

Представители рода <i>Potexvirus</i>	Шаг спирали, Å	Количество субъединиц БО на виток	Разрешение метода, Å
Вирус мозаики пепино (Agirrezabala <i>et al.</i> , 2015)	34.6	8.7	3.9
Вирус мозаики бамбука (DiMaio <i>et al.</i> , 2015)	35	8.8	5.6
ВМП (Kendall <i>et al.</i> , 2013)	33.4	8.74	21
ХВК (Grinzato <i>et al.</i> , 2020)	35.2	8.8	2.2
Вирус мозаики нарцисса (Kendall <i>et al.</i> , 2007)	34.5	8.8	-
ВМАльт	35.7	8.75	13

Помимо структуры нативных вирионов потексвирусов в литературе описана структура различных вирусоподобных частиц, в том числе, содержащих РНК – НПЧ. Так в 2021 году вслед за результатами, полученными в рамках данной работы (Donchenko...Manukhova *et al.*, 2017), была представлена структура НПЧ ВМАльт, полученных в растениях *Nicotiana benthamiana* из БО, экспрессированного с помощью реплицирующегося вектора на основе ХВК (Thuenemann *et al.*, 2021) (Важно подчеркнуть, что Thuenemann с соавторами используют термин «virus-like particles, вирусоподобные частицы» для частиц, включающих гетерологичную РНК, что демонстрирует широкую трактовку этого понятия. Для разграничения терминов и удобства читателя в тексте диссертации для содержащих гетерологичную РНК вирусоподобных частиц будет использовано понятие «нуклеокапсид-подобные частицы, НПЧ»). Описанная структура НПЧ ВМАльт существенно отличается от полученных нами структур ВПЧ и вирионов ВМАльт: диаметр НПЧ составляет 120 Å, шаг спирали – 41,1 Å, в то время как число субъединиц БО на виток в НПЧ сходно с параметрами для вирионов – 8,8 субъединиц (разрешение метода 3.3 Å) (Thuenemann *et al.*, 2021). По-видимому, отличия в структуре спирали НПЧ и нативных вирионов ВМАльт обусловлены природой инкапсидированной РНК – НПЧ включают гетерологичную РНК экспрессионного вектора на основе ХВК. Данные по структуре НПЧ ВМАльт не могут быть экстраполированы на нативные вирионы или ВПЧ.

Таким образом, впервые для нитевидных вирусов растений на примере ВМАльт прямыми методами было доказано наличие структурных различий у морфологически идентичных вирусных и вирусоподобных частиц. По-видимому, выявленные отличия связаны в первую очередь с отсутствием РНК в составе ВПЧ. Кроме того, параметры спирали вирионов ВПЧ ВМАльт, установленные в рамках данной работы, отличаются от параметров НПЧ ВМАльт, включающих гетерологичную РНК (Thuenemann *et al.*, 2021), что подтверждает ключевую роль РНК в формировании структуры частиц.

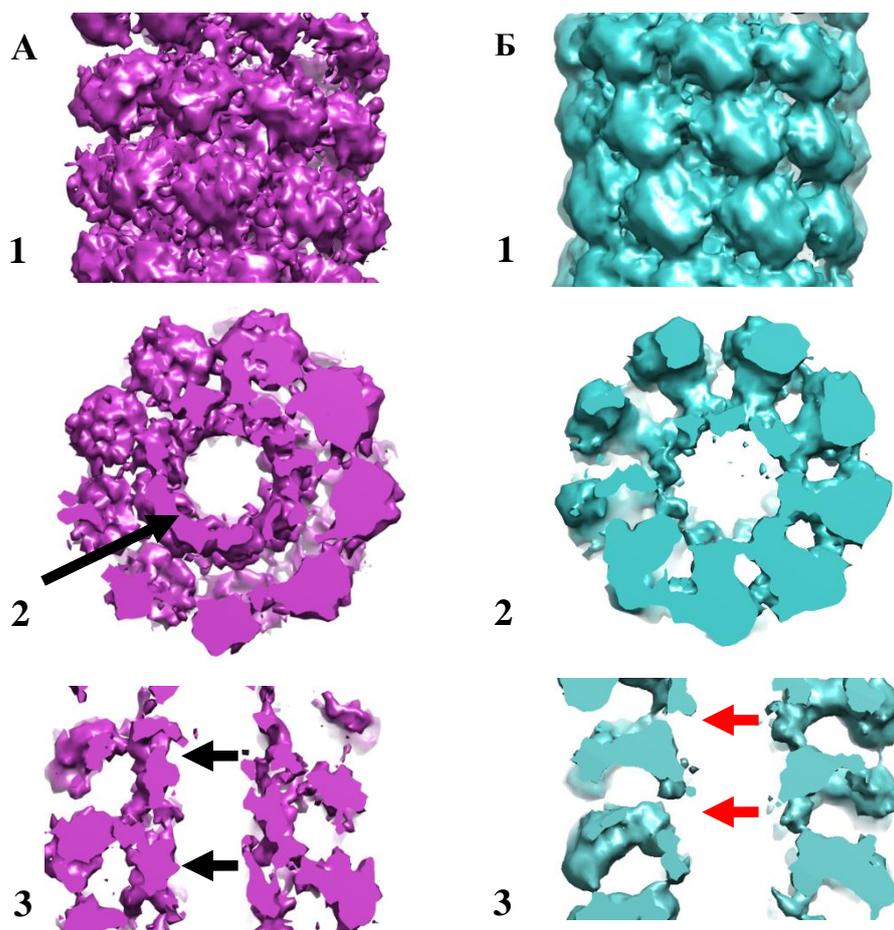


Рис. 7. 3D реконструкция структуры вирионов и ВПЧ ВМАльт. А – вирионы ВМАльт, Б – ВПЧ ВМАльт. 1. Структура поверхности, 2. Поперечный срез, 3. Сагиттальный срез.

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.

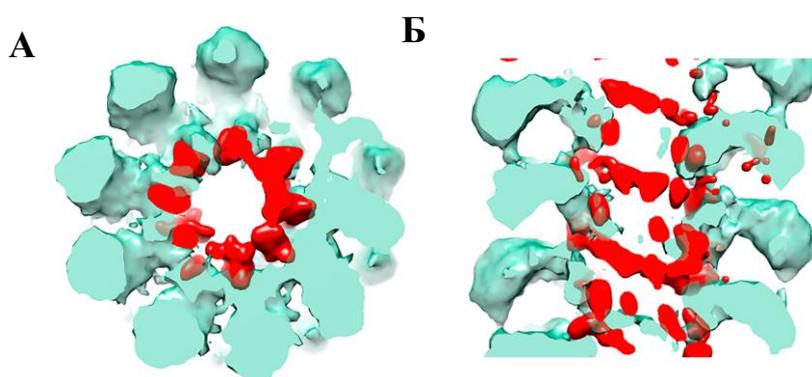


Рис. 8. Карта различий электронной плотности (the difference map) (выделены красным) между выровненными друг к другу картами электронной плотности вирионов и ВПЧ ВМАльт, наложенная на 3D структуру ВПЧ ВМАльт. А – поперечный срез, Б – сагиттальный срез.

Результаты получены совместно с к.б.н. Печниковой Е.В.

1.4. Сравнительный анализ структуры белка оболочки в составе ВПЧ и вирионов ВМАльт методом спектроскопии кругового дихроизма

Продемонстрированные различия в репертуаре аминокислотных остатков, экспонированных на поверхности БО (*разделы 1.1, 1.2*) в составе вирионов и ВПЧ ВМАльт, дают основания предположить, что вторичная структура БО в составе этих частиц также может отличаться.

Для сравнения вторичной структуры БО в составе спирали вирионов и ВПЧ были получены их спектры кругового дихроизма (КД) в дальнем ультрафиолете (УФ) (**Рис. 9**). Спектры КД вирионов и ВПЧ ВМАльт имели отрицательный максимум $[\theta]_{\max}$ при 208 нм (-15420° и -9510° соответственно, **Рис. 9**), что подтверждает высокое содержание альфа-спиральных фрагментов в этих структурах (Homer&Goodman, 1975). Кроме того, спектр ВПЧ (**Рис. 9**) имеет негативный пик с меньшей интенсивностью при 223 нм (-9230°). Присутствие дополнительного отрицательного минимума при данной длине волны, по-видимому, связано с некоторым изменением вторичной структуры БО при формировании ВПЧ, а также с отсутствием вклада структурированной РНК в спектр ВПЧ. Аналогично спектры КД вирионов и «свободного БО» ВМАльт в 5 мМ фосфатном буфере, рН 7.5, полученные в работе Семенюка с соавторами (2016), в целом сходны между собой. Кроме того, полученные спектры КД вирионов и БО ВМАльт хорошо совпали с описанными ранее спектрами КД вирионов и НПЧ ВМП (Tremblay *et al.*, 2006).

К сожалению, в публикации Семенюка с соавторами (2016) содержится неточность в трактовке «свободный БО/ВПЧ» ВМАльт – в приведенных условиях выделения БО ВМАльт не существует в свободной форме и собирается в ВПЧ. В работе не было проведено электронно-микроскопическое исследование препарата ВПЧ. Представленные результаты динамического светорассеяния мономеров БО ВМАльт в растворе следует рассматривать с осторожностью. Позднее коллективом нашей лаборатории было доказано, что в условиях, выбранных в данной работе – 5 мМ фосфатный буфер, рН 7.5

(Семенюк и др., 2016) БО ВМАльт существует в полимеризованном состоянии (Патент RU 2639491).

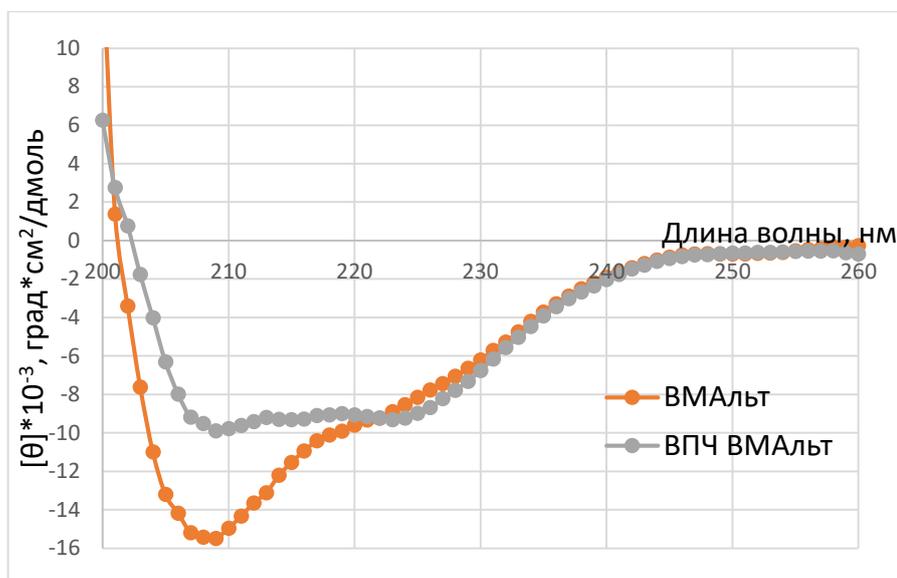


Рис. 9. Спектры кругового дихроизма вирионов и ВПЧ ВМАльт в дальнем УФ. Спектры были измерены при 25 °С в Milli-Q для ВПЧ и в 12.5 мМ Трис-НСI, рН 8.0 для вирионов.

Полученные для вирионов и НПЧ ВМП, содержащих гетерологичную РНК *E. coli* (Tremblay *et al.*, 2006), КД-спектры подтверждают, что вторичная структура БО в составе обоих типов частиц образована преимущественно альфа-спиралями. При этом КД-спектры вирионов и НПЧ ВМП практически совпадают друг с другом. Данные Tremblay с соавторами (2006) свидетельствует об идентичности вторичной структуры БО, в составе вирионов или НПЧ. Однако КД-спектры олигомеров БО ВМП, не включающих РНК и образующих структуру диска с коэффициентом седиментации 14-25S, характеризуются меньшим значением $[\theta]_{208}$, что по мнению авторов связано с увеличением доли альфа-спиралей при укладке БО в длинные полимеры НПЧ (Tremblay *et al.*, 2006).

Для сравнения стабильности белковой спирали в составе вирионов и ВПЧ была проведена термическая денатурация препаратов с отслеживанием изменений интенсивности отрицательных максимумов эллиптичности на 208 нм ($[\theta]_{208}$) (Рис. 10, кривые 1) и величин отношения эллиптичностей $[\theta]_{208}/[\theta]_{218}$ (Рис. 10, кривые 2), характеризующих изменение содержания α - и β -структур

в белке. В диапазоне 40-70 °С регистрируется постепенный рост интенсивности $[\theta]_{\max}$ до -8000° и 500° для вирионов и ВПЧ соответственно. Вероятно, 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 $T_{\text{пл}} \approx 57^\circ\text{C}$ (Рис. 10 А), плавление ВПЧ при $T_{\text{пл}} \approx 46^\circ\text{C}$ (Рис. 10 Б), то есть вирионы являются более термостабильными. Увеличение стабильности БО в составе вирионов связано скорее всего со стабилизирующим взаимодействием белок-РНК и некоторым отличием вторичной/третичной структуры по сравнению с БО в составе ВПЧ.

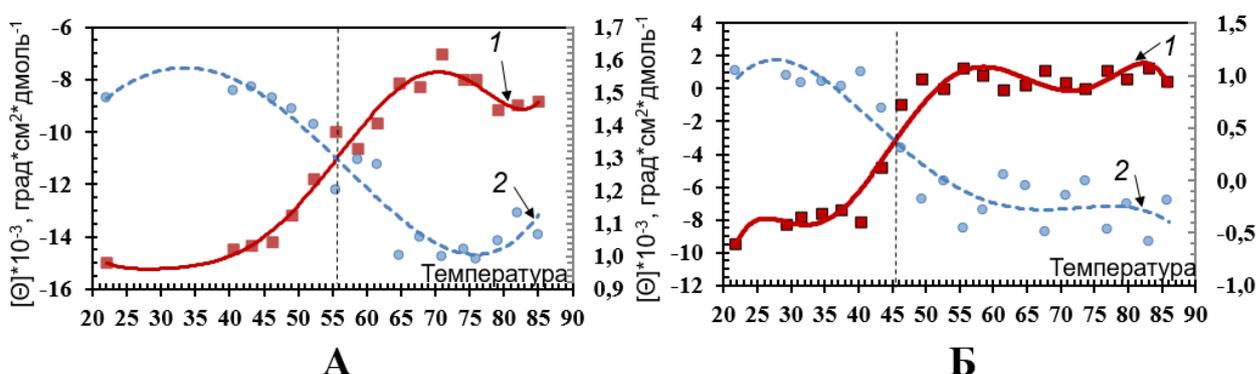


Рис. 10. Термическая денатурация вирионов ВМАльт (А) и ВПЧ ВМАльт (Б) по данным КД-спектров. Приведена температурная зависимость интенсивности отрицательных максимумов $[\theta]_{208}$ при 208 нм (1) и величины отношения $[\theta]_{208}/[\theta]_{218}$ (2).

Таким образом, было проведено сравнительное исследование структуры белковой спирали вирионов и ВПЧ ВМАльт. С помощью метода криоэлектронной микроскопии были определены параметры спирали вирионов и ВПЧ. Показано, что ВПЧ имеют структурные различия в сравнении с вирионами, что было подтверждено спектрами КД при термической денатурации. Было установлено, что укладка БО в составе ВПЧ отличается от укладки в составе вириона, несмотря на сходную морфологию частиц. Кроме того, было продемонстрировано, что вирионы и ВПЧ имеют сходные спектры кругового дихроизма, демонстрирующие преобладание альфа-спиральных элементов структуры БО.

2. СТРУКТУРНО МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЧАСТИЦЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ВИРИОНОВ И ВПЧ ВМАЛЬТ ПРИ ИХ ТЕРМИЧЕСКОЙ ПЕРЕЙСТРОЙКЕ

Феномен термической перестройки вирусов растений с образованием структурно-модифицированных частиц сферической формы (СЧ) был ранее описан для вирусов со спиральным типом симметрии, относящихся к нескольким семействам. СЧ на основе вирусов семейства *Virgaviridae* – ВТМ, вирус штриховатой мозаики (ВШМЯ), вирус мозаики долихоса (ВМД) – образуются при нагревании палочковидных вирионов до 94 °С. СЧ ХВК, представителя семейства *Alphaflexiviridae*, формируются при нагревании нитевидных вирионов до 90°С (Atabekov *et al.*, 2011; Nikitin *et al.*, 2016a; Трифонова и др., 2017). Доказано, что СЧ не содержат вирусную РНК и характеризуются свойствами, отличными от свойств нативных вирионов. Продемонстрировано, что во время термической перестройки как БО ВТМ, так и БО ХВК претерпевают серьёзные конформационные изменения, что выражается как в изменении внутренней структуры белка, так и его наружной поверхности (Dobrov *et al.*, 2014; Nikitin *et al.*, 2016a; Ksenofontov *et al.*, 2019).

Возможность структурной перестройки в СЧ была показана не только для вирионов ВТМ, но и для БО ВТМ. Из препаратов различных форм БО ВТМ (мономеры, димеры, 4S тримеры, 20S диски и реполимеры) СЧ образуются при более низкой температуре 65°С. Для СЧ из БО ВТМ продемонстрированы различия процесса структурного перехода и размеров образующихся частиц по сравнению с СЧ из вирионов (Atabekov *et al.*, 2011; Трифонова, 2013). БО ХВК не полимеризуется *in vitro* в отсутствие вирусной или гетерологичной РНК (Kaftanova *et al.*, 1975). Образование СЧ из мономеров БО ХВК ранее было показано коллективом нашей лаборатории (Никитин Н.А. и др., неопубликованные данные).

Также ранее в нашей лаборатории была продемонстрирована возможность образования СЧ из ВПЧ ВМАЛЬТ (СЧ_{ВПЧ}) при их нагревании до

94 °С в воде. СЧ_{ВПЧ} представляют собой частицы с диаметром около 100 нм, который практически не зависит от исходной концентрации препарата ВПЧ. При этом было показано, что термическая обработка вирионов ВМАльт в условиях, использованных для получения СЧ ХВК, не приводит к образованию СЧ (Трифорова и др., 2017). Предположительно, причиной отличий в условиях образования СЧ из вирионов (СЧ_{вир}) и СЧ_{ВПЧ} являются их структурные различия, в частности параметры спирали, наличие промежутков в стенке центрального канала и стабильность частиц, рассмотренные в *главе 1*. В данной работе были подобраны условия образования СЧ_{вир} ВМАльт, описан процесс структурного перехода, установлен биохимический состав СЧ_{вир} и проведено исследование структурных изменений БО при образовании СЧ.

2.1 Получение СЧ из вирионов, условия их образования и сравнительная характеристика СЧ, полученных из вирионов и ВПЧ ВМАльт

Проведен поиск условий образования СЧ_{вир}. Для этого вирионы ВМАльт нагревали до +98 °С в различных средах: деионизированная вода Milli-Q; фосфатно-солевой буфер (phosphate-buffered saline, PBS), pH 7.4; 0.001 М цитратный буфер, pH 4-4.2; 0.01 М Трис-НСl, pH 8.0. Кроме того, было исследовано влияние концентрации исходного вирусного препарата на возможность образования СЧ_{вир} и их размеры. С этой целью препараты ВМАльт с различной исходной концентрацией (0,1 мкг/мкл, 1 мкг/мкл, 2 мкг/мкл, 5 мкг/мкл) нагревали во всех перечисленных условиях.

Полученные таким образом препараты были проанализированы с помощью ПЭМ. Обнаружено, что компактные электронно-плотные частицы близкие к сферической форме образуются при нагревании вирионов ВМАльт в PBS, pH 7.4 (**Рис. 11 Г**) при всех выбранных концентрациях. При исследовании препаратов, полученных при нагревании вируса в различной концентрации в Milli-Q, цитратном и Трис-буферах, были выявлены

нитевидные структуры, представляющие собой, по-видимому, денатурированные вирусные частицы, не прошедшие структурную перестройку с образованием СЧ (Рис. 11А, Б, В – микрофотографии препаратов с концентрацией 1 мкг/мкл).

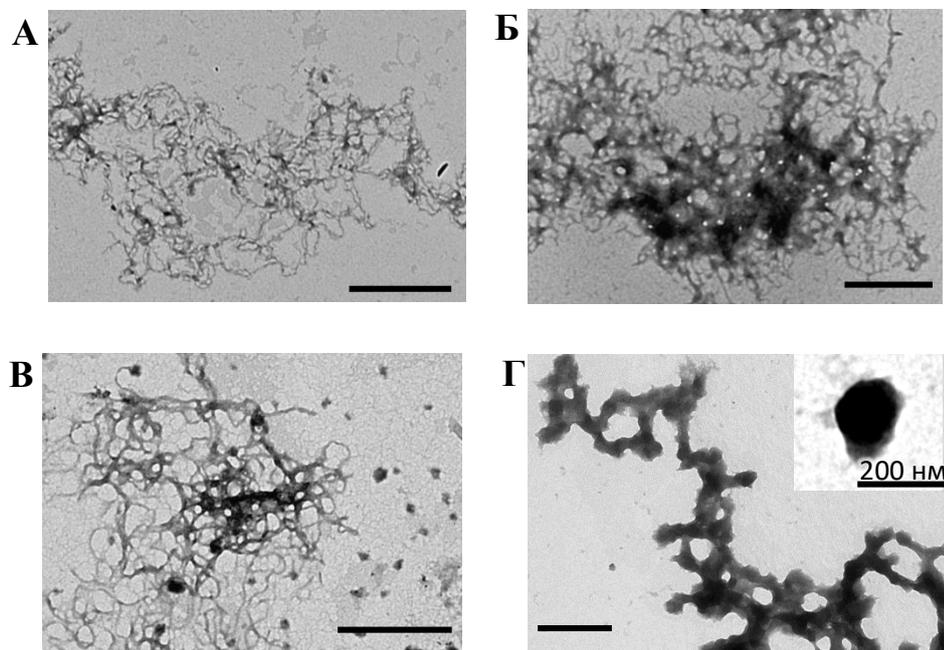


Рис. 11. Подбор условий образования СЧ_{вир} – нагревание вирионов ВМАльт в различных условиях. Исходная концентрация вируса – 1 мкг/мкл. А – в Milli-Q, Б – в 0,001М цитратном буфере, рН 4-4.2, В – в 0,01 М Трис-НСl, рН 8,0, Г – в PBS рН 7.4. ПЭМ, контрастирование 2% уранилацетатом, масштабная метка 500 нм.

Для последующего изучения влияния отдельных компонентов PBS на процесс структурной перестройки вирионов ВМАльт был проведен дополнительный эксперимент. Нагревание вируса с концентрацией 1 мкг/мкл до 98 °С проводили в 0.01 М фосфатном буфере, рН 7.4 и в 0.15 М NaCl. При изучении термически обработанных препаратов методом ПЭМ было установлено, что СЧ_{вир} образуются в 0.15 М NaCl (Рис. 12Б), в то время как в фосфатном буфере были выявлены аналогичные описанным выше (Рис. 11А, Б, В) нитевидные структуры (Рис. 12А). Следовательно, для успешного структурного перехода вирионов ВМАльт в СЧ_{вир} необходимо присутствие в растворе NaCl. Таким образом, условия структурного перехода для СЧ_{вир} (0.15 М NaCl) и СЧ_{ВПЧ} (Milli-Q) отличаются, что, предположительно, связано со структурными различиями этих морфологически сходных частиц, а также

отсутствием РНК в составе ВПЧ. В то же время условия образования СЧ_{вир} ВМАльт отличаются от условий образования СЧ ХВК (Milli-Q). Возможно, это обусловлено различиями свойств БО ВМАльт и БО ХВК – только первый способен к самосборке с образованием ВПЧ в отсутствие РНК. На примере ВПЧ потивирусов было показано, способность БО к самосборке с образованием ВПЧ обусловлена необходимыми электростатическими взаимодействиями и возможностью образования солевых мостиков между субъединицами БО (Palucha *et al.*, 2005). Можно предположить, что способность БО ВМАльт к самосборке указывает на наличие дополнительных взаимодействий между субъединицами БО не только в ВПЧ, но и в составе спирали вирионов. Следовательно, для осуществления структурного перехода вирионов ВМАльт в СЧ требуются условия, отличающиеся от достаточных для получения СЧ ХВК.

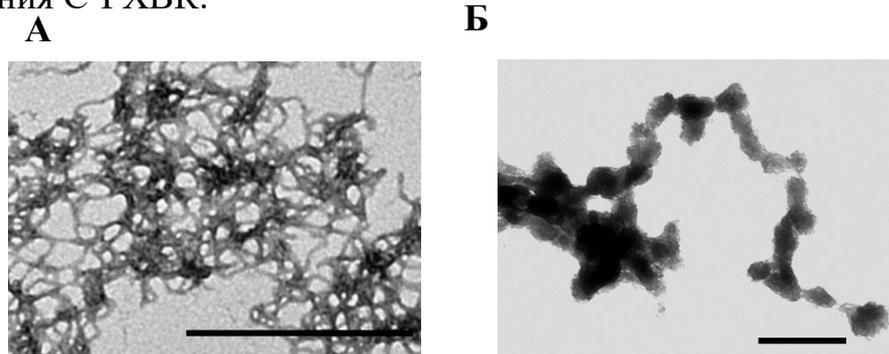


Рис. 12. Подбор условий образования СЧ_{вир} – нагревание вирионов ВМАльт в различных условиях. А – 0.01 М фосфатный буфер, рН 7.4, Б – 0.15 М NaCl. ПЭМ, контрастирование 2% уранилацетатом, масштабная метка 500 нм.

По литературным данным размер СЧ, образующихся при термической перестройке ВТМ и ВМД, коррелирует с концентрацией исходного вирусного препарата. Повышение концентрации ВТМ, ВМД приводит к увеличению диаметра СЧ (Табл. 3) (Atabekov *et al.*, 2011; Трифонова и др., 2017). Однако для СЧ, полученных из ХВК и ВШМЯ, строгой зависимости между концентрацией исходного препарата вируса и размером СЧ выявлено не было (Табл. 3) (Nikitin *et al.*, 2016а; Трифонова и др., 2017).

В настоящей работе была изучена взаимосвязь между концентрацией исходного вирусного препарата и размерами образующихся СЧ_{вир} ВМАльт. СЧ_{вир} были получены из исходных препаратов вируса с концентрацией 0.1, 1, 2, 5 мкг/мкл и исследованы с помощью ПЭМ. Диаметры СЧ были измерены по полученным микрофотографиям с помощью программного обеспечения Image J (Национальный институт здоровья, США). Средний размер СЧ, образованных при нагревании препарата с концентрацией 0.1 мкг/мкл – 124 ± 31 нм (Рис. 13). При повышении концентрации вируса до 1 мкг/мкл происходит увеличение среднего диаметра образующихся СЧ до 160 ± 48 нм (Рис. 13). При последующем повышении концентрации исходного препарата вируса до 2 мкг/мкл и 5 мкг/мкл значительного увеличения размеров, характерного для СЧ ВТМ и СЧ ВМД, не наблюдается. Согласно представленным результатам, диаметр СЧ_{вир} ВМАльт аналогично СЧ ХВК и ВШМЯ практически не зависит от концентрации исходного вирусного препарата.

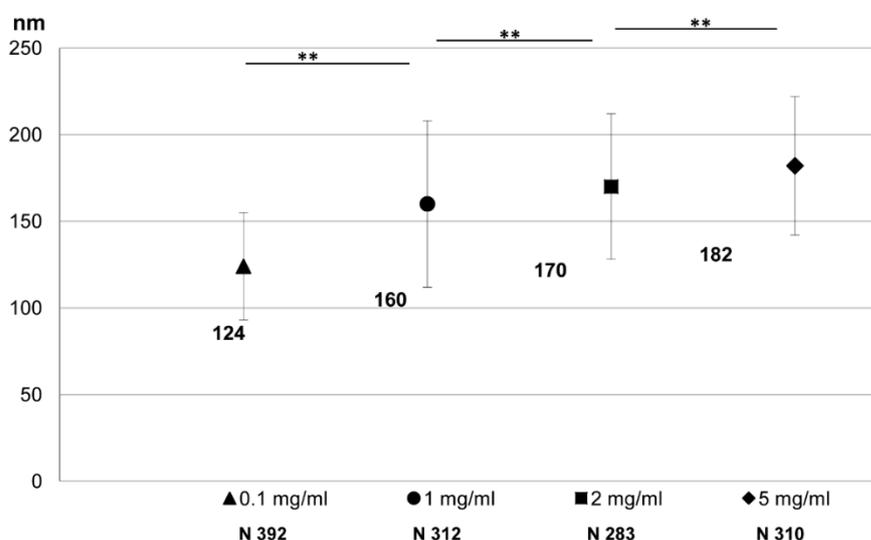


Рис. 13. Средний диаметр СЧ_{вир} ВМАльт, образованных из препаратов вируса с исходной концентрацией 0.1, 1, 2 и 5 мг/мл. Сводные данные по четырем отдельным образцам СЧ_{вир} для каждой из концентраций. Отрезки представляют собой стандартное отклонение. Статистические различия были проанализированы с использованием одностороннего ANOVA с использованием *post-hoc* Tukey HSD теста, *p* < 0.01.**

Зависимость диаметра СЧ_{ВПЧ} и концентрации исходных ВПЧ ранее была исследована в работе Трифионовой с соавторами (2017). Было продемонстрировано, что при термической обработке ВПЧ ВМАльт с концентрацией 0.1 и 1 мкг/мкл формируются СЧ с диаметром около 100 нм, т.е. увеличение концентрации в этом диапазоне не приводит к изменению диаметра образующихся СЧ_{ВПЧ}. В настоящей работе было проведено дополнительное исследование корреляции между размерами СЧ_{ВПЧ} и концентрацией ВПЧ. Так из различных препаратов ВПЧ (независимые выделения из вируса) с концентрацией 1 мкг/мкл были получены СЧ_{ВПЧ} с диаметром 70 ± 10 нм, 118 ± 13 нм и 157 ± 28 нм. Таким образом, диаметр СЧ_{ВПЧ} не связан с концентрацией ВПЧ. Предположительно, хранение препарата ВПЧ приводит к увеличению степени полимеризации белка, что впоследствии выражается в увеличении диаметра образуемых СЧ_{ВПЧ}.

Исследование диаметра СЧ ВТМ, полученных из препаратов, содержащих БО в форме ВПЧ различной концентрации, показало, что увеличение концентрации с 0.1 мкг/мкл до 1 мкг/мкл также практически не приводит к увеличению диаметра образуемых СЧ (Атабеков и др., неопубликованные данные). Таким образом, диаметр СЧ_{ВПЧ} ВМАльт аналогично СЧ на основе ВПЧ ВТМ практически не зависит от начальной концентрации препарата (в диапазоне 0.1-1 мкг/мкл).

2.2 Характеристика процесса структурного перехода частиц при образовании СЧ ВМАльт

Известно, что процесс образования СЧ как из жестких палочковидных вирионов ВТМ (Atabekov *et al.*, 2011), ВМД, ВШМЯ (Трифенова и др., 2017), так и из гибких нитевидных вирионов ХВК (Nikitin *et al.*, 2016a) является двухстадийным и сопровождается формированием интермедиатов. При этом в отличие от вирусов с палочковидным спиральным капсидом, для которых характерно образование интермедиатов при 90°C, промежуточные формы

термической перестройки вирионов ХВК в СЧ выявляются при более низких температурах (70°C) (Nikitin *et al.*, 2016a).

В настоящей работе было проведено исследование стадий термического перехода вирионов ВМАльт. Исходный препарат вируса был нагрет при различных температурах (+50 °С, 55 °С, 60 °С, 94 °С, 98 °С) в течение 10 секунд в 0.15 М NaCl и проанализирован с помощью ПЭМ. Согласно полученным результатам, при нагревании до +50 °С вирионы ВМАльт сохраняют исходную морфологию (**Рис. 14А**). При повышении температуры до +55 °С наблюдаются изменения: один из торцов вириона ВМАльт образует утолщение (**Рис. 14Б, указано стрелкой**), что соответствует описанию промежуточных форм при термической перестройке ХВК, ВТМ, ВШМЯ, ВМД (Atabekov *et al.*, 2011; Nikitin *et al.*, 2016a; Трифонова и др., 2017). При дальнейшем повышении температуры до 60°C наблюдается продолжение изменения морфологии торцов частиц (**Рис. 14В, указано стрелкой**), а при 94 °С происходит полное преобразование промежуточных форм в сферические частицы (**Рис. 14Г**). Дополнительное увеличение температуры от 94°C до 98°C и продолжительности инкубации с 10 до 30 секунд не приводило к изменению морфологии сферических частиц.

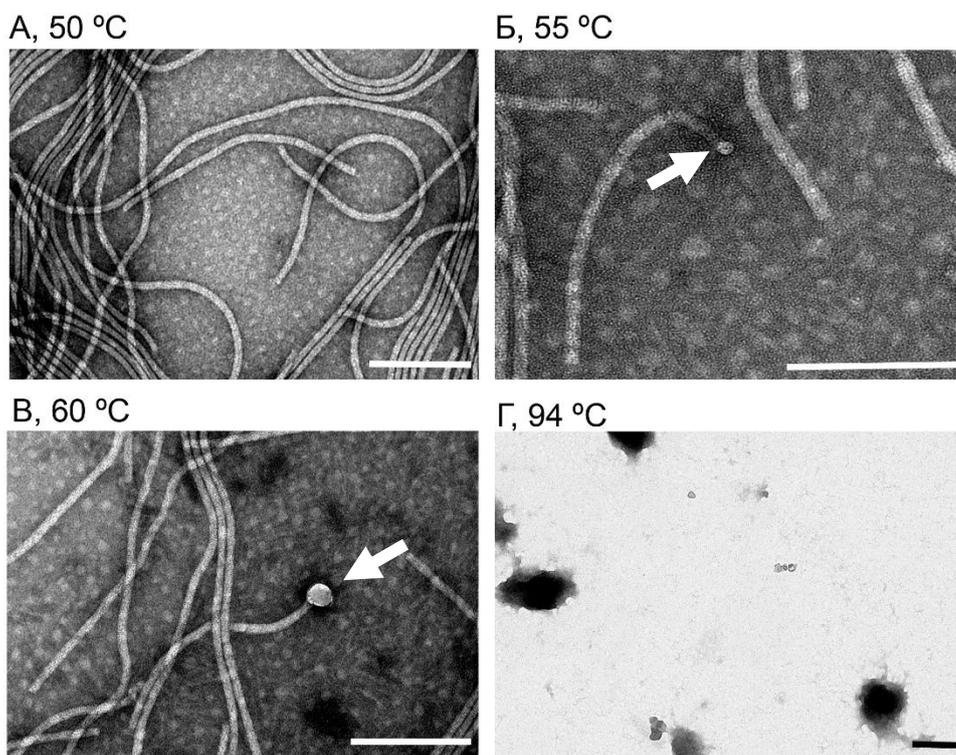


Рис. 14. Стадии структурного перехода при образовании СЧ_{вир} ВМАльт. А – вирионы ВМАльт, нагревание до 50 °С, Б – промежуточная форма, нагревание вирионов до 55 °С, В – промежуточная форма, нагревание вирионов до 60 °С, Г – сформированные СЧ_{вир}, нагревание вирионов до 94 °С. Нагревание до указанной температуры проводили в течение 10 секунд. ПЭМ, контрастирование 2% уранилацетатом, масштабная метка 200 нм.

Следовательно, условия структурного перехода двух гибких нитевидных вирусов (ХВК и ВМАльт) рода *Potexvirus* существенно различаются. В отличие от ХВК интермедиаты термической перестройки ВМАльт формируются при более низкой температуре (55 °С вместо 70 °С) (Nikitin *et al.*, 2016a), а полностью сформированные СЧ_{вир} ВМАльт образуются только при нагревании до 94 °С, в то время как СЧ ХВК – при 90 °С (Nikitin *et al.*, 2016a). Возможно, температура завершения структурного перехода зависит от состава раствора, в котором находится суспензия вируса: в случае СЧ_{вир} ВМАльт – 0.15 М NaCl, тогда как для образования СЧ ХВК достаточно водной среды (Nikitin *et al.*, 2016a). Это предположение согласуется с данными о том, что NaCl может повышать стабильность белков при нагревании (Wang *et al.*, 2013).

Для образования СЧ_{ВПЧ} ВМАльт (Рис. 15) ВПЧ прогревали в воде при различных температурах и исследовали полученные препараты с помощью ПЭМ (Рис. 15). По результатам ПЭМ, промежуточных форм, аналогичных наблюдаемым при перестройке вирионов, обнаружено не было. Нагревание ВПЧ до 45 °С сопровождается формированием сферических частиц, но при этом в препарате сохраняются и не модифицированные ВПЧ (Рис. 15Б). При дальнейшем нагревании до 60 °С продолжают выявляться как ВПЧ, так и СЧ_{ВПЧ} (Рис. 15В, Г, Д). Нагревание до 65 °С сопровождается окончательным переходом всех ВПЧ в СЧ_{ВПЧ} (Рис. 15Е).

Различия в температуре структурного перехода СЧ_{ВПЧ} и СЧ_{вир}, по-видимому, напрямую связаны с описанными в *разделе 1.4* отличиями в термической стабильности вирионов и ВПЧ по спектрам КД. Более высокая термостабильность вирионов ВМАльт ($T_{пл} \approx 57$ °С) коррелирует с более высокой температурой образования СЧ_{вир}, что в свою очередь связано со стабилизирующим влиянием РНК на структуру вирионов ВМАльт.

Формирование СЧ_{ВПЧ} происходит постепенно при нагревании от 45 до 60°С включительно, в то время как образование СЧ_{вир} сопровождается дискретным переходом через промежуточную форму. Кроме того, СЧ_{ВПЧ} формируются при более низких температурах. Аналогичные результаты были получены при термической перестройке БО ВТМ в различной форме. В ходе образования СЧ из ВПЧ, двуслойных 20S-дисков, А-белка, а также мономеров БО не выявляются промежуточные формы. Для осуществления структурного перехода из А-белка в СЧ достаточно нагревания до 65 °С (Atabekov *et al.*, 2011). Следовательно, стабилизирующая функция РНК, опосредующая более высокую температуру структурного перехода при образовании СЧ, проявляется как в случае капсидов палочковидной морфологии (ВТМ), так и для гибких нитевидных вирионов (ВМАльт).

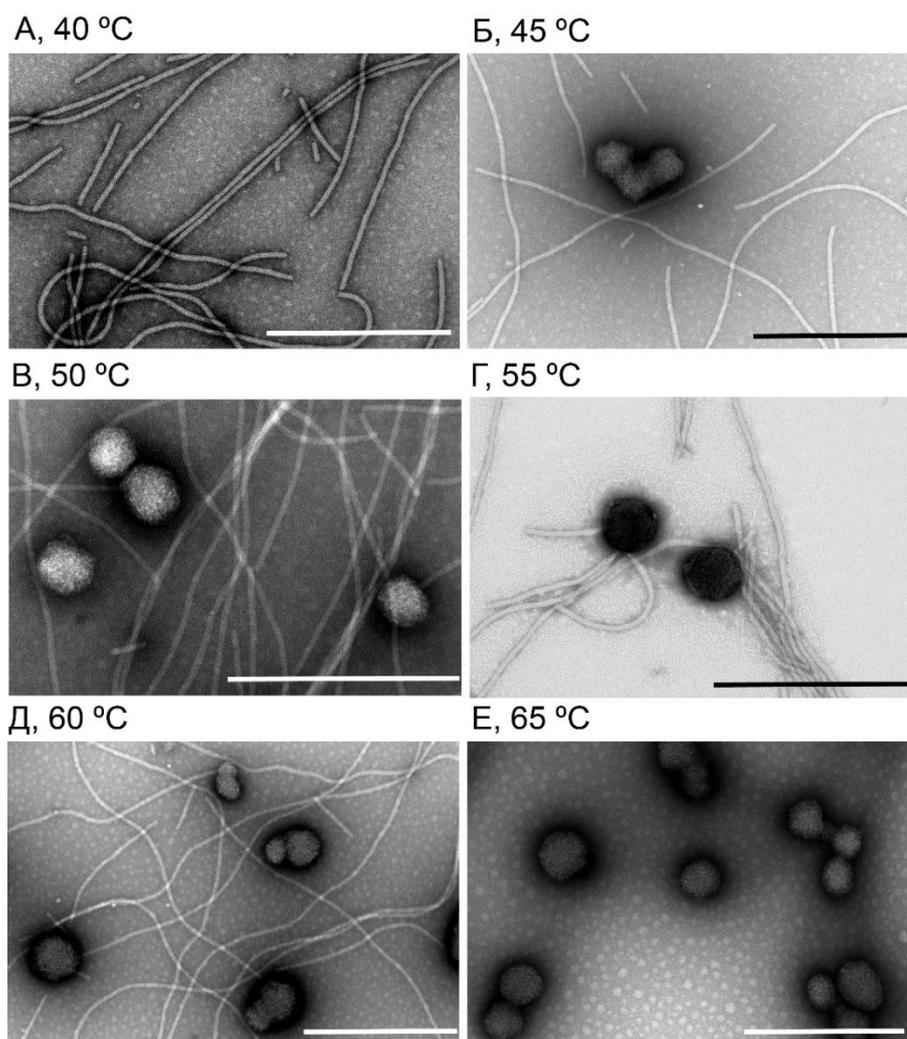


Рис. 15. Стадии структурного перехода при образовании $SCh_{ВПЧ}$ ВМАльт А – $ВПЧ$ ВМАльт при нагревании до 40 °С, Б, В, Г, Д – нагревание до 45 °С, 50°С, 55 °С и 60 °С соответственно, Е – $SCh_{ВПЧ}$ формируются при нагревании до 65 °С. Нагревание до указанной температуры проводили в течение 10 секунд. ПЭМ, контрастирование 2% уранилацетатом, масштабная метка 500 нм.

2.3 Характеристика биохимического состава SCh , образующихся при термической перестройке вирионов ВМАльт

Ранее на примере SCh ВТМ и ХВК было показано, что при термической перестройке вирионов вирусная РНК деградирует и в состав сформированных SCh не входит (Atabekov *et al.*, 2011 Nikitin *et al.*, 2016a). Для исследования состава частиц, образующихся при термической перестройке вирионов ВМАльт в структурно-модифицированные частицы на следующем этапе был изучен биохимический состав $SCh_{вир}$.

Сферические частицы, полученные при нагревании препарата ВМАльт с концентрацией 1 мг/мл, осаждали при помощи низкоскоростного ЦФ (2800 об./мин., Microspin FV-2400, Biosan, Россия) в течение 5 минут. Ранее в нашей лаборатории было подтверждено, что в этих условиях СЧ ВТМ переходят в осадок (Трифенова, 2013). Далее осадок СЧ_{вир} был ресуспендирован в воде. Из переведенных в воду СЧ_{вир} (*образец 1*) проводили выделение РНК методом фенольной депротенизации по Френкель-Конрату (Fraenkel-Conrat *et al.*, 1961). Параллельно было осуществлено выделение РНК из супернатанта (*образец 2*), образующегося после ЦФ СЧ_{вир}, а также из первоначального препарата СЧ_{вир} (препарат, который не центрифугировали для разделения на супернатант и осадок, *образец 3*) и из равного по количеству препарата ВМАльт (*образец 4*). При выделении РНК в качестве соосадителя была использована тРНК. Выделенная РНК была проанализирована с помощью электрофореза в 1% агарозном геле.

Согласно полученной электрофореграмме в составе *образца 1* не присутствует вирусная РНК (**Рис. 16, дорожка 5**). В то же время в *образцах 2 и 3* обнаружена недеградированная РНК (**Рис. 16, дорожки 4 и 3** соответственно). Важно отметить, что в ходе получения *образцов 2 и 3* препараты были нагреты до 98 °С в течение 30 секунд. Тем не менее после подобной обработки часть РНК осталась в растворе. Однако, несмотря на присутствие РНК в не центрифугированном *образце 3* (**Рис. 16, дорожка 3**) в отделенных от супернатанта СЧ_{вир} РНК не была обнаружена (**Рис. 16, дорожка 5**). Таким образом, СЧ_{вир} ВМАльт, так же, как и СЧ ВТМ и ХВК образованы исключительно БО и не содержат вирусной РНК.

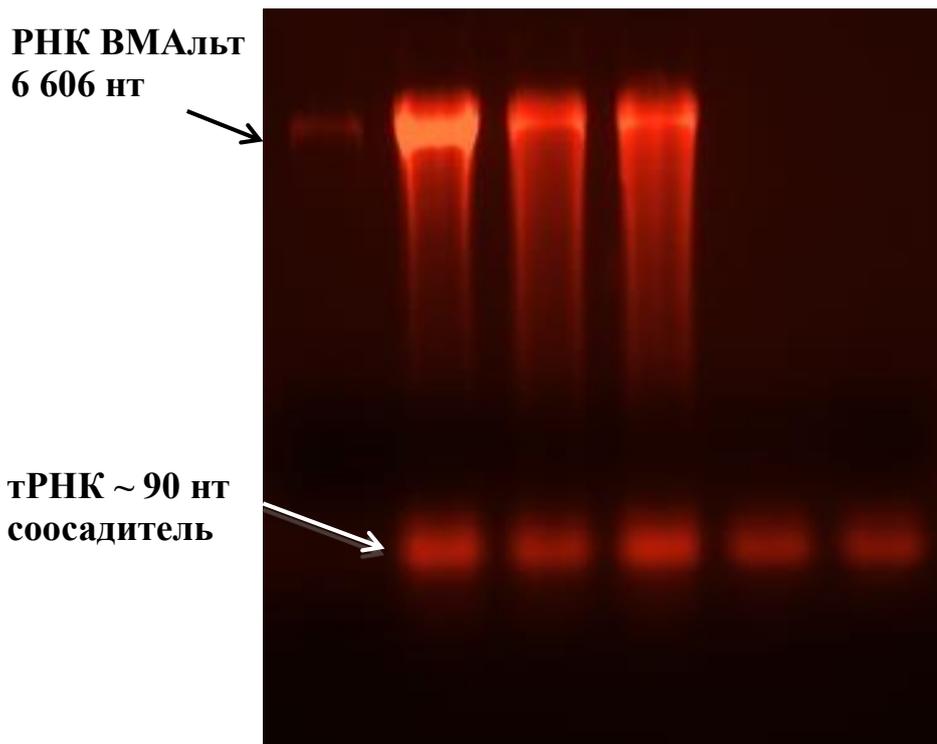


Рис. 16. Характеристика РНК, выделенной из СЧ_{вир} и вирионов ВМАльт. **1** – РНК ВМАльт (контроль), **2** – РНК, выделенная из вирионов ВМАльт (образец 4), **3** – РНК, выделенная из первоначального нецентрифугированного препарата СЧ (образец 3), **4** – РНК, выделенная из супернатанта, образующегося после ЦФ СЧ_{вир} (образец 2), **5** – РНК, выделенная из осадка, образующегося после ЦФ СЧ_{вир} (образец 1), **6** – негативный контроль, в качестве которого использовали воду Milli-Q, для которой была проведена процедура выделения РНК аналогично другим образцам. СЧ_{вир} получали при нагревании до 98 °С в течение 30 секунд. Электрофорез в 1% агарозном геле. Краситель – бромистый этидий.

Для оценки возможной деградации полипептидной цепи белка при термической перестройке в составе СЧ_{ВПЧ} и СЧ_{вир}, был проведен электрофоретический анализ БО, входящего в СЧ_{ВПЧ}, СЧ_{вир}, вирионы и ВПЧ ВМАльт. По результатам электрофореграммы БО в составе вирионов (Рис. 17, дорожки 2, 3) и СЧ_{вир} (Рис. 17, дорожка 4) не отличается по молекулярной массе, т.е. в ходе нагревания вирионов не происходит деградации полипептидной цепи, представляющей первичную структуру БО. Аналогичные результаты продемонстрированы и для БО в составе ВПЧ (Рис.

17, дорожка 5) и СЧ_{ВПЧ} (Рис. 17, дорожка 6). Стоит также отметить, что в дорожках, соответствующих СЧ_{ВПЧ} и СЧ_{вир} (Рис. 17, дорожки 4, 6), помимо мажорной полосы с молекулярной массой ~22 кДа выявляются более высокомолекулярные продукты $M_r > 40$ кДа, которые, по-видимому, соответствуют димерам БО. Следовательно, при образовании СЧ_{ВПЧ} и СЧ_{вир} не происходит деградации полипептидных цепей БО.

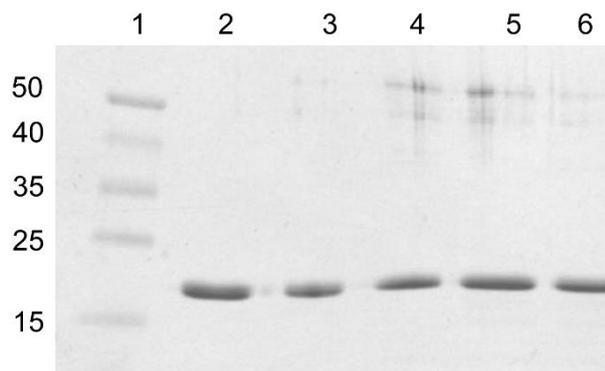


Рис. 17. Анализ БО, входящего в состав СЧ, ВПЧ и вирионов ВМАльт. 1 – маркеры молекулярной массы (кДа) 2, 3 – вирионы, 4 – СЧ_{вир}, 5 – ВПЧ, 6 – СЧ_{ВПЧ}. Электрофорез в 8-20% ПААГ. Краситель – Кумасси бриллиантовый синий G-250.

2.4. Анализ изменения структуры БО при образовании СЧ ВМАльт

Ранее при изучении структуры БО в составе СЧ ВТМ и СЧ ХВК было обнаружено, что при термической перестройке происходит изменение организации белковой молекулы – снижается доля α -спиралей и возрастает доля β -структур. Сравнение спектров внутренней флуоресценции СЧ ВТМ и вирионов ВТМ, а также СЧ ХВК и вирионов ХВК указывает на изменение в том числе и третичной структуры (Dobrov *et al.*, 2014; Nikitin *et al.*, 2016a). Одновременно с перестройкой вторичной и третичной структур БО в процессе образования СЧ ВТМ происходит изменение состава аминокислот на поверхности БО, что приводит к изменению антигенных свойств СЧ ВТМ по сравнению с вирионами (Atabekov *et al.*, 2011) и экспозиции а.о. лизина,

доступных для мечения атомарным тритием, FITC и трипсинолиза (Ksenofontov *et al.*, 2019).

В *разделе 1.4* методом КД были продемонстрированы различия во вторичной структуре БО в составе вирионов и ВПЧ ВМАльт. Также были проведены измерения спектров КД $СЧ_{\text{вир}}$ и $СЧ_{\text{ВПЧ}}$. Полученные КД спектры $СЧ_{\text{вир}}$ и $СЧ_{\text{ВПЧ}}$ ВМАльт существенно отличаются от спектров вирионов и ВПЧ, для которых характерно присутствие выраженных отрицательных максимумов при 208 и 220 нм (**Рис. 18А, Б**, кривые 1, 3). Так, спектр $СЧ_{\text{вир}}$ (**Рис. 18А**, кривая 2) и спектр $СЧ_{\text{ВПЧ}}$ (**Рис. 18Б**, кривая 4) характеризуются гораздо более широкими и пологими минимумами в этой области по сравнению с исходными частицами. Кроме того, КД-спектры $СЧ_{\text{вир}}$ и $СЧ_{\text{ВПЧ}}$ 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).

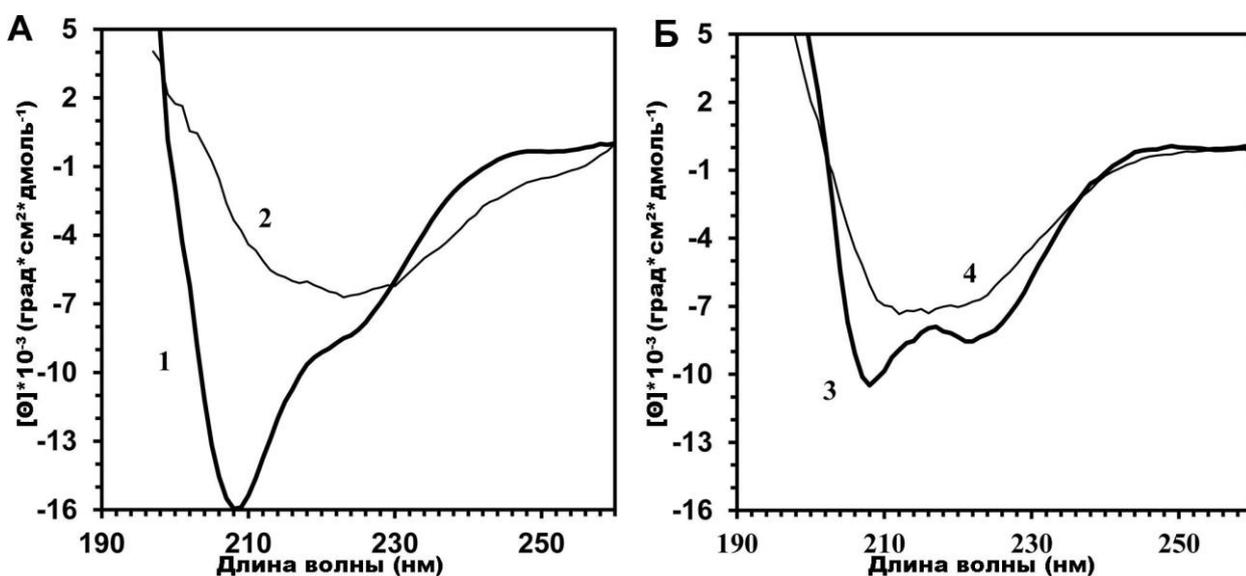


Рис. 18. Спектры кругового дихроизма вирионов, ВПЧ, $СЧ_{\text{вир}}$, $СЧ_{\text{ВПЧ}}$, ВМАльт в дальнем УФ. А – вирионы (1) и $СЧ_{\text{вир}}$ (2); Б – ВПЧ (3) и $СЧ_{\text{ВПЧ}}$ (4). Исходная концентрация вируса и ВПЧ 1 мг/мл. Измерения были проведены в воде Milli-Q при 25°C.

Для предсказания состава вторичной структуры БО в составе СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} была использована программа K2D3. Согласно полученным данным (Табл. 7), состав вторичной структуры БО в СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} существенно отличается от состава БО в исходных частицах. В частности, при образовании СЧ_{ВПЧ} происходит уменьшение содержания α -спиралей и увеличение доли β -структур по сравнению с БО в составе ВПЧ (Табл. 7). Вторичная структура БО ВМАльт в составе ВПЧ по данным Семенюка с соавторами (2016) образована 27.5% α -спиралей, 17% β -слоев. По расчетам, проведенным в рамках данной работы по формуле Гринфелда-Фасмана (Greenfield&Fasman, 1969), доля α -спиралей составляет 22%, β -слоев – 27%. Однако высокая доля β -слоев, по-видимому, является искажением метода КД, которое ранее было описано в работе Арутюнян с соавторами (2001). Длинные полимеры БО ВТМ имеют β -подобные спектры КД в области 200-250 нм по сравнению с 4S формой БО, несмотря на сохранение структуры по данным рентгеноструктурного анализа (Арутюнян и др., 2001). Тем не менее полученные данные подтверждают, что при переходе ВПЧ в СЧ_{ВПЧ} происходит снижение содержания α - и увеличение доли β -структур.

Аналогичные изменения были обнаружены и в составе вторичной структуры БО при образовании СЧ_{вир} из вирионов. Данные КД для БО в составе вирионов ВМАльт отсутствуют вследствие искажения результатов предсказания вкладом РНК. Однако существуют косвенные указания на то, что во вторичной структуре БО в составе вирионов преобладают α -спирали. По данным криоэлектронной микроскопии с разрешением 2.2 Å для БО ХВК (Grinzato *et al.*, 2020) и с разрешением 21 Å для БО ВМП (Kendall *et al.*, 2013) вторичная структура БО в составе вирионов образована преимущественно α -спиралями. При этом индекс идентичности аминокислот при выравнивании их последовательностей (index of similarity) для БО ВМАльт и ВМП составляет 75.7% (Ivanov *et al.*, 2011), что позволяет предположить, что доминирующим элементом вторичной структуры БО в составе вирионов ВМАльт являются α -спирали. Таким образом, при структурном переходе вирионов ВМАльт с

образованием СЧ_{вир} в БО происходит снижение содержания α -спиралей и возрастает доля β -структуры.

Таблица 7. Сравнение вторичной структуры БО в составе ВПЧ, СЧ_{вир}, СЧ_{ВПЧ} ВМАльт по данным КД.

Элементы вторичной структуры	α -спирали, %	β -слои, %	Неструктурированные участки, %
ВПЧ	22	27*	51
СЧ _{ВПЧ}	10 \pm 3**	35 \pm 1	54 \pm 2
СЧ _{вир}	3 \pm 1	42 \pm 1	55 \pm 1

* Высокая доля β -слоев обусловлена искажениями метода при измерении полимерных форм БО (пояснения в тексте).

**Значения для СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} выражены как среднее \pm SEM двух повторностей.

В связи с этим был исследован вопрос о возможном формировании кросс- β -структур при образовании СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ}. С этой целью был использован тест на интенсивность флуоресценции тиофлавина Т, активно применяемый для оценки присутствия амилоидо-подобных структур в белках (Xue *et al.*, 2017). Спектры флуоресценции тиофлавина при взаимодействии с обоими типами СЧ характеризуются значительно более высокими максимумами в области 490 нм (Рис. 19, кривые 2, 4) по сравнению со спектрами ВПЧ и вирионов (Рис. 19, кривые 1, 3), что свидетельствует о присутствии кросс- β -структур в СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ}. Кроме того, интенсивность флуоресценции тиофлавина при взаимодействии с СЧ_{вир} в два раза выше интенсивности в случае СЧ_{ВПЧ}, что косвенно указывает на более высокое содержание β -структур в СЧ_{вир}, а также согласуется с данными КД спектров (Рис. 18, Табл. 7). Разница в интенсивности флуоресценции тиофлавина при взаимодействии с СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ}, возможно, связана с различиями вторичной структуры БО в составе вирионов и ВПЧ (Рис. 9).

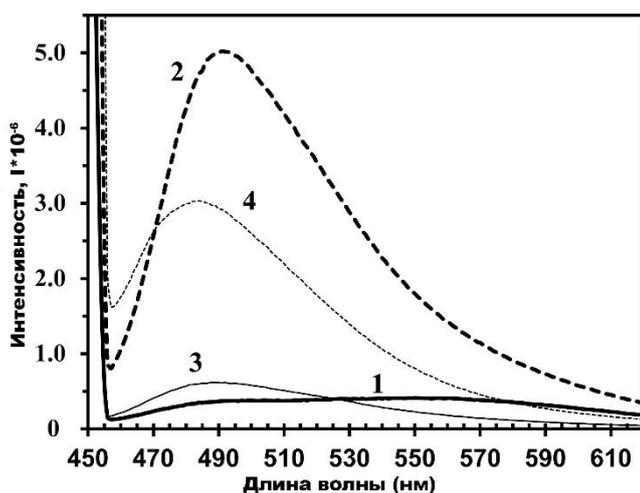


Рис. 19. Спектр флуоресценции тиофлавина при взаимодействии с вирионами ВМАльт (1), ВПЧ (3), СЧ_{вир} (2) и СЧ_{ВПЧ} (4). Исходная концентрация частиц 1 мг/мл. Измерения были проведены в воде Milli-Q при 25°C.

Помимо исследования изменений вторичной структуры БО при формировании СЧ в работе было проведено сравнение третичной структуры БО в СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} со структурой БО в исходных частицах. Для этого были получены спектры собственной флуоресценции в области 300–400 нм для каждого препарата. Известно, что интенсивность флуоресценции в этой области определяется стабильностью третичной структуры белка, а положение максимума флуоресценции зависит от степени гидрофобности окружения ароматических аминокислот – от ~ 320 нм для более гидрофобного до >350 нм для более гидрофильного. БО ВМАльт содержит 2 а.о. триптофана и 3 а.о. тирозина.

Согласно полученным спектрам, для СЧ_{ВПЧ} (Рис. 20А, кривая 2) и СЧ_{вир} (Рис. 20Б, кривая 4) характерно смещение максимума флуоресценции с 334 ± 2 нм к 344 ± 2 нм по сравнению со спектрами ВПЧ (Рис. 20А, кривая 1) и вирионов (Рис. 20Б, кривая 3). Смещение максимума флуоресценции при образовании СЧ указывает на переход а.о. триптофана и тирозина в более гидрофильное окружение.

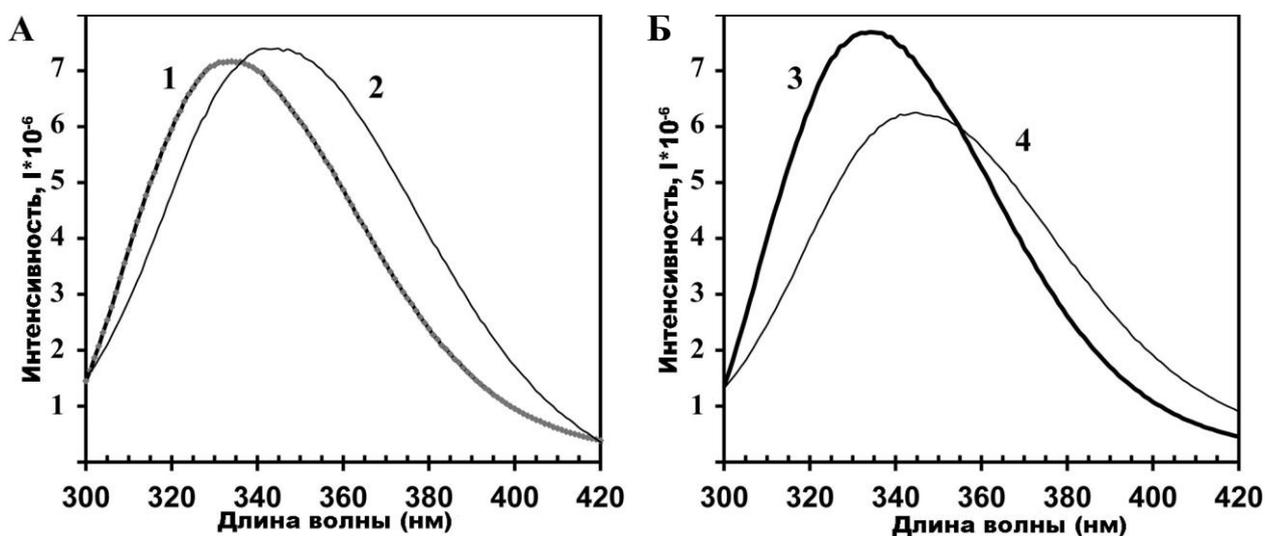


Рис. 20. Спектры собственной флуоресценции А – ВПЧ ВМАльт (1) и СЧ_{ВПЧ} (2); Б – вирионов ВМАльт (3) и СЧ_{вир} (4). Измерения были проведены в воде Milli-Q при 25°C.

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 α -спиралей и увеличении доли β -слоев, формировании кросс- β -структур и изменении состава окружения ароматических аминокислот. Сходные тенденции были продемонстрированы ранее на примере СЧ ВТМ (Dobrov *et al.*, 2014) и СЧ ХВК (Nikitin *et al.*, 2016a).

Выявленные изменения вторичной и третичной структур БО при термической перестройке должны отражаться и в изменении поверхностного состава аминокислот. Ранее на примере вирионов и СЧ ВТМ было показано, что в процессе термической обработки происходит изменение аминокислотного состава поверхности белка, что ведет к изменению антигенных свойств. Белок в составе вирионов антигенно не идентичен белку в составе СЧ ВТМ (Atabekov *et al.*, 2011). В работе Ksenofontov с соавторами (2019) изменение поверхности СЧ ВТМ было подтверждено в экспериментах по связыванию с FITC, а также методом тритиевой планиграфии. Исследования различий в аминокислотном составе поверхности СЧ и вирионов ХВК проведено не было. Однако было продемонстрировано, что БО

в составе вирионов и СЧ ХВК антигенно близки друг к другу (Nikitin *et al.*, 2016a).

Для исследования различий аминокислотных остатков, экспонированных на поверхности СЧ, вирионов и ВПЧ ВМАльт был проведен эксперимент по связыванию СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} с изотиоцианатом флуоресцеина (FITC) и диацетатом флуоресцеин-малеимида (5-(N-Maleimido) fluorescein diacetate). БО ВМАльт содержит восемь остатков лизина, доступных для мечения FITC и два остатка цистеина, доступных для связывания с диацетатом флуоресцеин-малеимида. Как было продемонстрировано в *разделе 1.1* вирионы ВМАльт практически не метятся ни одним из используемых агентов, что указывает на минимальное содержание а.о. лизина и цистеина на поверхности частиц.

Помеченные FITC и диацетатом флуоресцеин-малеимида СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} были исследованы с помощью метода флуоресцентной микроскопии (**Рис. 21**). Полученные микрофотографии подтверждают, что СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} успешно метятся как FITC (**Рис. 21А, Б**), так и диацетатом флуоресцеин-малеимида (**Рис. 21В, Г**). Для сравнения эффективности мечения СЧ и исходных частиц был проведен электрофоретический анализ с последующей детекцией помеченного БО 1) в УФ-свете и 2) окрашиванием Кумасси G-250. Оба типа СЧ (**Рис. 22А₂, дорожки 5,6**), также как ВПЧ (**Рис. 22А₂, дорожка 4**) метятся FITC эффективнее вирионов (**Рис. 22А₂, дорожка 3**). Различия в количестве, внесенных в 8-20% ПААГ препаратов обусловлено снижением концентрации СЧ в ходе мечения и последующих этапов диализа. Тем не менее различие в количестве нанесенных на ПААГ препаратов позволяет провести качественное сравнение интенсивности флуоресценции исследуемых частиц. Таким образом, на примере СЧ_{вир} и вирионов показано, что структурный переход сопровождается изменением состава аминокислотных остатков на поверхности БО – ранее не доступные для взаимодействия с FITC в составе вирионов а.о. лизина при образовании СЧ экспонируются на поверхности. Аналогичные результаты были получены и при мечении СЧ диацетатом флуоресцеин-малеимида (**Рис. 22Б₁₋₂**). ВПЧ, СЧ_{ВПЧ} и СЧ_{вир} взаимодействуют с

меткой (Рис. 22Б₂, дорожки 2-5, 8-9), что указывает на присутствие а.о. цистеина на их поверхности, в то время как БО в составе вирионов (Рис. 22 Б₂, дорожки 6-7) не доступен для мечения.

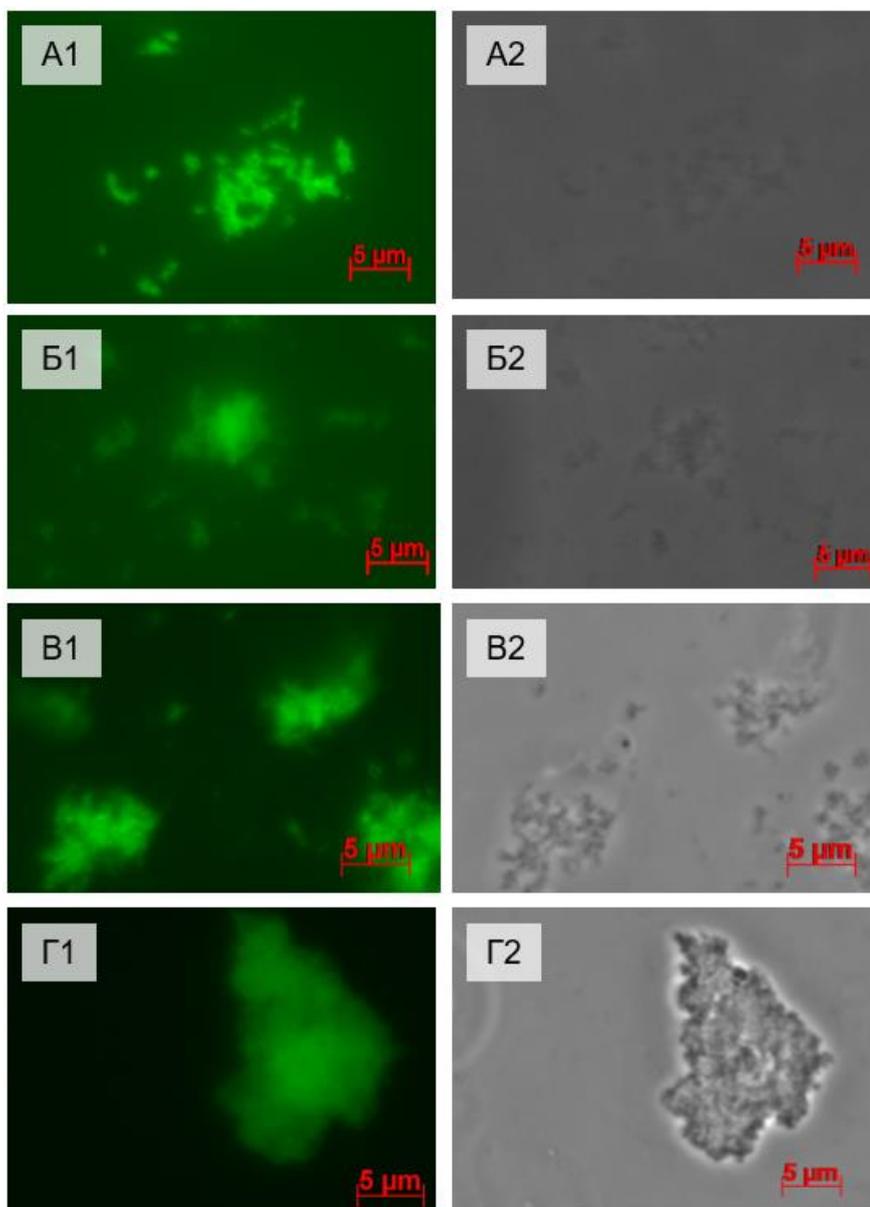


Рис. 21. Мечение СЧ ВМАЛьт флуоресцентными агентами. А – СЧ_{вир} связывается с FITC, Б – СЧ_{впч} связывается с FITC, В – СЧ_{впч} связывается с диацетатом флуоресцеин-малеимида, Г – СЧ_{вир} связывается с диацетатом флуоресцеин-малеимида. 1 – флуоресцентное изображение, 2 – фазовый контраст.

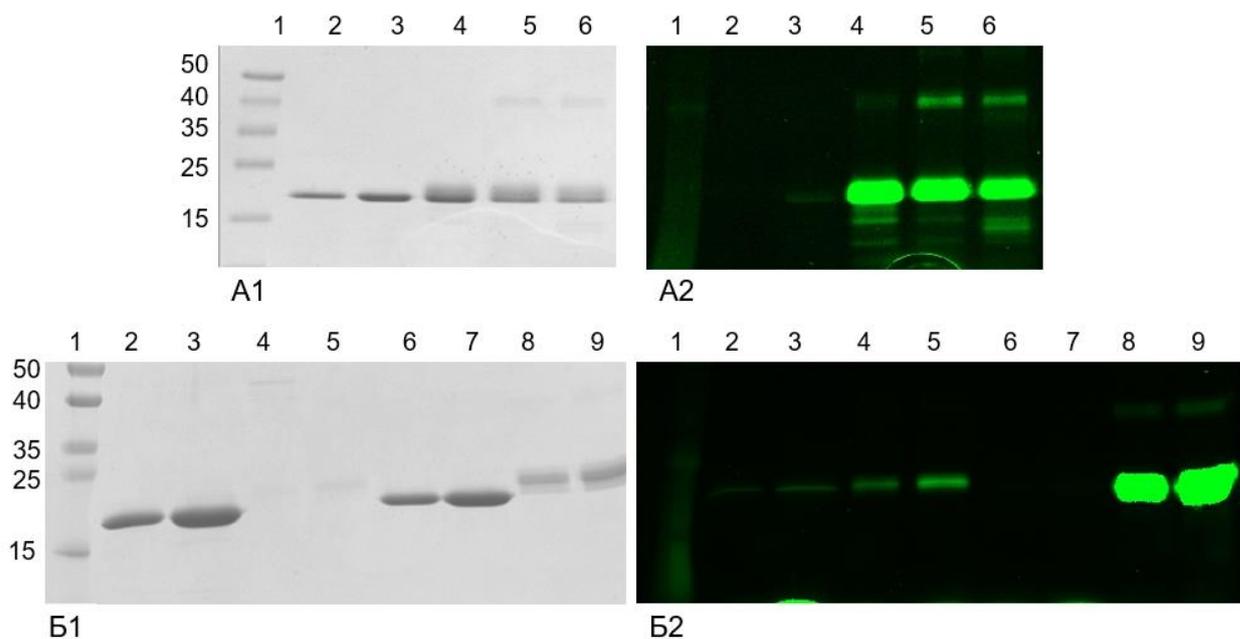


Рис. 22. Сравнение эффективности мечения $SCh_{\text{вир}}$, $SCh_{\text{ВПЧ}}$, вирионов и ВПЧ ВМАльт флуоресцентными агентами.

А – мечение FITC. БО ВМАльт в составе вирионов (дорожка 3), ВПЧ (дорожка 4), $SCh_{\text{вир}}$ (дорожка 5), $SCh_{\text{ВПЧ}}$ (дорожка 6). Дорожка 1 – маркеры молекулярной массы, кДа, дорожка 2 – немеченные вирионы ВМАльт. **А1)** окрашиванием Кумасси G-250, **А2)** детекция в УФ-свете.

Б – мечение диацетатом флуоресцеин-малеимида. БО ВМАльт в составе ВПЧ (дорожки 2,3), $SCh_{\text{ВПЧ}}$ (дорожки 4,5), вирионов (дорожки 6,7), $SCh_{\text{вир}}$ (дорожки 8,9). Дорожка 1 – маркеры молекулярной массы, кДа. **Б1)** окрашиванием Кумасси G-250, **Б2)** детекция в УФ-свете.

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, поскольку распознаются иммунной системой, не патогенны для млекопитающих и способны вызывать как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ (Nikitin *et al.*, 2016b; Venkataraman *et al.*, 2021). Помимо вакцинологии вирусы растений демонстрируют потенциал применения в области таргетной доставки лекарственных препаратов, в особенности к опухолевым клеткам. Этот подход позволяет снизить дозировку химиотерапевтических препаратов и повысить их эффективность за счет специфического аккумуляирования в опухолевых клетках, что приводит к лучшему ответу на терапию и общей выживаемости пациентов (Chung *et al.*, 2020). Помимо терапевтического использования вирусы растений получают применения в области молекулярного контрастирования для визуализации биологических процессов *in vivo*. В сравнении с синтетическими аналогами наночастицы вирусов растений характеризуются более коротким периодом циркуляции, что позволяет снизить возможные побочные эффекты (Steinmetz, 2010).

Предварительное исследование потенциала применения вирионов, ВПЧ и СЧ ВМАльт в биотехнологических и медицинских целях предполагает изучение стабильности этих частиц в условиях использования, прежде всего в физиологических. Кроме того, важным аспектом возможности прикладного применения вирусов растений является возможность получения вируса в препаративных количествах. В связи с этим разработка методики, позволяющей эффективно накапливать и выделять вирус, крайне важна для последующих исследовательских работ.

3.1. Стабильность вирионов, ВПЧ и СЧ ВМАльт в различных условиях

Стабильность вирионов и частиц, полученных из ВМАльт, особенно в условиях, приближенных к физиологическим, необходимое свойство для их успешного применения при решении биотехнологических задач.

Для оценки стабильности вирионов и ВПЧ ВМАльт частицы проинкубировали в различных условиях (Milli-Q; 0.15M NaCl; 0.01M Трис-НСl, рН 7.5; PBS) и проанализировали методом ПЭМ.

Согласно полученным микрофотографиям, вирионы ВМАльт сохраняют свою морфологию и размеры (диаметр) при всех условиях инкубации (вода: 14.2 ± 1.3 нм; 0.15M NaCl: 14 ± 0.95 нм; 0.01 M Трис-НСl, рН 7.5: 14.5 ± 1 нм), в том числе – в близких к физиологическим (PBS: 15 ± 1.3 нм) (Рис. 23Г).

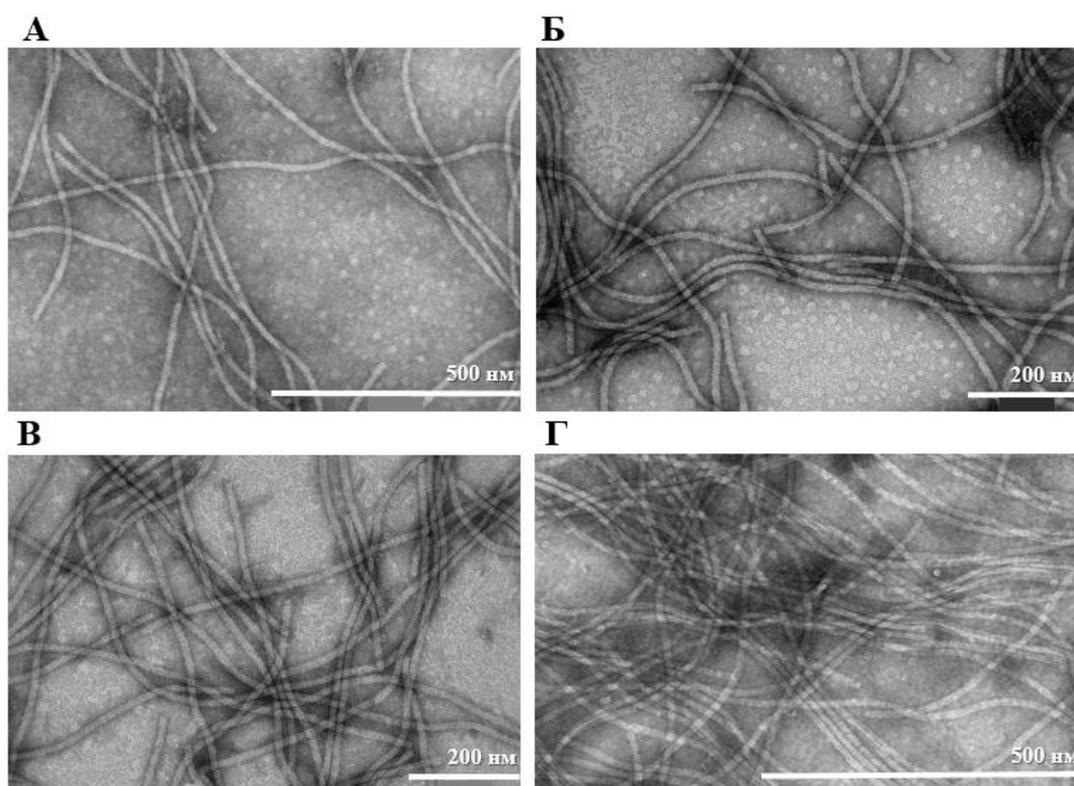
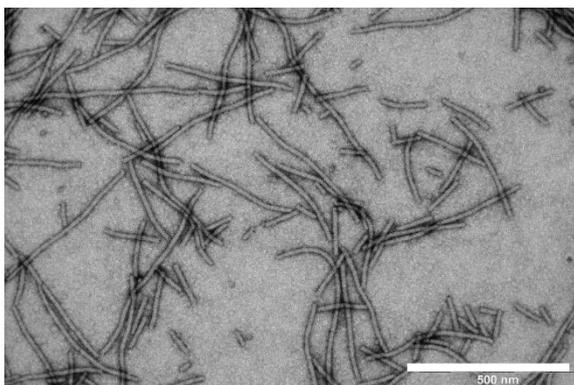


Рис. 23. Анализ стабильности вирионов ВМАльт в различных условиях: А) Milli-Q, Б) 0.15 M NaCl, В) 0.01 M Трис-НСl, рН 7.5, Г) PBS. ПЭМ, контрастирование 2% уранилацетатом, масштабная метка 500 нм.

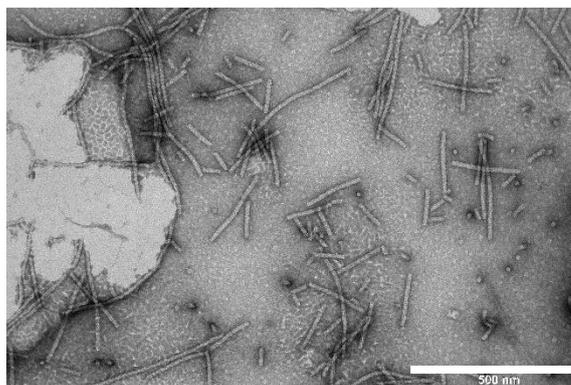
Способность формировать стабильные длинные ВПЧ в воде (Mukhamedzhanova *et al.*, 2011) отличает БО ВМАльт от БО ВМП, сборка

которого с образованием ВПЧ в отсутствие РНК происходит только при рН 4.0 и низкой ионной силе. При этом добавление NaCl к БО ВМП приводило к снижению коэффициента седиментации и длины образуемых полимеров. В диапазоне рН 7.5-9.0 сборка БО ВМП ограничивается образованием небольших агрегатов со спиральной структурой со средними коэффициентами седиментации 25S (Erickson *et al.*, 1976, 1978). В то же время БО другого потексвируса ХВК в отсутствие РНК существует в водном растворе (рН 6.8) в виде смеси небольших 2S-5S и 10-15S агрегатов (Новиков *и др.*, 1972; Kaftanova *et al.*, 1975), а согласно Goodman с соавторами – в форме 2.3S мономерных субъединиц (Goodman *et al.*, 1975). Частичная полимеризация БО ХВК оказалась возможной только при добавлении фосфатного буфера до конечной концентрации 0.2 М (рН 7.0-7.5) в инкубационную смесь, содержащую диализованный белок, и последующем выдерживании раствора в течение 24 ч при 4-20°C. Образование одно- и двухслойных белковых дисков было продемонстрировано методом ПЭМ (Kaftanova *et al.*, 1975). Диаметр дисков и диаметр их центрального канала оказался сходен с данными для вирионов ХВК. Однако было установлено, что при продолжении инкубации раствора БО в фосфатном буфере диски начинали агрегировать в стопки из 14-16 дисков, при этом спиральная структура практически не образовывалась (Kaftanova *et al.*, 1975).

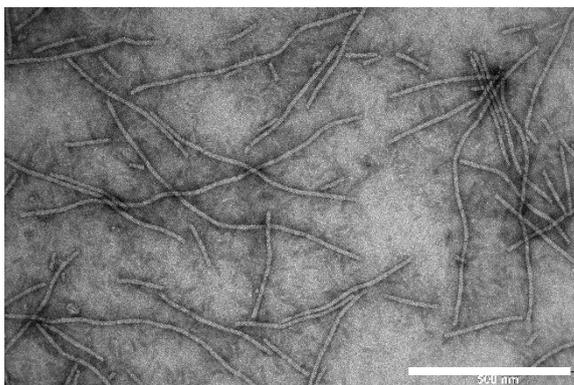
Для оценки стабильности предварительно собранных ВПЧ была проведена их инкубации в различных условиях (Milli-Q; 0.15 М NaCl; 0.01 М Трис-НСl, рН 7.5), в том числе приближенных к физиологическим (PBS) (Рис. 24). По результатам ПЭМ ВПЧ ВМАльт стабильны и сохраняют морфологию и диаметр во всех условиях проведения эксперимента (вода: 13.7 ± 1 нм; 0.15 М NaCl: 13.9 ± 1.9 нм; 0.01 М Трис-НСl, рН 7.5: 13.2 ± 1.5 нм; PBS: 13.7 ± 1.3 нм) (Рис. 24). Длина частиц составила от 40 до 2000 нм, со средней длиной 100-200 нм, что согласуется с полученными ранее в нашей лаборатории данными по длине ВПЧ ВМАльт при значении рН 8.0 (Mukhamedzhanova *et al.*, 2011).



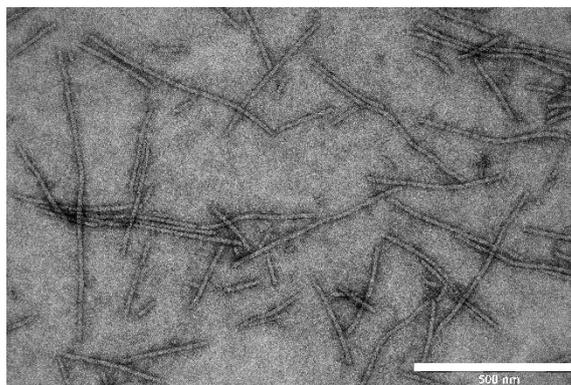
А



Б



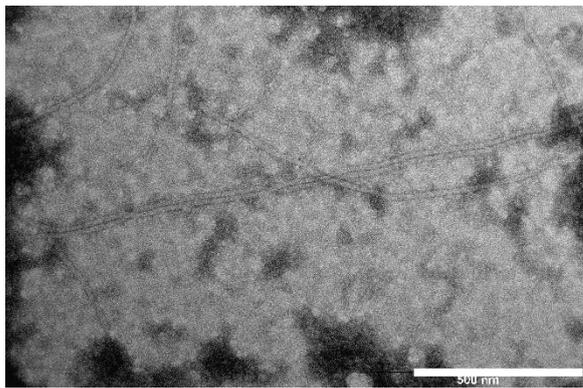
В



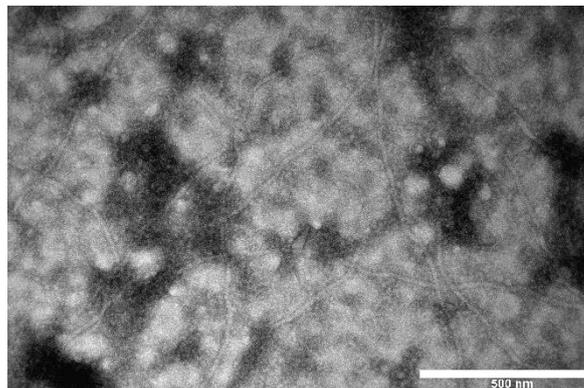
Г

Рис. 24. Анализ стабильности ВПЧ ВМАльт в различных условиях. А) Milli-Q, Б) 0.15 М NaCl, В) 0.01 М Трис-НСl, рН 7.5, Г) 0.01 М Трис-НСl, 0.15 М NaCl, рН 7.5. ПЭМ, контрастирование 2% уранилацетатом, масштабная метка 500 нм.

Стабильность вирионов и ВПЧ ВМАльт была оценена и при инкубации в сыворотке крови лабораторных животных, что важно для успешного применения вирусных и вирусоподобных частиц при разработке вакцинных препаратов. Согласно результатам ПЭМ проинкубированные в сыворотке крови мышей вирионы и ВПЧ ВМАльт сохраняют исходную морфологию (Рис. 25) – диаметр частиц не изменяется (вирионы: 14.7 ± 1.3 нм, вирионы; ВПЧ: 13.8 ± 1.2 нм).



А)



Б)

Рис. 25. Анализ стабильности вирионов и ВПЧ ВМАльт в сыворотке крови лабораторных животных. А) Вирионы, Б) ВПЧ. ПЭМ, контрастирование 2% уранилацетатом, масштабная метка 500 нм.

Данных, посвященных стабильности вирионов или ВПЧ ВМП или других потексвирусов в литературе не представлено. В ряде работ были изучены иммуностимулирующие свойства ВМП. Способность к иммуностимуляции может быть косвенным доказательством сохранения в физиологических условиях высокомолекулярных структур, на поверхности которых представлены многократно повторяющиеся эпитопы (Acosta-Ramírez *et al.*, 2008).

В свою очередь, БО ВМП не способен полимеризоваться в отсутствие РНК *in vitro* в близких к физиологическим условиям, а при экспрессии в клетках *E. coli* нуклеопротеин-подобные частицы (НПЧ) ВМП неизбежно содержат бактериальную РНК в своем составе (Erickson *et al.*, 1976; Tremblay *et al.*, 2006). Таким образом, отсутствие стабильности ВПЧ ВМП, не содержащих РНК, в физиологических условиях, а также включение гетерологичной РНК при образовании НПЧ налагают существенное ограничение на применение ВПЧ и НПЧ ВМП в биотехнологических целях. В то же время, ВПЧ ВМАльт не содержат РНК и остаются стабильны независимо от состава раствора для инкубации (Milli-Q; 0.15 М NaCl; 0.01 М Трис-НСl, pH 7.5; 0.01 М Трис-НСl, 0.15 М NaCl, pH 7.5.), в том числе в сыворотке крови лабораторных животных.

Для успешного использования вирионов, ВПЧ и СЧ ВМАльт при разработке лекарственных препаратов также имело смысл убедиться в возможности их лиофилизации. Лيوфилизованные вирусные частицы и препараты на их основе не только стабильны и нетребовательны к условиям длительного хранения, но и могут транспортироваться при любой температуре, что упрощает и удешевляет доставку лекарственных препаратов на основе лиофилизованных частиц.

Для этого вирионы, ВПЧ и СЧ ВМАльт были заморожены при -70°C и лиофилизованы; для оценки сохранности частиц лиофилизованные препараты были заново растворены в воде и исследованы методом ПЭМ и электрофореза в ПААГ. В соответствии с полученной электрофореграммой, БО в составе вирионов (Рис. 26, дорожки 2, 3), ВПЧ (Рис. 26, дорожки 4, 5), а также СЧ_{вир} (Рис. 26, дорожки 6, 7) и СЧ_{ВПЧ} (Рис. 26, дорожки 8, 9) не деградирует после лиофилизации – дополнительных полос с более низкой молекулярной массой для лиофилизованных частиц выявлено не было.

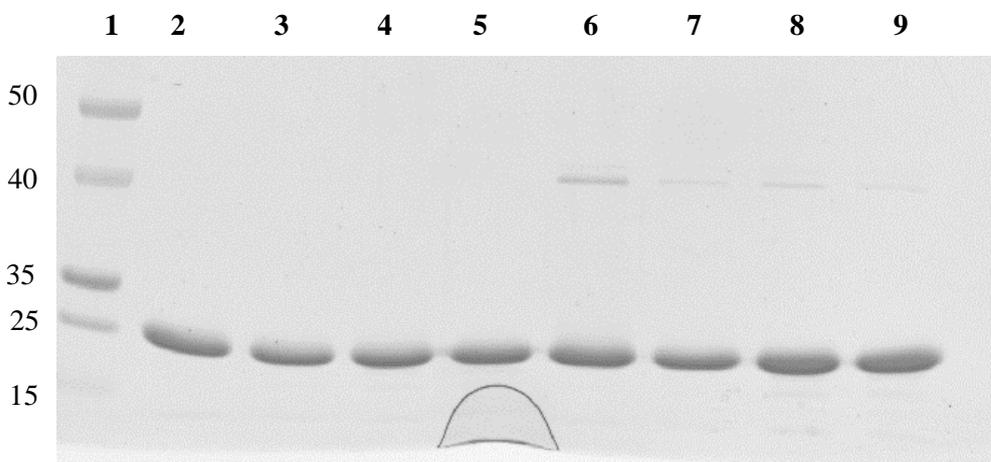


Рис. 26. Анализ стабильности БО в составе вирионов, ВПЧ и СЧ ВМАльт после лиофилизации. 1 – маркеры молекулярной массы (кДа), 2 – вирионы ВМАльт (контроль), 3 – лиофилизованные вирионы ВМАльт, 4 – ВПЧ ВМАльт (контроль), 5 – лиофилизованные ВПЧ ВМАльт, 6 – СЧ_{вир} (контроль), 7 – лиофилизованные СЧ_{вир}, 8 – СЧ_{ВПЧ} (контроль), 9 – лиофилизованные СЧ_{ВПЧ}. Анализ методом электрофореза в 8-20% ПААГ. Краситель – Кумасси бриллиантовый синий G-250.

Электронные микрофотографии лиофилизированных и заново растворенных в воде вирионов, ВПЧ, СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} не имеют существенных отличий от микрофотографии не прошедших лиофилизацию частиц (**Рис. 27**). Прошедшие лиофилизацию частицы не имеют тенденции к повышенной агрегации, диаметры лиофилизированных вирионов (15 ± 1.5 нм) и ВПЧ (14 ± 1.3 нм) соответствуют исходным значениям нелиофилизированных частиц, морфологических различий не выявлено (**Рис. 27 А2, Б2**). СЧ_{вир} имеют тенденцию к агрегации в независимости от проведения лиофилизации (**Рис. 11, 12**). Таким образом, при лиофилизации вирионов, ВПЧ, СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} ВМАльт не происходит деградации белка в их составе и изменения морфологии частиц, что позволяет использовать лиофилизацию для их хранения и транспортировки. Кроме того, лиофилизация предоставляет возможность сконцентрировать исходные препараты, что также может упростить работу с частицами.

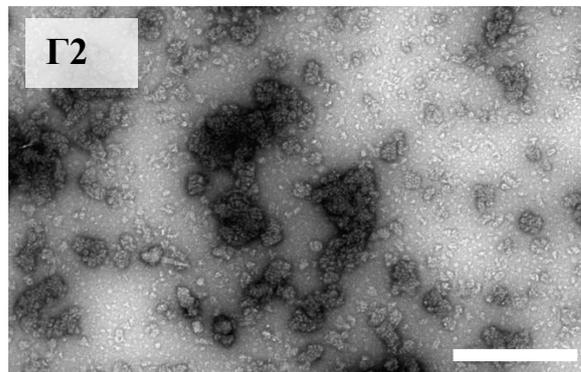
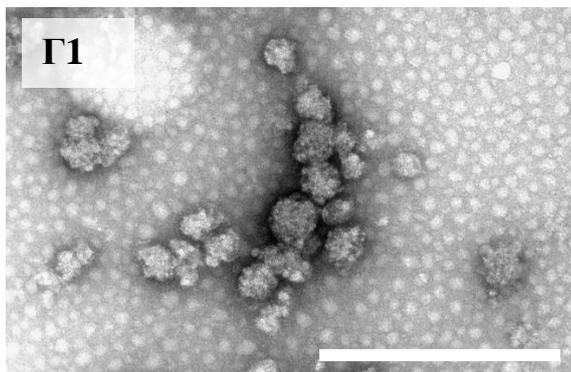
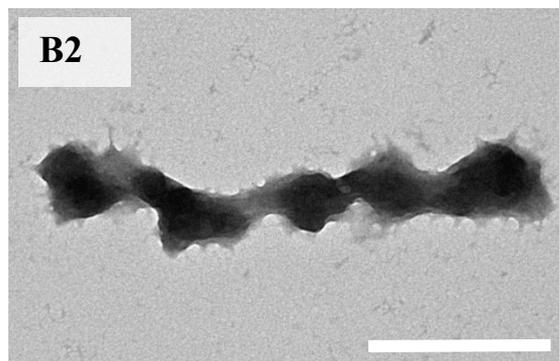
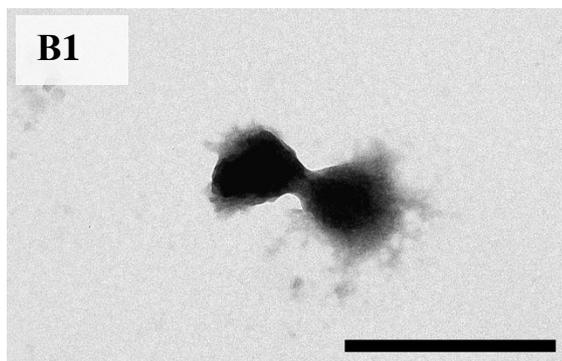
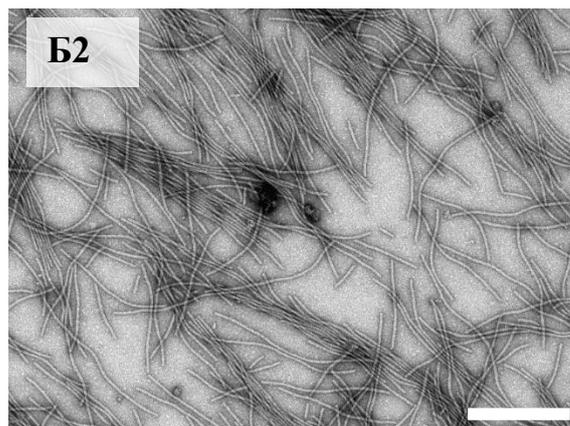
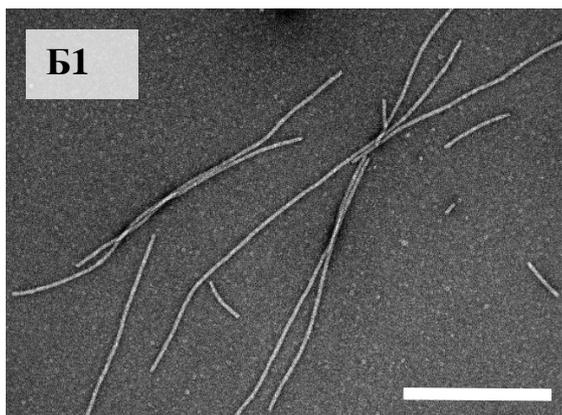
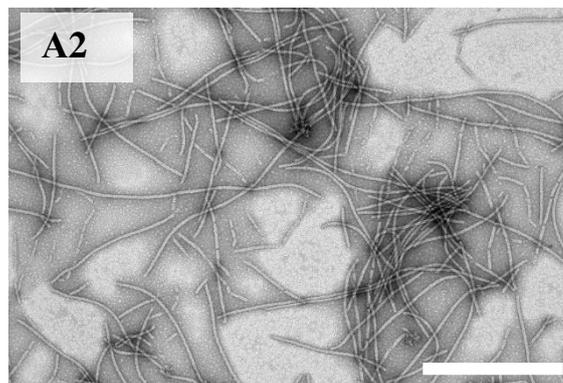
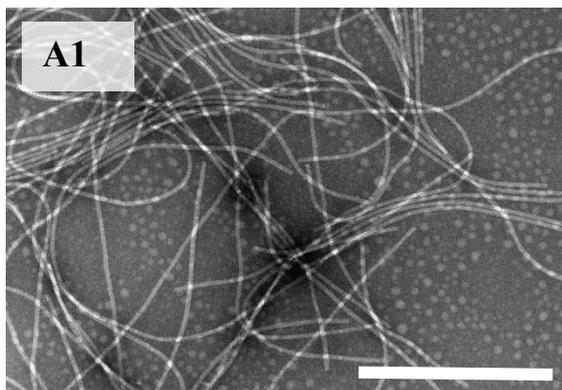


Рис. 27. Анализ стабильности вирионов, ВПЧ и СЧ ВМАльт при лиофилизации. А – вирионы, Б – ВПЧ, В – СЧ_{вир}, Г – СЧ_{ВПЧ}. 1 – частицы до лиофилизации, 2 – частицы после лиофилизации. ПЭМ, контрастирование 2% уранилацетатом, масштабная метка 500 нм.

3.2. Оптимизация методики выделения ВМАльт

Для успешного использования вирионов, ВПЧ и СЧ ВМАльт в решении биотехнологических и медицинских задач важно было повысить эффективность методики выделения вируса из зараженных растений. Наиболее высокий выход чистого вирусного препарата наблюдается при выделении классического объекта вирусологии – вируса табачной мозаики, выход которого составляет до 7-10 г/ 1 кг зеленой массы (Gleba *et al.*, 2007). В предшествующих работах выделение ВМАльт проводили из различных растений несколькими вариантами методик. Впервые ВМАльт был выделен на растениях *Chenopodium amaranticolor* по методике выделения вируса желтой мозаики клевера (Geering and Thomas, 1999). Hammond с соавторами выделяли ВМАльт на *Nicotiana benthamiana*, применяя методику, адаптированную для вируса X подорожника (2006b). В работах Ivanov с соавторами (2011) и Mukhamedzhanova с соавторами (2011) выделение осуществляли на растениях *Portulaca grandiflora* по методике, разработанной для ХВК (Табл. 8).

Для увеличения выхода ВМАльт был модифицирован этап накопления вируса за счет подбора растения-хозяина, а также изменена стадия выделения и очистки вирусного препарата. В данной работе накопление ВМАльт проводили на двух видах растений: табаке Бентхама (*N. benthamiana*) и портулаке крупноцветковом (*P. grandiflora*). Использование для накопления ВМАльт мари гигантской (*C. amaranticolor*), на которой проводили накопление вируса Geering и Thomas (1999), представляется недостаточно безопасным, так как это растение по литературным данным является хозяином для множества других видов потексвирусов (<https://www.genome.jp/>). Напротив, в лабораторных условиях портулак практически не подвержен заражению другими вирусами, т.к. обладает толстой кутикулой. Эта особенность позволяет минимизировать возможную кросс-контаминацию растений портулака другими вирусами. Однако выделение ВМАльт из портулака осложнено высокой концентрацией полисахаридов в растительном

соке. В свою очередь, табак Бентхама является неприхотливым и удобным в уходе растением, на котором относительно просто проводить накопление и выделение вирусов. Таким образом, предложенная коллективом нашей лаборатории идея о сочетании двух видов растений для размножения ВМАльт позволяет решить несколько задач: сохранить чистоту итогового вирусного препарата, упростить подготовку растений и процедуры выделения и очистки вируса.

Для получения неконтаминированного другими потексвирусами препарата ВМАльт пассаж инфекционного материала проводился через *P. grandiflora*. Заражение как табака, так и портулака проводили соком инфицированных ВМАльт растений портулака. Для зараженных растений *N. benthamiana* были отмечены следующие симптомы: мозаика листовой пластинки, скручивание и морщинистость листьев (Рис. 28А, Б), в то время как инфекция на *P. grandiflora* протекала бессимптомно.



А



Б



В

Рис. 28. Симптомы инфекции ВМАльт на *N. benthamiana*.

А, Б Зараженные ВМАльт растения, 20 день после инокуляции.
В Здоровые растения (отрицательный контроль).

Существует несколько описанных в более ранних работах вариантов методики выделения ВМАльт. Авторы используют различные растения для накопления, применяют разные буферы для гомогенизации и экстракции, различные подходы к очистке и режимы ультрацентрифугирования. В работе

Geering and Thomas (1999) авторы использовали методику выделения, ранее описанную Bancroft с соавторами (1979). Hammond с коллегами (2006b) выделяли ВМАльт по методике, разработанной изначально для потексвирусов и впоследствии адаптированной для выделения потивирусов. В данной работе ВМАльт выделяли по методике, разработанной изначально для другого потексвируса – X вируса картофеля – с некоторыми модификациями (Ivanov *et al.*, 2011; Mukhamedzhanova *et al.*, 2011) (**Табл. 8**).

Для повышения выхода вируса нами было введено дополнительное осаждение с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ M_r 6000). Первое осаждение происходит при концентрации ПЭГ 5%, второе – при 8%. Такой подход позволяет увеличить количество выделяемого вируса уже на первых стадиях работы. Методика Hammond с коллегами (2006b) и Mukhamedzhanova с соавторами (2011) предполагает только одну стадию осаждения вируса, в то время как в работе Geering и Thomas (1999) эта стадия отсутствует.

Для экстракции вируса из полученного осадка был использован 0,05 М Трис-НСl, 0,01 М ЭДТА, рН 8,0, аналогично методике Mukhamedzhanova с соавторами (2011). Повышение эффективности было достигнуто за счет увеличения числа и продолжительности циклов экстракции – два-три цикла в течение 2-6 часов вместо одного-двух в течение 1-2 часов.

Финальная очистка осуществлялась с помощью высокоскоростного ультрацентрифугирования. Была увеличена продолжительность ультрацентрифугирования: первый цикл – 111 000 g, 3 часа, второй, с 30% сахарозной подушкой – 111 000 g, 4 часа. Сравнительное описание методик выделения ВМАльт приведено в **Таблице 8**.

Для обеспечения максимально высокого выхода были проверены на наличие вируса супернатанты после ультрацентрифугирования, нерастворенные за время экстракции осадки. В случае обнаружения вируса, использовали эти фракции для выделения и на следующих этапах объединяли с основным препаратом.

В результате нами были получены следующие значения выхода ВМАльт:

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

✓ 20 мг вируса/100 г зеленого материала при накоплении и выделении ВМАльт на растениях портулака, что в 6 раз превышает выходы Mukhamedzhanova с соавторами (2011) (Табл. 8).

Таким образом, нами была разработана методика накопления и выделения ВМАльт, которая позволяет получать вирионы ВМАльт в препаративных количествах. Предложенный подход имеет существенное преимущество перед описанными ранее в литературе методиками, заключающееся в повышении выхода вируса без применения дополнительных затрат, материалов, времени и т.д. Кроме того, нами была продемонстрирована стабильность вирионов и ВПЧ ВМАльт в физиологических условиях, что позволяет рассматривать эти частицы в качестве объектов для разработки новых биомедицинских технологий.

Таблица 8. Сравнение методик накопления и выделения ВМАльт

Авторы Этапы выделения	Geering and Thomas, 1999	Hammond <i>et al.</i> , 2006b	Mukhamedzhanova <i>et al.</i> , 2011	В данной работе	
Растение-хозяин	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>Portulaca grandiflora</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>Portulaca grandiflora</i>
Выход (мг вируса/100 г зел. материала)	23,4	8,6-12,4	3,4	57,3	20,0
Буфер для гомогенизации	0.02 М Na-боратный, 0.5% Na ₂ SO ₃ , pH 8.2	0.5 М K ₂ H/KH ₂ PO ₄ , 0.5% Na ₂ SO ₃ , pH 8.4	0.3 М глицин-КОН, 1% Na ₂ SO ₃ , pH 7.5	0.3 М глицин-КОН, 1% Na ₂ SO ₃ , pH 7.5	
Очистка от растительных остатков	Низкоскоростное центрифугирование 0.5% тритон X-100	Низкоскоростное центрифугирование 2% тритон X-100, 4% ПЭГ M _r 8000, 2% NaCl	Низкоскоростное центрифугирование 1% тритон X-100 5% ПЭГ M _r 6000, 2% NaCl	Низкоскоростное центрифугирование 1% тритон X-100 Два этапа осаждения: 1. 5% ПЭГ M _r 6000, 2% NaCl 2. 8% ПЭГ M _r 6000	
Буфер для экстракции	0.01 М Трис-НСl, 0.001 М ЭДТА, pH 8.0	0.1 М Na-боратный, 0.1 М KCl, pH 8.0	0.05 М Трис-НСl, 0.01 М ЭДТА, pH 8.0	0.05 М Трис-НСl, 0.01 М ЭДТА, pH 8.0	
Очистка экстракта	Центрифугирование сахарозная подушка (30%) (85 000 g, 4 часа)	Центрифугирование сахарозная подушка (30%) (85 600 g, 2,5 часа)	Центрифугирование (100 000 g, 1,5 часа)	Центрифугирование (111 000 g, 3 часа)	
		Центрифугирование (139 000 g, 16-20 часов) в градиенте CsCl ρ _{ср} = 1.32 г/см ³			
	Центрифугирование (85 000 g, 2,5 часа)	Диализ 0,1 М борная кислота, NaOH, pH 8.0	Центрифугирование сахарозная подушка (30%) (110 000 g, 2,5 часа)	Центрифугирование сахарозная подушка (30%) (111 000 g, 4 часа)	

3.3. Адсорбционные свойства СЧ ВМАльт

Известно, что структурно-модифицированные сферические частицы ВТМ и ХВК способны адсорбировать целевые белки на своей поверхности (Atabekov *et al.*, 2011, Karпова *et al.*, 2012, Nikitin *et al.*, 2016a). Так, СЧ ВТМ способны адсорбировать белки с молекулярной массой от 17 до 66.5 кДа с различным аминокислотным составом, а также небольшие простые икосаэдрические вирионы вирусов животных и растений. Важно, что при этом белки, адсорбированные на поверхности СЧ ВТМ и СЧ ХВК сохраняют свою антигенную специфичность (Atabekov *et al.*, 2011, Karпова *et al.*, 2012, Nikitin *et al.*, 2016a). На примере СЧ ВТМ было показано, что композиции СЧ с модельным антигеном (БО ХВК, 25 кДа) стимулируют более активную выработку антител на антиген по сравнению с иммунизацией индивидуальным БО ХВК в отсутствие СЧ ВТМ (Karпова *et al.*, 2012). СЧ ВТМ с адсорбированным на поверхности рекомбинантным антигеном вируса краснухи были исследованы в качестве кандидатной вакцины против этого заболевания. Согласно проведенными доклиническим испытаниям предложенные композиции представляют собой прототип эффективной вакцины, активирующей гуморальный иммунитет против краснухи (Trifonova *et al.*, 2017).

Для исследования адсорбционных свойств СЧ_{ВПЧ} и СЧ_{вир} ВМАльт были получены комплексы СЧ с модельным антигеном (рекомбинантный белок ТМ2е, содержащий повторяющиеся последовательности М2е-эпитопа вируса гриппа А, $M_r=24$ кДа). Комплексы СЧ_{вир}-ТМ2е и СЧ_{ВПЧ}-ТМ2е были приготовлены путем простого смешивания СЧ с белком. Формирование комплексов СЧ_{вир}-ТМ2е и СЧ_{ВПЧ}-ТМ2е было детектировано с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии с сывороткой к ТМ2е. Полученные микрофотографии в режиме флуоресценции и фазового контраста подтверждают формирование комплексов СЧ_{вир}-ТМ2е и СЧ_{ВПЧ}-ТМ2е (**Рис. 29**).

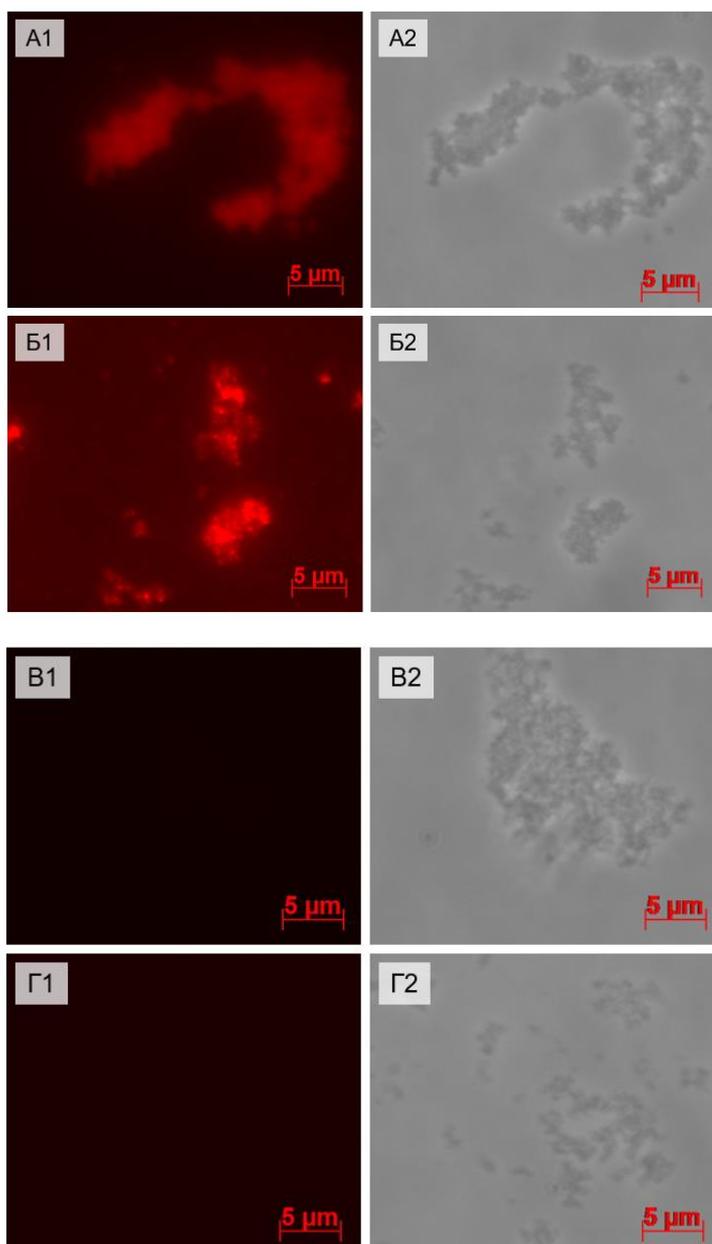


Рис. 29. Иммунофлуоресцентная микроскопия комплексов СЧ ВМАльт с адсорбированным на поверхности рекомбинантным белком ТМ2е. **А** – комплексы с СЧ_{вир}–ТМ2е, **Б** – комплексы с СЧ_{ВПЧ}–ТМ2е. Комплексы обработаны первичными антителами к ТМ2е и вторичными антивидовыми антителами, конъюгированными с флуорофором Alexa 546. **В** – негативный контроль: комплексы с СЧ_{вир}–ТМ2е, без добавления первичных антител, **Г** – негативный контроль: комплексы с СЧ_{ВПЧ}–ТМ2е, без добавления первичных антител. Иммунофлуоресцентная микроскопия в режиме флуоресценции (1) и фазового контраста (2).

Изображение частиц в режиме флуоресценции (Рис. 29 А1, В1) полностью соответствует положению СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ}, наблюдаемых в режиме фазового контраста (Рис. 29 А2, Б2). Сравнение этих изображений свидетельствует о том, что все СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ}, находящиеся в поле зрения,

покрыты белком ТМ2е. Отсутствие флуоресценции в контрольных препаратах (Рис. 29 В2, Г2), не обработанных сывороткой к ТМ2е, подтверждает достоверность полученных результатов и специфичность взаимодействия ТМ2е, находящегося в комплексе с СЧ_{вир/ВПЧ} ВМАльт, с антисывороткой. Таким образом, СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} способны адсорбировать целевые белки за счет нековалентных взаимодействий в условиях *in vitro*. При этом адсорбционные свойства СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} ВМАльт качественно сопоставимы со способностью к адсорбции СЧ ВТМ и СЧ ХВК – все частицы демонстрируют связывание с антигеном при простом смешивании в отсутствии дополнительных кросс-сшивающих реагентов.

3.4. Применение СЧ и ВПЧ ВМАльт в качестве платформы для химической конъюгации

Биоконъюгация позволяет использовать вирусы растений в качестве носителей, которые за счет образования ковалентных связей с молекулой интереса либо инкапсулируют, либо презентируют ее на своей поверхности. В отличие от рассмотренной выше адсорбции, которая основана на нековалентных взаимодействиях, конъюгация позволяет осуществлять направленное специфическое связывание с молекулами интереса. Такими молекулами могут выступать активные компоненты лекарственных препаратов, контрастирующие вещества и молекулы, позволяющие осуществлять направленную доставку лекарственных препаратов в ткани. Значительным преимуществом вирусов растений в качестве носителей является возможность использования как внутренней, так и внешней поверхности капсида. При этом для конъюгации доступны присутствующие в БО остатки лизина, цистеина и аспарагиновой/глутаминовой кислоты, которые можно конъюгировать через N-гидроксисукцинимидид (NHS), малеимид и карбодиимид соответственно (Pokorski&Steinmetz, 2011). Конъюгация используется для присоединения крупных пептидов или целевых белков к поверхности носителя. Это выгодно отличает конъюгацию от генно-

инженерного подхода, при котором для успешной сборки белка с образованием ВПЧ размер добавляемого пептида должен составлять не более 30 аминокислот (Chatterji *et al.*, 2004).

Для обеспечения возможности конъюгации к вирионам и ВПЧ вирусов растений, не имеющих расположенных на поверхности доступных для конъюгации аминокислотных остатков, используют сайт-направленный мутагенез БО для добавления необходимых активных аминокислот. Была продемонстрирована возможность конъюгации рекомбинантного белка с молекулярной массой 22 кДа к внешней поверхности вируса мозаики цветной капусты с добавленными остатками цистеина (Chatterji *et al.*, 2004). Эпитопы белков F и HN конъюгировали к генно-инженерно модифицированному БО вируса мелкой полосатости кукурузы (Maize rayado fino virus), собирающемуся в ВПЧ. В отличие от изометрических вирусов применение вирусов растений со спиральной симметрией и их ВПЧ в качестве носителей для конъюгации позволяет добиться многократного повторения конъюгированной к БО целевой молекулы. McCormick с коллегами (2006) использовали ВТМ, с модифицированным БО, имеющим на поверхности дополнительный остаток лизина, для конъюгации коротких пептидов. Guerrero-Rodriguez с соавторами (2014) успешно конъюгировали зеленый флуоресцентный белок к немодифицированному вирусу кольцевой пятнистости через кросслинкер sulfo-MBS, однако полученный конъюгат обладал низкой стабильностью.

Для оценки возможности конъюгации полноразмерных белков к нативной поверхности частиц на основе ВМАльт были проведены следующие исследования. В *разделах 1.4* и *2.4* было продемонстрировано связывание БО в составе ВПЧ, СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} с флуоресцентными агентами – FITC и диацетатом флуоресцеин-малеимида, что указывает на потенциал применения этих частиц для биоконъюгации через реактогенные аминокислотные остатки лизина и цистеина. На следующем этапе работы нами была поставлена задача продемонстрировать возможность химической конъюгации по аминокислотным

лизина БО ВМАльт в составе ВПЧ, СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} ВМАльт с модельным рекомбинантным белком Со1 ($M_r=27$ кДа). Со1 представляет собой полипептид на основе рецептор-связывающего домена белка S (319–541 а.о.) коронавируса SARS-CoV-2, который был предложен в качестве антигена для разработки вакцины коллективом нашей лаборатории.

Рекомбинантный белок Со1 был обработан NHS и 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимидом (EDC) для получения амида карбоновой кислоты, который далее был конъюгирован через аминокислотные группы лизина к БО ВМАльт в составе ВПЧ, СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ}. Результаты конъюгации оценивались методом электрофоретического анализа.

В соответствии с полученной электрофореграммой (**Рис. 30**) между БО ВМАльт в составе ВПЧ и рекомбинантным белком Со1 прошла успешная конъюгация (**Рис. 30, дорожки 1, 2, полосы, соответствующие продукту конъюгации, указаны стрелками**) с образованием конъюгата с молекулярной массой ~ 49 кДа (молекулярная масса рассчитана с помощью программного обеспечения Image Lab™ Software (Bio-Rad Laboratories)). Экспериментальное значение молекулярной массы продукта конъюгации соответствует ожидаемому, являющемуся суммой молекулярных масс БО ВМАльт (22кДа, **Рис. 30, дорожка 3**) и Со1 (27кДа, **Рис. 30, дорожки 4, 5**). При этом полоса, соответствующая конъюгату, выявляется только на дорожках 1 и 2 (**Рис. 30**) и не обнаруживается в контролях (**Рис. 30, дорожки 3, 4, 5**), несмотря на присутствие на электрофореграмме рекомбинантных белков (**Рис. 30, дорожки 4, 5**) минорных полос, соответствующих олигомерным формам. Полученные результаты подтверждают потенциал применения ВПЧ ВМАльт для биоконъюгации по а.о. лизина.

В случае конъюгации рекомбинантного белка Со1 с БО ВМАльт в составе СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} в стандартных условиях реакции четко дифференцируемые на электрофореграмме полосы, соответствующие продукту конъюгации, выявлены не были (*данные не представлены*). Тем не менее, эти результаты не могут опровергать возможность конъюгации для СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} ВМАльт. Для

достижения положительных результатов необходимо провести подбор условий реакции и повысить разрешающую способность электрофореграммы, т.к. целевой продукт конъюгации находится между димером СЧ (45кДа) и димером Со1 (55 кДа).

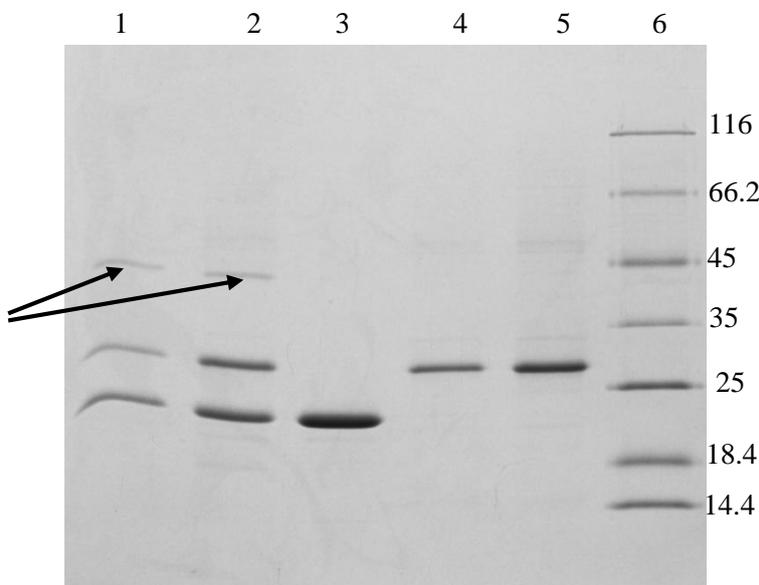


Рис. 30. Анализ результатов конъюгации рекомбинантного белка Со1 с ВПЧ ВМАльт. 1 – конъюгат ВПЧ+ Со1 1 мкл смеси, содержащей 1 мкг исходных белков, 2 – конъюгат ВПЧ+ Со1 2 мкл смеси, содержащей 1 мкг исходных белков, 3 – ВПЧ ВМАльт 3 мкг, 4, 5 – рекомбинантный белок Со1 ($M_r=27$ кДа) 1 и 2 мкг соответственно, 6 – маркеры молекулярной массы (кДа). Электрофорез в 8-20% ПААГ. Краситель – Кумасси бриллиантовый синий G-250

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 нано-носителей для лекарственных препаратов.

В связи с наличием доступных для конъюгации аминокислотных остатков на поверхности СЧ ВМАльт и успешными данными на СЧ ВТМ, на следующем этапе работы нами были проведены исследования потенциала СЧ

ВМАльт в качестве носителей лекарственных препаратов для доставки в опухолевые клетки.

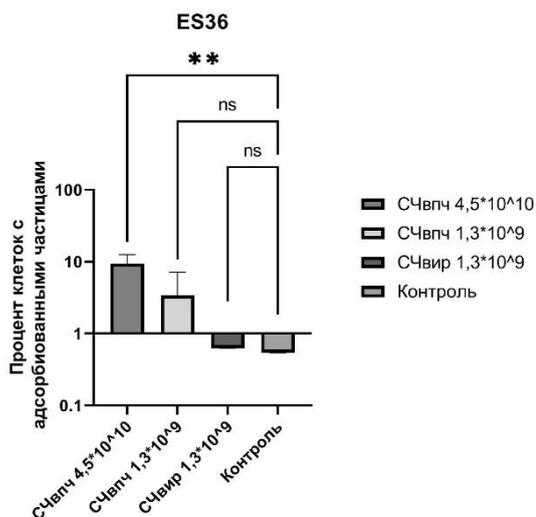
3.5. Применение СЧ ВМАльт в качестве платформы для доставки в опухолевые клетки лекарственных препаратов

Для изучения потенциала применения СЧ ВМАльт в качестве носителей для таргетной доставки в опухолевые клетки были проведены предварительные исследования возможности адсорбции и захвата конъюгированных с FITC СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} ВМАльт. Работа с клеточными культурами и оценка эффективности адсорбции и проникновения частиц в клетки были проведены в сотрудничестве с группой экспериментальной биотерапии и диагностики отдела современных биоматериалов Института регенеративной медицины первого МГМУ имени И.М. Сеченова. Результаты были получены совместно с Д.Р. Файзуллиной.

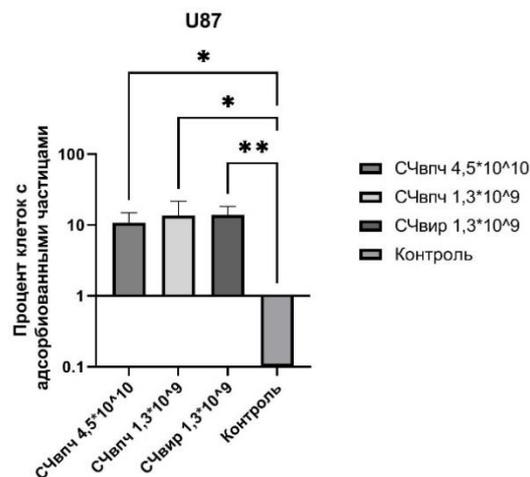
Для адсорбции использовали конъюгированные с FITC СЧ_{ВПЧ} (диаметр по ПЭМ 89 ± 25 нм) и СЧ_{вир} (диаметр по ПЭМ 167 ± 27 нм). СЧ_{ВПЧ} в двух различных концентрациях ($4.5 \cdot 10^{10}$ и $1.3 \cdot 10^9$ частиц/лунка) и СЧ_{вир} ($1.3 \cdot 10^9$ частиц/лунка) инкубировали с клетками линий ES36 (саркома Юинга), U87 (глиобластома человека) и M19 (фибробласты человека).

По данным флуоресцентной микроскопии СЧ_{ВПЧ} в обеих концентрациях, а также СЧ_{вир} адсорбируются на поверхности клеток глиобластомы человека (**Рис. 31Б**). При этом на клетках саркомы Юинга линии ES36 видно, что СЧ_{ВПЧ} в большей концентрации ($4.5 \cdot 10^{10}$ частиц/лунка) эффективнее адсорбируются на поверхности клеток, чем СЧ_{ВПЧ} в низкой концентрации ($1.3 \cdot 10^9$ частиц/лунка) (**Рис. 31А**). Важно, что в то же время уровень адсорбции СЧ_{ВПЧ} ($4.5 \cdot 10^{10}$ частиц/лунка) и СЧ_{вир} на фибробластах не имеет значимых различий со значениями для контроля (клетки без добавления СЧ) (**Рис. 31В**), т.е. СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} в концентрации $4.5 \cdot 10^{10}$ частиц/лунка избирательно адсорбируются на разных линиях опухолевых клеток.

А



Б



В

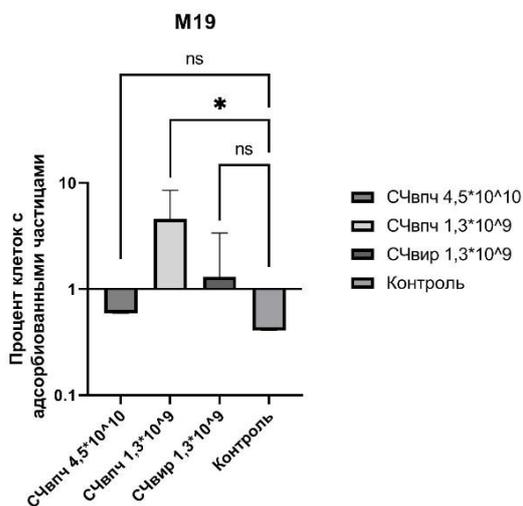


Рис. 31. Эффективность адсорбции СЧ_{вир} и СЧ_{впч} ВМАльт на клетках саркомы Юинга (ES36), глиобластомы человека (U87) и фибробластах человека (M19) при инкубации в течение 1 часа при +4°C. Контроль – клетки без добавления частиц. Статистические различия были проанализированы с использованием одностороннего ANOVA с использованием *post-hoc* Tukey HSD теста, **p* < 0.05.

Были проведены предварительные исследования возможности проникновения СЧ ВМАльт в клетки первичной короткоживущей культуры саркомы Юинга (линия ES36). Для этого клетки инкубировали с СЧ_{впч} и СЧ_{вир} при температуре 37°C в течение 5 часов. В качестве контроля параллельно проводили инкубацию СЧ с культурой клеток фибробластов человека (линия M19). Результаты фиксировали с помощью проточной цитофлуорометрии. Согласно полученным данным, проникновение СЧ_{впч} в концентрации 4,5*10¹⁰ частиц/лунка и СЧ_{вир} в концентрации 1,3*10⁹ частиц/лунка выше значений для контроля, что указывает на возможность проникновения СЧ в клетки линии

ES36 (**Рис. 32, 33**). Сравнение количества клеток, захвативших СЧ_{ВПЧ}, показывает, что повышение концентрации частиц приводит к увеличению числа таких клеток (**Рис. 33**), аналогично результатам адсорбции на ES36 (**Рис. 31**). Кроме того, полученные предварительные данные указывают на то, что захват СЧ клетками линии саркомы Юинга выше, чем фибробластами. Однако в случае СЧ_{вир} результаты анализа проникновения частиц в клетки отличаются от результатов адсорбции. СЧ_{вир} не адсорбировались на ES36 (**Рис. 31**), наоборот – захват СЧ_{вир} клетками ES36 прошел наиболее эффективно (**Рис. 33**). Предположительно, высокий уровень проникновения для СЧ_{вир} обусловлен агрегацией частиц и образованием крупных скоплений, которые лучше адсорбируются на клетках, чем одиночные частицы, и в то же время не могут быть полностью удалены при отмывке. Кроме того, температурные условия проведения эксперимента по захвату СЧ отличаются от условий адсорбции. Возможно, что при +37°C адсорбция происходит эффективнее, чем при +4°C. В связи этим можно предположить, что флуоресцентный сигнал от клеток, захвативших СЧ_{вир}, представляет собой результат суммарного эффекта проникновения и адсорбции за 5 часов, поскольку оба этих процесса возможны в условиях эксперимента.

ES36

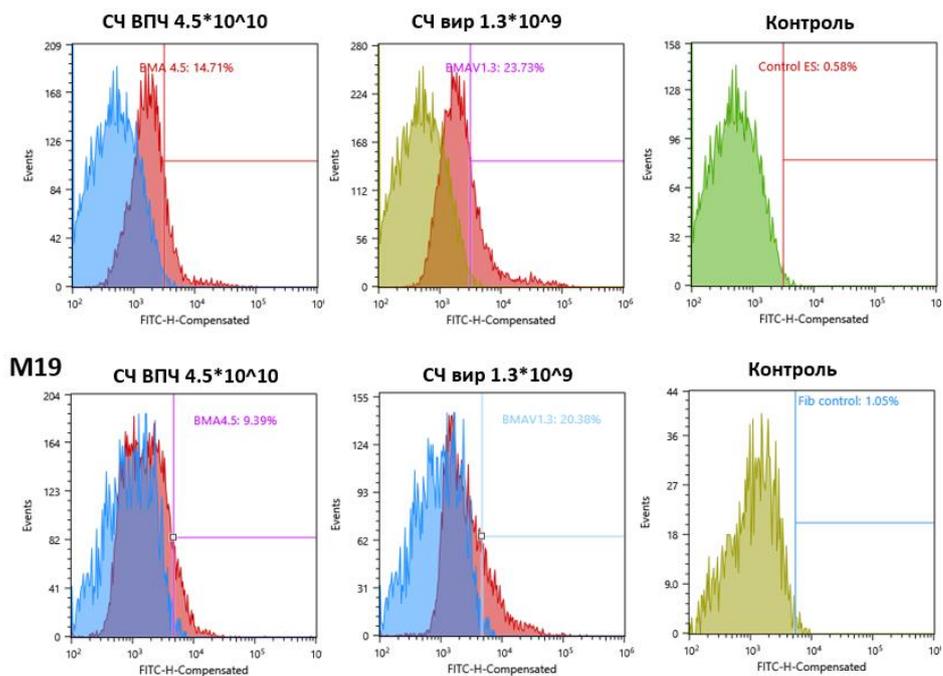


Рис. 32. Исследование захвата СЧ_{ВПЧ/вир} ВМАльт клетками культуры саркомы Юинга (линия ES36) и фибробластами человека (M19) методом проточной цитофлуорометрии. По оси ординат отложено число зарегистрированных событий. По оси абсцисс отложена интенсивность флуоресценции (длина лазера 561 нм). Контроль – клетки, к которым не добавляли СЧ. Значения для контроля наложены на результаты, полученные для экспериментов с проникновением. Вертикальная линия отсекает сигнал на уровне, отличающемся от негативного контроля.

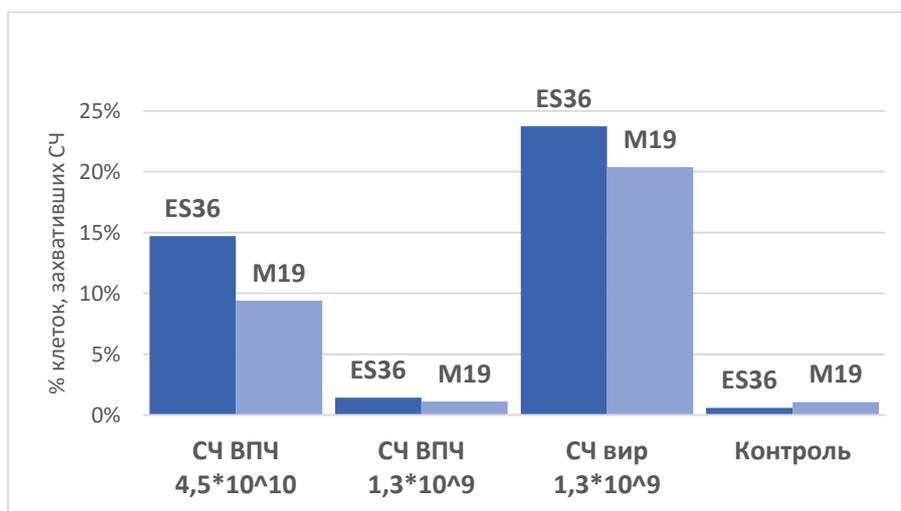


Рис. 33. Уровень проникновения СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} ВМАльт в клетки саркомы Юинга (ES36) и фибробласты человека (M19).

Проникновение СЧ_{вир} в клетки саркомы Юинга (ES36) также подтверждается данными иммуноцитохимического анализа: на полученных микрофотографиях наложение зеленого сигнала от СЧ_{вир} и красного от F-актина свидетельствует о локализации СЧ_{вир} в клетках ES36 (Рис. 34А, указано стрелками).

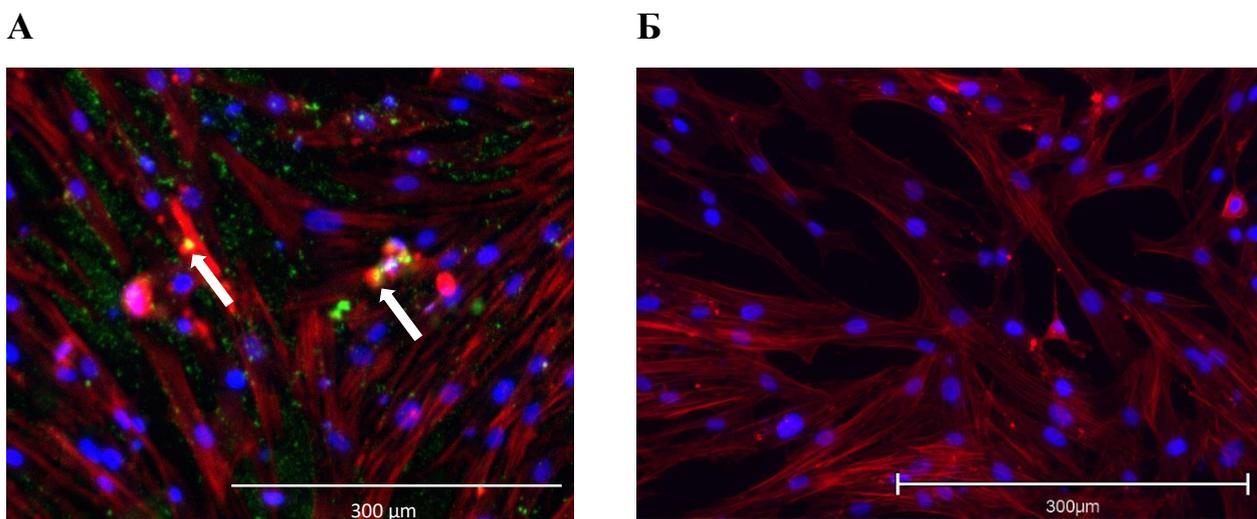


Рис. 34. Иммуноцитохимическое исследование проникновения СЧ_{вир} в клетки саркомы Юинга (линия ES36). А – клетки, инкубированные с СЧ_{вир} в течение 5 часов при +37°С, Б – контроль, клетки без добавления СЧ_{вир}. Красный – полимерные актиновые структуры (окрашивание родамин-фаллоидином), синий сигнал – клеточные ядра (окрашивание DAPI), зеленый сигнал – меченные FITC СЧ_{вир}. *Флуоресцентная микроскопия.*

Таким образом, в рамках данной работы впервые была продемонстрирована адсорбция и возможность проникновения СЧ_{ВПЧ/вир} ВМАльт в различные культуры опухолевых клеток. Было доказано, что адсорбция проходит специфично по отношению к опухолевым клеткам, но не нормальным клеткам (M19). Полученные данные подтверждают, что СЧ_{ВПЧ/вир} ВМАльт представляют собой перспективный объект для разработки платформы для таргетной доставки конъюгированных с СЧ препаратов к раковым клеткам.

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 (а.о.) 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_{вир}), условия формирования которых отличаются от условий образования СЧ из ВПЧ ВМАльт (СЧ_{ВПЧ}). Также показано, что концентрация исходного препарата не влияет на размер образующихся частиц (СЧ_{ВПЧ} и СЧ_{вир}). Продемонстрированы различия в процессе структурного перехода при образовании СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ}. Образование СЧ_{вир} происходит дискретно через промежуточную форму (интермедиат) и требует нагревания до 94°C, в то время как переход ВПЧ в СЧ_{ВПЧ} происходит постепенно при нагревании от 45 до 60 °C включительно. СЧ_{вир} не содержат вирусную РНК и образованы, как и СЧ_{ВПЧ} 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 β-слоев, формируются кросс-β-структуры и одновременно снижается доля α-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_{вир} и вирионов ВМАльт показано, что ранее недоступные для взаимодействия с флуоресцентными красителями а.о. лизина/цистеина БО в составе вирионов при образовании СЧ_{вир} 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_{вир/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_{вир/ВПЧ} ВМАльт могут специфически адсорбироваться на поверхности различных линий опухолевых клеток и потенциально захватываются 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_{вир}).
3. Выявлены различия в условиях образования СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} (СЧ на основе ВПЧ ВМАльт). Образование СЧ_{вир} происходит через переходные формы, в то время как СЧ_{ВПЧ} 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 β -структур и снижается содержание α -спиралей.
5. СЧ_{вир/ВПЧ} ВМАльт обладают адсорбционными свойствами, вирионы, ВПЧ и СЧ_{вир/ВПЧ} 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_{вир/ВПЧ} ВМАльт в опухолевые клетки различных линий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арутюнян А.М., Рафикова Э.Р., Драчев В.А., Добров Е.Н. Появление β -подобного спектра кругового дихроизма при агрегации белка, не сопровождающейся переходом в β структуру // Биохимия. 2001. Т. 66. №12. С. 1702–1705.
2. Архипенко М.В., Атабеков И.Г., Карпова О.В., Кирпичников М. П., Кондакова О.А., Никитин Н.А., Петрова Е.К., Трифонова Е.А. Вирионы и вирусоподобные частицы вируса мозаики альтернантеры как усилители иммунного ответа. Патент 2639491 С2, Россия. Опубликовано 21 декабря 2017.
3. Кондакова О.А., Трифонова Е.А., Архипенко М.В., Никитин Н.А., Карпова О.В., Атабеков И.Г. Разработка вакцины против птичьего гриппа на основе структурно модифицированных вирусов растений // С.-х. биол. 2017. Т. 52. №4. С. 731-738.
4. Новиков В.К., Кимаев В.З., Атабеков И.Г. Реконструкция нуклеопротеида вируса Х картофеля // Доклады Академии наук СССР. 1972. Т. 204. № 5. С. 1259-1262.
5. Семенюк П.И., Карпова О.В., Ксенофонтов А.Л., Калинина Н.О., Добров Е.Н., Макаров В.В. Структурные особенности белков оболочки потексвирусов, выявляемые оптическими методами // Биохимия 2016. Т. 81. №12. С. 1838–1848.
6. Трифонова Е.А. Изучение сферических частиц, образующихся при термической перестройке вируса табачной мозаики, и области их применения: диссертация кандидата биологических наук: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.02/ Трифонова Екатерина Алексеевна. – М., 2013 – 152 с.
7. Трифонова Е.А., Никитин Н.А., Архипенко М.В., Донченко Е.К., Атабеков И.Г., Карпова О.В. Сравнительное изучение термической перестройки вирусов с икосаэдрическим и спиральным типом симметрии // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2017. Т. 72. № 4. С. 209-214.
8. Трифонова Е.А., Никитин Н.А., Кирпичников М.П., Карпова О.В., Атабеков И.Г. Способ получения и характеристика сферических частиц - новых биогенных платформ // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2015. № 4. С. 46-50.
9. Agirrezabala X., Méndez-López E., Lasso G., Sánchez-Pina M.A., Aranda M., Valle M. The near-atomic cryoEM structure of a flexible filamentous plant virus shows homology of its coat protein with nucleoproteins of animal viruses // Elife. 2015. V. 4. e11795.
10. Atabekov J., Dobrov E., Karpova O., Rodionova N. Potato virus X: structure, disassembly and reconstitution // Mol Plant Pathol. 2007 V. 5. P. 667-675.
11. Atabekov J., Nikitin N., Arkhipenko M., Chirkov S., Karpova O. Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into

- spherical nanoparticles // *Journal of General Virology*. 2011. V.92. P. 453-456.
12. Babin C., Majeau N., Leclerc D. Engineering of papaya mosaic virus (PapMV) nanoparticles with a CTL epitope derived from influenza NP // *J Nanobiotechnology*. 2013. V. 11: 10.
 13. Baker C.A., Breman L. and Jones L. Alternanthera mosaic virus found in Scutellaria, Crossandra, and Portulaca spp, in Florida // *Plant Disease*. 2006. V. 90. №6. P. 833.
 14. Bancroft J.B., Abouhaidar M., Erickson J.W. The assembly of clover yellow mosaic virus and its protein // *Virology*. 1979. V. 98. P. 121-130.
 15. Bancroft J.B., Hills G.I., Richardson J.F. A re-evaluation of the structure of narcissus mosaic virus and polymers made from its protein // *Journal of General Virology*. 1980. V. 50. P. 451-454.
 16. Bernal J.D., Fankuchen I. X-ray and crystallographic studies of plant virus preparations // *J Gen Physiol*. 1941. V. 25. №1. P. 111-46.
 17. Bruckman M. A., Czapar A. E., VanMeter A., Randolph L. N., Steinmetz N.F. Tobacco mosaic virus-based protein nanoparticles and nanorods for chemotherapy delivery targeting breast cancer // *J Control Release*. 2016. V. 231. P. 103-113.
 18. Caparco A.A., González-Gamboa I., Hays S.S., Pokorski J.K., Steinmetz N.F. Delivery of Nematicides Using TMGMV-Derived Spherical Nanoparticles // *Nano Lett*. 2023. V. 23. № 12. P. 5785-5793.
 19. Carignan D., Thérien A., Rioux G., Paquet G., Gagné M.-È.L., Bolduc M, Savard P., Leclerc D. Engineering of the PapMV vaccine platform with a shortened M2e peptide leads to an effective one dose influenza vaccine // *Vaccine*. 2015. V. 33. №51. P. 7245–7253.
 20. Chatterji A., Ochoa W., Shamieh L., Salakian S. P., Wong S. M., Clinton G., Ghosh P., Lin T., Johnson J. E Chemical conjugation of heterologous proteins on the surface of Cowpea mosaic virus // *Bioconjug Chem*. 2004. V. 15. P. 807-813.
 21. Chung Y.H., Cai H., Steinmetz N.F. Viral nanoparticles for drug delivery, imaging, immunotherapy, and theranostic applications // *Adv Drug Deliv Rev*. 2020. V. 156. P. 214-235.
 22. Ciuffo M., Turina M. A potexvirus related to Papaya mosaic virus isolated from moss rose (*Portulaca grandiflora*) in Italy // *Plant pathology*. 2004. V. 53. P. 515.
 23. Clare D.K., Pechnikova E.V., Skurat E.V., Makarov V.V., Sokolova O.S., Solovyev A.G., et al. Novel inter-subunit contacts in barley stripe mosaic virus revealed by cryo-electron microscopy // *Structure*. 2015. V. 23. №10. P. 1815–1826.
 24. Denis J., Acosta-Ramirez E., Zhao Y., Hamelin M.E., Koukavica I., Baz M., Abed Y., Savard C., Pare C., Lopez Macias C., Boivin G., Leclerc D. Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform // *Vaccine*. 2008. V. 26. P. 3395-3403.

- 25.Desfosses A., Ciuffa R., Gutsche I., Sachse C. SPRING - an image processing package for single-particle based helical reconstruction from electron cryomicrographs // *J Struct Biol.* 2014. V 185. №1. P. 15-26.
- 26.DiMaio F., Chen C.C., Yu X., Frenz B., Hsu Y.H., Lin N.S., Egelman E.H. The molecular basis for flexibility in the flexible filamentous plant viruses // *Nat Struct Mol Biol.* 2015. V. 8. P.642-644.
- 27.Dobrov E.N., Nikitin N.A., Trifonova E.A, Parshina E.Y., Makarov V.V., Maksimov G.V., Karpova O.V., Atabekov J.G. β -structure of the coat protein subunits in spherical particles generated by tobacco mosaic virus thermal denaturation // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* 2014. V. 32. P. 701-708.
- 28.Donchenko E., Trifonova E., Nikitin N., Atabekov J., Karpova O. Alternanthera mosaic potexvirus: Several Features, Properties, and Application // *Adv Virol.* 2018. 1973705.
- 29.Donini M., Lico C., Baschieri S., Conti S., Magliani W., Polonelli L., Benvenuto E. Production of an engineered killer peptide in *Nicotiana benthamiana* by using a potato virus X expression system // *Appl Environ Microbiol.* 2005. V. 71. №10. P. 6360-6367.
- 30.Duarte L.M.L., Toskano A.N., Alexandre M.A.V., Rivas E.B., Harakava R.R. Identificacao e controle do Alternanthera mosaic virus isolado de *Torenia* sp. (Scrophulariaceae) // *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental.* 2008. V. 14(1). P. 59-66.
- 31.Dudich E., Semenkova L., Gorbatova E., Dudich I., Khromykh L., Tatulov E., Grechko G., Sukhikh G. Growth-regulative activity of human alphafetoprotein for different types of tumor and normal cells // *Tumor biology.* 1998. V. 19. № 1. P. 30-40.
- 32.Erickson J.W., Abouhaidar M., Bancroft J.B. The specificity of papaya mosaic virus assembly // *Virology.* 1978. V. 90. P. 60-66.
- 33.Erickson J.W., Bancroft J. B. & Horne R.W. The assembly of Papaya mosaic virus protein // *Virology.* 1976. V. 72. P. 514-517.
- 34.Erickson J.W., Bancroft J. B. The self-assembly of Papaya mosaic virus // *Virology.* 1978. V. 90. P. 36-36.
- 35.Erickson J.W., Bancroft J. B., Stillman M.J. Circular dichroism studies of papaya mosaic virus coat protein and its polymers // *Journal of molecular biology.* 1981. V. 147. P. 337-349.
- 36.Evtushenko E.A., Ryabchevskaya E.M., Nikitin N.A., Atabekov J.G., Karpova O.V. Plant virus particles with various shapes as potential adjuvants // *Sci Rep.* 2020. V. 10: 10365.
- 37.Fraenkel-Conrat H., Singer B. Virus reconstitution and the proof of the existence of genomic RNA. // *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences.* 1999. V. 354. P. 583-586.
- 38.Fraenkel-Conrat H., Singer B., Tsugita A. Purification of viral RNA by means of bentonite // *Virology.* 1961. V. 14.P. 54-58.

39. Geering A.D.W., Thomas J.E. Characterization of a virus from Australia that is closely related to papaya mosaic potexvirus // *Archives of virology*. 1999. V. 144. P. 577-592.
40. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007. V. 18. № 2. P. 134-141.
41. Goddard T.D., Huang C.C., Ferrin T.E. Visualizing density maps with UCSF Chimera // *J Struct Biol*. 2007. V. 157. №1. P. 281-287.
42. Goodman R.M., Horne R.W., Hobart J.M. Reconstruction of potato virus X in vitro. II. Characterization of the reconstituted product // *Virology*. 1975. V. 68. P. 299-308.
43. Granovskiy D.L., Ryabchevskaya E.M., Evtushenko E.A., Kondakova O.A., Arkhipenko M.V., Kravchenko T.B., Bakhteeva I.V., Timofeev V.S., Nikitin N.A., Karpova O.V. New formulation of a recombinant anthrax vaccine stabilised with structurally modified plant viruses // *Front Microbiol*. 2022. V. 13. №13. 1003969.
44. Greenfield N., Fasman G.D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation // *Biochemistry*. 1969. V. 8: №10. P. 4108–4116.
45. Grinzato A., Kandiah E., Lico C., Betti C., Baschieri S., Zanotti G. Atomic structure of potato virus X, the prototype of the Alphaflexiviridae family // *Nat Chem Biol*. 2020. V. 16. №5. P. 564–569.
46. Guerrero-Rodríguez J., Manuel-Cabrera C.A., Palomino-Hermosillo Y.A., Delgado-Guzmán P.G., Escoto-Delgado M., Silva-Rosales L., et al. Virus-like particles from Escherichia Coli-derived untagged papaya ringspot virus capsid protein purified by immobilized metal affinity chromatography enhance the antibody response against a soluble antigen // *Mol Biotechnol*. 2014. V. 56. №12. P. 1110–1120.
47. Hammond J., Reinsel M.D. Variability in Alternanthera mosaic virus isolates from different hosts // *Acta Horticulturae*. 2015. V. 1072. P. 47-53.
48. Hammond J., Reinsel M.D., Maroon-Lango C.J. Identification and full sequence of an isolate of Alternanthera mosaic potexvirus infecting phlox stolonifera // *Archives of virology*. 2006b. V. 151. P. 477-493.
49. Hammond J., Reinsel M.D., Maroon-Lango C.J. Identification of potexvirus isolates from creeping phlox and trailing portulaca as strains of Alternanthera mosaic virus, and comparison of the 3-terminal portion of the viral genomes. XI International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants 722. 2004. P. 71–78.
50. Hammond J., Reinsel M.D., Maroon-Lango C.J. Identification of potexvirus isolates from creeping phlox and trailing portulaca as strains of Althernanthera mosaic virus, and comparison of the 3'-terminal portion of he viral genomes // *Acta Horticulturae*. **2006a**. V. 722. P. 71-77.
51. Hart R.G. Morphological changes accompanying thermal denaturation of tobacco mosaic virus // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1956. V. 20. P. 388-389.

- 52.Homer R.B., Goodman R.M. Circular dichroism and fluorescence studies on potato virus X and its structural components // *Biochim Biophys Acta*. 1975. V. 378. №2. P. 296–304.
- 53.American Type Culture Collection (ATCC). HTB-14 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.atcc.org/products/htb-14>. Дата обращения: 04.03.2024.
- 54.PeptideCutter Swiss Institute of Bioinformatics [Электронный ресурс]. URL: <https://www.expasy.org/resources/peptidecutter>. Дата обращения: 15.03.2024.
- 55.GenomeNet [Электронный ресурс]. URL: <https://www.genome.jp/>. Дата обращения: 18.03.2024.
- 56.International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Current ICTV Taxonomy Release [Электронный ресурс]. URL: <https://ictv.global/taxonomy>. Дата обращения: 17.07.2023.
- 57.Ivanov P.A., Mukhamedzhanova A.A., Smirnov A.A., Rodionova N.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. The complete nucleotide sequence of Alternanthera mosaic virus infecting *Portulaca grandiflora* represents a new strain distinct from phlox isolates // *Virus genes*. 2011. V. 45. P. 268-271
- 58.Iwabuchi N., Yoshida T., Yusa A., Nishida S., Tanno K., Keima T., Nijo T., Yamaji Y., Namba S. Complete genome sequence of Alternanthera mosaic virus, isolated from *Achyranthes bidentata* in Asia // *Genome announcements*. 2016. V. 5(2). P. 16.
- 59.Kaftanova A.S., Kiselev N.A., Novikov V.K., Atabekov J.G. Structure of products of protein reassembly and reconstruction of potato virus X // *Virology*. 1975. V. 67. P. 283-287.
- 60.Karpova O., Nikitin N., Chirkov S., Trifonova E., Sheveleva A., Lazareva E., Atabekov J. Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens // *J Gen Virol*. 2012. V. 93. № 2. P. 400-407.
- 61.Karpova O.V., Nikitin N.A. Plant Viruses: New Opportunities under the Pandemic// *Her Russ Acad Sci*. 2022. V. 92. №4. P. 464–469.
- 62.Kendall A., Bian W., Maris A., Azzo C., Groom J., Williams D., Shi J., Stewart P.L., Wall J.S., Stubbs G. A common structure for the potexviruses // *Virology*. 2013. V. 436. №1. P.173-178.
- 63.Kendall A., McDonald M., Bian W., Bowles T., Baumgarten S.C., Shi J., Stewart P.L., Bullitt E., Gore D., Irving T.C., Havens W.M., Ghabrial S.A., Wall J.S., Stubbs G. Structure of flexible filamentous plant viruses // *J Virol*. 2008. V. 82. №19. P.9546-9554.
- 64.Ksenofontov A.L., Fedorova N.V., Badun G.A., Serebryakova M.V., Nikitin N.A., Evtushenko E.A., et al. Surface characterization of the thermal remodeling helical plant virus // *PLoS One*. 2019. V. 14. №5. e0216905.
- 65.Kurashova S.S., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Egorova M.S., Balovneva M.V., Nikitin N.A., Evtushenko E.A., Karpova O.V., Markina A.A., Aparin P.G., Tkachenko P.E., L Vov V.L., Tkachenko E.A. Various

- Adjuvants Effect on Immunogenicity of Puumala Virus Vaccine // *Front Cell Infect Microbiol.* 2020. V. 26. №10. 545371.
- 66.Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680-685.
 - 67.Laliberté Gagné M.E., Lecours K., Gagné S., Leclerc D. The F13 residue is critical for interaction among the coat protein subunits of papaya mosaic virus // *FEBS J.* 2008. V. 7. P. 1474-1484.
 - 68.Lebel M.-È., Chartrand K., Tarrab E., Savard P., Leclerc D., Lamarre A. Potentiating cancer immunotherapy using Papaya mosaic virus-derived nanoparticles // *Nano Lett.* 2016. V. 16. P. 1826–1832.
 - 69.Leclerc D., Beauseigle D., Denis J., Morin H., Paré C., Lamarre A., Lapointe R. Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells // *J Virol.* 2007. V. 81. №3. P. 1319-1326.
 - 70.Lecours K., Tremblay M.H., Gagné M.E., Gagné S.M., Leclerc D. Purification and biochemical characterization of a monomeric form of papaya mosaic potexvirus coat protein // *Protein Expr Purif.* 2006 V. 47. №1. P.273-280.
 - 71.Lim H.-S., Vaira A.M., Reinsel M.D., Bae H., Bailey B.A., Domier L.L., Hammond J. Localization of Alternanthera mosaic virus pathogenicity determinants to RdRp and TGB1, and separation of TGB1 silencing suppression from movement functions// *Journal of general virology.* 2010. V. 91. P. 277–287.
 - 72.Lockhart B.E., Daughtrey M.L. First Report of Alternanthera mosaic virus infection in Angelonia in the United States // *Plant disease.* 2008. V. 92. P. 1473.
 - 73.Low J. N., Tollin P., Wilson H. R. The number of protein subunits per helix turn in narcissus mosaic virus particles // *Journal of General Virology.* 1985. V. 66. P. 177-179.
 - 74.Mathieu C., Rioux G., Dumas M.-C., Leclerc D. Induction of innate immunity in lungs with virus-like nanoparticles leads to protection against influenza and *Streptococcus pneumoniae* challenge // *Nanomedicine.* 2013. V. 9. P. 839-848.
 - 75.McCormick A.A., Corbo T.A., Wykoff-Clary S., Palmer K.E., Pogue G.P. Chemical conjugate TMV-peptide bivalent fusion vaccines improve cellular immunity and tumor protection // *Bioconjug Chem.* 2006. V. 17. №5. P. 1330–1338.
 - 76.McCormick A.A., Palmer K.E. Genetically engineered Tobacco mosaic virus as nanoparticle vaccines // *Expert Rev Vaccines.* 2008. V. 7. P. 33–41.
 - 77.Mindell J.A., Grigorieff N. Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy // *J Struct Biol.* 2003. V. 142. №3. P. 334-347.
 - 78.Mukhamedzhanova A.A., Smirnov A.A., Arkhipenko M.V., Ivanov P.A., Chirkov S.N., Rodionova N.P., Karpova O.V., Atabekov J.G.

- Characterization of Alternanthera mosaic virus and its coat protein // *Open Virol J.* 2011. V. 5. P. 136-140.
79. Murray A.A., Wang C., Fiering S., Steinmetz N.F. In Situ Vaccination with Cowpea vs Tobacco Mosaic Virus against Melanoma // *Mol Pharm.* 2018. V. 15. P. 3700-3716.
 80. Namba K., Stubbs G. Structure of tobacco mosaic virus at 3.6 Å resolution: implications for assembly // *Science.* 1986. V. 231. №4744. P. 1401-1406.
 81. Nanda J.S., Lorsch J.R. Labeling of a protein with fluorophores using maleimide derivitization // *Methods Enzymol.* 2014. V. 536: P. 79-86.
 82. Nikitin N., Ksenofontov A., Trifonova E., Arkhipenko M., Petrova E., Kondakova O., Kirpichnikov M., Atabekov J., Dobrov E., Karpova O. Thermal conversion of filamentous potato virus X into spherical particles with different properties from virions // *FEBS Letters.* 2016a. V. 590. P. 1543-1551.
 83. Nikitin N.A., Malinin A.S., Rakhnyanskaya A.A., Trifonova E.A., Karpova O.V., Yaroslavov A.A., Atabekov J.G. Use of a polycation spacer for noncovalent immobilization of albumin on thermally modified virus particles // *Polyelectrolytes.* 2011. V. 53. №11. P. 1885-1891.
 84. Nikitin N.A., Matveeva I.N., Trifonova E.A., Puhova N.M., Samuylenko A.Y., Gryn S.A., Atabekov J.G., Karpova O.V. Spherical particles derived from TMV virions enhance the protective properties of the rabies vaccine // *Data Brief.* 2018a. V. 12. № 21. P.742-745.
 85. Nikitin N.A., Trifonova E.A., Karpova O.V., Atabekov J.G. Biosafety of plant viruses for human and animals // *Moscow Univ Biol Sci Bull.* 2016b. V. 71. P. 128–134.
 86. Nikitin N.A., Zenin V.A., Trifonova E.A., Ryabchevskaya E.M., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Assessment of structurally modified plant virus as a novel adjuvant in toxicity studies // *Regul Toxicol Pharmacol.* 2018b. V. 97. P. 127-133.
 87. Palucha A., Loniewska A., Satheshkumar S., Boguszewska-Chachulska A. M., Umashankar M., Milner M., Haenni A. L., Savithri H. S. Virus-like particles: models for assembly studies and foreign epitope carriers // *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2005. V. 80. P. 135–168.
 88. Parker L., Kendall A., Stubbs G. Surface features of potato virus X from fiber diffraction // *Virology.* 2002. V. 300. № 2. P. 291-295.
 89. Pokorski J.K., Steinmetz N.F. The art of engineering viral nanoparticles // *Mol Pharm.* 2011. V. 8. P. 29-43.
 90. Richardson J.F., Tollin P., Bancroft J.B. The architecture of the potexviruses // *Virology.* 1981. V. 112. №1. P.34-39.
 91. Robinson D. J., Hutcheson A., Tollin P., Wilson H.R. A double-helical structure for re-aggregated protein of narcissus Mosaic Virus // *Journal of General Virology.* 1975. V. 29. P. 325-330.
 92. Rodionova N.P., Karpova O.V., Kozlovsky S.V., Zayakina O.V., Arkhipenko M.V., Atabekov J.G. Linear remodeling of helical virus by movement protein binding // *Journal of molecular biology.* 2003. V. 333. P. 565-572.

93. Ryabchevskaya E.M., Evtushenko E.A., Granovskiy D.L., Ivanov P.A., Atabekov J.G., Kondakova O.A., et al. Two approaches for the stabilization of *Bacillus anthracis* recombinant protective antigen // *Hum Vaccin Immunother.* 2021. V. 17. № 2. P. 560–565.
94. Ryabchevskaya E.M., Granovskiy D.L., Evtushenko E.A., Ivanov P.A., Kondakova O.A., Nikitin N.A., et al. Designing stable *Bacillus anthracis* antigens with a view to recombinant anthrax vaccine development // *Pharmaceutics.* 2022. V. 14. №4. P. 806.
95. Savard C., Guérin A., Drouin K., Bolduc M., Laliberté-Gagné M.E., Dumas M.C., Majeau N., Leclerc D. Improvement of the trivalent inactivated flu vaccine using PapMV nanoparticles // *PLoS One.* 2011. V. 6. e21522.
96. Shukla S., Marks I., Church D., Chan S.-K., Pokorski J. K., Steinmetz N. F. Tobacco mosaic virus for the targeted delivery of drugs to cells expressing prostate-specific membrane antigen // *RSC advances.* 2021. V. 11, № 33. P. 20101-20108.
97. Steinmetz N.F. Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices // *Nanomedicine.* 2010. V. 6. P. 634-641.
98. Tang G., Peng L., Baldwin P.R., Mann D.S., Jiang W., Rees I., Ludtke S.J. EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy // *J Struct Biol.* 2007 V. 157. №1. P. 38-46.
99. Tang J., Olson J.D., Ochoa-Corona F.M., Glover G.R.G. *Nandina domestica*, a new host of Apple stem grooving virus and *Alternanthera* mosaic virus // *Australasian Plant Disease Notes.* 2010. V. 5. P. 25-27.
100. Therien A., Bédard M., Carignan D., Rioux G., Gauthier-Landry L., Laliberté-Gagné M.-È., Bolduc M., Savard P., Leclerc D. A versatile papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform based on sortase-mediated antigen coupling // *J Nanobiotechnology.* 2017. V. 15. №1. 54.
101. Thuenemann E.C., Byrne M.J., Peyret H., Saunders K., Castells-Graells R., Ferriol I., et al. A replicating viral vector greatly enhances accumulation of helical virus-like particles in plants // *Viruses.* 2021. V. 13. №5. P. 885.
102. Tollin P., Bancroft J.B., Richardson J.F., Payne N.C., Beveridge T.J. Diffraction studies of papaya mosaic virus // *Virology.* 1979. V. 98 №1. P.108-15.
103. Tollin P., Wilson H. R., Mowat W. P. Optical diffraction from particles of narcissus mosaic virus // *Journal of General Virology.* 1975. V. 29. P. 331-333.
104. Tollin P., Wilson H. R., Bancroft J. B. Further observations on the structure of particles of potato virus X // *Journal of General Virology.* 1980. V. 49. P. 407-410.
105. Tremblay M.-H., Majeau N., Gagné M.-E.L., Lecours K., Morin H., Duvignaud J.-B., et al. Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self-assembly of papaya mosaic potexvirus coat protein // *FEBS J.* 2006. V. 273. №1. P. 14–25.
106. Trifonova E., Nikitin N., Gmyl A., Lazareva E., Karpova O., Atabekov J. Complexes assembled from TMV-derived spherical particles and entire

- virions of heterogeneous nature // *J Biomol Struct Dyn*. 2014. V. 32. № 8. P. 1193-1201.
107. Trifonova E.A., Zenin V.A., Nikitin N.A., Yurkova M.S., Ryabchevskaya E.M., Putlyaev E.V., Donchenko E.K., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., et al. Study of rubella candidate vaccine based on a structurally modified plant virus // *Antiviral Res*. 2017. V. 144. P. 27-33.
108. Venkataraman S., Apka P., Shoeb E., Badar U., Hefferon K. Plant virus nanoparticles for anti-cancer therapy // *Front Bioeng Biotechnol*. 2021. V. 9.
109. Vitoreli A., Baker C.A., Harmon C.L. Alternanthera mosaic virus identified in clock vine in Florida // *Phytopathology*. 2011. V. 101. P. 183.
110. Wang D., Zheng Z.-Y., Feng J., Zhan X.-B., Zhang L.-M., Wu J.-R., Zhu L. Influence of sodium chloride on thermal denaturation of a high-salt-tolerant neutral protease from *Aspergillus oryzae* // *Food Science and Biotechnology*. 2013. V. 22. №5. P. 1-7.
111. Xue C., Lin T.Y., Chang D., Guo Z. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation // *R Soc Open Sci*. 2017. V. 4. 160696.
112. Yang S., Wang T., Bohon J., Marie-Ève Laliberté Gagné, Marilène Bolduc, Leclerc D., Li H. Crystal structure of the coat protein of the flexible filamentous Papaya mosaic virus // *Journal of molecular biology*. 2012. V. 422. P. 263-273.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Разнообразие растений-хозяев ВМАльт и симптомы инфекции

Название растения	Семейство	Симптомы		Авторы
		Локальные	Системные	
<i>Tetragonia expansa</i>	<i>Aizoaceae</i>	Некрозы, хлорозы, скрученность листьев		Hammond <i>et al.</i> , 2006b
<i>Amaranthus caudatus</i>	<i>Amarantaceae</i>	Некрозы		Hammond <i>et al.</i> , 2006b
<i>Amaranthus tricolor</i>		Хлороз	Мозаика	Geering and Thomas, 1999
<i>Gomphrena celosiodoes</i>		Бессимп.*	Мозаика	
<i>Gomphrena globosa</i>		Некрозы	Бессимп.	Geering and Thomas, 1999; Hammond <i>et al.</i> , 2006b
<i>Alternanthera dentate</i>		Скрученность листьев, некрозы		
<i>Apium graveolens</i> , cv. «Crisp Salad»	<i>Apiaceae</i>	Некрозы	Мозаика	Geering, Thomas, 1999
<i>Lactuca sativa</i> , cv. «Black velvet»	<i>Asteraceae</i>	Некрозы	Нет инфекции	Geering, Thomas, 1999
<i>Zinnia elegans</i>		Бессимп.	Штриховатость	
<i>Dahlia variabilis</i>		Нет инфекции		Hammond <i>et al.</i> , 2006b
<i>Helianthus annuus</i>		Нет инфекции		Hammond <i>et al.</i> , 2006b
<i>Sanvitalia procumbens</i>		Мозаика,	скрученность листьев	Hammond <i>et al.</i> , 2006b
<i>Aster novi-belgii</i>		Нет инфекции		Hammond <i>et al.</i> , 2006b
<i>Brassica campestris</i> var. <i>pekinensis</i> cv. Lin White Spoon		<i>Brassicaceae</i>	Бессимптомно	Нет инфекции
<i>Rhaphanus sativus</i> cv. French Breakfast	Нет инфекции		Нет инфекции	

<i>Cassia floribunda</i>	<i>Caesalpin iaceae</i>	Нет инфекции	Нет инфекции	Geering, Thomas, 1999
<i>Cassia occidentalis</i>		Нет инфекции	Нет инфекции	
<i>Carica papaya</i> cv. Richter Gold	<i>Carica ceae</i>	Нет инфекции	Нет инфекции	Geering, Thomas, 1999
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	<i>Chenopodiaceae</i>	Хлороз	Мозаика	Geering, Thomas, 1999
<i>Chenopodium quinoa</i>		Хлороз	Межжилков ые пожелтения	
<i>Spinacia oleracea</i>		Хлороз	Мозаика	
<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>Caffer</i> cv. Candy Red	<i>Cucurbitaceae</i>	Бессимп.	Мозаика	Geering, Thomas, 1999
<i>Cucumis sativus</i> cv. Green Gem		Бессимп.	Бессимп.	
<i>Cucurbita pepo</i> cv. Green Buttons		Бессимп.	Нет инфекции	
<i>Plantago lanceolata</i>	<i>Plantag inaceae</i>	Бессимп.	Мозаика	Geering, Thomas, 1999
<i>Glycine max</i> cv. Bragg	<i>Fabaceae</i>	Нет инфекции	Нет инфекции	Geering, Thomas, 1999
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Bointiful		Нет инфекции	Нет инфекции	
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv Kerman		Нет инфекции	Нет инфекции	
<i>Pisum sativum</i> cv. Greenfeast		Нет инфекции	Нет инфекции	
<i>Trifolium pretense</i> cv. Montgomery		Бессимп.	Нет инфекции	
<i>Vigna unguiculata</i> cv. Black-eye		Бессимп.	Бессимп.	
<i>Vicia faba</i>		Бессимп.	Мозаика	
<i>Sorghum halapense</i> cv. Silk	<i>Poaceae</i>	Нет инфекции	Нет инфекции	Geering, Thomas, 1999
<i>Zea mays</i> cv. Jubilee		Нет инфекции	Нет инфекции	

<i>Capsicum annuum</i> cv. Yolo Wonder	<i>Solanaceae</i>	Нет инфекции	Нет инфекции	Geering, Thomas, 1999
<i>Datura stramonium</i>		Нет инфекции	Нет инфекции	
<i>Lycopersicon</i> <i>esculentum</i> cv. Gross Lisse		Бессимп.	Штриховато сть	
<i>Nicotiana</i> <i>benthamiana</i>		Бессимп.	Мозаика Морщинисто сть Эпинастии	
<i>Nicotiana</i> <i>clevelandii</i>		Нет инфекции	Нет инфекции	
<i>Nicotiana glutinosa</i>		Нет инфекции	Нет инфекции	
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Turkish		Нет инфекции	Нет инфекции	
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi		Нет инфекции	Нет инфекции	
<i>Physalis floridana</i>		Нет инфекции	Нет инфекции	
<i>Solanum tuberosum</i> cv. Sebago		Нет инфекции	Нет инфекции	

*Бессимп. - бессимптомно