

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Ксенофонтов Александр Леонидович

**Капсидные белки нитевидных вирусов растений: неупорядоченные
участки, их структура и функция**

Специальность 1.5.10. Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена в отделе хроматографического анализа Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный консультант **Баратова Людмила Алексеевна**, доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты **Морозов Сергей Юрьевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генной инженерии вирусов отдела биохимии вирусов растений Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова

Козловская Любовь Игоревна, доктор биологических наук, заведующий отделом актуальных и вновь возникающих инфекций с пандемическим потенциалом, Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН

Конарев Петр Валерьевич, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории рефлектотрии и малоуглового рассеяния Института кристаллографии им. А.В. Шубникова, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Защита диссертации состоится «3» декабря 2026 г. в 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: msu.015.4.dissovet@org.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3972>

Автореферат разослан «___» сентября 2026 г

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.В. Комарова

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Гибкие спиральные вирусы растений представляют собой одну из самых многочисленных и экономически важных групп вирусов растений. Однако, глубокое структурное понимание организации этих вирусов долгое время оставалось недостижимым. Первая кристаллическая структура фрагмента белка оболочки (БО) вируса мозаики папайи, относящегося к роду *Potexvirus*, была определена только в 2012 году. Позже, методом криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) были определены фрагменты БО вируса мозаики бамбука, вируса мозаики пепино и Х-вируса картофеля (ХВК), а также представителей рода *Potyvirus*: вируса арбузной мозаики, вируса мозаики репы и Y-вируса картофеля. Определение этих структур выявило существование консервативной трехдоменной архитектуры, общей для БО всех изученных потекс- и потивирусов. Однако критически важные для понимания функционирования вирусов гибкие N- и C-концевые фрагменты их БО до сих пор остаются недоступными для детального структурного анализа методами высокого разрешения.

Необходимость дальнейшего изучения, безусловно, актуальна, поскольку современные исследования убедительно показали, что структура спиральных вирионов обладает исключительными возможностями. Способность к конформационным переходам, ремоделированию и образованию альтернативных структур не является артефактом, а представляет собой ключевое адаптивное свойство, лежащее в основе всего жизненного цикла вируса: от проникновения в клетку-хозяина и до разборки с целью высвобождения генома для системного перемещения по растению и сборки новых частиц. Однако, именно это фундаментальное свойство, которое обеспечивает успех вируса как патогена, создает непреодолимые трудности для его изучения классическими статическими методами структурной молекулярной биологии. В связи с этим особую важность приобретает тщательный подбор новых методических подходов для исследования структурных особенностей вирионов и их трансформаций в ходе патогенеза, а

также для анализа воздействия различных факторов, способных модифицировать структуру вирусных частиц.

У вирусов семейств *Potexviridae* и *Potyviridae* БО не только формирует капсид, но и участвует в системном перемещении, определении круга хозяев, модуляции вирулентности и в регуляции экспрессии вирусного генома. Особый интерес представляет N-концевой домен БО потексвирусов, который, как было показано ранее, репрессирует трансляцию РНК. Его активация посредством фосфорилирования или мутаций действует как переключатель, запускающий синтез вирусных белков. Таким образом, именно глубокое изучение структуры и динамики этого критического домена определит успех в создании препаратов, способных подавлять вирусную инфекцию на самых ранних стадиях для разработки средств защиты растений.

Для решения ряда задач, связанных с изучением структурных особенностей и трансформаций капсидов гибких фитовирусов, нами был широко использован метод тритиевой планиграфии. Высокая чувствительность метода позволяет регистрировать весьма малые изменения пространственной структуры, идентифицировать поверхностно локализованные участки молекулы или молекул в составе надмолекулярных комплексов. В частности, регистрировать особенности структуры гибких поти- и потексвирусов растений на различных стадиях патогенеза, изучать молекулярные механизмы упорядоченной агрегации БО, приводящей к сборке вирусных и вирусоподобных частиц (ВПЧ).

Нами был активно использован метод малоуглового рентгеновского рассеяния, широко применяемый в структурной диагностике надмолекулярных комплексов. Ключевым достоинством метода является его способность анализировать структурную организацию объектов в нативном масштабе (1,5-200 нм), что особенно ценно для изучения биологических макромолекул. Метод позволяет проводить исследования в условиях, приближенных к физиологическим - в растворах с контролируемыми параметрами температуры, pH и ионной силы. Современные подходы к анализу данных, в сочетании с развитыми алгоритмами компьютерного моделирования и молекулярной

динамики, обеспечивают точное описание структуры биологических макромолекул в растворе.

В последние годы активно разрабатываются подходы для использования в нанобиотехнологии вирионов вирусов растений, их ВПЧ и термически трансформированных вирусных частиц (Atabekov et.al., 2011). Регулярная поверхностная структура, способность к направленной модификации и выраженные адъювантные свойства делают их перспективными носителями для различных вакцинных конструкций. Развитие работ в этом направлении важно и биотехнологически перспективно.

Цели исследования

Целью работы было определение структурных особенностей и физико-химических свойств нитевидных поти- и потексвирусов растений (на примерах А- и Х-вирусов картофеля и вируса мозаики альтернантеры), функциональной значимости природно-неупорядоченных сегментов белков оболочки, моделирование структуры вирионов. Была также поставлена цель изучить топографии доступной поверхности БО в составе вирусных частиц, знание которой необходимо для их использования в различных нанотехнологических приложениях, в частности, в качестве платформы для направленного присоединения биологически активных групп к их поверхности.

Задачи исследования

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Определить локализацию N-концевого фрагмента БО потексвируса Х-вируса картофеля (ХВК) и изучить различия в организации капсидов ХВК и его *in situ* усечённой формы БО без 19/21 N-концевых а.о. (ХКВΔN).
2. Локализовать структурные изменения в БО транслируемого ST-мутанта ХВК, в котором все остатки Ser и Thr в N-концевом пептиде из 20 а.о. заменены на остатки Ala и Gly, в сравнении с диким типом вириона.

3. Установить структурные изменения в БО ХВК, вызываемые связыванием транспортного белка ТГБ1 с вирионом, приводящим к включению системы активации трансляции вириона.
4. Провести сравнительные структурные исследования и моделирование структуры низкого разрешения двух нитевидных растительных вирусов: ХВК и вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт) с помощью метода малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР).
5. Провести модельные предсказания пространственной организации БО потивируса А-вируса картофеля (АВК) на основании данных стерической доступности белка атомам трития и предсказательным методам топологии элементов вторичной структуры белка.
6. Для вирионов АВК и ВПЧ, сформированных из БО этого вируса, определить физико-химические свойства и структуру. В рамках этой задачи:
 - установить условия образования ВПЧ белком оболочки АВК при различных рН раствора, структуру и условия их диссоциации.
 - определить форму и структурные параметры развернутых ID-областей (intrinsically disordered) БО путём интеграции данных МУРР, физико-химических методов и предсказательных алгоритмов.
7. Изучить структуру и свойства вирионов АВК и их усечённой формы (АВКΔ32) в растворе, с определением локализации и роли N-концевого участка. Методами МУРР, тритиевого мечения и моделирования будут изучены строение и динамика частиц в нативных условиях и проведён сравнительный анализ интактных и усечённых вирионов.
8. Охарактеризовать данные термической перестройки БО АВК в вирионах и ВПЧ, ведущей к формированию β-структур, с целью создания новых структурно-модифицированных наночастиц.

Были поставлены и решены методические задачи:

1. Адаптация метода тритиевой планиграфии (Гос. премия РФ 2000 г.: «Химия горячих атомов трития как основа метода исследования поверхностных молекулярных слоев и структуры биополимеров») для изучения топографии

поверхности нитевидных вирусов растений. В рамках этой задачи требовалось разработать методику проточного измерения радиоактивности меченных тритием аминокислот в элюате с хроматографических колонок аминокислотного анализатора L8800 (Hitachi, Japan) с помощью проточного счетчика Radiomatic 150TR Flow Scintillation Analyzer (Packard Instrument Co, USA).

2. Разработка комплексного подхода, комбинирующего метод МУРР, молекулярную динамику, просвечивающую электронную микроскопию (ПЭМ), метод тритиевой планиграфии и компьютерное моделирование. Данный методологический комплекс апробирован на модели вируса табачной мозаики (ВТМ) для исследования в растворе его вирионов и реполимеров БО.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость

В работе получены фундаментальные результаты, раскрывающие новые аспекты структурной организации гибких спиральных вирусов растений – потексвируса ХВК и потивируса АВК. Научная новизна заключается в комплексном определении структуры, свойств и вариабельности вирионов под воздействием факторов, связанных с изменениями N-концевых сегментов БО.

Методом МУРР определены структурные параметры вирионов ХВК, ХВКΔN и ВМАльт. Комбинация с тритиевой планиграфией и атомарной моделью (PDB: 6R7G) разрешила дискуссию о поверхностной локализации N-концевого пептида ХВК, стабилизирующего капсид. Впервые показана структурная лабильность ХВК в трёх функциональных состояниях (нативный, ST-мутант, комплекс с ТГБ1), соответствующих трансляционно-неактивной форме и двум путям её активации.

Для потивирусов доказано, что БО АВК относится к ID-белкам. Методами МУРР, ПЭМ и моделирования впервые получены структуры интактного АВК и АВКΔ32. Установлена роль N-концевого пептида: выступающая часть экранирует поверхностные остатки, встроенный сегмент (16–26 а.о.) определяет шаг спирали (~3,9 нм) и гибкость вириона. Его удаление уменьшает шаг (~3,37 нм), уплотняет

упаковку, превращает гибкие нити в жёсткие палочки и повышает термостабильность.

Впервые обнаружено, что изолированный БО АВК формирует ВПЧ или овальные ассоциаты в зависимости от условий; термическая обработка индуцирует образование наночастиц с высоким содержанием β -структур.

Теоретическая значимость работы заключается в получении новых структурно-функциональных характеристик изученных вирусов, введение концепции структурной лабильности вириона как регулятора трансляции и транспорта. Установлено различие ролей N-концевых доменов: у потексвирусов – стабилизация вирионов, у потививирусов – регуляция их гибкости. Выводы с достаточной степенью уверенности применимы к другим потекс- и потививирусам.

Работа демонстрирует эффективность комплексного подхода (МУРР, тритиевая планиграфия, биоинформатика, моделирование) для изучения конформационно-лабильных наноструктур, что является вкладом в методологию структурной биологии.

Практическая значимость работы заключается в создании основы для противовирусных стратегий защиты растений (мишень – N-концевые домены БО, регулирующие трансляцию и транспорт) и в биотехнологическом потенциале БО АВК как безопасной и технологичной платформы, пригодной для конструирования вакцин, адресной доставки соединений.

Положения, выносимые на защиту

1. N-концевые пептиды белка оболочки (БО) ХВК и АВК локализованы на поверхности вирионов, а их расположение относительно соседних субъединиц определяет структурную роль этих пептидов.

2. N-концевой пептид БО ХВК (а.о. 1–20) выполняет функцию межсубъединичного стабилизатора, повышающего упорядоченность капсида, тогда как у АВК (а.о. 1–32) он является регулятором гибкости и шага спирали вириона.

3. Делеция N-концевого пептида АВК индуцирует уплотнение упаковки БО, уменьшение шага спирали (с 3,9 до 3,37 нм), повышение термостабильности и потерю гибкости вириона, что свидетельствует о его ключевой роли в структурной динамике капсида.

4. Трансляционная активация ХВК-ST (Ala/Gly-замены в N-концевом пептиде БО) и ТГБ1-опосредованная активация трансляции ХВК реализуются через общий механизм: снижение плотности упаковки капсида и ослабление связывания РНК с БО, что обеспечивает доступ рибосом к геному.

5. Изолированный БО АВК способен к рН- и ионно-зависимой самосборке с образованием вирусоподобных или овальных частиц, которые могут представлять собой промежуточные структуры сборки; гибкие концевые домены стабилизируют обе морфологические формы.

6. Нагревание выше 55 °С индуцирует необратимую агрегацию вирионов и ВПЧ АВК за счёт реорганизации неупорядоченных областей БО в межмолекулярные β -структуры с образованием стабильных сферических (из ВПЧ) или аморфных (из вирионов) частиц.

Личный вклад соискателя

Личный вклад автора заключается в планировании и проведении экспериментов, интерпретации полученных в работе данных, анализе литературы, подготовке к печати публикаций и написании диссертации. Основные результаты диссертационной работы были получены лично автором или при его непосредственном участии. Сотрудничество с рядом научных коллективов при выполнении данной работы происходило в рамках грантов РФФИ, РНФ и Государственного задания.

Степень достоверности результатов

В работе использованы современное научное оборудование и методики измерений, а также актуальные методы статистического анализа. Все результаты, представленные в работе, статистически достоверны и воспроизводимы.

Обработка данных, полученных методом МУРР, проводилась с помощью ряда широко используемых в мире специализированных программ (PRIMUS, PEAK, пакета ATLAS и др.). В работе использовались реактивы от ведущих российских и международных компаний.

Апробация результатов

Результаты диссертационной работы были представлены на: Конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (FEBS) (Иерусалим, Израиль, 2017; Прага, Чехия, 2018; Краков, Польша, 2019); 6 Европейском конгрессе вирусологии, Гамбург, Германия, 2016; VII Международном симпозиуме "SAHLC", Дрезден, Германия, 2000; Курчатовском форуме синхротронных и нейтронных исследований «Курчатов ФСНИ-2023»; IX, X Российских симпозиумах «Белки и пептиды», Сочи, 2019 и Москва, 2021; VI Съезде биофизиков России, Краснодар, 2019; XV Международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2020», Севастополь, 2020; Московской конференция по вычислительной молекулярной биологии «MCCMB'17», Москва, Россия, 2017; XXVII Симпозиуме "Современная химическая физика", Туапсе, 2015; IV, V, IX Российских Конференциях по радиохимии "Радиохимия" – Дубна, 2006; Озерск, 2003; Санкт-Петербург, 2018 и других. Диссертация была апробирована на совместном заседании отделов биохимии вирусов растений и хроматографического анализа НИИФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ в присутствии членов кафедры вирусологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова 6 апреля 2026 года.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 27 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.10 – Вирусология, отрасль науки – Биология.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из следующих основных разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и Обсуждение, Заключение и Список литературы (последний раздел состоит из 228 ссылок). Работу иллюстрируют **66** рисунков и **7** таблиц. Общий объем диссертации 199 страниц.

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Поверхностная локализация и структурная функция частично разупорядоченных N-концевых доменов белка оболочки X-вируса картофеля

Данные по антигенному картированию потексвирусов до 2000-х годов были весьма немногочисленны и противоречивы. Ряд работ свидетельствовал о поверхностной локализации только N- концевой части БО (Радавский и др., 1989), по другим данным поверхностными были N- и С- концевые сегменты (Koenig et al., 1978). Делались попытки формулировки идеи единообразия укладки полипептидной цепи для всех спиральных растительных вирусов с поверхностной локализацией, как у ВТМ, N- и С- концевых участков БО. Однако эти представления строились на основании недостаточных данных и их надежность, как оказалось, была не слишком велика.

Вирионы и изолированные БО трех представителей рода Potexvirus вирусов со сходной спиральной морфологией (Х-вируса картофеля (ХВК), вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт) и вируса аукуба мозаики картофеля (ВАМК), изученные методом спектроскопии кругового дихроизма (КД) в дальнем УФ-диапазоне (185–250 нм), обнаружили выраженные аномалии, не характерные для типичных α -спиральных белков (Рис.1). Эти аномалии включали: 1) существенно пониженную отрицательную эллиптичность при 208 нм; 2) наличие дополнительного пика при 228 нм; 3) необычно интенсивный положительный максимум при 191-195 нм ($[\theta] = +16800 \text{ град} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{дмоль}^{-1}$). В то время как спектры вирионов ВМАльт полностью соответствовали канонической форме для α -спиральных белков,

спектры ВАРК занимали промежуточное положение, демонстрируя сходные, но менее выраженные аномалии, чем у ХВК (Рис.1).

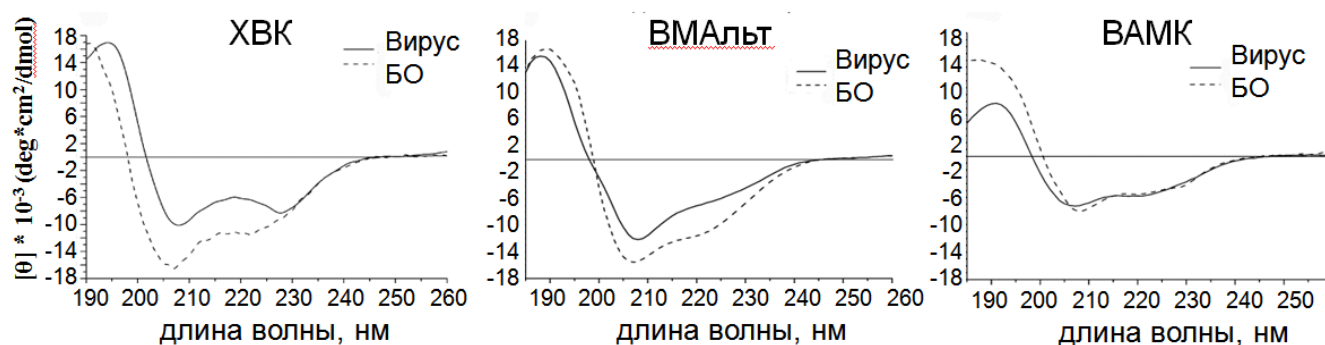


Рисунок 1 – Сравнение спектров КД вирусов ХВК, ВМАльт, ВАРК и выделенных белков. Спектры измерены на дихрографе «Chiroscan» при 25°C в 5 мМ фосфатном буфере с рН 7,5. Все эксперименты по КД проведены совместно с д.б.н., проф. Добровым Е.Н. (Биологический факультет МГУ) и к.ф./м.н. А.М. Арутюняном (НИИФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ)

Причина этих аномалий, как мы полагаем, связана со структурными различиями N-концевых доменов. Гомологичное моделирование показало, что центральные домены БО всех трёх вирусов практически идентичны. Биоинформатический анализ показал наличие протяжённых неупорядоченных N-концевых участков у БО ХВК и ВАРК, тогда как БО ВМАльт таких регионов не имел (Рис. 2). Эти участки обогащены гидрофильными остатками и лишены гидрофобных, что препятствует формированию стабильной вторичной структуры в изолированном состоянии.

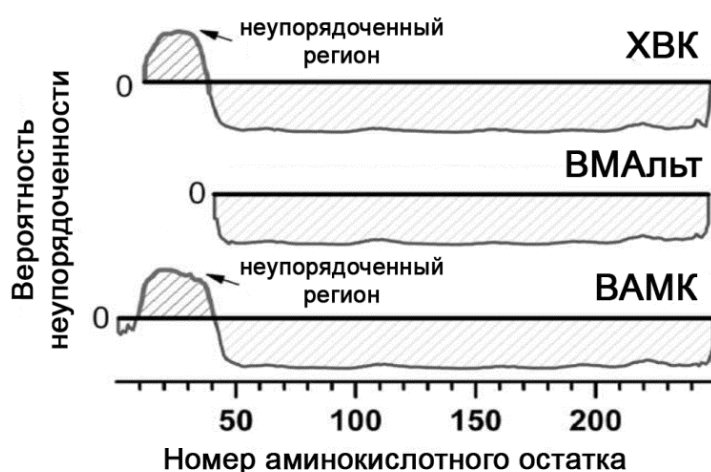


Рисунок 2 – Предсказание неупорядоченной структуры в БО ХВК, ВМАльт и ВАРК с помощью веб-сервиса DisoPred

Спектры КД (формула Гринфилда-Фасмана, % альфа-спиралей = $([\theta]^{208} - 4000 \text{ град} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{дмоль}^{-1}) / 29000 \text{ град} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{дмоль}^{-1}$) показали высокое содержание α -спиралей у изолированного БО ХВК (43%), что впоследствии подтверждено крио-ЭМ. Для БО ВМАльт (39%) и ВАМК (13%) значения занижены, вероятно, из-за низкой стабильности белков в растворе и не отражают их нативную укладку.

Исследование ХВК методом тритиевой планиграфии (ТП) однозначно подтвердило поверхностную локализацию N-концевого участка БО на вирионе. Этот вывод был основан на прямом эксперименте: сравнении доступности включения трития в нативные вирионы и в вирионы, у которых был *in situ* удален N-концевой пептид из 19/21 а.о. (ХВКΔN). Средние радиоактивности (в %) для каждого элемента вторичной структуры в вирионах ХВК и ХВКΔN представлены на Рисунке 3.

Анализ распределения метки по элементам вторичной структуры, определённым в крио-ЭМ модели (Grinzato et al., 2020) выявил чёткую картину: после удаления N²⁰-пептида доступность для мечения элементов $\alpha 1$ (а.о. 30-34), $\alpha 7$ (а.о. 122-129), и $l 4$ (а.о. 143-153) значительно возрастала. Это прямо указывало, что в интактном вирионе именно N²⁰-пептид стерически экранировал эти специфические участки.

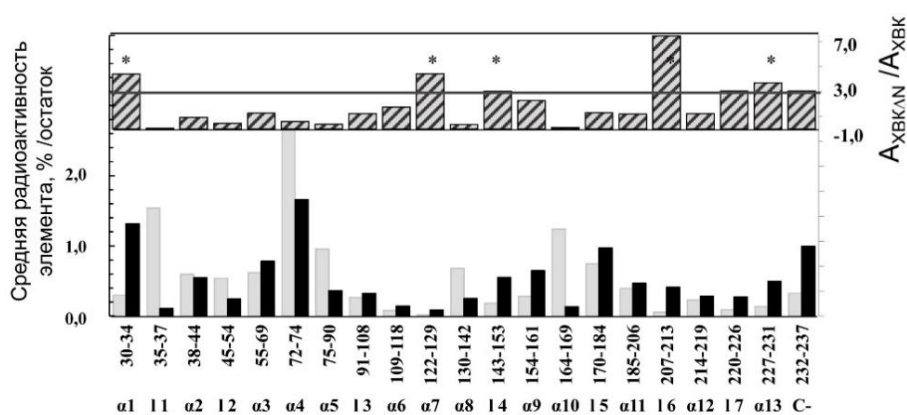


Рисунок 3 – Доступность мечению тритием БО вирионов ХВК (серые столбики) и ХВКΔN (черные столбики), рассчитанная по элементам вторичной структуры (PDB ID: 6R7G). В верхней части графика приведены величины $A_{\text{HBK}\Delta\text{N}}/A_{\text{HBK}}$. Звездочкой обозначены элементы, где $A_{\text{HBK}\Delta\text{N}}/A_{\text{HBK}} > 3$

Удаление N-концевого «экрана» приводило также к резкому увеличению доступности внутреннего С-концевого домена ($l 6$ и $\alpha 13$), демонстрируя общее

снижение плотности упаковки вирусной частицы и подтверждая, что N²⁰-пептид является важным структурным стабилизатором вириона.

Относительное изменение радиоактивности элементов вторичной структуры белка при удалении N²⁰-пептида вириона продемонстрировано на трехмерной модели фрагмента вириона ХВК (PDB: 6R7G) (Рис. 4).

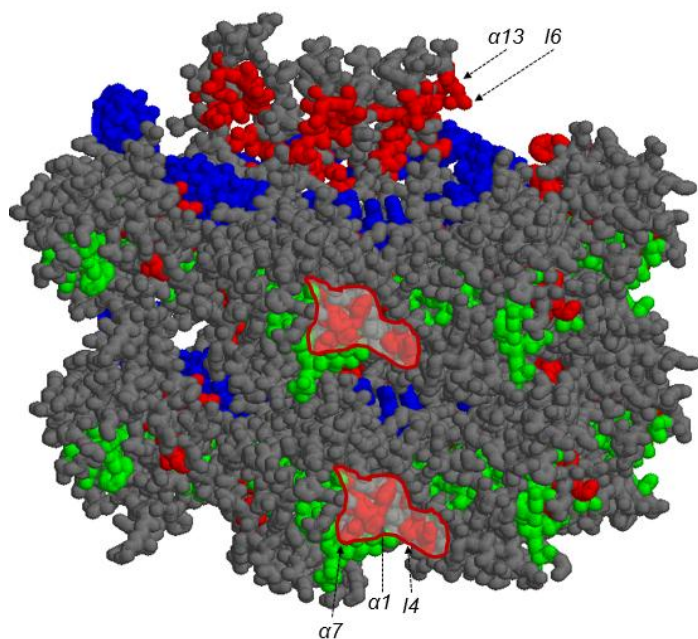


Рисунок 4 – Схематическое представление поверхности вириона по данным тритиевой планиграфии.

Фрагмент, состоящий из восьми субъединиц. Области со значением $A_{ХВКΔN} / A_{ХВК} < 0,4$ – закрашены зеленым; > 3 – красным. Фрагмент РНК окрашен синим цветом

Результаты метода ТП, предсказавшие поверхностную, но структурно организованную локализацию N²⁰-пептида, нашли своё прямое подтверждение при изучении методом МУРР и последующего моделирования (Таблица 1). Сравнительное изучение структурной организации вирионов ХВК, ХВКΔN (без ~20 а.о.) и ВМАльт (короче БО ХВК на ~30 а.о.) методом МУРР выявило ключевые различия, обусловленные наличием N-концевого пептида у БО интактного ХВК. Несмотря на схожие спиральные параметры (шаг спирали $d \sim 3,4$ нм, волновой вектор рассеяния $s_{\max} \sim 1,86$), вирионы ХВКΔN и ВМАльт демонстрировали меньшую структурную упорядоченность (Δ/d), более размытый брэгговский пик и меньший размер упорядоченных областей (L - 110 нм против 140 нм у ХВК).

Таблица 1 – Структурные характеристики упорядоченных областей вирионов ХВК, ХВКΔN и ВМАльт*.

Образцы	$s_{\max}$, нм ⁻¹	d , нм	L , нм	Δ/d
ХВК	1,85	3,40	140 ± 10	$0,05 \pm 0,01$
ХВКΔN	1,86	3,38	110 ± 10	$0,06 \pm 0,01$
ВМАльт	1,86	3,37	110 ± 10	$0,06 \pm 0,01$

* Эксперименты МУРР выполнены совместно с к.ф.м.н. М.В. Петуховым и д.х.н. Э.В. Штыковой (Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН) на синхротроне Petra III (DESY, Гамбург)

Анализ функций распределения расстояний $p(r)$ показал, что вирионы ХВК формируют более жесткие цилиндрические частицы диаметром $\sim 13,2$ нм, а вирионы ХВКΔN и ВМАльт – более гибкие структуры диаметром $\sim 12,5$ нм. Разница в диаметрах напрямую связана с наличием у ХВК N-концевого пептида. Моделирование строения вирионов на основе атомарных структур подтвердило, что центральные домены (48-210 а.о.) БО ХВК и ВМАльт (PDB ID: 7OG6) структурно сходны и наибольшая дистанция между их Cα-атомами наблюдалась в N- и C-концевых участках.

Исходная модель, построенная на основе крио-ЭМ структуры БО ХВК (без координат для первых 28 а.о.), не могла адекватно описать экспериментальную кривую МУРР.

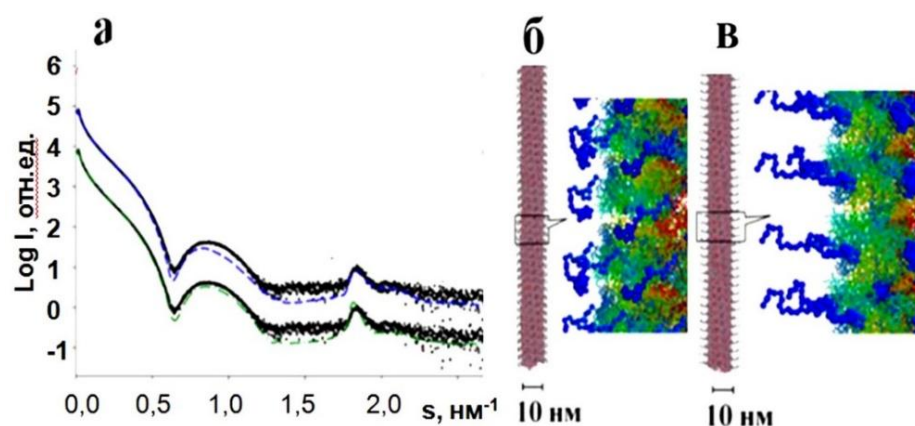


Рисунок 5 – Сравнение экспериментальных кривых МУРР (чёрным) с моделями ХВК, содержащими N²⁸-пептиды в связанном (синим) и развернутом (зелёным) состояниях. (б, в) – соответствующие

модели вириона. Увеличение на вставках (б, в): 10×. Все работы по моделированию проведены совместно с к.ф.м.н. М.В.Петуховым

В работе был виртуально «достроен» отсутствующий N²⁸-пептид и протестированы две его гипотетические конформации (Рис. 5б, в). Модель со «связанными» пептидами лучше описывала брэгговский пик и объясняла данные

третиевой планиграфии: N²⁰-пептиды экранируют от трития элементы ($\alpha 1$, $\alpha 7$, 14), чья радиоактивность возрастает после их удаления. ТП и МУРР-моделирование взаимно подтвердили друг друга: ТП идентифицировала N-пептид как экранирующий фактор, моделирование показало его частично сложенную конформацию.

Термостабильность вирионов ХВК и ХВКАΔN была близкой (~68°C), тогда как у вирионов ВМАльт - ниже на 12°C (~56°C), что также указывало на стабилизирующая роль N-пептида (Рис. 6а, б).

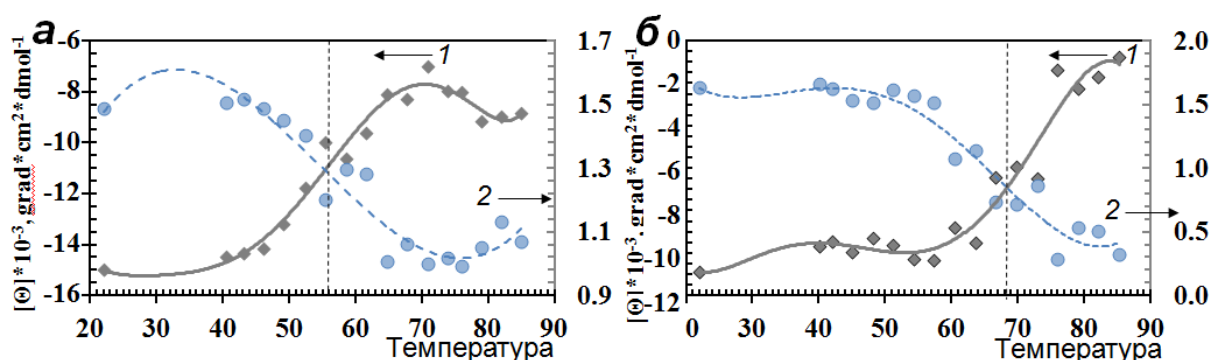


Рисунок 6 – Термическая денатурация препаратов ВМАльт (а) и ХВК (б) по данным КД-спектров. Приведена температурная зависимость интенсивности отрицательных максимумов $[\theta]^{208}$ при 208 нм (1) и величины $[\theta]^{208}/[\theta]^{218}$ (2)

Таким образом, N-концевой пептид БО ХВК способствует структурной упорядоченности вириона за счёт дополнительных межсубъединичных контактов. Это пример того, как неупорядоченный регион приобретает функционально значимую конформацию при сборке, выступая в роли «закрепляющего элемента».

2. Структурная лабильность концевых доменов БО ХВК и трансляционная активация вирионов

2.1. Структура нефосфорилируемого мутанта ХВК-ST.

Геномная РНК Х-вируса картофеля в составе интактных вирионов не способна к трансляции *in vitro*, в отличие от ВТМ. Известно, что для активации трансляции РНК ХВК необходимо фосфорилирование N-концевых остатков Ser - Thr его БО, что вызывает конформационные изменения, открывающие 5'-конец

РНК для рибосом. Для проверки критической роли этих остатков был создан мутант ХБК-ST, в первых 20 а.о. которого все Ser–Thr были заменены на неспособные к фосфорилированию Ala–Gly. Неожиданно, вирионы этого мутанта приобрели способность к трансляции, что указывало на глубокие структурные перестройки, имитирующие активированное состояние ХБК дикого типа.

Измерения кривых МУРР для ХБК и ХБК-ST проводились в двух геометриях (Рис. 7а, б) на станции «БиоМУР» Курчатовского источника синхротронного излучения (НИЦ «Курчатовский институт», Москва). Функции распределения по расстояниям $p(r)$, рассчитанные из этих кривых, были характерны для длинных цилиндров с максимальным размером ($D_{\max}$) около 140 нм и поперечным сечением ~ 12 нм (Рис. 8а, вставка).

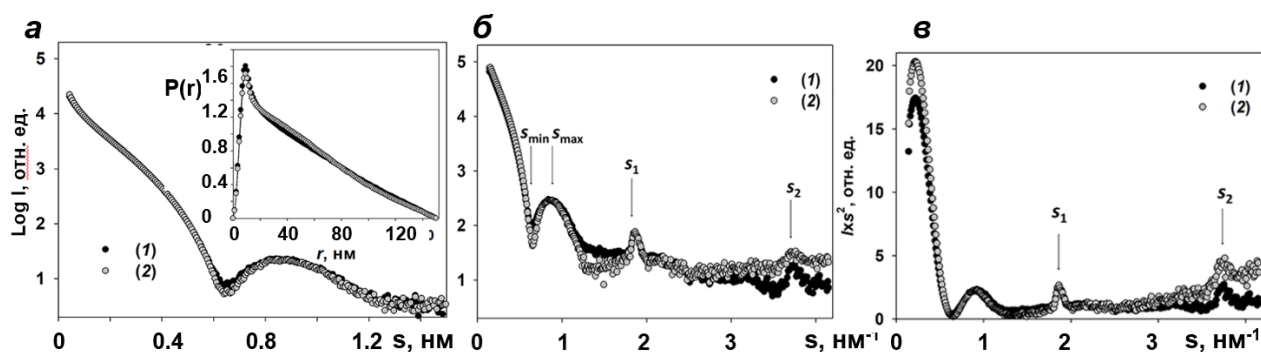


Рисунок 7 – Экспериментальные кривые МУРР вирионов ХБК (1) и ХБК-ST (2), измеренные с расстоянием образец - детектор 2500 мм (а) и 700 мм (б). Вставка панели (а) - функции распределения по расстояниям $p(r)$ для вирионов ХБК (1) и ХБК-ST (2). (в) Графики Кратки кривых МУРР вирионов ХБК (1) и ХБК-ST (2)

На кривых МУРР у обоих образцов детектировались четкие брэгговские пики при $s_1 = 1,86 \text{ nm}^{-1}$ и $s_2 = 3,72 \text{ nm}^{-1}$ (Рис. 7б). Совпадение их положений указывает на идентичность основного структурного параметра – шага спирали, который составил $3,36 \pm 0,01 \text{ nm}$ для обоих вирионов. Однако в областях, отвечающих за рассеяние от элементов структуры среднего ($s = 1,3\text{--}1,7 \text{ nm}^{-1}$) и малого ($s > 4 \text{ nm}^{-1}$) размера, наблюдались различия в профилях кривых. Анализ в координатах Кратки (Рис. 7в) выявил более выраженное разупорядочение для мутанта ХБК-ST именно в области высоких s ($> 4 \text{ nm}^{-1}$), что соответствует структурным перестройкам на уровне малых элементов (менее 2 нм).

Для интерпретации различий, выявленных МУРР на атомарном уровне, было проведено моделирование с помощью молекулярной динамики (МД) 1,5 витков спирали ХВК и ХВК-ST, построенных на основе крио-ЭМ структуры с достроенными N-концевыми пептидами. Структура ядра БО (а.о. 51-185) совпадала с крио-ЭМ данными (RMSD $\sim 3\text{\AA}$). Ключевое различие наблюдалось в N-концах: у мутанта ХВК-ST они более свёрнуты ($R_g = 1,2\text{ нм}$), чем у дикого типа ($R_g = 1,4\text{ нм}$). Пространственное выравнивание МД-моделей подтвердило, что наибольшие структурные отклонения (до $35\text{ \AA}$) локализованы в N-концевых областях, меньшие изменения (до $8\text{ \AA}$) наблюдались в С-концевом домене.

Анализ структуры N-концевых пептидов с помощью сервера AlphaFold 3 показал, что пептид мутантного вириона обладает значительно большей склонностью к сворачиванию, чем пептид интактного ХВК. При моделировании в отсутствии взаимодействия с окружающими а.о. радиус инерции R_g исходного пептида составил $1,94\text{ нм}$, в то время как пептид мутанта был почти вдвое более свернут ($R_g = 1,02\text{ нм}$), несмотря на идентичную длину (Рис. 8).

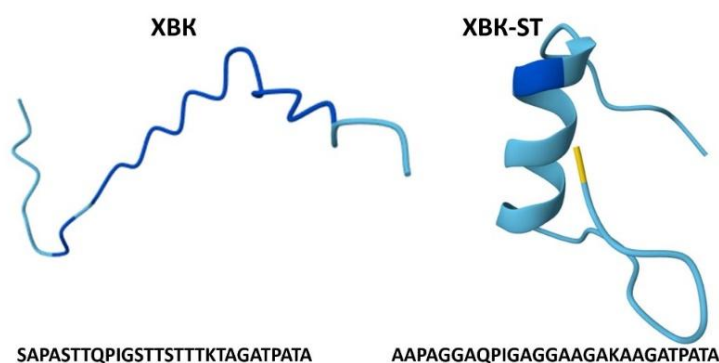


Рисунок 8 – Предсказанные с помощью сервера AlphaFold 3 структуры N-концевых пептидов ХВК и ХВК-ST. Цветовая шкала отражает достоверность предсказания pLDDT (0–100): синий (>90), голубой (90–70), жёлтый (70–50).

КД-спектроскопия показала, что при близкой термостабильности ($T_{пл}$ $67\text{--}70^\circ\text{C}$) интенсивность положительного максимума ХВК-ST была вдвое ниже (~ 5000 против ~ 13000). Мутант менее устойчив к додецилсульфату натрия (ДСН): потеря третичной структуры по флуоресценции в присутствии $0,15\%$ ДСН происходила за $8\text{--}10$ мин против 20 мин у ХВК (Рис. 9а). Анализ вторичной структуры по КД показал, что в $0,1\%$ ДСН величина $[\theta]^{208}$ у ХВК-ST резко менялась (с -12000 до $-6000\text{ град}\cdot\text{см}^2\cdot\text{дмоль}^{-1}$) за ~ 6 минут, говоря о разрушении α -спиралей, тогда как у ХВК этот показатель оставался стабильным в течение 20

минут (Рис. 9б). Эти данные свидетельствовали о меньшей устойчивости третичной и вторичной структур вириона ХВК-ST к денатурирующему действию детергента.

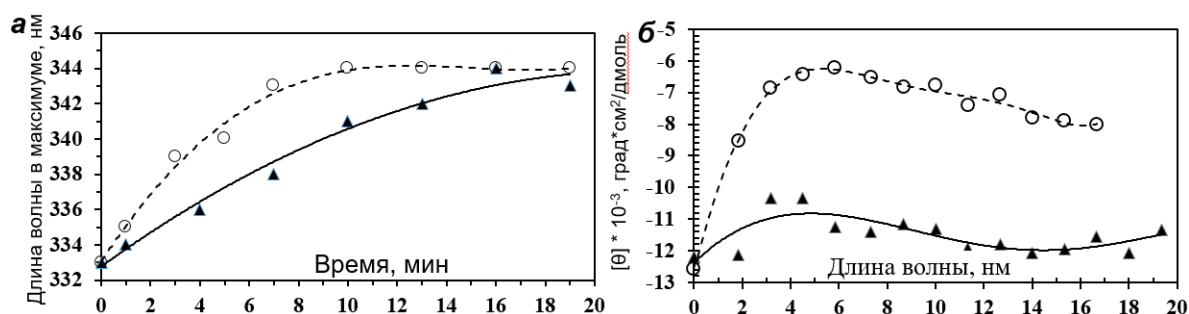


Рисунок 9 – Влияние ДСН на стабильность вирионов по данным флуоресценции (а) и КД-спектрам (б). Изменение λ_{max} флуоресценции для ХВК (▲) и ХВК-ST (○).

Прямые доказательства структурных изменений были получены методом тритиевой планиграфии. Анализ распределения тритиевой метки выявил у мутанта ХВК-ST (Рис. 10а) значительное увеличение доступности трёх ключевых фрагментов БО: участка а.о. 30-44 (часть N-концевого домена), участка а.о. 130-169 (субдомен, связывающий РНК) и участка а.о. 207-226 (петлевая область С-домена вблизи РНК). Повышенное включение метки этих областей связано с менее плотной укладкой белковой спирали капсида в мутанте.

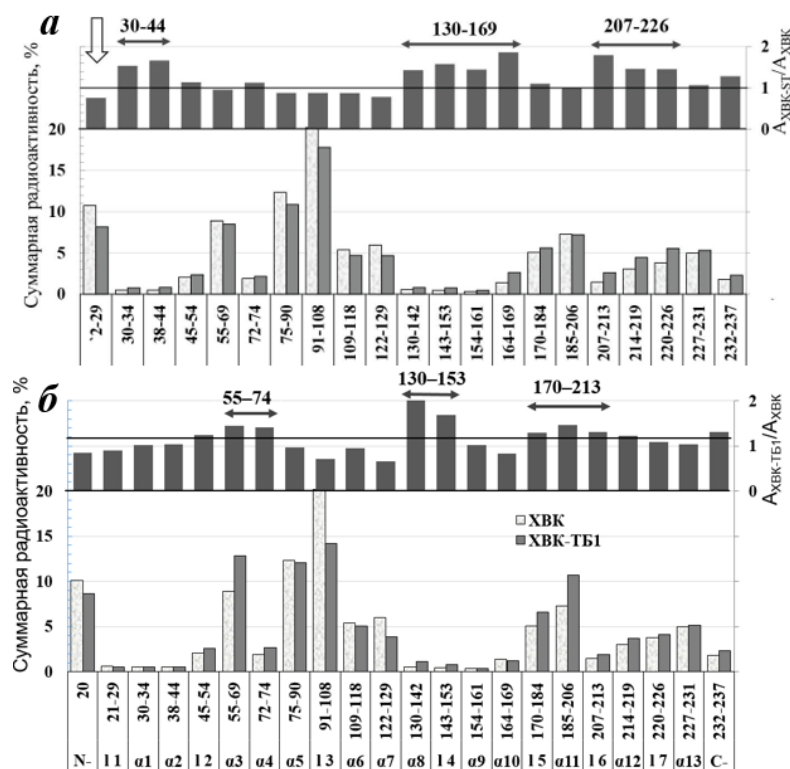


Рисунок 10 – Доступность элементов вторичной структуры БО вирионов ХВК (светло-серые), ХВК-ST (а) и ХВК-ТГБ1 (б) (чёрные столбики) для тритиевого мечения (по модели PDB 6R7G). % суммарной радиоактивности. В верхней части – величины $A_{\text{HBK-ST/TGB1}}/A_{\text{HBK}}$, участки с отношением $>1,3$ подписаны. Широкая стрелка – N-концевой пептид. Эксперименты по мечению проведены совместно с зав. лаб. радионуклидов и меченых соединений кафедры радиохимии Химического факультета МГУ Г.А. Бадуном

Суммирование данных позволяет предложить следующую модель. Замена Ser-Thr на Ala-Gly в N-концевом пептиде БО существенно меняет его физико-химические свойства (Таблица 2): возрастает алифатический индекс и гидрофобность пептида, нарушается гликозилирование и гидратная оболочка вириона (Baratova et al., 2004). Согласно концепции Уверского, такое сочетание – увеличение гидрофобности при сохранении высокого заряда – способствует переходу из разупорядоченного состояния в частично упорядоченное, что согласуется с данными предсказания структуры (AlphaFold).

Таблица 2 – Сравнение свойств N-концевых пептидов из 28 а.о. ХВК и ХВК–ST*

N-конц. пептид	Последовательность	$M_{\text{теор.}}$ Да	Алифатичес- кий индекс	Удельная гидро- фобность (H)	Удельный заряд (Q)	Q/H	R_g
ХВК	SAPASTTQPI GSTTSTTTKT AGATPATA	2579	35,36	-0,282	0,035	-0,12	1,9
ХВК-ST	AAPAGGAQPI GAGGAAGAKA AGATPATA	2204	60,36	+0,411	0,036	0,09	1,0

*Удельную гидрофобность рассчитывали из суммарной гидрофобности (шкала Куте, Doolittle, 1982); удельный заряд определяли при pH 7,3; средний радиус инерции R_g определяли для предсказанных структур пептидов (AlphaFold3).

Таким образом, замена Ser-Thr на Ala-Gly в N-концевом пептиде БО индуцирует сворачивание пептида и повышает его гидрофобность. Нарушение межсубъединичных контактов приводит к снижению плотности упаковки капсида, облегчая доступ рибосом и трансляционных факторов к РНК, что обуславливает трансляционную активность мутанта ХВК-ST.

2.2. Структура ХВК при связывании ТГБ1 с вирионом по данным ТП.

Альтернативный путь трансляционной активации РНК ХВК – связывание вирус-специфичного белка ТГБ1 (продукта первого гена тройного генного блока) с 5'-концом РНК (Atabekov et al., 2000, 2001; Rodionova et al., 2003). Это индуцирует кооперативное ремоделирование всей частицы, обеспечивая котрансляционное «раздевание» на РНК и субъединицы БО в процессе трансляции первых кодонов при важной роли С-концевой области БО. Для

визуализации структурных изменений было проведено сравнительное исследование методом ТП интактных вирионов и вирионов с ТГБ1 (Рис. 10б).

Данные метода подтвердили, что связывание ТГБ1 не вызывает диссоциации вириона: включение трития для большей части БО осталось практически неизменным, что свидетельствовало о сохранении архитектуры капсида. Однако, выявлены изменения в РНК-ассоциированных сегментах: рост включения метки на ~47% в области а.о. 55–74 (первые α -спирали центрального домена, рядом с Asn51, контактирующим с РНК) и почти двукратное увеличение в области а.о. 130–153 (РНК-связывающий субдомен, $\alpha 8$ и $l4$). Был обнаружен рост мечения остатков 170-213. Область а.о. 185-213 включает спираль $\alpha 11$ и петлю $l6$, которые являются частью С-концевого домена и содержат критические остатки (Lys199, Ile200, Arg204, Gln206), формирующие контакты с четырьмя из пяти нуклеотидов (Grinzato et.al., 2020) в РНК-связывающем сайте каждой субъединицы БО (Рис. 11).

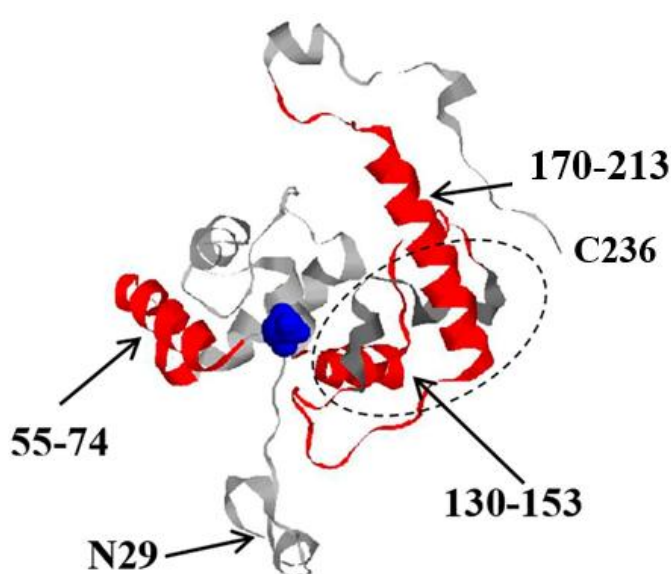


Рисунок 11 – Крио-ЭМ модель ХБК (PDB 6R7G). На схеме красным выделены участки белка (остатки 55–74, 130–153 и 170–213), в которых тритиевое мечение возрастает при образовании комплекса ХБК-ТГБ1, Asn51- синим цветом. Эллипсом показан субдомен 130-169

Таким образом, используя метод ТП, удалось подтвердить, что связывание ТГБ1 индуцирует конформационные сдвиги, которые избирательно дестабилизируют и «приоткрывают» ключевые РНК-связывающие сайты БО, включая критически важный С-концевой домен. Повышение доступности участков 130-153 и, особенно, 185-213 прямо указывает на ослабление контактов, удерживающих РНК внутри вириона. В таком «ремоделированном» состоянии 5'-

конец РНК становится стерически доступным для трансляционных факторов. Последующее связывание рибосомы и инициация трансляции запускает кооперативное «раздевание» вириона, приводящее к высвобождению трансляционно-компетентной РНК.

3. Модель топологии БО потивируса А-вируса картофеля (АВК) по данным тритиевой планиграфии и предсказательных алгоритмов.

Методом ТП изучена топография поверхности вирионов АВК: частицы бомбардировали атомами трития и определяли распределение метки в аминокислотах триптических пептидов после их разделения ВЭЖХ. Профиль доступности (см. Рис. 17) показал, что в N-концевой области наибольшая метка была в а.о. 1–15 и 27–50, а наименьший уровень мечения был в пептиде T11 (87–159 а.о.) и в С-концевом фрагменте.

Для моделирования топологии белка оболочки АВК был использован подход, основанный на известных принципах строения белков (Efimov, 1999) с учетом того, чтобы при моделировании доступные для метки сегменты белка находились на поверхности. Полученная модель предсказывала структуру из трех доменов: (i) открытый извне N-концевой домен, включающий неструктурированный N-конец из 8 аминокислот и два β -тяжа, (ii) С-концевой домен, включающий две спирали, а также три β -тяжа, которые образуют двухслойную структуру, и (iii) центральный домен, содержащий пучок из четырёх спиралей, подобный найденному в БО ВТМ.

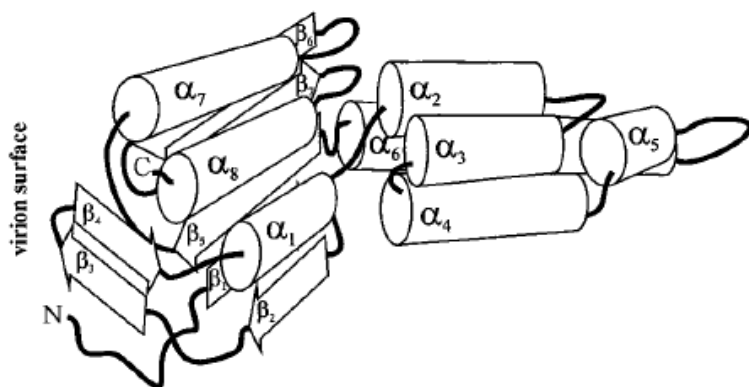


Рисунок 12 – Топология укладки БО АВК. α -спирали – цилиндры, β -нити – открытые стрелки, петли и N/C-концы – сплошные линии. Моделирование выполнено совместно с д.б.н. Добровым Е.Н. (Биологический факультет МГУ) и д.х.н. Ефимовым А.В. (Институт Белка РАН, Пуцино)

В течение многих лет это была единственная модель, которую использовали для объяснения трёхмерной структуры БО потивирусов. Однако она отличалась от схематических моделей, предложенных для родственного потивируса – Y-вируса картофеля (YVK), у которого N- и C-концевые сегменты БО были поверхностно локализованы (Shukla, 1988;1989).

4. Роль неупорядоченных N-концевых доменов в структурной организации и гибкости вирионов потивируса АВК.

4.1. Белок оболочки АВК имеет частично разупорядоченную структуру.

Анализ КД-спектров в дальнем УФ показал у вирионов АВК интенсивный отрицательный максимум при 203 нм, характерный для высокого содержания неупорядоченных структур. Обработка 0,15% ДСН вызвала сдвиг максимума к 208 нм и снижение интенсивности с -26000° до -15000° , что соответствует типичному α -спиральному спектру (Рис. 13).

Нагрев до 55°C (до разрушения вириона) вызвал резкое увеличение КД-сигнала $[\theta]_{203}$ с -26000° до -45000° , что указывало на рост разупорядоченности (Рис. 13а, б). Одновременно пик собственной флуоресценции сдвигался с 327 до 340 нм, а его интенсивность снижалась вдвое. Термостабильность вирионов АВК ($T_{\text{пл}} \sim 55^\circ\text{C}$), определенная методом калориметрии (ДСК), оказалась ниже чем у вирионов ВТМ ($80,5^\circ\text{C}$) и ХВК ($64,3^\circ\text{C}$).

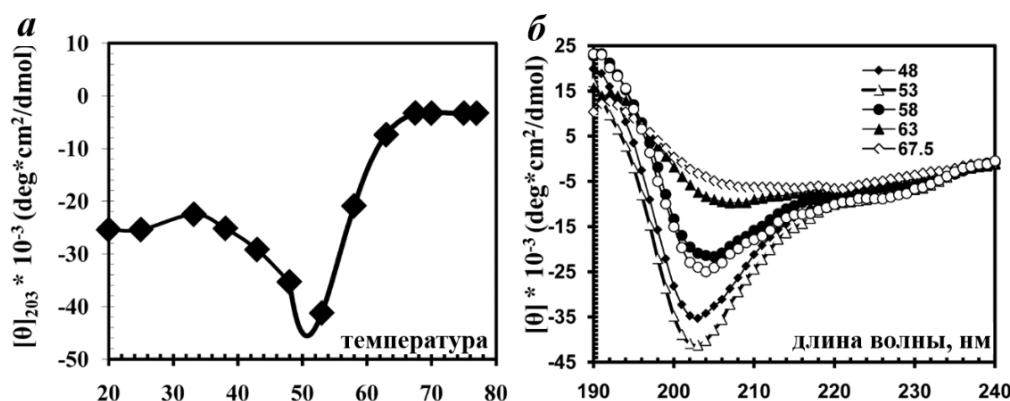


Рисунок 13 – Термическая денатурация АВК по данным КД: (а) температурная зависимость $[\theta]_{203}$ (б) КД-спектры при указанных температурах

Прогнозирование по первичной структуре выявляло высокий процент неупорядоченных ID-областей (40-50%), особенно в N- и C-концевых регионах БО (Рис. 14), которые могут стабилизировать межсубъединичные взаимодействия.

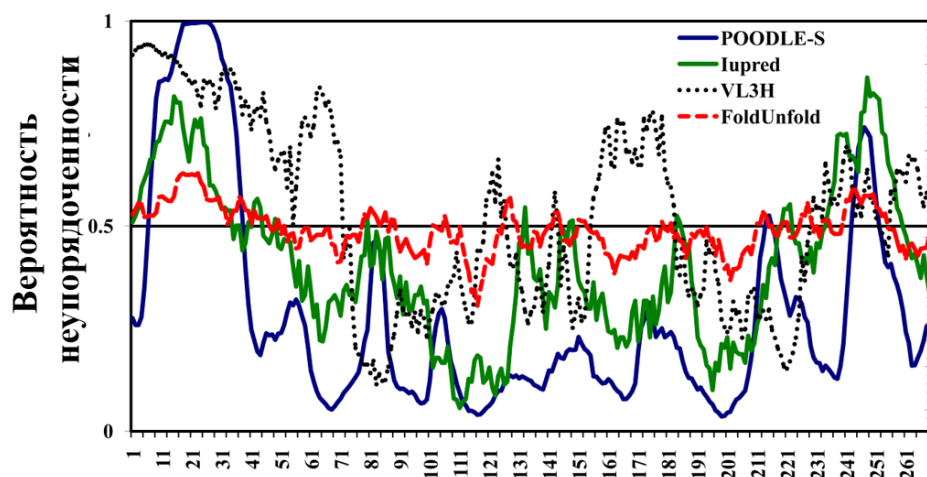


Рисунок 14 –
Предсказание
развернутых ID-
областей в БО АВК
рядом указанных
программ. По оси
абсцисс – номера
остатков.

4.2. N-концевые фрагменты встроены в спиральную упаковку и регулируют гибкость вириона.

Триптическое удаление N-концевых пептидов (остатки 1–32) изменяло структурные свойства вириона (АВКΔ32). КД-спектры АВКΔ32 отличались меньшей амплитудой (-26000° против -12000°) и сдвигом максимума (203→205 нм), что указывало на уменьшение содержания ID-областей. При 55 °С спектральные изменения АВКΔ32 были слабее (минимум -29600° против -45000° у АВК), что свидетельствует о его повышенной термостабильности.

По данным МУРР, удаление N-концевых пептидов уменьшало шаг спирали с 3,92 до 3,37 нм (Рис. 15а). АВКΔ32 становился более упорядоченным и жёстким ($\Delta/d = 0,04 \pm 0,01$ против $0,06 \pm 0,01$; размер кристаллических областей 180 ± 5 нм против 125 ± 10 нм). Функции распределения по расстояниям $p(r)$ соответствовали удлинённым объектам; диаметр вириона уменьшался с 12 до 10,8 нм (Рис. 15б).

Полноразмерная структура АВК с атомным разрешением пока не известна; опубликованные в 2026 г. данные крио-ЭМ фрагмента БО (без 43 а.о.) подтверждают консервативность архитектуры (Koritnik et al., 2026). Впервые

выполнено *ab initio* моделирование полноразмерной структуры АВК по данным МУРР, подтвердившее бóльшую компактность АВКΔ32 (Рис. 15в)

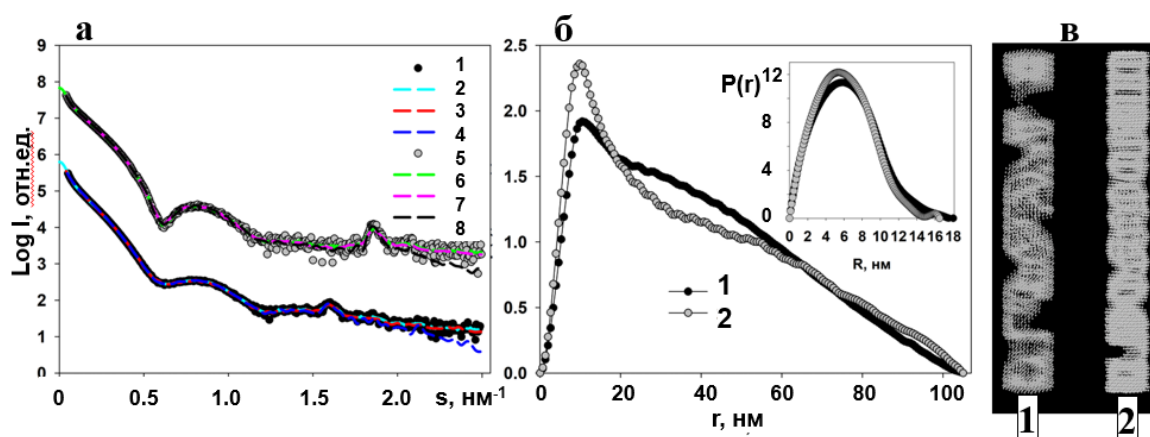


Рисунок 15 – Экспериментальные кривые рассеяния АВК и АВКΔ32 (1, 5, кружки) и аппроксимации: по функции $p(r)$ (2, 6), от форм, восстановленных *ab initio* DAMMIN (3, 7) и MONSA (4, 8) (a). Функции $p(r)$ для АВК и АВКΔ32 (б); вставка – анализ поперечного сечения. Модели вирионов, восстановленные DAMMIN (в). Модели (1 и 2) хорошо аппроксимируют данные: $\chi^2 = 2,3$ (АВК) и $1,8$ (АВКΔ32)

Первичные структуры БО АВК и YBK имеют высокое сходство (64% идентичности). На основе структуры YBK (Kezar et al., 2019; а.о. 44-267) проведено *ab initio* моделирование АВК геометрическими телами. Построена модель вириона YBK из 30 витков длиной 105 нм, рассеяние которой сравнивали с МУРР-данными для АВК. Сравнение профилей подтверждает структурное сходство спиральных параметров оболочек обоих потивирусов.

Данные ПЭМ показали переход от гибких нитевидных частиц к жестким палочковидным частицам АВКΔ32 (Рис. 16), что коррелировало с МУРР.

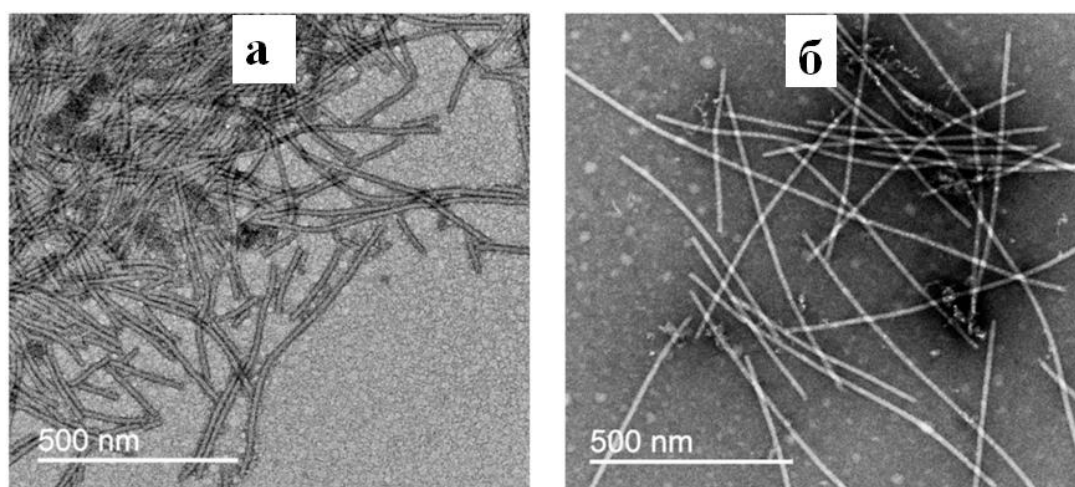


Рисунок 16 – Результаты ПЭМ вирионов АВК (a) и АВКΔ32 (б).

Согласно предлагаемой модели, N-концевой пептид частично встроен между витками спирали (фиксация межсубъединичных расстояний), а его выступающий фрагмент увеличивает диаметр вириона с 10,8 до 12 нм (МУРР).

4.3. Локализация N-концевого пептида и структурные перестройки вириона при его удалении по данным тритиевой планиграфии.

Распределение тритиевой метки в N-концевом пептиде АВК (а.о. 1–32) неравномерно (Рис. 17): центральный фрагмент (16–26 а.о.) практически не мечен, в отличие от фланкирующих участков (1–15 и 27–32 а.о.), что подтверждает локализацию центральной части пептида внутри вириона

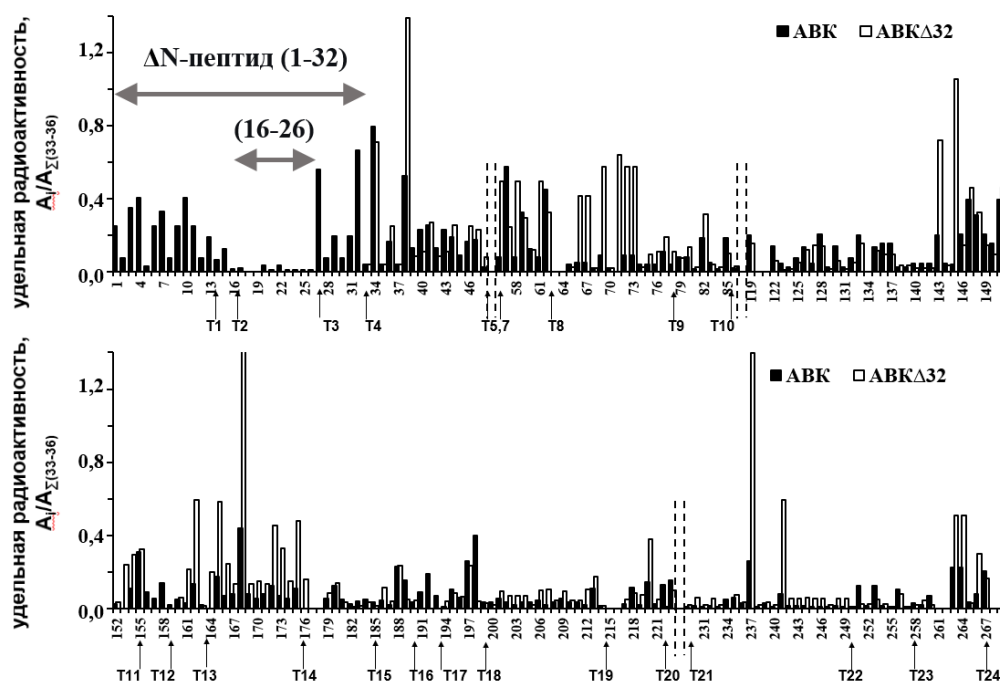


Рисунок 17 –
Распределение
тритиевой
метки в БО
вирионов АВК и
АВКΔ32. $A_i/A_{\Sigma(33-36)}$ –
удельные
радиоактивности
остатка (A_i),
нормированные на
сумму A_i
поверхностных
остатков 33–36.
Стрелками
показаны N-
концевой пептид

и его «встроенная» часть (а.о. 16–26). Сайты расщепления трипсином показаны стрелками. Пунктиром показано положение отсутствующих пептидов

Для интерпретации данных тритиевого мечения АВК использована модель БО YVK (PDB: 6HXX). Выбор модели обоснован высокой идентичностью последовательностей и соответствием спиральных параметров по данным МУРР. На модели БО YVK (Рис. 18) визуализировано относительное изменение радиоактивности при удалении N-пептида (красным – увеличение; желтым – снижение). Мечение резко возрастало ($A_{\text{ABK}\Delta 32}/A_{\text{ABK}} > 1,8$) в элементах N-концевого ($\alpha 1$, 68–74 а.о.) и центрального ($\beta 4$, 141–146 а.о.) доменов, что

указывает на их экранирование N-пептидом (Рис. 18а). Усиление мечения $\alpha 5$ – $\alpha 6$ (157–180 а.о.) свидетельствует о локализации N-пептида над межвитковой зоной и экранировании межсубъединичных контактов

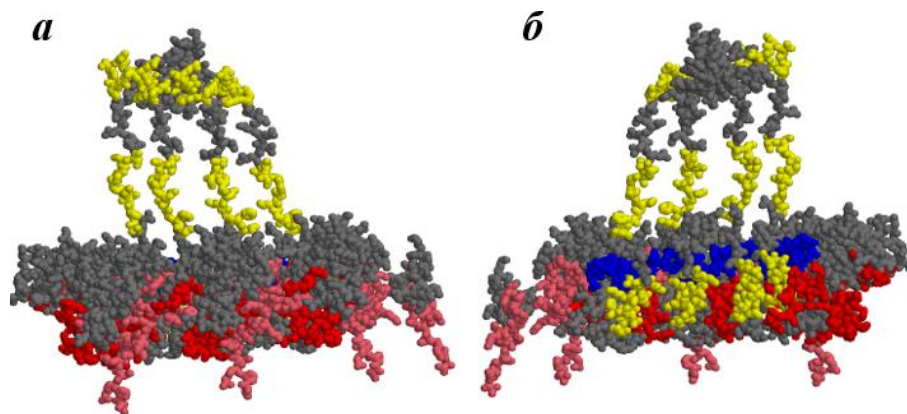


Рисунок 18 –
Относительное изменение радиоактивности в элементах вторичной структуры БО вирионов ABK и ABKΔ32 на модели БО YBK (PDB: 6HXX). AABKΔ32/AABK > 1,8 – красным, < 0,5 –

жёлтым. Показаны 4 субъединицы: снаружи (а) и изнутри (б); РНК – синим. Относительное изменение радиоактивности в элементах вторичной структуры белков вирионов ABK и ABKΔ32 на модели БО YBK (PDB: 6HXX). Области со значением $A_{ABK\Delta 32}/A_{ABK} > 1,8$ показаны красным, $< 0,5$ – желтым. Показано 4 субъединицы (скелет структуры), снаружи (а) и изнутри(б) вириона соответственно; РНК – синим цветом

Снижение уровня тритиевой метки во внутренних слоях вириона ABKΔ32 (Рис. 18б) коррелирует с данными МУРР и ПЭМ и указывает на структурную перестройку, ведущую к уплотнению упаковки белковой спирали после протеолитической обработки.

Для количественной оценки доступности поверхности остатков БО в составе вириона и в изолированном состоянии использован подход Ли и Ричардса (1971) с радиусом зонда 0,9 Å, соответствующим атому трития. Показано, что участки со значительным изменением мечения (петли 11 и 12, $\beta 3$ -тяж, спирали $\alpha 6$, $\alpha 7$) локализованы в зонах межсубъединичных контактов: их доступная площадь в вирионе почти вдвое меньше, чем у свободного белка.

Таким образом, N-концевой пептид БО ABK, характеризующийся частичной разупорядоченностью и интеграцией в спиральную упаковку капсида, выполняет роль структурного регулятора. Выступающая часть пептида экранирует поверхностные элементы и межсубъединичные контакты, тогда как

встроенный фрагмент (а.о. 16–26) определяет шаг спирали и гибкость вириона. Делеция пептида индуцирует упорядочивание капсида, уплотнение упаковки и потерю гибкости, что способствует повышению устойчивости вириона к внешним воздействиям и усилению защиты РНК от нуклеазной деградации. Высокая стабильность препаратов АВК (штамм В11) при длительном хранении при +4 °С подтверждает сделанные выводы.

5. Способность к альтернативной упаковке изолированного БО АВК.

Ключевая роль неупорядоченных концевых доменов.

Изолированный БО АВК *in vitro* демонстрирует структурный полиморфизм, формируя различные олигомерные частицы в зависимости от условий среды, что обусловлено свойствами его неупорядоченных концевых доменов.

В физиологических условиях (5 mM Tris-HCl, pH 7,8) БО АВК самособирается в ВПЧ, близкие к нативному вириону (ПЭМ, Рис. 19а). В диссоциирующих условиях (0,5 M NaCl, 5 mM CAPS, pH 10,5), где ВПЧ других потивирусов распадаются на мономеры, белок АВК образует стабильные овальные частицы 20–30 нм (Рис. 19б), что указывает на уникальные структурные особенности, препятствующие полной диссоциации.

Переход между состояниями регулируется электростатическими взаимодействиями: при возвращении в буфер pH 7,8 овальные частицы быстро (10–15 мин) реассоциируют в ВПЧ (Рис. 19в), причём скорость замедляется с ростом ионной силы. Овальные частицы могут представлять собой промежуточные стадии сборки вирионов *in vitro* и *in vivo*.

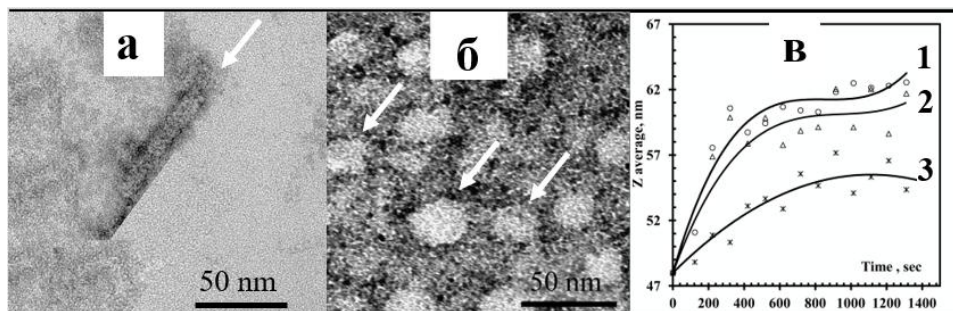


Рисунок 19 – ПЭМ частиц БО АВК после диализа в буферы pH 7,8 – (а) и pH 10,5 (0,5 M NaCl) – (б). (в) Кинетика сборки ВПЧ по данным ДЛС

при разбавлении частиц (буфер pH 10,5) буфером pH 7,8 с NaCl: (1) 80 мМ, (2) 215 мМ, (3) 920 мМ. По оси Y – Z-средний (гидродинамический) размер при 18 °C (ZetasizerNano ZS)

Анализ ограниченного протеолиза трипсином выявил структурные различия между состояниями БО. В составе интактного вириона и ВПЧ при pH 7,8 белок защищён от глубокого расщепления (удаляется только N-концевой фрагмент, 28/32 а.о.). В овальных частицах протеолиз протекает глубже (Рис. 20а): масс-спектрометрия идентифицировала фрагменты f1–f5 (Рис. 20б), соответствующие отщеплению N- и C-концевых участков, с образованием протеолитически стабильного ядра 87–223 (~50% белка) (Рис. 26б).

Таким образом, в овальных частицах N- и C-концевые домены доступны для протеолиза, что указывает на их частичную разупорядоченность, тогда как сохранение стабильного ядра 87–223 свидетельствует о структурированности центрального домена БО.

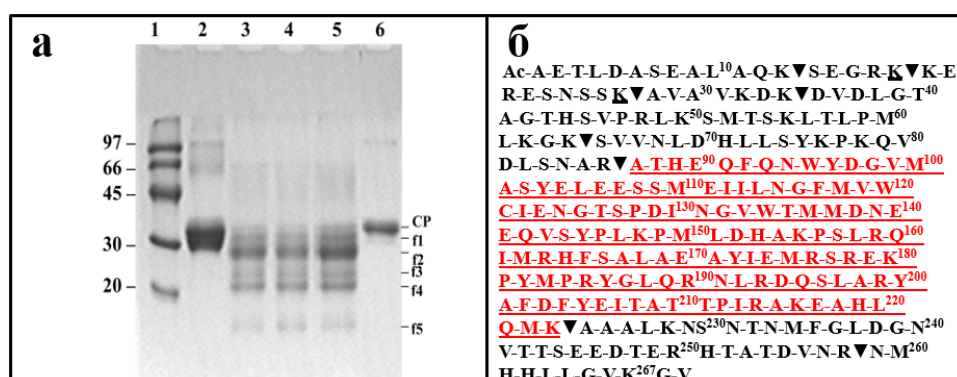


Рисунок 20 –
Анализ продуктов
ограниченного
трипсинолиза (ДСН-
ПААГ). 1 – маркеры
ММ; 2 – протеолиз
вирионов АВК; 3–5 –
протеолиз частиц БО
в буфере pH 10,5 (15,
30 и 60 мин); 6 –

интактный БО АВК; f1–f5 – триптические фрагменты (а). Сайты фрагментации БО АВК (б): места гидролиза в частицах БО (▼) и в вирионе (подчёркнуты); нерасщепляемый сегмент выделен. Последовательность – NCBI NP_734368.1. Эксперименты по MALDI-TOF МС - анализу выполнены к.ф/м.н. М.В. Серебряковой

Данные МУРР количественно подтвердили структурные различия между частицами, полученными в разных условиях. Частицы овальной формы, сформированные в pH 10,5 (0,5 М NaCl), имели низкую плотность упаковки и молекулярную массу (ММ) ~1000 кДа (~30 субъединиц). Напротив, частицы, образованные при pH 7,8 (0,1 М NaCl), представляли собой компактные цилиндры с массой >2000 кДа (>60 субъединиц), и воспроизводили форму и плотность

вириона (см. диссертацию). *Ab initio* реконструкция формы демонстрирует структурный переход: от «рыхлой» овальной частицы – к вытянутому цилиндру, стабильность которого обеспечивается интеграцией неупорядоченных N- и C-концевых фрагментов в структуру белкового комплекса.

Отсутствие способности БО АВК к полной диссоциации, в отличие от гомологичных белков оболочки YBK и PVBV, может быть объяснено особенностями его первичной структуры; алгоритмы предсказывают большее содержание ID-областей именно в N/C-концевых доменах БО АВК. Эти гибкие, богатые заряженными остатками регионы, по-видимому, способствуют образованию множественных межмолекулярных контактов, которые стабилизируют олигомерное состояние.

Обработка ДСН вызывала диссоциацию ассоциатов на микродомены размером ~1 нм, организованные по модели «бус на нити», описанной Shirahama et al. (1974). В составе детергентного комплекса белок утрачивал третичную структуру, но сохранял вторичную, что свидетельствует о разрушении контактов, стабилизированных, в том числе, ID-фрагментами.

Таким образом, неупорядоченные концевые фрагменты БО АВК обладают функциональной двойственностью, стабилизируя овальные ассоциаты и направляя сборку ВПЧ в зависимости от условий, что свидетельствует об их ключевой роли в управлении структурными перестройками и, вероятно, закреплено эволюционно для обеспечения гибкости и регуляции сборки вириона.

6. Роль неупорядоченных доменов в термоиндуцированном β -переходе и агрегации БО и вирионов АВК.

БО АВК характеризуется значительной долей ID-доменов, что подтверждается спектрами комбинационного рассеяния (КР), выявляющими «ID+ α » структуры в вирионе и изолированном белке. Нагревание выше 55 °C, увеличивающее долю ID-структур (Рис. 13), запускает необратимую агрегацию. При 60–70 °C неупорядоченные домены реорганизуются в β - и кросс- β -структуры, что подтверждено: (1) КР-спектроскопией (сдвиг «ID+ α » $\rightarrow$ «ID+ β »);

(2) тестом с тиофлавином Т (появляется пик флуоресценции при 492 нм); (3) КД-спектрами (рост β -структур, снижение α -структур при нагреве 17→70 °С, Рис. 13).

По данным ДЛС, кажущийся диаметр частиц увеличивался с 40–50 до >100 нм выше 55 °С, что указывает на агрегацию денатурированного белка через межмолекулярные β -связи. Электронная микроскопия показала, что при ~60 °С вирионы агрегируют с торцов (Рис. 21а), выше 70 °С – трансформируются в аморфные структуры (Рис. 21б). Изолированный БО при 55 °С (10 мин, pH 7,8) превращался из ВПЧ в сферические агрегаты 45–65 нм (Рис. 21в, г).

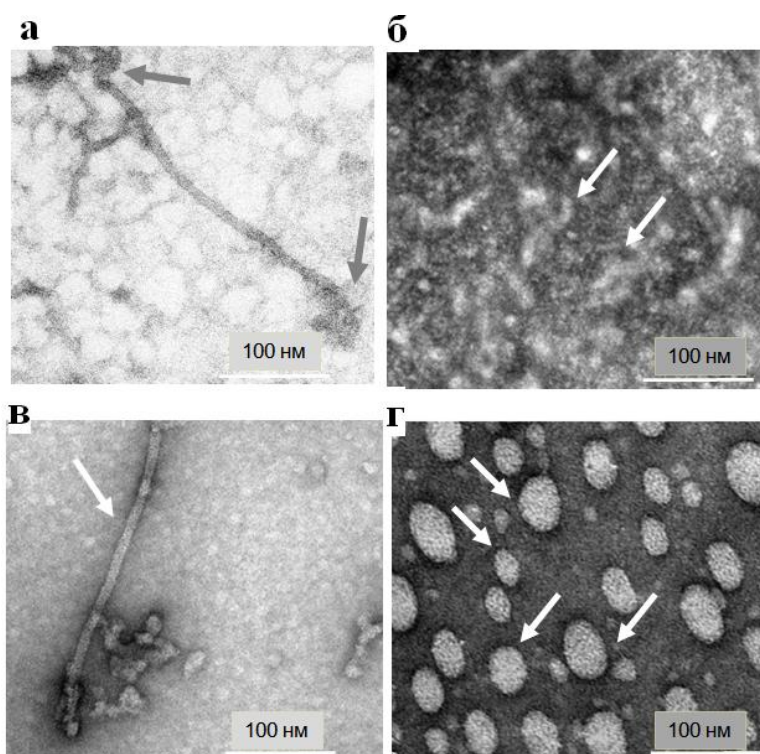


Рисунок 21 – Структурный переход вирионов АВК (а, б) и БО АВК (в, г) при нагревании по данным ПЭМ. Вирусный препарат выдерживали при 57 °С, 10 мин (а); тот же препарат прогревали еще при 70 °С, 10 мин (б). Препарат ВПЧ БО АВК при 25 °С, pH7,8 (в); ВПЧ БО АВК прогревали при 55 °С, 10 мин (г)

Согласно литературным данным, дестабилизация ID-доменов при нагревании служит движущей силой агрегации (Chiti & Dobson, 2009). In silico анализ последовательности БО (TANGO, WALTZ, AGGRESCAN, Zyggregator, AmylPred2) выявил в БО АВК агрегационно-склонные сегменты в ID-доменах или на их границах. Нагрев экспонирует эти сегменты и индуцирует переход внутримолекулярных контактов в межмолекулярные кросс- β -структуры (Wetzel, 1994). Таким образом, ID-домены БО АВК, обеспечивающие гибкость и сборку, при нагревании становятся центрами агрегации, что соответствует общей роли ID-областей как регуляторов стабильности и агрегации (Chiti et al., 2009)

Ранее было показано, что термическая обработка растительных вирусов (ХВК, ВМАльт, ВТМ) индуцирует структурные изменения (Atabekov et al., 2011; Karpova et al., 2012; Nikitin et al., 2016; Ksenofontov et al., 2019; Manukhova et al., 2021), а получаемые модифицированные частицы с повышенной стабильностью, адсорбционными свойствами и биodeградируемостью перспективны для биотехнологических применений, в частности для разработки вакцинных платформ (Nikitin et al., 2023; Кондакова и др., 2022).

7. Эффективность комплексного подхода, интегрирующего данные МУРР, тритиевой планиграфии, биоинформатики и моделирования для изучения нитевидных растительных вирусов.

Каждый из использованных методов вносит уникальный вклад в структурную характеристику вирусов. **Тритиевая планиграфия**, основанная на бомбардировке образца атомарным тритием (метод Лэнгмюра), обеспечивает информацию о доступности поверхности макромолекул. При 2000 К ~25% атомов трития имеют энергию $\geq 0,3$ эВ, достаточную для отрыва водорода, при этом нереакционное столкновение снижает энергию атома, что ограничивает анализ поверхностным слоем толщиной 5–6 Å. Удельная радиоактивность достигает 0,1–1 Ci/ммоль (выход 0,03–0,3%). Малый диаметр атома (0,9 Å) и линейная корреляция включения метки с доступной поверхностью позволяют определять экспонированность отдельных компонентов в многокомпонентных комплексах. Разработанная методика проточного измерения радиоактивности (аминокислотный анализатор Hitachi L8800, сцинтилляционный счётчик Packard Radiomatic 150TR, сцинтиллятор Ultima-Flo AP) обеспечивает детекцию ~100 dpm, что подтверждает высокую эффективность ТП для изучения динамичных поверхностей спиральных растительных вирусов.

Метод МУРР дополняет этот подход, предоставляя структурную информацию в растворе в условиях, близких к физиологическим, что критически важно для сохранения их нативной гибкости. Апробация метода на вирионах и реполимерах ВТМ показала хорошее согласие экспериментальных кривых

рассеяния (Рис. 22 а, в; кривые 1) с расчётами от атомистических моделей (Рис. 22; кривые 2). Модель полного вириона (~120 нм, ~800 субъединиц БО) продемонстрировала высокую степень соответствия эксперименту в широком диапазоне ($0,01 < s < 0,35$), а положение характеристических пиков совпало с данными рентгеновской дифракции (Kendall et al., 2007). Для реполимеров БО ВТМ на основе структуры PDB: 1EI7 созданы три модели: $(BA)_{16}$, $(AA)_{16}$ и $(BAAAB)_8$ (из ~550 БО, длиной ~100 нм). Наилучшее соответствие с экспериментом достигнуто для модели $(AA)_{16}$, что согласуется с данными крио-ЭМ (Raghavendra et al., 1986). Анализ положения пиков (например, s4) позволил определить осевую периодичность $2,6 \pm 0,1$ нм, что подтверждено ПЭМ. Несмотря на ограничения метода (низкая точность для объектов $<1,5$ нм и >200 нм), результаты МУРР в этом диапазоне размеров характеризуют весь вирион, что позволяет изучать интактную структуру в растворе без кристаллизации (РСА) или криофиксации (крио-ЭМ).

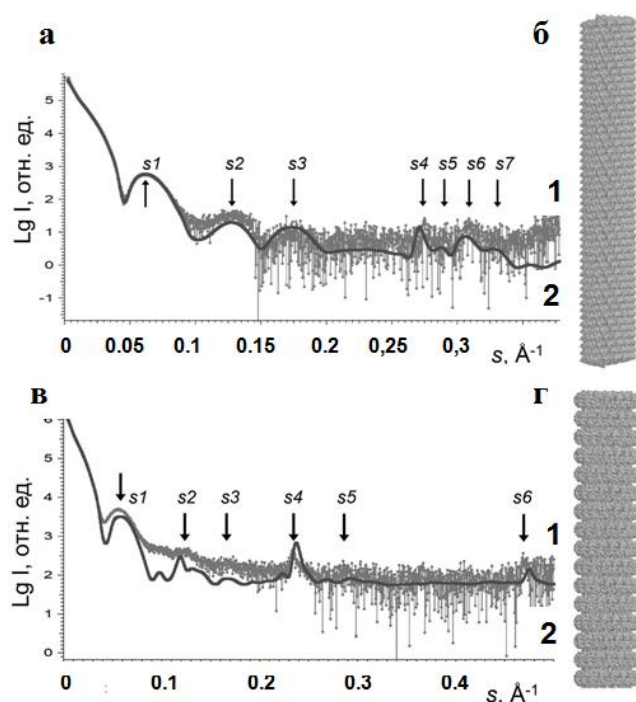


Рисунок 22 – Экспериментальные кривые МУРР вириона (а) и реполимера (в). Модель вириона ВТМ (б) и реполимера $(AA)_{16}$ (г); кривая 1 – экспериментальные данные; кривая 2 – рассеяние, рассчитанное с помощью программы CRY SOL от структур (б, г)

Таким образом, интеграция методов МУРР, тритиевой планиграфии, биоинформатики и моделирования представляет собой эффективную стратегию для всестороннего изучения структуры и динамики нитевидных растительных вирусов, позволяя получать взаимодополняющую информацию на разных уровнях организации.

III. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на значительный прогресс в области вирусологии, молекулярные принципы сборки нитевидных вирусов растений остаются недостаточно изученными как на физическом, так и на биологическом уровнях. Капсидные белки таких вирусов способны формировать глобально стабильные структуры посредством слабых нековалентных взаимодействий, что представляет особый интерес для фундаментальной биологии.

В представленной работе с помощью комплекса современных биофизических, структурных и компьютерных методов проведено фундаментальное исследование структурно-функциональной организации белков оболочки и вирионов ключевых представителей спиральных растительных вирусов – потексвирусов (Х-вирус картофеля, вируса мозаики альтернантеры) и потивируса (А-вирус картофеля). Полученные результаты вносят значительный вклад в понимание взаимосвязи между структурной динамикой, неупорядоченностью полипептидной цепи и функциональными свойствами вирусных частиц.

Одним из достижений работы является доказательство ключевой регуляторной роли природно-неупорядоченных N-концевых доменов в архитектуре и биологической активности вирионов. Для ХВК экспериментально установлено, что его неупорядоченный N-концевой пептид в составе вириона приобретает частично упорядоченную конформацию, выступая в роли межсубъединичного «структурного стабилизатора». Он локализован на поверхности, экранирует специфические участки соседних субъединиц, влияет на термостабильность и упорядоченность вирусных частиц. Это яркий пример того, как неупорядоченный регион приобретает функционально значимую структуру в контексте надмолекулярного комплекса.

Исследование выявило конформационную лабильность капсида ХВК, которая лежит в основе его способности существовать в функционально различных состояниях. Показано, что специфические мутации в N-концевом

пептиде или связывание вирусного белка ТГБ1 с вирионом ХВК вызывают локальные перестройки, которые ослабляют упаковку капсида и делают вирусную РНК доступной для трансляционного аппарата. Это раскрывает молекулярный механизм регуляции инфекционного процесса через структурные изменения БО.

Проведённый сравнительный анализ выявил существенные различия между семействами вирусов. Для потивирусов характерны более протяжённые природно-неупорядоченные N- и С-концевые домены, более сложная сеть межсубъединичных контактов и меньшая термостабильность. У потивирусов (АВК) N-концевой пептид, интегрированный в спиральную упаковку, играет решающую роль в гибкости вириона, критически важную для межклеточного транспорта, его удаление вызывает уменьшение шага спиральной упаковки и уплотнение структуры. В отличие от этого, у потексвирусов (ХВК) N-концевой домен в большей степени отвечает за стабилизацию вириона, при его удалении несколько снижается плотность упаковки белков, что не вызывает столь значительных изменений в параметрах спирали.

Важным результатом работы является демонстрация способности изолированного БО АВК к альтернативной упаковке. Способность белка формировать в различных условиях либо вирусоподобные частицы, либо стабильные овальные промежуточные частицы (на пути сборки ВПЧ), указывает на важную роль ID-доменов не только в поддержании структуры зрелого вириона, но и в процессах его сборки и диссоциации.

Установлено, что контролируемая термическая денатурация вирионов и ВПЧ АВК приводит к образованию стабильных наночастиц с высоким содержанием β -структур. Эти структурно-модифицированные частицы, особенно сферические на основе ВПЧ, открывают новые перспективы для их использования в биотехнологии в качестве платформ для создания биоконъюгатов, иммуногенных препаратов или доставки веществ.

В методологическом аспекте работа подтвердила высокую эффективность использования сравнительно новых методов тритиевой планиграфии для точного картирования поверхности и малоуглового рентгеновского рассеяния при

изучении нативной структуры гибких частиц в растворе. Эти методы доказали свою незаменимость при анализе конформационно-лабильных объектов, недоступных для изучения их классическими методами высокого разрешения.

Таким образом, данная работа вносит существенный вклад в понимание молекулярных принципов организации и динамики спиральных вирусных частиц. Полученные результаты расширяют современные представления в структурной вирусологии, демонстрируя, что неупорядоченные белковые домены являются эволюционно отобранным инструментом для тонкой регуляции стабильности, гибкости, функциональной активности и путей самосборки сложных биологических наноструктур. Полученные данные открывают также новые возможности для целенаправленного дизайна вирусных частиц с заданными свойствами.

Выводы

1. N-концевой пептид белка оболочки (БО) ХВК (а.о. 1–20) локализован на поверхности над остатками: 30–34, 122–129, 143–153, а у АВК (а.о. 1–32) - над остатками: 68–73, 141–146 и 157–180.

2. N-концевые пептиды БО ХВК и АВК являются природно-неупорядоченными и выполняют критически важные и различные функции в структуре вириона.

3. N-концевой пептид (а.о. 1–20) БО ХВК выступает как межсубъединичный стабилизатор, повышающий упорядоченность капсида. Предложена модель, согласно которой N-концевой пептид в составе вириона контактирует с соседними субъединицами, что приводит к повышению структурной упорядоченности частиц ХВК по сравнению с вирусами, БО которых лишён подобного домена (ВМАльт и ХВКАN).

4. N-концевой пептид (а.о. 1–32) БО АВК является главным регулятором гибкости и шага спирали. Его «встроенная» часть определяет шаг спирали (~3.9 нм) и обеспечивает гибкость вириона. Удаление этого пептида приводит к

уплотнению упаковки и уменьшению шага спирали (~3.37 нм), повышению термостабильности и потере гибкости вириона.

5. Выявлена роль N-концевого пептида БО мутанта ХВК (ХВК-ST) в трансляционной активации вирусной РНК. Замена в нем 12 остатков Ser-Thr на Ala-Gly приводит к увеличению гидрофобности пептида, изменению его вторичной структуры и его взаимодействий с соседними субъединицами. Это вызывает снижение плотности упаковки капсида, облегчая доступ рибосом к РНК, что объясняет приобретение мутантом способности к трансляции без фосфорилирования.

6. При связывании транспортного белка ТГБ1 активация трансляции достигается за счет локальных конформационных изменений БО, приводящих к снижению плотности упаковки капсида и ослабляющих связывание РНК с белками капсида.

7. Изолированный БО АВК способен формировать в зависимости от ионной силы и pH раствора либо вирусоподобные частицы, либо стабильные овальные частицы. Предложена гипотеза, согласно которой эти частицы представляют собой промежуточные стадии сборки; при этом, гибкие N- и C- концевые фрагменты белка стабилизируют оба типа частиц.

8. Термическая денатурация выше 55 °C индуцирует в вирионах и ВПЧ АВК необратимую агрегацию, связанную с реорганизацией неупорядоченных областей в межмолекулярные β -структуры и приводит к образованию стабильных структурно-модифицированных частиц (сферических – из ВПЧ, аморфных – из вирионов).

**Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в
диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.10 – Вирусология,
отрасль науки – Биология.**

1. **Ksenofontov** A.L., Petoukhov M.V., Arutyunyan A.M., Oleynikov I.P., Peters G.S., Baratova L.A., Arkhipenko M.V., Nikitin N.A., Karpova O.V., Shtykova E.V. Effect of Mutations in the N-Terminal Peptide of the Coat Protein on the Structure of Potato Virus X According to Small-Angle X-Ray Scattering and Molecular Dynamics // *Biochemistry (Moscow)*. 2026. vol. 91. № 3. pp. 519–530, EDN: GEOWHT, Импакт-фактор 2,2 (JIF), 50%, 0,75 п.л.
2. **Ksenofontov** A.L., Petoukhov M.V., Peters G.S., Arutyunyan A.M., Baratova L.A., Arkhipenko M.V., Nikitin N.A., Karpova O.V., Shtykova E.V. Influence of *in situ* Limited Proteolysis of Potato Virus X on Change in the Structure of Virions According to the Small-Angle X-Ray Scattering Data and Tritium Labeling // *Biochemistry (Moscow)*. 2025. vol. 90. № 3. pp. 413–423. EDN: ZCFWER. Импакт-фактор 2,2 (JIF), 50%, 0,81 п.л.
3. Shtykova E.V., Dubrovin E.V., **Ksenofontov** A.L., Gifer P.K., Petoukhov M.V., Tokhtar V.K., Sapozhnikova I.M., Stavrianidi A.N., Kordyukova L.V., Batishchev O. V. Structural Insights into Plant Viruses Revealed by Small-Angle X-ray Scattering and Atomic Force Microscopy // *Viruses*. 2024. vol. 16. № 3. p. 427. DOI: 10.3390/v16030427, EDN: QOPLSN. Импакт-фактор 4.8 (SJR), 30%, 1,19 п.л.
4. **Ksenofontov** A.L., Petoukhov M.V., Matveev V.V., Fedorova N.V., Semenyuk P.I., Arutyunyan A.M., Manukhova T.I., Evtushenko E.A., Nikitin N.A., Karpova O.V., Shtykova E.V. Effect of the Coat Protein N-Terminal Domain Structure on the Structure and Physicochemical Properties of Virions of Potato Virus X and Alternanthera Mosaic Virus // *Biochemistry (Moscow)*. 2023. vol. 88. № 1. pp. 119–130. EDN: QLPJFL. Импакт-фактор 2,3 (JIF), 50%, 0.69 п.л.
5. **Ksenofontov** A.L., Baratova L.A., Semenyuk P.I., Fedorova N.V., Badun G.A. Changes in the Structure of Potato Virus A Virions After Limited *in situ* Proteolysis According to Tritium Labeling Data and Computer Simulation // *Biochemistry*

(Moscow). 2023. vol. 88. № 12. pp. 2146–2156. EDN: YXVQNY. Импакт-фактор 2,3 (JIF), 60%, 0,75 п.л.

6. Shtykova E.V., Petoukhov M.V., Fedorova N.V., Arutyunyan A.M., Skurat E.V., Kordyukova L.V., Moiseenko A.V., **Ksenofontov A.L.** The Structure of the Potato Virus A Particles Elucidated by Small Angle X-Ray Scattering and Complementary Techniques // Biochemistry (Moscow). 2021. vol. 86. № 2. pp. 230–240. EDN: IIHHBT. Импакт-фактор 2,8 (JIF), 50%, 0,69 п.л.

7. Manukhova T.I., Evtushenko E.A., **Ksenofontov A.L.**, Arutyunyan A.M., Kovalenko A.O., Nikitin N.A., Karpova O.V. Thermal remodelling of Alternanthera mosaic virus virions and virus-like particles into protein spherical particles // PLoS ONE. 2021. vol. 16. № 7. e0255378, DOI: 10.1371/journal.pone.0255378. EDN: MOEJMH. Импакт-фактор 3.7 (JIF), 30%, 0,75 п.л.

8. **Ksenofontov A.L.**, Petukhov M.V., Prusov A.N., Fedorova N.V., Shtykova E.V. Characterization of Tobacco Mosaic Virus Virions and Repolymerized Coat Protein Aggregates in Solution by Small-Angle X-Ray Scattering. // Biochemistry (Moscow). 2020. vol. 85. № 3. pp. 310–317. EDN: COFTNY. Импакт-фактор 2,0 (JIF), 70%, 0,69 п.л.

9. **Ksenofontov A.L.**, Fedorova N.V., Badun G.A., Serebryakova M.V., Nikitin N.A., Evtushenko E.A., Chernysheva M.G., Bogacheva E.N., Dobrov E.N., Baratova L.A., Atabekov J.G., Karpova O.V. Surface characterization of the thermal remodeling helical plant virus // PLoS One. 2019. vol. 14. № 5. e.0216905. DOI: 10.1371/journal.pone.0216905, EDN: WTXYSC. Импакт-фактор 3.7 (JIF), 50%, 0,88 п.л.

10. **Ksenofontov A.L.**, Dobrov E.N., Fedorova N.V., Arutyunyan A.M., Golanikov A.E., Shtykova E.V., Järvekülg L. Structure of Potato Virus a Coat Protein Particles and Their Dissociation // Molecular Biology. 2018. vol. 52. № 6. pp. 913–921. EDN: ZYAVGX. Импакт-фактор 1.2 (JIF), 70%, 0,75 п.л.

11. **Ksenofontov A.L.**, Dobrov E.N., Fedorova N.V., Serebryakova M.V., Prusov A. N., Baratova L.A., Paalme V., Järvekülg L., Shtykova E.V. Isolated Potato Virus A coat

protein possesses unusual properties and forms different short virus-like particles // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2018. vol. 36. № 7. pp. 1728-1738, EDN: XXHLDV. Импакт-фактор 3.31 (JIF), 50%, 0,69 п.л.

12. Semenyuk P.I., Karpova O.V., **Ksenofontov A.L.**, Kalinina N.O., Dobrov E.N., Makarov V.V. Structural Properties of Potexvirus Coat Proteins Detected by Optical Methods // Biochemistry (Moscow). 2016. vol. 81. № 12. pp. 1522–1530. EDN: XZTLZB. Импакт-фактор 1.8 (JIF), 40%, 0,69 п.л.

13. Nikitin N.A., **Ksenofontov A.L.**, Trifonova E.A, Arkhipenko M.V, Petrova E., Kondakova O., Kirpichnikov M., Atabekov J.G, Dobrov E.N, Karpova O.V. Thermal conversion of filamentous potato virus X into spherical particles with different properties from virions // FEBS Letters. 2016. vol. 590. № 10. pp. 1543-1551, EDN: WWGCHF. Импакт-фактор 3.0 (JIF), 40%, 0,56 п.л.

14. **Ksenofontov A.L.**, Parshina E.Y., Fedorova N.V., Arutyunyan A.M., Rumvolt R., Paalme V., Baratova L.A., Järvekülg L., Dobrov E.N. Heating-induced transition of Potyvirus Potato Virus A coat protein into β -structure // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2016. vol. 34. № 2. pp. 250-258, EDN: WPSPLD. Импакт-фактор 3.31(JIF), 60%, 0,5 п.л.

15. **Ksenofontov A.L.**, Paalme V., Arutyunyan A.M., Semenyuk P.I., Fedorova N.V., Rumvolt R., Baratova L.A., Järvekülg L., Dobrov E.N. Partially Disordered Structure in Intravirus Coat Protein of *Potyvirus Potato Virus A* // PLoS One. 2013. vol. 8. № 7. e67830. DOI: 10.1371/journal.pone.0067830, EDN: RFGXXP. Импакт-фактор 2.8 (JIF), 60%, 0,44 п.л.

16. Lukashina E.V., **Ksenofontov A.L.**, Fedorova N.V, Badun G.A, Mukhamedzhanova A.A., Karpova O.V, Rodionova N.P., Baratova L.A, Dobrov E.N. Analysis of the role of the coat protein N-terminal segment in *Potato virus X* virion stability and functional activity // Molecular Plant Pathology. 2012. vol. 13. № 1. pp. 38-45, EDN: UEGQZD. Импакт-фактор 4.1 (JIF), 40%, 0,5 п.л.

17. Bogacheva E.N., Dolgov A.A., Chulichkov A.L., Shishkov A.V., **Ksenofontov A.L.**, Fedorova N.V, Baratova L.A. Tritium Planigraphy: Differences in the Spatial

Structures of the Influenza Virus M1 Protein in Crystal, Solution, and Virion // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2012. vol. 38. № 1. pp. 56–63. EDN: PDPBFP. Импакт-фактор 0.37 (JIF), 30%, 0.5 п.л.

18. Badun G.A., Chernysheva M.G., **Ksenofontov A.L.** Increase in the specific radioactivity of tritium-labeled compounds obtained by tritium thermal activation method // Radiochimica Acta. 2012. vol. 100. № 6. pp. 401-408, EDN: PDRNVP. Импакт-фактор 1.5 (JIF), 25%, 0.5 п.л.

19. Богачева Е.Н., **Ксенофонтов А.Л.**, Долгов А.А., Чуличков А.Л., Шишков А.В., Бадун Г.А., Федорова Н.В., Баратова Л.А. Диагностика неструктурированных участков белков атомарным тритием // Перспективные материалы. 2011. № 10. С. 332-338. EDN: UHSZF. Импакт-фактор 0.51 (РИНЦ), 25%, 0.44 п.л.

20. **Ksenofontov A.L.**, Dobrov E.N., Fedorova N.V., Radyukhin V.A., Arutyunyan A.M., Baratova L.A., Badun G.A., Bogacheva E.N. Intrinsically Unstructured Regions in the C Domain of the Influenza Virus M1 Protein // Molecular Biology. 2011. vol. 45. № 4. pp. 634–640, EDN: OHUTHR. Импакт-фактор 0.42 (JIF), 70%, 0.38 п.л.

21. Lukashina E.V., Badun G.A., Fedorova N.V., **Ksenofontov A.L.**, Nemykh M., Serebryakova M.V., Mukhamedzhanova A.A., Karpova O.V., Rodionova N.P., Baratova L.A., Dobrov E.N. Tritium planigraphy study of structural alterations in the coat protein of Potato virus X induced by binding of its triple gene block 1 protein to virions // FEBS Journal. 2009. vol. 276. № 23. pp. 7006-7015, EDN: MWZPPP. Импакт-фактор 2.2 (JIF), 30%, 0.63 п.л.

22. **Ksenofontov A.L.**, Kozlovsky V.S., Kordyukova L.V., Radyukhin V.A., Timofeeva A.V., Dobrov E.N. Determination of concentration and aggregate size in influenza virus preparations from the true UV absorption spectra // Molecular Biology. 2006. vol. 40. № 1. pp. 152-158, EDN: LJSJTX. Импакт-фактор 0.15 (JIF), 70%, 0.38 п.л.

23. Dobrov E.N., Badun G.A., Lukashina E.V., Fedorova N.V., **Ksenofontov A.L.**, Fedoseev V.M., Baratova L.A. Tritium planigraphy comparative structural study of tobacco mosaic virus and its mutant with altered host specificity // European Journal of

Biochemistry. 2003. vol. 270. № 16. pp. 3300-3308, EDN: LIBEFZ. Импакт-фактор 3.1 (JIF), 35%, 0,56 п.л.

24. Badun G.A., Lukashina E.V., Batuk O.N., **Ksenofontov A.L.**, Fedoseev V.M. Atomic tritium as a surface nanoprobe in a structural investigation of molecular assemblies // Materials Science and Engineering: C. 2003. vol. 23. № 6. pp. 797-802, EDN: LHTXEF. Импакт-фактор 1.24 (JIF), 20%, 0,38 п.л.

25. Lukashina E.V., Badun G.A., **Ksenofontov A.L.**, Baratova L.A., Dobrov E.N., Fedoseev V.M. Determination of Low Activity of Tritium-Labeled Amino Acids Using Simultaneously Flow Scintillation and Amino Acid Analyzers // Radiochemistry. 2002. vol. 44. № 1. pp. 81-85. EDN: ERNBRP. Импакт-фактор 0,9 (JIF), 20%, 0,31 п.л.

26. Lukashina E.V., Badun G.A., Fedoseev V.M., Fedorova N.V., **Ksenofontov A.L.**, Baratova L.A., Dobrov E.N. The Spatial Arrangement of the Wild-Type and Mutant Tobacco Mosaic Virus Coat Proteins Assessed by Tritium Planigraphy // Molecular Biology. 2001. vol. 35. № 3. pp. 426-430. EDN: LGMEAV. Импакт-фактор 0.2 (JIF), 25%, 0,31 п.л.

27. Baratova L.A., Efimov A.V., Dobrov E.N., Fedorova N.V., Hunt R., Badun G. A., **Ksenofontov A.L.**, Torrance L., Järvekülg L. In Situ Spatial Organization of Potato Virus A Coat Protein Subunits as Assessed by Tritium Bombardment // Journal of Virology. 2001. vol. 75. № 20. pp. 9696-9702, EDN: LXMTNB. Импакт-фактор 5.1 (JIF), 20%, 0,44 п.л.