

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ
БИОЛОГИИ ИМЕНИ А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО

На правах рукописи

КСЕНОФОНТОВ Александр Леонидович

**КАПСИДНЫЕ БЕЛКИ НИТЕВИДНЫХ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ:
НЕУПОРЯДОЧЕННЫЕ УЧАСТКИ, ИХ СТРУКТУРА И
ФУНКЦИЯ**

1.5.10 – Вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор химических наук, профессор
Баратова Людмила Алексеевна

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОТЕКСВИРУСОВ.....	16
2. СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ПОТЕКСВИРУСОВ МЕТОДАМИ КРИО- ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ И КРИСТАЛЛОГРАФИИ.	19
2.1. Вирус мозаики папайи.	19
2.2. Вирус мозаики бамбука.	21
2.3. Вирус мозаики пепино.	23
2.4. X–вирус картофеля.	25
3. СБОРКА ПОТЕКСВИРУСОВ <i>in vitro</i>	28
4. МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ РНК ХВК.	30
4.1. Дестабилизация и разборка вирионов ХВК при взаимодействии с ТГБ1 ХВК.	30
4.2. Дестабилизация и разборка ХВК при фосфорилировании БО.	32
5. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОТИВИРУСОВ.....	33
6. СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ПОТИВИРУСОВ МЕТОДАМИ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ.	35
6.1. Вирус полосатой мозаики пшеницы.	35
6.2. Вирус мозаики арбуза.	36
6.3. Y–вирус картофеля. Сравнение с A–вирусом картофеля.	38
6.4. Вирус мозаики турнепса.	43
6.5. Вирус слабой крапчатости батата, род <i>Ipotovirus</i>	44
6.6. Вирус шарки сливы.	45

7. СБОРКА ВИРУСНЫХ И ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ ПОТИВИРУСОВ.....	47
8. МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ БЕЛКОВ ПОТИВИРУСОВ. Наличие неструктурированных областей.....	50
9. НИТЕВИДНЫЕ ФИТОВИРУСЫ КАК ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ВАКЦИНАЦИИ, иммунотерапии и биотехнологических применений.	53
9.1. Потексвирусы.	54
9.2. Потивирусы.	57
10. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ И ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ.	59
11. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ МЕТОДА ТРИТИЕВОЙ ПЛАНИГРАФИИ..	68
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	74
1. Материалы	74
2. Выделение вирусных препаратов и их компонентов	74
3. УФ-спектроскопия	76
4. Определение истинного поглощения светорассеивающих суспензий методом экстраполяции	76
5. Флуоресцентная спектроскопия.....	78
6. Флуоресцентный анализ связывания тиюфлавина T (ТфТ).....	79
7. Спектроскопия кругового дихроизма (КД).	79
7. Аналитическое ультрацентрифугирование (АУЦ)	80
8. Динамическое лазерное светорассеяние	80
9. Дифференциальная сканирующая калориметрия	81
10. Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР)	81
11. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ).	82

12. Электрофоретический анализ белков в денатурирующем полиакриламидном геле.	82
13. Эксперимент и анализ данных МУРР.	83
14. Молекулярная динамика.	84
15. Введение трития.	85
16. Высокоэффективная жидкостная хроматография и аминокислотный анализ.	86
17. Биоинформатический анализ первичной и вторичной структуры БО вирусов растений. Математические расчёты.	88
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	90
1. ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕКСВИРУСА X-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ.....	90
1.1. Поверхностная организация частично развернутых N-концевых участков белка оболочки X-вируса картофеля и их вклад в стабильность вириона	90
1.2. Структурная лабильность малоупорядоченных концевых доменов БО ХВК и её роль в трансляционной активации вирионов ХВК.	101
1.2.1. Структура мутанта ХВК-ST.	101
1.2.2. Структурные перестройки БО ХВК при связывании ТГБ1 с вирионом.	110
2. ИЗУЧЕНИЕ ПОТИВИРУСА А-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ.....	113
2.1. Модель топологии и структуры белка оболочки потивируса АВК по данным тритиевой планиграфии и предсказательных методов.....	113
2.1.1. N-концевая область БО АВК (~50 а.о.) расположена на поверхности вириона.	114
2.1.2. Предсказание вторичной структуры белка и пространственная реконструкция.....	117

2.2. Роль неупорядоченных N-концевых доменов в структурной организации и гибкости вирионов потивируса АВК.	119
2.2.1. БО АВК имеет частично разупорядоченную структуру.....	119
2.2.2. N-концевые пептиды встроены в спиральную упаковку и регулируют гибкость вириона	123
2.3. Локализация N-концевого пептида и структурные перестройки вириона при его удалении по данным тритиевой планиграфии.	136
2.3.1. N- концевые пептиды экранируют поверхность БО вириона. Часть пептида скрыта между витками спирали.	136
2.3.2. Расчёт доступных поверхностей остатков БО в вирионе и в свободном белке на модели УВК.	139
3. СПОСОБНОСТЬ К АЛЬТЕРНАТИВНОЙ УПАКОВКЕ БО АВК <i>in vitro</i> . РОЛЬ НЕУПОРЯДОЧЕННЫХ КОНЦЕВЫХ ДОМЕНОВ.....	144
4. ТЕРМОИНДУЦИРОВАННЫЙ В-ПЕРЕХОД И АГРЕГАЦИЯ БЕЛКА ВИРУСА АВК. РОЛЬ НЕУПОРЯДОЧЕННЫХ УЧАСТКОВ	153
5. АПРОБАЦИЯ МЕТОДА МУРР ДЛЯ СТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА ВИРИОНОВ СПИРАЛЬНОЙ СИММЕТРИИ (на примере ВТМ).	163
Сводные данные экспериментального исследования	167
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	169
ВЫВОДЫ	172
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	179

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Названия вирусов

АВК – А–вирус картофеля (PVA – Potato virus A)
ВАМК – вирус аукубы мозаики картофеля (PAMV – Potato aucuba mosaic virus)
ВМАльт – вирус мозаики альтернантеры (AltMV – Alternanthera mosaic virus)
ВМБ – вирус мозаики бамбука (BMV– Bamboo mosaic virus)
ВМК – вирус мозаики костра (BMV – Brome mosaic virus)
ВМН – вирус мозаики нарцисса (NMV – Narcissus mosaic virus)
ВМЦК – вирус мозаики цветной капусты (CaMV – cauliflower mosaic virus)
ВМП – вирус мозаики папайи (PapMV – Papaya mosaic virus)
ВМПеп – вирус мозаики пепино (PepMV – Pepino mosaic virus)
ВТМ – вирус табачной мозаики (TMV – Tobacco mosaic virus)
ВШМЯ – вирус штриховатой мозаики ячменя
ХВК – Х–вирус картофеля (PVX – Potato virus X)
УВК – У–вирус картофеля (PVY – Potato virus Y)
ТЕV – Вирус табачной полосковой мозаики (TEV – tobacco etch viruses)
ВМА – вирус мозаики арбуза (WMV – Watermelon mosaic virus)
ВМТу – вируса мозаики турнепса (TuMV – Turnip mosaic virus)
ВШС – Вирус оспы (шарки) сливы (PPV– Plum pox virus)
ВСКБ –Вирус слабой крапчатости батата (SPMMV–Sweet potato mild mottle virus)
ВПКБ – Вирус перистой крапчатости батата (SPFMV – Sweet Potato Feathery Mottle Virus)

Другие сокращения

О–GlcNAc – O–linked N–acetylglucosamine (O–N–ацетилглюкозамин)
PBS – фосфатный буфер
pI – изоэлектрическая точка
а.о. – аминокислотный остаток
АСМ – атомно–силовая микроскопия
ББС – бесклеточная белоксинтезирующая система

БО – белок оболочки
БСА – бычий сывороточный альбумин
ВПЧ – вирусоподобная частица
вРНП – вирусный рибонуклеопротеид
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДЛС – динамическое лазерное светорассеяние
ДСН – додецилсульфат натрия
ДТТ – дитиотреитол
ИФА – иммуноферментный анализ
КД – круговой дихроизм
кДа – килодальтон
нм – нанометр
ПААГ – полиакриламидный гель;
ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
РНК – рибонуклеиновая кислота
СЧ – сферическая частица
ТГБ1 – транспортный белок
ТБГ – тройной блок генов
РНП – рибонуклеопротеид
Трис – трис(гидроксиметил)аминометан
CAPS –N-циклогексил- 3-аминопропансульфоная кислота
УФ – ультрафиолет
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние
Крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия

ВВЕДЕНИЕ

Гибкие спиральные вирусы растений представляют собой обширную и экономически значимую группу патогенов, структурное изучение которых долгое время оставалось затруднительным из-за их конформационной лабильности и крупных размеров. Несмотря на недавний прогресс в определении криоэлектронно-микроскопических (крио-ЭМ) структур белков оболочки (БО) представителей родов *Potexvirus* и *Potyvirus*, выявивший консервативную трёх-доменную архитектуру, гибкие N- и C-концевые регионы по-прежнему не поддаются визуализации. Эти неструктурированные домены, однако, играют критическую роль в жизненном цикле вируса, обеспечивая структурную пластичность, необходимую для проникновения в клетку, сборку и разборку вирионов, системное движение, регуляцию вирусной репликации и трансляции. В частности, N-концевой домен БО потексвирусов выступает ключевым регулятором трансляционной активности вирусной РНК, где даже точечные замены гидроксилсодержащих аминокислот могут существенно влиять на функциональность белка. Для преодоления методических сложностей, связанных с высокой гибкостью и размерами этих вирусов, в представленной работе был использован комплексный подход, включающий метод тритиевой планиграфии, позволяющий с высокой чувствительностью регистрировать конформационные изменения и картировать поверхностно-локализованные участки в надмолекулярных комплексах, а также метод синхротронного малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), обеспечивающий анализ структурной организации объекта в надатомном масштабе в условиях, близких к физиологическим. Эти методы были использованы при изучении структурных особенностей вирионов и вирусоподобных частиц (ВПЧ) на разных стадиях патогенеза, механизмов их сборки и функциональной роли неупорядоченных регионов БО.

Практическая значимость работы обусловлена также перспективой использования гибких вирионов и их модифицированных форм в качестве

платформ для нанотехнологических применений, благодаря их неинфекционности, стабильности, регулярной организации эпитопов и выраженным адъювантным свойствам. В связи с этим, целью исследования являлось всестороннее изучение структуры и свойств нитевидных растительных вирусов, функциональной роли неупорядоченных доменов их БО, а также топографии поверхности вирусных частиц, в частности, в качестве платформы для направленного присоединения биологически активных групп к их поверхности.

В работе были поставлены и решены следующие задачи:

1. Определить локализацию N-концевого фрагмента белка оболочки потексвируса X вируса картофеля (ХВК). В рамках этой задачи изучить по данным тритиевого мечения различия в организации капсидов ХВК и его *in situ* гидролизованной формы, лишенной 19/21 аминокислотных остатков (а.о.) с N-конца (ХКВΔN).
2. Локализовать структурные изменения в белке оболочки транслируемого ST-мутанта ХВК, в 20-аминокислотном N-концевом пептиде которого все остатки серина и треонина заменены на остатки глицина и аланина в сравнении с диким типом вириона.
3. Исследовать структурные изменения в белке оболочки ХВК, вызываемые связыванием транспортного белка ТГБ1 с вирионом, приводящим к включению системы активации трансляции вириона.
4. Провести сравнительные структурные исследования и моделирование структур низкого разрешения двух нитевидных растительных вирусов: ХВК и вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт) методом малоуглового рентгеновского рассеяния и оптическими методами.
5. Провести модельные предсказания пространственной организации белка оболочки потивируса А-вируса картофеля (АВК) на основании данных *in situ* стерической доступности белка атомам трития (метод тритиевой планиграфии) и предсказательным методам топологии элементов вторичной структуры белка.

6. Исследовать свойства и структуру вирионов АВК и вирусоподобных частиц из белка оболочки. В рамках этой задачи:

– исследовать условия образования вирусоподобных частиц белком оболочки АВК при различных рН раствора, а также их структуру и возможность диссоциации.

– с помощью ряда физико–химических подходов и компьютерного прогнозирования определить развернутые ID–области (intrinsically disordered) в белке оболочки.

7. Изучить структуру и свойства вирионов АВК и их усечённой формы (АВКΔ32) в растворе, а также определить локализацию и структурную роль N-концевого участка БО. В рамках этой задачи методом МУРР исследовать строение и динамику частиц в нативных условиях. Данные тритиевого мечения и компьютерного моделирования использовать для картирования N-концевого участка БО и сравнительного анализа структурных различий между интактными вирионами и подвергнутыми *in situ* протеолизу.

8. Охарактеризовать данные термической перестройки белка оболочки АВК в вирионах и ВПЧ, ведущие к формированию β- и кросс-β-структур, с целью создания новых структурно-модифицированных наночастиц (СЧ).

В ходе выполнения работы были поставлены и решены две методические задачи:

1. Адаптация метода тритиевой планиграфии (Государственная 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 меченых тритием аминокислот в элюате с хроматографических колонок аминокислотного анализатора L8800 (Hitachi, Japan) с помощью проточного счетчика Radiomatic 150TR Flow Scintillation Analyzer (Packard, USA).

2. Разработка комплексного подхода уникальных по своим возможностям методов для изучения нитевидных растительных вирусов, комбинирующего малоугловое рассеяние рентгеновских лучей (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 данной работе получены фундаментальные результаты, раскрывающие ранее неизвестные аспекты структурной организации ключевых представителей гибких спиральных вирусов растений – потексвируса ХВК и потивируса АВК. Научная новизна исследования заключается в комплексном определении структуры, физико-химических свойств и вариабельности вирионов под воздействием различных факторов, в первую очередь обусловленных изменениями в N-концевых сегментах их белков оболочки (БО).

Определены точные структурные параметры вирионов ХВК, его *in situ* гидролизованной формы (без 19/21 а.о. с N-конца -ХКВΔN) и ВМАльт в растворе методом малоуглового рентгеновского рассеяния. Комбинация этих данных с результатами тритиевой планиграфии и атомарной моделью (PDB ID: 6R7G) позволила разрешить многолетнюю дискуссию, однозначно доказав поверхностную локализацию N-концевого пептида в вирионе ХВК. Было установлено, что этот пептид стабилизирует структуру, располагаясь над определёнными остатками (122–129 и 143–153) соседних субъединиц, а его удаление приводит к снижению упорядоченности капсида.

Впервые было показано, что вирион ХВК обладает структурной лабильностью, позволяя существование вириона в трёх функционально различных состояниях (нативный, ST-мутант, комплекс с ТГБ1), что было доказано специфическими изменениями топографии поверхности БО, зафиксированными методом тритиевой планиграфии. Эти состояния соответствуют трансляционно-неактивной форме и двум путям её активации (Atabekov et al., 2007; Atabekov et al., 2001; Atabekov et al., 2000; Rodionova et al., 2003; Козловский С.В., 2003)

Для потивирусов экспериментально доказано, что белок оболочки АВК принадлежит к классу природно-неупорядоченных (intrinsically disordered – ID) белков. Методами МУРР, электронной микроскопии и компьютерного моделирования впервые определены структуры низкого разрешения как интактного вириона АВК, так и его формы, лишённой 32 N-концевых аминокислот (АВКΔ32). Установлена ключевая роль частично разупорядоченного N-концевого пептида. Его выступающая часть экранирует специфические остатки на поверхности, а встроенный сегмент (а.о. 16–26) определяет шаг спирали (~3,9 нм) и обеспечивает критически важную гибкость вириона. Удаление этого пептида приводит к структурному «переходу»: шаг спирали уменьшается (~3,37 нм), упаковка уплотняется, а гибкие нити превращаются в жёсткие палочки, что приводит к увеличению термостабильности вириона.

Впервые обнаружено, что изолированный БО АВК способен в зависимости от условий среды формировать либо вирусоподобные частицы, либо стабильные овальные ассоциаты, являющиеся, как мы полагаем, промежуточными формами сборки. Показано, что контролируемая термическая обработка вирионов и ВПЧ АВК индуцирует образование наночастиц нового типа с высоким содержанием β-структур.

Теоретическая значимость работы заключается в получении ранее не известных структурных и связанных с ними функциональных характеристик всех изученных в данной работе вирусов. Полученные данные позволяют говорить о структурной лабильности вириона как ключевого функционально значимого свойства, напрямую связанного с регуляцией инфекционного процесса (активация трансляции) и функцией внутриклеточного и межклеточного перемещения. В работе доказано принципиальное различие в роли N-концевых доменов у потекс- и потивирусов: у первых он выступает в роли стабилизатора, у вторых – основного регулятора гибкости. Полученные закономерности с достаточной степенью уверенности можно применять и к другим потекс- и потивирусам.

Кроме того, исследование демонстрирует эффективность комплексного подхода, интегрирующего данные МУРР, тритиевой планиграфии, биоинформатики и моделирования, для изучения конформационно-лабильных биологических наноструктур, что является вкладом в методологию структурной биологии.

Практическая значимость исследования определяется двумя основными направлениями. Во-первых, полученные результаты закладывают молекулярную основу для разработки новых стратегий защиты растений. Понимание того, что N-концевые домены служат мишенями для переключения вириона между состояниями, открывает путь к созданию соединений, блокирующих активацию трансляции или межклеточный транспорт. Во-вторых, выявленные структурные качества вирионов (лабильность, управляемая сборка, термоиндуцированный переход) открывают широкие возможности для биотехнологического применения. Вирусные частицы и их модифицированные формы, особенно сферические наночастицы на основе ВПЧ АВК, представляют собой перспективные, безопасные и контролируемо модифицируемые платформы для создания вакцинных конструкций, систем доставки веществ и новых биоматериалов.

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.

Методология диссертационного исследования

Работа выполнена с использованием современного оборудования и комплексных методов исследования (вирусологических, молекулярно–биологических, физико–химических).

Степень достоверности результатов и апробация результатов

В работе использованы современные приборы и методики измерений, а также современные методы статистического анализа. Все результаты, представленные в работе, статистически достоверны и воспроизводимы.

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

“SAIILC”, 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 «МССМВ'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.

Основные публикации диссертационной работы отражены в печати, в том числе, в 27 статьях в рецензируемых научных журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.10 – Вирусология. Материалы диссертации были представлены в 20 международных конференциях.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОТЕКСВИРУСОВ

Потексвирусы (род *Potexvirus*, семейство *Alphaflexiviridae*) – одна из наиболее изученных групп нитевидных РНК–содержащих вирусов растений (Adams et al., 2004). Несмотря на более чем 50–летнюю историю исследований, их структура остается недостаточно изученной стандартными методами (ЯМР, рентгеновская дифракция, крио–ЭМ) из–за технических сложностей, связанных с гибкой спиральной морфологией вирионов. Тонкости структурной организации вирионов и свободного белка оболочки (БО) все еще остаются не до конца изученными.

Вирионы потексвирусов имеют длину 470–580 нм и диаметр около 13 нм, с шагом спирали 3,3–3,6 нм. Каждый виток спирали содержит около 9 субъединиц белка оболочки (БО), взаимодействующих с 5 нуклеотидами РНК (Tollin P., 1988). Вирионы содержат ~6% РНК и 94% БО, с молекулярной массой РНК $2,1\text{--}2,4 \times 10^6$ Да. Геном представлен одноцепочечной (+) РНК (матрица для трансляции) с кэп–структурой на 5'–конце и поли–А–последовательностью на 3'–конце, кодирующей пять белков: репликазу (150–170 кД), три транспортных белка (25, 12 и 8 кД) и БО (22–25 кД). Особенностью потексвирусов является наличие тройного блока генов (ТБГ), кодирующего транспортные белки, необходимые для межклеточного перемещения вируса. ТБГ1 обладает РНК–связывающей активностью и взаимодействует с плазмодесмами (Kalinina et al., 1996), тогда как ТБГ2/ТБГ3 обеспечивают его доставку к клеточной стенке (Morozov & Solovyev, 2003; Zamyatnin et al., 2006).

Типичные представители – Х–вирус картофеля (ХВК), вирус мозаики папайи (ВМП) и вирус мозаики нарциссов (ВМН) различаются по длине частиц (515–550 нм) и массе БО (22–25 кД). Несмотря на низкую стабильность вирионов, они накапливаются в растениях в больших количествах (до 1,5 г/кг), уступая лишь вирусу табачной мозаики (ВТМ).

Особенностью БО ХВК является его аномально низкая подвижность при ДСН–ПААГ электрофорезе: хотя расчетная молекулярная масса составляет 25 кДа (236 а.о.), экспериментальные значения варьировали от 26,4 кДа до 31,5 кДа (Гольдштейн М.И., 1990). Koenig связала эту аномалию с N–концевым доменом, богатым серином и треонином, которые слабо связывает ДСН (Koenig, 1972).

БО ХВК демонстрирует ступенчатое протеолитическое расщепление при выделении и хранении, образуя дискретные формы с уменьшающейся молекулярной массой. Впервые это явление было описано в работе Koenig с соавторами, которые наблюдали образование "легких" форм Pf (fast) при инкубации вируса в растительном соке или с трипсином. Эти формы, образующиеся за счет отщепления N–концевых фрагментов (~20 остатков), проявляли нормальную электрофоретическую подвижность (Koenig et al., 1970). Биологическая значимость этого явления до конца ещё не выяснена. Показано, что укороченные Pf–формы проявляли сниженную инфекционность и способность к самосборке (Гольдштейн М.И., 1990).

Гидродинамические исследования также выявили необычные свойства свободного БО ХВК: БО демонстрирует концентрационно–зависимую седиментацию ($S_{20,w} = 2,5S$ при 0,3 мг/мл) и аномальное поведение при гель–фильтрации (радиус Стокса 32,7 Å) (Goodman, 1975). Эти аномалии могут быть объяснены развернутой конформацией БО в растворе и/или склонностью к димеризации (Goodman, 1975).

Многочисленные исследования структурной организации ХВК выявили четкую функциональную специализацию различных доменов БО. N–концевой участок БО ХВК, экспонированный на поверхности вирусных частиц (Baratova et al., 1992), играет ключевую роль в формировании иммунодоминантных эпитопов (Koenig, 1978), в то время как C–концевой домен располагается внутри вириона. Особый интерес представляет способность N–концевого домена формировать гидратную оболочку вокруг вирусной частицы, что обусловлено уникальными химическими свойствами этого участка: высоким содержанием гидроксильрованных аминокислот и наличием углеводных остатков (Baratova et

al., 2004). Эти структурные особенности согласуются с общебиологическими принципами гидратации белков, где связанные молекулы воды критически важны для поддержания нативной конформации, стабильности и функциональной активности белков (Gerken et al., 1989). Полученные данные позволяют предположить, что специфическая гидратация N-концевого домена БО ХВК может играть существенную роль в процессе самосборки вириона и поддержании его структурной целостности.

Вирионы ХВК демонстрируют значительную конформационную «лабильность». Инкубация вирионов ХВК при -20°C в Tris-HCl буфере (pH 7,5) резко снижает их стабильность, вероятно, из-за структурных изменений БО (Nemykh et al., 2007). Для потексвирусов обнаружен необычный механизм трансляции вирусной РНК. В отличие от ВТМ, ХВК использует два альтернативных механизма: (1) ремоделирование – связывание транспортного белка ТГБ1 с 5'-концом РНК, что снижает стабильность вириона и позволяет его разборку при трансляции; (2) фосфорилирование N-конца БО – активирует котрансляционную разборку без существенного изменения стабильности.

Гибкая нитевидная структура спиральных вирусов растений препятствует их кристаллизации, что делает классический рентгеноструктурный анализ (РСА) практически неприменимым (Stubbs et al., 1977). Для палочковидных вирусов, таких как тобамовирусы, удалось получить ориентированные нити, что позволило определить структуру ВТМ с разрешением $2,9\text{ \AA}$ (Namba et al., 1989). Ключевую роль в этом сыграли данные РСА кристаллов парных дисков БО ВТМ (Bloomer et al., 1978), а также метод молекулярного замещения, примененный для изучения родственных штаммов (Stubbs, 1999).

Для потексвирусов достичь этим методом разрешения $3\text{--}5\text{ \AA}$ не удавалось, поскольку их вирионы не формируют достаточно ориентированных нитей. В лаборатория Stubbs безуспешно пыталась решить эту проблему для X-вируса картофеля (Parker et al., 2002). В 2002 году удалось улучшить ориентацию нитей ХВК, что подтвердило наличие глубоких ($20\text{ \AA}$) продольных борозд на поверхности вирионов, способствующих их гибкости (Parker et al., 2002). Анализ

дифракции показал 8,9 субъединиц БО на виток, что согласовывалось с более ранними данными (Richardson et al., 1981).

В статье Kendall (2013) была сделана попытка выполнить структурный анализ трех гибких вирусов растений, представителей рода *Potexvirus* – ХВК, ВМН и ВМП (Kendall et al., 2013). Авторы провели комплексное исследование симметрии и низко разрешенной структуры этих вирусов. Используя методы рентгеновской дифракции на нитях, сканирующей трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ) и крио–ЭМ, ученые определили, что все три вируса имеют схожую структуру и примерно одинаковую симметрию, близкую к девяти субъединицам (примерно 8,7–8,8) на оборот вирусной спирали. РНК располагается на глубине ~ 25 Å (у ВМН) от оси вириона. Диаметры частиц для ХВК и ВМН составили около 130 Å, в то время как для ВМП – около 120 Å. Номинальное разрешение составило 21 Å для ХВК, 16 Å для ВМН и 16 Å для ВМП. Внутренняя структура вирусов характеризовалась крупным доменом, занимающим внешнюю сторону вирусной частицы, и меньшим внутренним доменом, включающим сайт связывания РНК.

2. СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ПОТЕКСВИРУСОВ МЕТОДАМИ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ И РЕНТГЕНОВСКОЙ КРИСТАЛЛОГРАФИИ.

2.1. Вирус мозаики папайи.

Первый случай анализа структуры гибких вирусов растений высокого разрешения представлен в пионерской работе Yang (Yang et al., 2012). Авторы использовали методы рентгеновской кристаллографии и крио–ЭМ для определения структуры БО ВМП. Структура закристаллизованного фрагмента БО ВМП (остатки 6–175) определена с разрешением 2,7 Å. Белок состоит из семи α -спиралей, что отличает его от классического четырёх-спирального пучка, характерного для жёстких вирусов, таких как ВТМ. БО кристаллизовался в виде

асимметричного димера, где один мономер взаимодействует с другим через N-концевой пептид (остатки 11–26), образуя гидрофобные контакты.

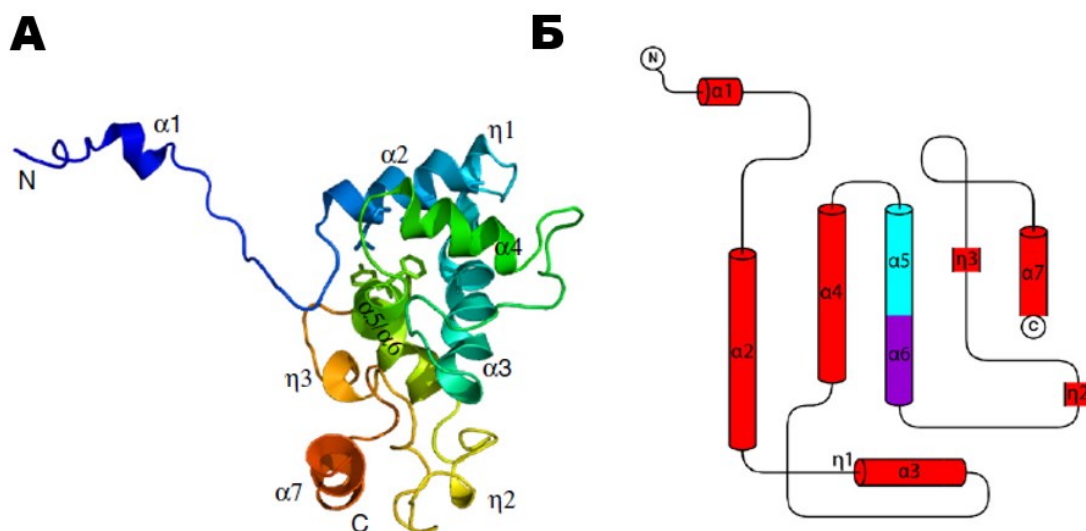


Рис. 1. Структура мономера БО ВМПан. (А) Молекула БО показана ленточной моделью. Структура окрашена в радужной гамме от синего цвета на N-конце до красного. (Б) Топология семи α -спиралей БО ВМП (Yang et al., 2012).

Отмечена особая роль остатка Phe13, который глубоко погружался в гидрофобный карман соседнего мономера, что критически важно для полимеризации белка. Предложен механизм "N-концевого петлевого обмена" (swapping), объясняющий гибкость ВМП. В отличие от ВТМ, где жёсткость обеспечивается плотными взаимодействиями между спиральными доменами, гибкость ВМП обусловлена динамичным N-концевым пептидом, который связывает соседние субъединицы через гибкий шарнирный участок. Исследование интактного вируса методом крио-ЭМ позволило определить его морфологию: диаметр ~ 135 Å и спиральную симметрию с ~ 10 субъединицами на виток. Несмотря на низкое разрешение реконструкции (21 Å), кристаллическая структура БО была успешно помещена в карту плотности методом докинга, подтвердив, что N-концевой пептид экспонирован на поверхности вириона, а С-концевая область и РНК расположены внутри.

2.2. Вирус мозаики бамбука.

В исследовании DiMaio (DiMaio et al., 2015) представлен детальный анализ молекулярной структуры филаментозных вирусов растений на примере вируса мозаики бамбука (ВМБ). Авторы использовали крио-ЭМ для определения структуры вириона с разрешением 5,6 Å, что позволило выявить ключевые особенности организации этих патогенов. Вирусная частица ВМБ формирует левозакрученную спираль диаметром около 130 Å с центральным каналом 30 Å. Каждый вирион содержит приблизительно 1300 копий БО, которые защищают геномную РНК длиной 6,4 тыс. нуклеотидов. БО ВМБ демонстрирует консервативную α -спиральную структуру, аналогичную ранее описанной для БО ВМП (Yang et al., 2012). БО состоит из трех основных элементов: консервативного α -спирального ядра (аминокислотные остатки 26–179), N-концевого домена (1–25) и C-концевого расширения (180–215). Гибкость вирусной частицы обеспечивается подвижными N- и C-концевыми доменами БО, которые образуют динамичные межсубъединичные контакты и позволяют относительное смещение соседних белковых единиц. N-концевой домен участвует в латеральных гидрофобных взаимодействиях, причем остаток Trp41 играет критическую роль в этом процессе. Мутации в этом положении полностью нарушают сборку вириона. C-концевой регион отвечает за продольные связи вдоль оси вириона. Каждая субъединица БО связывает три нуклеотида геномной РНК. С фосфатным остовом РНК взаимодействуют положительно заряженные остатки а.о. (Lys97, Arg124), обеспечивая стабильность комплекса. N-конец каждой субъединицы огибает субъединицу $i-1$, образуя короткую спираль, которая укладывается в гидрофобную щель на поверхности, при этом остаток Phe45 погружен в небольшой поверхностный «карман», а остатки Trp41 и Trp68 образуют ароматическое стэкинг-взаимодействие. Первые 38 N-концевых остатков в модели неупорядоченные; это подтверждается поразительным сходством между реконструкциями БО вируса дикого типа и мутанта без 35 N-концевых остатков. C-конец (Рис. 2) проходит через сердцевину капсида, следуя вдоль канала, и формирует контакты

с тремя субъединицами в витке выше ($i+7$, $i+8$ и $i+9$), после чего направляется к центру вириона, где крайние С-концевые остатки взаимодействуют с субъединицей $i-7$ в витке ниже. Эта переплетённая структура гибкого вируса резко контрастирует с компактной архитектурой ВТМ. Субъединица белка ВТМ по размеру схожа с таковой у ВМБ (158 а.о. против 204 у ВМБ, если не учитывать 38 N-концевых остатков), но имеет меньшую доступную поверхность – $8787 \text{ \AA}^2$ на субъединицу против $12922 \text{ \AA}^2$ у ВМБ ($8075 \text{ \AA}^2$ без учёта протяжённых концевых участков). Однако ВТМ формирует значительно более обширные контакты между соседними субъединицами – $4499 \text{ \AA}^2$ (около 51%) поверхности участвует в межсубъединичных взаимодействиях. Компактное ядро ВМБ образует меньше межсубъединичных контактов площадью $1806 \text{ \AA}^2$ (22%). При включении в расчёт N- и С-концевых участков, соединённых с ядром субъединицы гибкими линкерами, площадь контактирующей поверхности увеличивается до $5752 \text{ \AA}^2$ (45%), что сопоставимо с ВТМ. Вероятно, именно такая архитектура позволяет гибким нитевидным вирусам поддерживать многочисленные нековалентные взаимодействия с окружающими субъединицами при механических деформациях структуры.

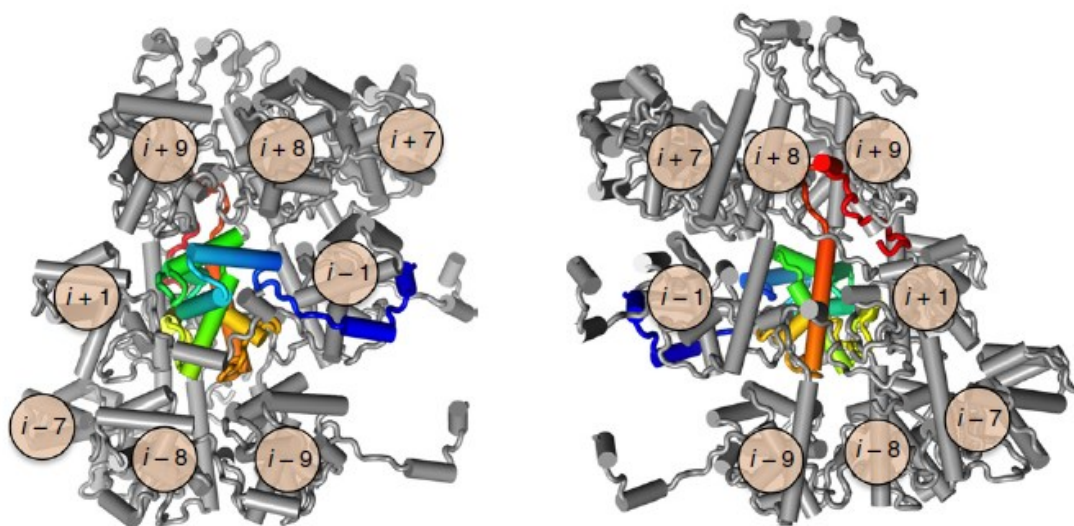


Рис.2. Схематическое изображение, демонстрирующее высокую степень структурной взаимосвязанности БО вируса ВМБ. Белок окрашен градиентом от синего (N-конец) до красного (С-конец). (слева) Вид снаружи: N-конец белка оборачивается вокруг субъединицы $i - 1$, помещая короткую α -спираль в

гидрофобную бороздку на поверхности белка. (справа) Вид изнутри: С–конец взаимодействует с тремя субъединицами из витка спирали выше, а затем завершается контактом с субъединицей из витка ниже (DiMaio et al., 2015).

2.3. Вирус мозаики пепино.

В исследовании Agirrezabala (Agirrezabala et al., 2015) методом крио–ЭМ была определена структура вируса мозаики пепино (ВМПеп) с разрешением 3,9 Å. Анализ выявил, что БО этого вируса обладает трёхдоменной организацией, включающей: (1) консервативное α–спиральное ядро, (2) высокоподвижный N–концевой участок (остатки 1–20), который не удалось визуализировать из–за структурной динамичности, и (3) С–концевую петлю. Каждая субъединица БО специфически связывает 5 нуклеотидов вирусной РНК, которая располагается в положительно заряженном желобке между соседними молекулами БО. Ключевые аминокислотные остатки (S92, S94, Q203, R124, D163, K196) формируют карман для взаимодействия с фосфатным остовом и основаниями РНК, причём мутации в этих позициях приводят к нарушению процессов сборки вирионов и их межклеточного транспорта. Механизм сборки вирусных частиц ВМПеп основан на динамических взаимодействиях концевых доменов БО. N–концевая петля, содержащая критически важный остаток F28, встраивается в гидрофобный карман соседней субъединицы, обеспечивая формирование боковых контактов. Параллельно С–концевая область участвует в создании внутренней стенки вириона и стабилизации продольных взаимодействий между субъединицами. Эксперименты с мутантом F28A продемонстрировали, что, хотя данная мутация нарушает процесс сборки полноценных вирионов, она не влияет на межклеточное движение вируса. Этот факт подтверждает гипотезу о том, что транспорт ВМПеп в растении может осуществляться в форме рибонуклеопротеинового комплекса (РНП), а не полностью собранных вирусных частиц.

В этом исследовании было сделано неожиданное открытие: БО вириона ВМПеп, относящегося к роду *Potexvirus*, демонстрирует удивительное

структурное сходство с РНП флебовирусов (семейство Bunyaviridae), таких как вирус лихорадки долины Рифт. Это сходство свидетельствует о возможном горизонтальном переносе генов между эволюционно далекими группами вирусов. Оба белка обладают α -спиральной архитектурой с RMSD для C α -атомов 1,5 Å для консервативных участков (остатки 21–205 БО ВМПеп и остатки 2–181 РНП флебовируса) и содержат N-концевой "рычаг", участвующий в олигомеризации. Механизм полимеризации также оказался схожим: в обоих случаях N-концевой участок (включая F28 у ВМПеп) встраивается в гидрофобный карман соседней субъединицы. При этом оба белка имеют электростатически положительный желобок для связывания РНК, хотя и с разной специфичностью (5 нуклеотидов у ВМПеп против 7 у флебовирусов). Однако были обнаружены и ключевые различия. С-концевая область у ВМПеп участвует в формировании внутренней стенки вириона, обеспечивая гибкость структуры, тогда как у флебовирусов она загибается обратно в ядро белка.

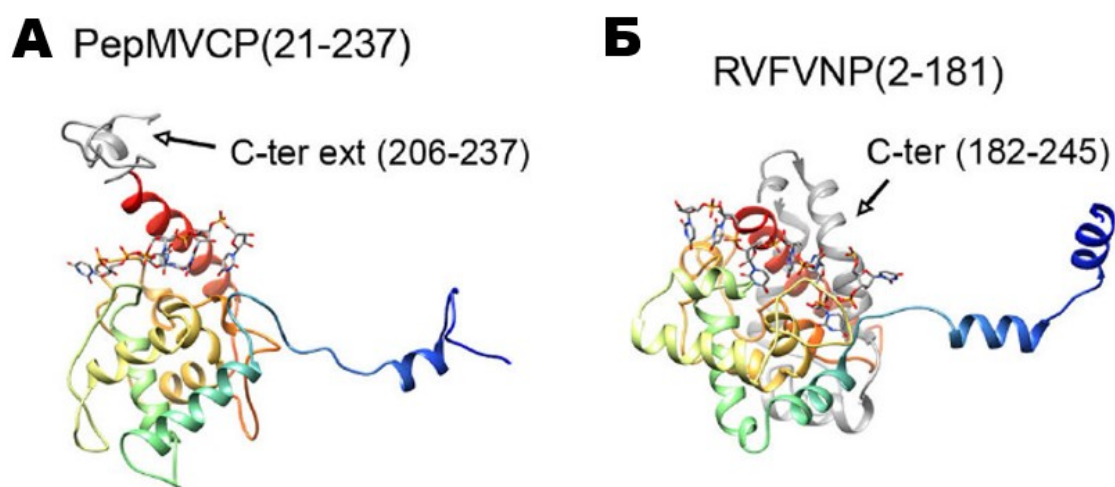


Рис. 3. Структурная гомология между БО ВМПеп (А) и РНП флебовируса (Б). Атомные структуры смоделированного БО ВМПеп и РНП вируса лихорадки долины Рифт (RVFV, код PDB 4H5O (Raymond et al., 2012) показаны в схожих ориентациях. На изображениях представлены соответствующие одноцепочечные РНК. Оба белка окрашены в радужной гамме, С-концы показаны серым цветом для сравнения (Agirrezabala et al., 2015).

Это может объяснять разницу в организации частиц: ВМПеп образует филаментозные вирионы, а флебовирусы – оболочечные частицы с рыхлыми РНП. Обнаруженная гомология между белками вирусов растений и животных (имеющих разную геномную организацию (ВМПеп – (+) ssRNA, флебовирусы – (–) ssRNA) предполагает либо горизонтальный перенос генов через общего переносчика (например, членистоногих), либо конвергентную эволюцию под давлением сходных функциональных требований.

2.4. X-вирус картофеля.

В статье Grinzato (Grinzato et al., 2020) представлены результаты крио–ЭМ с разрешением 2,2 Å, позволившие впервые определить атомную структуру X-вируса картофеля, представителя того же рода *Potexvirus*, имеющего важное значение как патогена сельскохозяйственных культур. Авторам удалось визуализировать не только структуру белка оболочки, но и детали упаковки геномной РНК, а также многочисленные белок – белковые и белок – РНК взаимодействия, стабилизирующие вирион. БО ХВК демонстрирует характерную для потексвирусов трехдоменную организацию: N-концевой домен (остатки 29–50), центральный домен (51–185) и C-концевой домен (186–237). Особый интерес представляет N-концевой регион, который, несмотря на свою гибкость и отсутствие в крио–ЭМ карте, играет критическую роль в стабилизации вириона через взаимодействия между соседними субъединицами. Центральный домен содержит шесть α -спиралей и формирует основную структуру капсида, в то время как C-концевой домен участвует в создании внутреннего туннеля вириона диаметром около 16 Å.

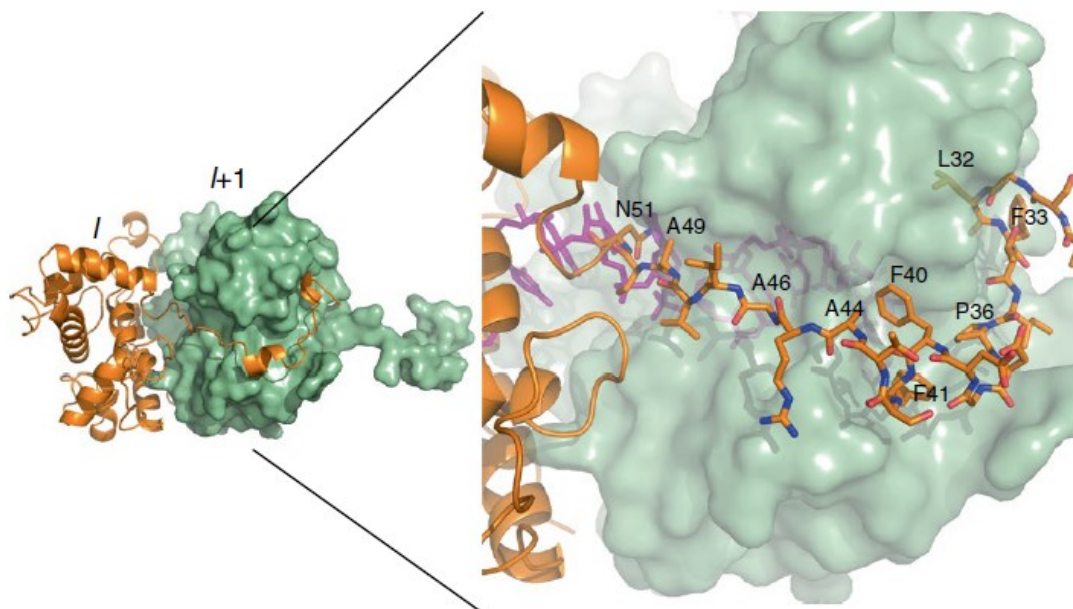


Рис. 4. Взаимодействия между субъединицами БО. Слева – вид на N–конец субъединицы i (оранжевый), демонстрирующий её обвитие вокруг основного домена субъединицы $i+1$. Справа – все остатки N–конца показаны в явном виде. Аминокислота N51 взаимодействует с цепью РНК на заднем плане (пурпурная) (Grinzato et al., 2020).

Одним из наиболее значимых достижений работы стало определение точного механизма упаковки геномной РНК. Сборка вириона ХВК представляет собой сложный кооперативный процесс, инициируемый специфическим взаимодействием между БО и геномной РНК. Ключевым стартовым элементом служит 5'–стеблевая петля (5'SL1) РНК, которая выступает в качестве сайта начала сборки (origin of assembly). Первый критический шаг включает образование водородной связи между остатком Asn51 БО и O2'–гидроксилом рибозы первого нуклеотида (j) в пентамерном мотиве РНК. Это взаимодействие обеспечивает правильное позиционирование РНК относительно белкового каркаса. По мере прогрессирования сборки N–концевой домен БО (остатки 29–50) играет ключевую роль в стабилизации формирующейся структуры. Его гидрофобные остатки (Leu32, Phe40, Pro36) образуют прочные взаимодействия с соседними субъединицами, в частности создавая кластер между Phe40 БО и Trp81 соседней молекулы. Одновременно с этим консервативный остаток Arg124

БО фиксирует фосфатный остов РНК, образуя водородные связи с нуклеотидами $j+3$ и $j+4$, что обеспечивает стабильность упаковки генетического материала. Интересно, что каждый пентамерный повтор РНК демонстрирует уникальную конформацию: первые четыре нуклеотида сохраняют классическую А-форму, тогда как пятый развернут на 90° , что позволяет РНК плавно следовать по спиральной щели, образованной доменами II и III БО. Этот структурный мотив повторяется вдоль всей длины вириона, причем неинкапсидированная часть РНК служит направляющей для последовательного присоединения новых субъединиц. По завершении сборки вирион приобретает характерную левозакрученную спиральную организацию с шагом $35,2 \text{ \AA}$ и диаметром около $130 \text{ \AA}$, где С-домен БО формирует внутренний туннель диаметром $16 \text{ \AA}$ с чередующимися положительными и отрицательными зарядами на стенках, что обеспечивает дополнительную электростатическую стабилизацию. Ключевые остатки БО, такие как Asn51, Arg124 и Asp163, образуют специфические взаимодействия с сахаро-фосфатным остовом РНК, обеспечивая стабильность упаковки. Особенно важно взаимодействие Arg124, который стабилизирует конформацию фосфатного остова через водородные связи с нуклеотидами $j+3$ и $j+4$. Мутации этих остатков нарушают сборку вириона. Важно отметить, что сборка абсолютно зависит от присутствия РНК – *in vitro* БО не способен к самостоятельной олигомеризации без нуклеиновой кислоты.

Авторы подчёркивают, что практическая значимость работы определяется возможностью применения полученных структурных данных в двух ключевых областях: разработке противовирусных стратегий, направленных на дестабилизацию критических белок-РНК взаимодействий, и создании биотехнологических платформ на основе ХВК. В частности, атомная структура позволяет точно определять сайты для вставки гетерологичных пептидов без нарушения сборки вириона, что важно для разработки вирусных вакцин.

3. СБОРКА ПОТЕКСВИРУСОВ *in vitro*.

Вирусы обладают уникальной способностью к самосборке *in vitro*. Х-вирус картофеля стал первым нитевидным вирусом растений, реконструированным *in vitro* из РНК и белка оболочки (Goodman, 1975; Новиков В.К., 1972; Kaftanova et al., 1975). Оптимальные условия сборки включали pH 6,5–7,0, температуру 20–25°C и низкую ионную силу (0,01 М), обеспечивая выход реконструированных частиц 40 – 60%. Повышение ионной силы до 0,1 М NaCl полностью ингибировало процесс (Новиков В.К., 1972). Электронно-микроскопические исследования выявили, что реконструированные частицы имели более рыхлую структуру по сравнению с нативными вирионами, хотя в некоторых работах различий не наблюдалось (Kaftanova et al., 1975). Инфекционность реконструированных частиц может достигать уровня интактных вирусов, как показали исследования с использованием ингибиторов РНКаз (Atabekov et al., 2007). Для вируса мозаики папайи оптимальные условия сборки отличались (pH 8,0), а выход достигал 90%, однако инфекционность оставалась низкой (Erickson & Bancroft, 1978).

Многочисленные исследования *in vitro* показали, что БО ХВК в отсутствие вирусной РНК не способен к спонтанной полимеризации в спиральные структуры, идентичные нативным вирионам (Goodman, 1975; Kaftanova et al., 1975; Новиков В.К., 1972). Однако частичная полимеризация БО ХВК возможна при специфических условиях – добавлении фосфатного буфера (0,2 М, pH 7,0–7,5) с последующей инкубацией в течение 24 часов при 4–20°C. В этих условиях формируются одно- и двухслойные белковые диски диаметром канала около 4 нм, что близко параметрам центрального канала интактных вирионов ХВК (Kaftanova et al., 1975). При продолжительной инкубации эти диски агрегируют в стопки по 14–16 дисков, причем образование таких стопок энергетически более выгодно, чем формирование коротких спиральных структур (Kaftanova et al., 1975). Интересно, что в отличие от ХВК, БО вируса мозаики папайи способен к образованию полноценных спиральных частиц без участия РНК (Erickson et al., 1976). Эти различия свидетельствуют о существенных особенностях в свойствах

белков оболочки у разных представителей рода *Potexvirus*, что может быть связано с их адаптацией к различным стратегиям сборки вирусных частиц *in vivo*. Полимеризация БО ВМП зависит от концентрации: при 0,1 мг/мл преобладают мономеры (2–3S), при 0,25 мг/мл образуются двухслойные диски (14S), а при >1 мг/мл – крупные агрегаты (27–30S) (Erickson & Bancroft, 1978; Erickson et al., 1976).

Ключевым моментом сборки РНП является инициация на 5'-конце РНК. Для ВМП участок инициации (138 нт) содержит 8 повторов GCAAA, а у ХВК аналогичную роль может играть SL1-домен (51–84 нт) (Kwon et al., 2005; Lok & Abouhaïdar, 1986). Эти участки, богатые аденином и цитозином, вероятно, облегчают связывание с БО благодаря отсутствию стабильной вторичной структуры (Erickson & Bancroft, 1978).

Процесс сборки включает три стадии:

- 1) неспецифическое связывание БО с РНК и плавление ее структуры
- 2) инициация спиральной упаковки на 5'-конце
- 3) элонгация вдоль молекулы РНК (Erickson & Bancroft, 1980).

Ингибирование сборки катионами (Na^+ , Mg^{2+}) связано с их стабилизирующим действием на вторичную структуру РНК (Abouhaïdar et al., 1979).

При этом БО потексвирусов способен формировать частицы с гетерологичными РНК, хотя их структура (вытянутые или изломанные по данным ПЭМ) зависит от условий сборки (Erickson & Bancroft, 1978). При инкубации БО ХВК с гетерологичными РНК (ВТМ, ВМК) в условиях низкой ионной силы (0,0001–0,001 М Трис–HCl, pH 6,8–7,3, комнатная температура) формировались палочковидные нуклеопротеидные частицы (Новиков В.К., 1972). Эти частицы демонстрировали характерный УФ-спектр спиральных нуклеопротеидов, их коэффициент седиментации был 55–63S (против 110S у интактного вируса), Эти РНП были иммунологически сходны с нативными вирионами. Выход составлял 20–30% и резко падал при повышении ионной силы. Электронная микроскопия выявила частицы переменной длины с

диаметром, аналогичным нативному вирусу. Важно отметить, что все полученные комплексы БО ХВК с гетерологичными РНК были неинфекционными. Эти особенности делают систему сборки потексвирусов уникальной моделью для изучения молекулярных взаимодействий в РНП комплексах.

4. МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ РНК ХВК.

В отличие от некоторых вирусов растений, инкапсидированная РНК ХВК не способна транслироваться *in vitro*, но может быть переведена в транслируемую форму двумя путями: 1) при взаимодействии ХВК с вирус-специфичным белком ТГБ1 (продукт первого гена тройного генного блока), либо 2) фосфорилированием БО в составе вируса.

4.1. Дестабилизация и разборка вирионов ХВК при взаимодействии с ТГБ1 ХВК.

ТГБ1 ХВК демонстрирует уникальную способность селективно связываться с одним концом вириона, содержащим 5'-конец вирусной РНК (Atabekov et al., 2000; Rodionova et al., 2003). Это взаимодействие приводит к обратимой дестабилизации белковой спирали, переводя вирион в метастабильное состояние. Комплекс ТГБ1–ХВК способен к быстрой диссоциации на БО и РНК под действием дополнительных факторов (Rodionova et al., 2003). Данный механизм трансляционной активации принципиально отличается от классической котрансляционной разборки ВТМ, где происходит постепенное удаление субъединиц БО рибосомами (Wilson, 1984). В случае ХВК, ТГБ1–зависимая трансляционная активация предполагает быструю (и, предположительно, кооперативную) диссоциацию частиц на субъединицы БО и РНК на ранней стадии трансляции. Для полной разборки вириона достаточно лишь инициации трансляции и нескольких циклов элонгации (Rodionova et al., 2003). Ключевую роль в данном процессе играет С-концевой домен белка оболочки ХВК. Эксперименты с делеционными мутантами

продемонстрировали, что усечение С-конца всего на 10–18 аминокислотных остатков полностью подавляет способность белка ТГБ1 активировать трансляцию вирусной РНК, а также блокирует связывание ТГБ1 с вирионом. Примечательно, что удаление 19 N-концевых остатков не приводит к аналогичному эффекту, что указывает на специфическую и незаменимую функцию именно С-концевой области в передаче сигнала от ТГБ1 к геномной РНК (Zayakina et al., 2008).

Эксперименты с вирусоподобными частицами ХВК_{РНК-ДЕГ}, содержащими деградированную РНК, подтвердили, что ТГБ1 связывается с белковой оболочкой независимо от наличия интактной РНК (Rodionova et al., 2003). Интересно, что комплексы ТГБ1–ХВК_{РНК-ДЕГ} демонстрируют повышенную чувствительность к центрифугированию (разбираются при 14 000 g) и механическому воздействию при атомно–силовой микроскопии, в то время как свободные ХВК_{РНК-ДЕГ} остаются стабильными (Kiselyova et al., 2003). Эти наблюдения позволили предложить модель "ремоделирования" – ТГБ1–зависимой линейной дестабилизации белковой спирали, при которой конформационные изменения передаются вдоль всей вирусной частицы (Kiselyova et al., 2003; Rodionova et al., 2003).

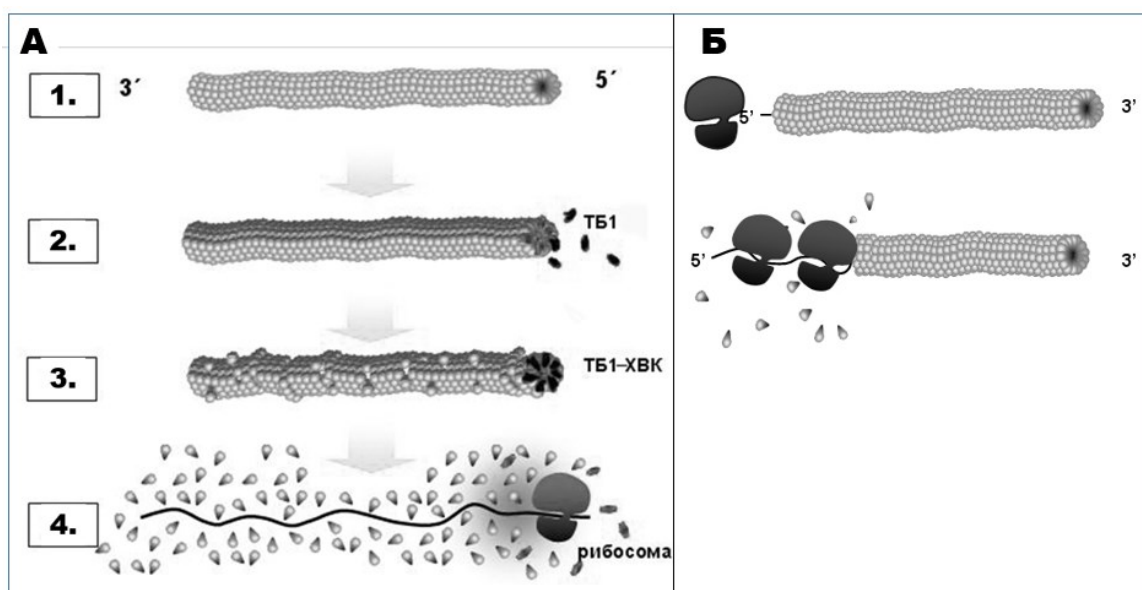


Рис. 5. Схема дестабилизации вирионов ХВК под действием ТГБ1 (А): 1 - интактный вирион ХВК; 2 - связывание ТГБ1 с вирионом; 3 - перестройка

белковой спирали (ремоделирование); 4 - рибосом-инициируемая разборка вирионов. Фосфорилирование белка оболочки запускает котрансляционное «раздевание» вириона (Б).

4.2. Дестабилизация и разборка ХВК при фосфорилировании БО.

Альтернативный механизм трансляционной активации ХВК связан с фосфорилированием БО в составе вириона. Установлено, что фосфорилирование N-концевых остатков серина и треонина протеинкиназами (включая казеинкиназу 2 и протеинкиназу С) вызывает конформационные изменения, делающие 5'-конец РНК доступным для рибосом (Atabekov et al., 2001). В отличие от ТГБ1-зависимого механизма, фосфорилирование приводит к классической котрансляционной разборке, аналогичной наблюдаемой у ВТМ (Wilson, 1984).

Иммунохимические исследования показали, что фосфорилирование существенно изменяет антигенные свойства вирионов, свидетельствуя о значительных структурных перестройках (Atabekov et al., 2001). Примечательно, что удаление N-концевого домена БО трипсином (образование Ptd-формы) не препятствует трансляции уже активированной фосфорилированием РНК, что указывает на необратимый характер изменений (Atabekov et al., 2001).

Эти данные предполагали, что фосфорилируемые серин и треонин в N-конце БО ХВК критичны для трансляционной активации вирусной РНК. Для проверки этого создали мутант ХВК-ST, заменив эти остатки на нефосфорилируемые аланин и глицин (Козловский С.В., 2003). Оказалось, что мутантные вирионы ХВК-ST сохраняли способность к трансляции даже после удаления трипсином N-концевого пептида. Это свидетельствует, что аминокислотные замены вызвали конформационные изменения в БО, сделав 5'-конец РНК доступным для рибосом без фосфорилирования. Данный механизм напоминал котрансляционную разборку фосфорилированного ХВК, но реализовался через альтернативный структурный путь (Козловский С.В., 2003).

Оба механизма трансляционной активации ХВК – ТГБ1–зависимое ремоделирование и фосфорилирование БО – демонстрируют отличия от классической модели ВТМ. Для ХВК характерна возможность полного освобождения РНК, включая 3'-концевой участок. Структурные изменения (ремоделирование) носят кооперативный характер (Rodionova et al., 2003). Эти особенности подчеркивают уникальность стратегии ХВК, типичного представителя потексвирусов, по регуляции экспрессии вирусного генома и могут отражать адаптацию к особенностям внутриклеточного транспорта и репликации. Дальнейшие исследования молекулярных деталей этих процессов могут открыть новые перспективы для разработки средств противовирусной защиты растений.

5. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОТИВИРУСОВ.

Семейство *Potyviridae* объединяет наибольшее число растительных вирусов, включающее около трети всех известных вирусов растений. Потивирусы распространены по всему миру и поражают многие важные сельскохозяйственные культуры. Некоторые представители семейства вызывают серьезные заболевания в субтропических регионах развивающихся стран, угрожая их продовольственной безопасности (Jones & Naidu, 2019). Семейство делится на 12 родов, среди которых род *Potyvirus* является крупнейшим, включающим более 195 видов. Геномы большинства потивирусов состоят из одноцепочечной положительной РНК длиной около 10 тысяч нуклеотидов, которая кодирует крупный полипротеин, разделяемый на зрелые белки: P1, HCPro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa–VPg, NIa–Pro, NIb и БО тремя вирус–кодированными протеазами. С помощью механизма сдвига рамки считывания вирусы семейства *Potyviridae* синтезируют белок P3N–PIPO. Этот белок играет ключевую роль в передаче вируса насекомыми–переносчиками.

Вирионы потивирусов представляют собой гибкие нитевидные частицы размером 680–900 нм и диаметром 11–13 нм, состоящие из приблизительно 2000

субъединиц белка оболочки, которые образуют защитный капсид вокруг вирусной РНК. Помимо БО, в состав зрелых вирусных частиц входят минорные компоненты: ковалентно связанный с 5'-концом РНК белок VPg, а также мультифункциональный белок HCPro и РНК-хеликаза CI (Gabrenaite-Verkhovskaya et al., 2008; Torrance et al., 2006).

БО потивирусов имеют молекулярный вес в диапазоне 29–40 кДа. N-концевой остаток серина часто ацетилирован (McKern et al., 1991). Функция этой модификации может быть связана с регуляцией деградации белка. Зрелый БО традиционно подразделяют на три структурных домена: вариабельный неструктурированный N-концевой участок, высококонсервативное центральное ядро, ответственное за сборку капсида и связывание РНК, и относительно консервативный C-концевой домен. Согласно современным данным крио-ЭМ, в архитектуре БО можно выделить пять субдоменов: N-концевой неупорядоченный пептид (Δ N-пептид), N-концевой домен, центральное ядро, C-концевой домен и C-концевой пептид. Подобное разделение было предложено ранее для БО вируса мозаики турнепса (BMV) (Yuste-Calvo et al., 2020).

Наиболее функционально значимые мотивы сосредоточены в N-концевой области. Ключевую роль в передаче вируса тлями играет консервативный мотив DAG, опосредующий взаимодействие БО с белком HCPro –важнейший этап в процессе переноса вируса насекомым (Blanc et al., 1997). Помимо DAG, в передаче могут участвовать прилегающие вариабельные участки, обогащённые определёнными а.о. (Glu, Lys, Pro), которые также могут влиять на стабильность белка (Wu et al., 2018). Для вируса шарки (оспы) слив (PPV) было предположено, что фосфолирование псевдомотива PEST (богатого Glu, Pro, Ser и Thr) в N-конце может модулировать деградацию БО системой убиквитин-протеасомы (Martinez-Turino et al., 2018).

Центральное ядро БО содержит несколько строго консервативных мотивов, имеющих структурное и функциональное значение. Универсальный сайт связывания РНК формируется триадой аминокислот SRD, мутации в

которой нарушают сборку вириона (остатки 122, 154 и 198 в вирусе TEV), но не влияют на репликацию вируса (Dolja et al., 1991; Valle, 2018). Другие консервативные мотивы, такие как WCIENG и QMKAAA, широко используются для разработки праймеров в ПЦР–диагностике потивирусов, хотя их точная биологическая роль остаётся невыясненной. Функциональная значимость этих мотивов в значительной степени неизвестна. Цистеин мотива WCIENG во многих случаях является единственным присутствующим в целом белке, но не показана его возможная роль в образовании дисульфидных связей между цепями (Yuste-Calvo et al., 2019). С–концевая область БО, в целом более консервативная, чем N–концевая и есть данные, что точечные мутации в этом домене могут влиять на эффективность передачи вируса тлями, вероятно, косвенно модулируя взаимодействие БО с другим вирусным белком HCPro, что показано для вируса мозаики сои (Seo et al., 2010).

Наличие гибкой структуры с неупорядоченными областями в белках потивирусов (см. ниже) делает их изучение структурными методами крайне затруднительным.

6. СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ПОТИВИРУСОВ МЕТОДАМИ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

6.1. Вирус полосатой мозаики пшеницы.

В работе Parker (Parker et al., 2005) была сделана попытка определить структурные параметры вируса полосатой мозаики пшеницы (WSMV) из семейства *Potyviridae* (род *Tritimovirus*) с помощью рентгеновской дифракции на волокнах и электронной микроскопии. До этого структурные данные по этому огромному семейству были крайне скудными и приблизительными. В отличие от жестких вирусов вроде ВТМ, их крайне сложно выровнять в идеально упорядоченные волокна или получить кристаллы, необходимые для высококачественной дифракции. На полученной рентгеновской дифракционной картине от "частично ориентированного" образца WSMV видны как минимум 14

дифракционных рефлексов. Часть из них (4) являются порядками дифракции от спиральной структуры. Анализ положений этих рефлексов позволил рассчитать шаг спирали (pitch), который составил $33,4 \pm 0,6$ Å, что позже было подтверждено. Дифракционная картина WSMV необычно детальна и авторы связывают это с наличием у белка капсида WSMV длинного (~70 остатков) N-концевого домена, который, вероятно, выступает наружу из вириона и участвует в создании поверхностного рельефа, создавая дополнительную контрастность для рассеяния рентгеновских лучей. Рассчитанное наиболее вероятное число субъединиц на виток спирали составляло 6,9, хотя авторы не исключали возможности числа субъединиц 5,9 и 7,9 и указывали, что это «низкоразрешенная» структурная модель. Она говорит об общей симметрии и форме, но не о деталях укладки белка или его взаимодействии с РНК. Их стехиометрический расчет сильно зависел от оценки радиуса "ядра" вириона без N-конца, что внесло большую погрешность ($\pm 1,3$). Работа продемонстрировала, что гибкие вирусы можно изучать дифракционными методами, заложив основу для будущих исследований другими физическими методами (МУРР).

6.2. Вирус мозаики арбуза.

В работе Zamora (Zamora et al., 2017) впервые определена с почти атомарным разрешением (4,0 Å) структура вириона потивируса (вируса мозаики арбуза, ВМА) с помощью современной технологии крио-ЭМ. Карту трёхмерной электронной плотности использовали для расчёта атомной модели белка оболочки и одноцепочечной РНК. Была определена точная архитектура вириона, представляющая левостороннюю спираль диаметром 130 Å, с шагом 35,2 Å и примерно 8,8 субъединицами БО на виток. Был обнаружен консервативный основной структурный мотив (фолд) белка оболочки. Несмотря на низкое сходство аминокислотных последовательностей, фолд белка оболочки ВМА оказался практически идентичным таковому у других гибких филаментозных потексовирусов растений (ВМПеп и МВПап). Это подтверждало гипотезу об их общем эволюционном происхождении. Каждая субъединица белка оболочки ВМА имеет компактный основной домен, богатый альфа-спиралями, и два

протяжённых фрагмента на N– и C–концах. В полученной карте плотности отсутствовали сигналы, соответствующие последним 17 а.о. на C–конце БО и первым 59 а.о. на N–конце, которые обращены наружу и находятся в контакте с раствором.

В структуре БО был определен универсальный и высоко консервативный сайт связывания РНК. В этом кармане ключевые аминокислоты (Ser140, Arg172, Asp216 и Lys236) взаимодействовали с нуклеотидами РНК. Эти аминокислоты оказались строго консервативны у всех гибких филаментозных вирусов растений. Отмечалось, что этот участок может быть мишенью для разработки новых противовирусных препаратов, которые могли бы блокировать сборку вируса и упаковку его генома, воздействуя сразу на огромную группу патогенов.

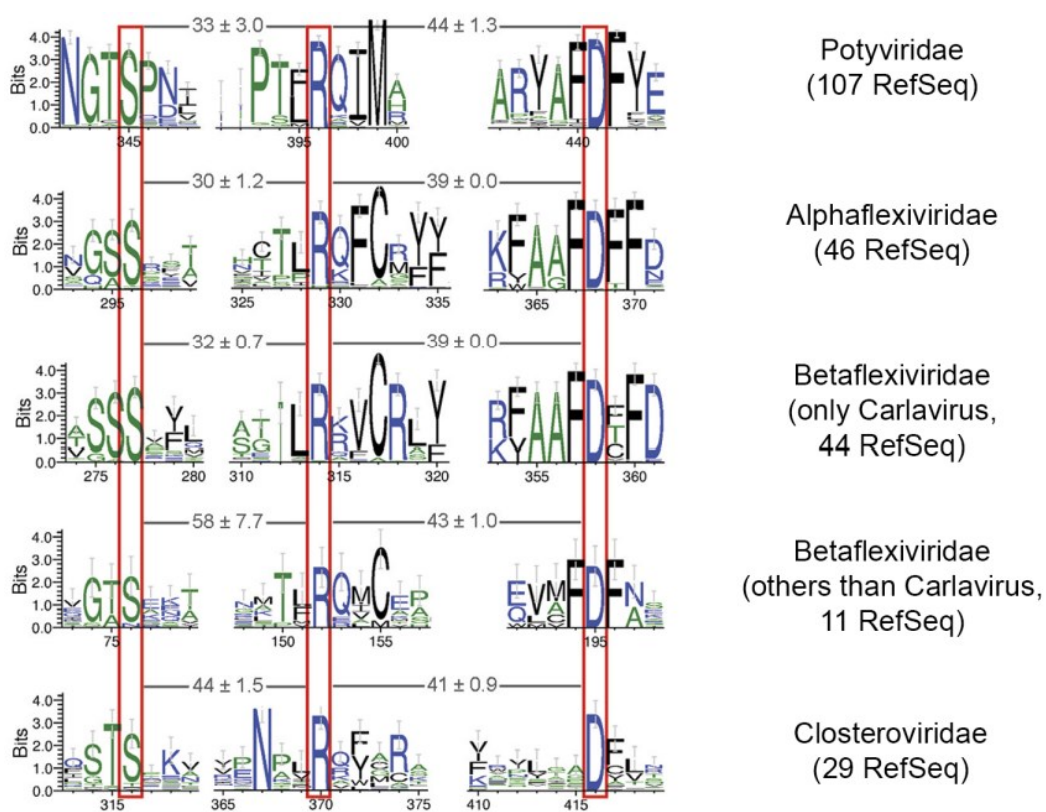


Рис. 6. Консервативный РНК–связывающий участок в гибких нитевидных растительных вирусах. Логотипы консенсусных последовательностей для БО различных семейств гибких фитовирусов. Расстояние измерялось количеством а.о. (среднее значение) между инвариантными аминокислотами (Ser, Arg и Asp), обозначенными линиями и цифрами. Указано количество референсных

последовательностей, выровненных для каждого семейства. Цветовая схема символов а.о.: синий для гидрофильных, зеленый для нейтральных, черный для гидрофобных (Zamora et al., 2017).

Авторы работы обнаружили структурное сходство между белком оболочки растительного вируса ВМА и РНП крупных оболочечных вирусов животных. К ним относятся вирусы с сегментированным геномом из (–)ssRNA, такие как вирусы гриппа (*Orthomyxoviridae*) и вирусы рода *Phlebovirus* (*Bunyaviridae*, например, вирус лихорадки Рифт–Валли). Несколько ранее подобное сходство было обнаружено для потексвируса ВМПеп (см. выше). Это предполагало, что белки, защищающие геномную РНК у столь разных вирусов, несмотря на значительную разницу в их внешней структуре ("голые" нити у растений или окружены липидными мембранами) и путях заражения, имеют общее эволюционное происхождение. Авторы предположили, что существовал очень древний белок–предок, который широко распространился среди эукариотических РНК–вирусов. Работа раскрывает общие принципы строения и эволюции огромного мира РНК–вирусов, демонстрируя глубокое единство на структурном уровне там, где на уровне последовательностей его уже не увидеть.

6.3. Y–вирус картофеля. Сравнение с A–вирусом картофеля.

В работе Kezar (Kezar et al., 2019), используя крио–ЭМ, авторы определили атомарную структуру гибких вирионов YBK (3,4 Å для вириона, без 43 N-концевых а.о.), демонстрирующую уникальные внутренние взаимодействия между длинными C–концевыми областями белка оболочки и вирусной РНК. Было показано, что вирионы YBK формируются как гибкие нити с левосторонней спиральной организацией. C–концевые области полностью спрятаны внутри внутреннего канала вириона и плотно переплетены с вирусной РНК уникальным способом. Структура показала, что каждая субъединица БО взаимодействует с 12 соседними субъединицами (по сравнению с 8 у потексовирусов), а также с РНК в двух сайтах. Обнаружен консервативный сайт,

связывающий 5 нуклеотидов, с участием остатков Ser125, Arg157 и Asp201. Во втором сайте, Ser240 из С–конца одной субъединицы взаимодействует с нуклеотидами, связанными с ядром другой субъединицы (БО_{n+9}). Эта "перекрестная" связь дополнительно стабилизирует сборку.

Авторы проанализировали также свободные от РНК вирусоподобные частицы (ВПЧ, с разрешением 4,1 Å), что позволило показать, что взаимодействия БО с РНК критически важны для спиральной конфигурации и стабильности вириона. Оказалось, что отсутствие РНК кардинально меняет внутреннюю структуру частицы. Без РНК ВПЧ собирается не в спиральные филаменты, а в стопки октамерных колец (в отличие от ВПЧ ВМТy (Cuesta et al., 2019)), которые сохраняли спиральность). Структура ВПЧ отличается увеличенной гибкостью и большим количеством взаимодействий между белками оболочки. Частицы без РНК гораздо менее прочны и стабильны по сравнению с вирионами, что подчеркивает незаменимую роль вирусной РНК в формировании правильной и устойчивой структуры. В ВПЧ α–спирали укорачиваются, а петли, участвующие в связывании РНК, смещаются. Это показывает удивительную структурную лабильность БО, позволяющую ему адаптироваться к наличию или отсутствию партнера по связыванию (РНК).

С помощью мутагенеза (удаление N– и С–концевых регионов БО) и функциональных тестов *in planta* проведена оценка инфекционности мутантных вирусов. Авторы показали, что N–концевой участок критически важен для сборки. Удаление 49 остатков приводило к образованию одиночных колец БО вместо филаментозных структур. Удаление 69 остатков приводило к накоплению мономерного белка. С–конец оказался не важен для сборки ВПЧ *in vitro* (удаление до 60 остатков приводило к образованию полых нанотрубок), но был абсолютно необходим для инфекционности РНП *in planta*. Мутанты без С–конца не могли эффективно реплицироваться и распространяться по растению. Таким образом, N–конец критичен для сборки и движения вируса, а С–концевой регион играет ключевую роль в функциях, не связанных со сборкой

и нужен для взаимодействия с РНК на этапах репликации и системного распространения.

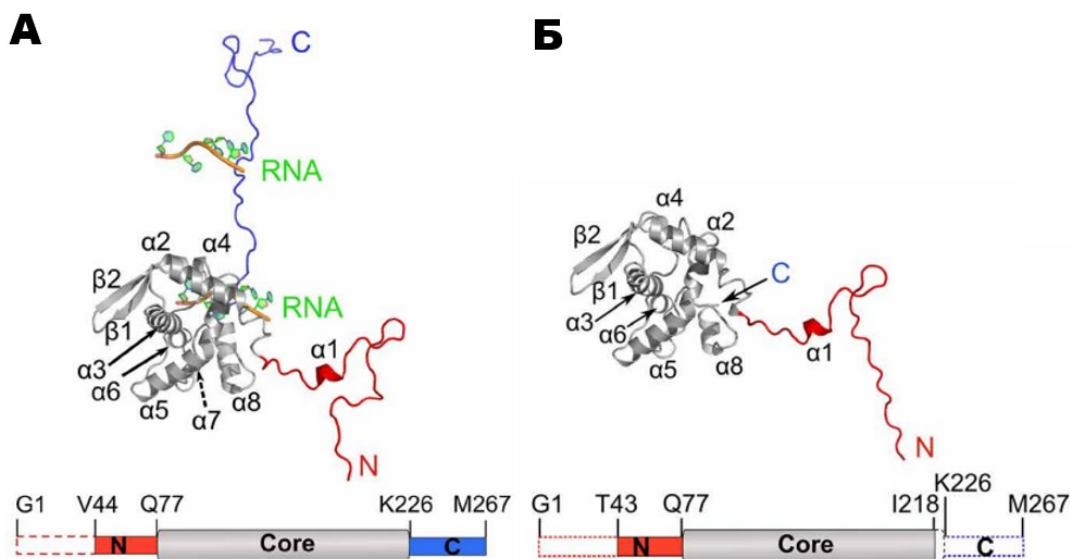


Рис. 7. Структурные особенности белка оболочки Y-вируса картофеля. (А) Структура БО (N-концевая область, красный; ядро, серый; C-концевая область, синий), демонстрирующая два сайта взаимодействия с РНК. Внизу: Линейное представление белка БО; цветовая схема соответствует модели. (Б) Структура БО ВПЧ. Внизу: линейное представление белка с использованием той же цветовой схемы, что и в модели выше. Пунктирные рамки в N- и C-концевых областях обозначают структурно неупорядоченные участки (Kezar et al., 2019).

Способность БО YVK выполнять множество функций вируса (сборка, движение, репликация) структурно обеспечена гибкостью их N- и C-концевых регионов, которые могут принимать разные конформации в зависимости от контекста. Вирусная РНК выступает не просто как генетический материал, а как центральный организатор и стабилизатор правильной спиральной архитектуры вириона через разветвленную сеть взаимодействий. Таким образом, объединение межбелковых и белок-РНК взаимодействий обеспечивает вириону максимальную прочность и жизнеспособность, позволяя ему выдерживать неблагоприятные внешние условия и эффективно распространять инфекцию.

В следующей работе эта группа показала (Kavcic et al., 2024), что рекомбинантный белок оболочки вируса YVK спонтанно собирается в бактериальной системе в три типа ВПЧ: филаменты из стопок колец без РНК

(67%), без-РНК-вые спиральные филаменты с левой симметрией (7,5 субъединиц на виток, 25%) и РНК-содержащие спиральные филаменты (8,8 субъединиц на виток, 8%), подобные нативным вирионам.

Структурный сравнительный анализ показал, что С-концевой домен упорядочен только в РНК-содержащих частицах; глобулярное ядро консервативно, за исключением РНК-связывающей петли S125-G130, которая принимает различные конформации в присутствии или отсутствии РНК; N-концевой домен лабилен, обеспечивая формирование двух типов без-РНК-вых филаментов. Удаление С-концевого домена устраняло спиральные без-РНК-вые филаменты. Более глубокое усечение (удаление N- и С-концевых доменов с добавлением пептида, с сайтом узнавания TEV протеазы и His6-тэгом на С-конце) вызывало структурный метаморфоз, приводя к образованию двойных октамерных колец по типу «голова к хвосту», стабилизированных кластеризацией His6-тэгов. Октамерное кольцо было анизотропно по заряду: N-сторона отрицательная, Р-сторона положительная. Одиночные замены на N-стороне кольца восстанавливали способность к формированию филаментов, а на Р-стороне – индуцировали образование гомогенных двойных колец «голова к голове», а также кубические и сферические частицы из шести или девяти колец, стабилизированные гидрофобными взаимодействиями. Авторы разработали систему контролируемой сборки *in vitro* на основе слияния БО с мальтозо-связывающим белком (MBP) на С-конце. Это предотвращало спонтанную самосборку в бактериальной системе и позволяло выделить мономерные формы. Протеолитическое удаление MBP с помощью TEV протеазы инициировало сборку *in vitro* высокоупорядоченных без-РНК-вых наночастиц. Введение дисульфидных связей между субъединицами стабилизировало филаменты, повышая на 5-10°C их термостабильность. Таким образом, лабильность PVY CP позволяет простыми модификациями направленно получать широкий спектр наночастиц – от мономорфных филаментов до кубических и сферических сборок, что делает этот белок перспективной платформой для нанобиотехнологии.

В недавно вышедшей работе (Koritnik et al., 2026) с помощью крио-ЭМ получена структура интактного вируса АВК с разрешением $\sim 2,4$ Å и шагом спирали 3,89 Å (без 43 N-концевых а.о.). Несмотря на консервативность архитектуры, при сравнении с УБК, выявлены видовые различия в трёх ключевых регионах: изгибе N-концевого домена, стыке $\alpha 8$ -спирали с C-концевым доменом и в самом C-конце. АВК формирует меньше межбелковых контактов (десять против двенадцати у УБК), но больше контактов с РНК, включая дополнительный неканонический сайт связывания (Thr242 – U2). АВК и УБК используют разные стратегии, что позволяет разным видам достигать одинаковой структурной целостности и близкой термостабильности. Исследование без-РНК-вых ВЧП показало, что их архитектура определяется аминокислотной последовательностью: белок АВК формировал спиральные частицы (с параметрами 8,5 субъединиц на виток с шагом спирали 4,74 Å, что делает их более широкими и компактными, чем у УБК) и не образовывал стопки колец, в отличие от полиморфного БО УБК. Методом мутагенеза идентифицированы четыре ключевых сайта (S1–S4), расположенных преимущественно в глобулярном ядре БО, ответственных за видоспецифичную сборку. Сайт S4 (Arg163 в АВК) создаёт положительный потенциал в канале вириона; мутация R163A полностью блокирует связывание РНК и системную инфекцию. Замена трёх остатков в АВК на варианты из УБК приводила к появлению способности формировать декамерные кольца (не октамерные), что подтверждает роль первичной структуры в определении архитектуры ВЧП. Таким образом, АВК эволюционно выбрал путь мономорфной упаковки, жертвуя множественностью форм, тогда как РВУ сохранил способность к множественным путям самосборки, что, возможно, отражает различные функциональные состояния или этапы инфекционного цикла. Авторы обнаружили высококонсервативный мотив из трёх заряженных остатков (Arg, Asp, Glu), действующий как молекулярный шарнир, фиксирующий изгиб N-концевого домена. Мутация в этом триплете (D138C) нарушала сборку без-РНК-вых частиц.

Таким образом, обобщение данных позволило авторам заключить, что потивирусы демонстрируют парадигму структурно-функциональной эволюции, в рамках которой YBK сохранил высокую пластичность и способность к множественным путям самосборки, что, вероятно, отражает разнообразие функциональных состояний в инфекционном цикле. Напротив, ABK эволюционировал в сторону строгой детерминированности архитектуры. Вирусная РНК выступает как центральный организатор сборки, а гибкость концевых доменов БО является ключевым фактором, обеспечивающим как структурную пластичность (для YBK), так и строгую видоспецифичность укладки (для ABK).

6.4. Вирус мозаики турнепса.

В работе Cuesta (Cuesta et al., 2019) крио-ЭМ и компьютерная обработка изображений использована для изучения структуры вирионов и вирусоподобных частиц вируса мозаики турнепса (ВМТу) –представителя рода потивирусов, чтобы оценить роль взаимодействия БО и РНК в сборке вирионов. Трёхмерная электронная карта (3D) показывает левостороннюю спиральную укладку вирионов ВМТу и структурный мотив, аналогичный другим известным потивирусам (ВМА и YBK), где каждая субъединица БО связывает 5 нуклеотидов РНК, несмотря на некоторые отличия в аминокислотных последовательностях. N-концевой фрагмент одной субъединицы БО действует как "молекулярная скрепка", соединяясь с соседними субъединицами в том же витке и в витке выше. Автоматическая классификация трёхмерных данных крио-ЭМ позволила разделить их на классы, отражающие растяжение и сжатие нитей вирионов с амплитудой около 2 Å на один виток спирали.

ВПЧ сохраняют спиральную архитектуру, но являются менее стабильными и структурно неоднородными. Их разрешение (~8 Å) было хуже, чем у вирионов (~5 Å). В отличие от ВПЧ потивируса YBK, которые образуют стопки колец, ВПЧ ВМТу собирался в спирали. Анализ показал, что отсутствие РНК в ВПЧ нарушает критически важные взаимодействия: N-концевой

фрагмент БО теряет свое правильное положение и не может стабилизировать взаимодействие между субъединицами. Несколько α -спиралей (Н1, Н5, Н7) в коровом домене БО смещались. Была выявлена сеть консервативных белок – РНК и белок –белковых взаимодействий (с участием остатков Asn103, Arg204, Arg209), которые "закрепляют" N-концевой рычаг в правильной позиции для выполнения его "скрепляющей" функции.

Отмечалось, что взаимодействие с геномной РНК является не просто пассивным упаковыванием, но активно регулирует процесс сборки вириона. РНК выступает в роли шаблона и стабилизатора, обеспечивая правильную ориентацию гибкого N-концевого домена БО, который, в свою очередь, скрепляет всю структуру вирусной частицы. Без РНК этот механизм нарушается, что приводит к образованию нестабильных и дефектных частиц (ВПЧ). Полученные результаты позволяют лучше понимать механизм сборки вирионов и разработать эффективные подходы для модификации вирусных частиц с целью создания различных наночастиц.

6.5. Вирус слабой крапчатости батата, род *Ipotovirus*.

В работе Chase (Chase et al., 2023) исследователи сравнили структуру и стабильность рибонуклеопротеидов двух вирусов, заражающих батат, – ВПКБ (вирус перистой крапчатости батата, род *Potyvirus*) и ВСКБ (вирус слабой крапчатости батата, род *Ipotovirus*). Оба относятся к семейству *Potyviridae*, но передаются разными переносчиками: тлями и белокрылками соответственно. Данные РНП были получены экспрессией гена БО каждого вируса в растениях *Nicotiana benthamiana* с использованием самореплицирующегося вектора на основе ХВК (pEff). ВПЧ содержали РНК, происходящие из реплицирующегося вектора pEff, преимущественно субгеномные РНК длиной >1000 нт. Была проведена крио–ЭМ для определения структуры ВПЧ с высоким разрешением (2,6 Å для ВПКБ и 3,0 Å для ВСКБ). Первые N-концевые остатки не могли быть прослежены (90 а.к. для ВПКБ и 65 а.к. для ВСКБ). Структура ВПЧ обоих вирусов имеют сходную архитектуру – гибкие нитевидные частицы с

левозакрученной спиральной симметрией, состоящие из ~8,8 субъединиц БО на виток с диаметром частиц: ~130 Å и внутренним диаметром ~40 Å. БО состоит из трёх доменов: N–концевой, коровый и С–концевой. РНК упакована внутри, 5 нуклеотидов взаимодействует с консервативным карманом в коровом домене БО. Ключевые консервативные остатки для связывания РНК у SPFMV: Arg235, Ser172, Asp248; у SPMV: Arg262, Ser152, Asp236. Отмечается, что эти три остатка присутствуют в эквивалентных положениях в БО как потивируса, так и ипомовируса. N–концы БО взаимодействуют с соседними субъединицами как в том же витке, так и в соседних, что характерно для представителей *Potyviridae* и эти контакты стабилизированы водородными связями и солевыми мостиками. Структура БО обоих вирусов высококонсервативна и схожа с таковой у других представителей *Potyviridae* (например, YBK, BMTy).

Согласно предсказанию AlphaFold, наиболее вариабельный N–концевой участок БО, который взаимодействует с переносчиком у ВПКБ, может иметь уникальную структуру (петля и мотив "спираль–поворот–спираль"), тогда как у ВСКБ он неструктурирован. Предположено, что это связано со специфичностью передачи белокрылкой.

Несмотря на структурное сходство, ВПЧ ВПКБ оказались значительно стабильнее, чем ВПЧ ВСКБ. Они диссоциировали (T_{m1}) и денатурировали (T_{m2}) при более высоких температурах ($T_{m1} = 60^{\circ}\text{C}$ и $T_{m2} = 69^{\circ}\text{C}$ для ВСКБ против 55°C и 66°C для SPFMV), как показал анализ термической стабильности с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии. Различия в стабильности и в N–концевой области БО могут объяснять их различную специфичность к насекомым–переносчикам. Это исследование – важный шаг для понимания механизмов передачи вирусов и разработки мер борьбы с ними.

6.6. Вирус шарки сливы.

В недавно вышедшей статье Bonnet (Bonnet et al., 2025) представлены структурные характеристики с использованием крио-ЭМ высокого разрешения вируса шарки сливы (Plum pox virus, PPV), экономически значимого патогена рода *Potyvirus*, наносящего серьёзный экономический ущерб плодоводству из-за

лёгкой передачи большинству видов *Prunus* (слива, абрикос, персик, вишня и т.д.). Полученная структура с разрешением 2,9 Å представляет собой нитевидный вирион со спиральной сборкой, содержащий 8,8 субъединиц БО на виток. Модель БО включала остатки Asn129-Val330. Структурное ядро белка (Gln140-Asn290) образует полый цилиндр, а С-концевая область участвует во внутренних взаимодействиях. Одноцепочечная РНК располагается в желобке между ядром и С-концом БО, по пять нуклеотидов на протомер БО, который упаковывает РНК. Структура ядра БО демонстрирует значительную консервативность в сравнении с другими потивиррусами и включает сайт связывания РНК, а также межсубъединичные взаимодействия, частично опосредованные неупорядоченным N-концевым доменом.

Масс-спектрометрический анализ выявил множество посттрансляционных модификаций. Обнаружены специфические сайты фосфорилирования: Ser137, Ser151, Thr254, Ser270 и Thr309, а также в N-концевой области найдены сайты O-GlcNAc-модификаций. Среди этих специфических сайтов идентифицированы – Thr19, Thr24, Thr41, Thr50, Thr53, Thr54, Thr58 и Ser65. Предсказания выявили природно-неупорядоченные области (30% БО, 77 а.о. из первых 100).

Интересно, что *in silico* анализ предсказал наличие шести амилоидогенных участков в БО PPV, наиболее длинный из которых включает остатки 171-184. Крио-ЭМ было обнаружено, что крайние остатки (Asn323-Arg328), расположенные во внутренней части вириона, частично формируют конформацию, напоминающую амилоидные фибриллы (Рис.8). Выравнивание последовательностей показало соответствие предсказанных амилоидогенных регионов у шести представителей потивирусов (ABK, YBK, BMTu и др.), что было ранее показано для ABK нами (см. ниже). Обсуждается их возможная функциональная значимость и потенциальная роль в патогенезе (способность вызывать нарушения в клетке хозяина) или сборке и стабилизации вируса.

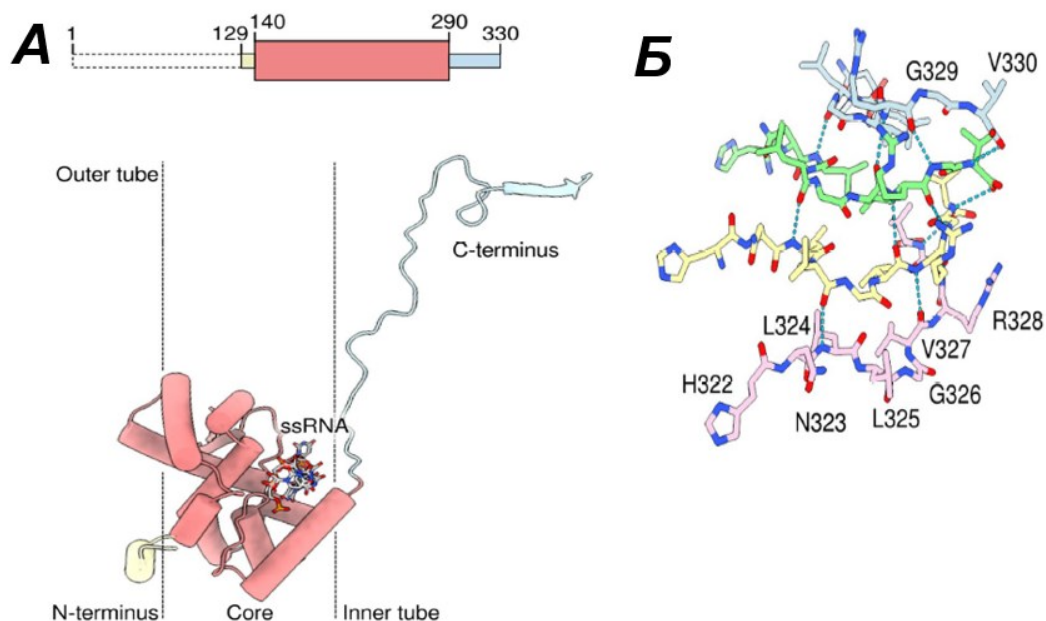


Рис. 8. Структурный анализ вириона PPV. (А). Детальный вид асимметричной единицы структуры вириона. Структура БО представлена в виде ленточной диаграммы, РНК показана в виде атомного представления. Две пунктирные линии представляют собой «трубку», образованную ядром БО. Схематичное представление первичной последовательности белка приведено в верхней части изображения. (Б). С-концевые β -тяжи, образующие четыре слоя. Водородные связи между слоями обозначены пунктирными линиями (Bonnet et al., 2025).

7. СБОРКА ВИРУСНЫХ И ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ ПОТИВИРУСОВ.

Ранние эксперименты МакДональда показали, что выделенные *in vitro* мономерные субъединицы белка оболочки Y-вируса картофеля (McDonald, 1977) способны самопроизвольно ассоциировать в длинные гибкие ВПЧ даже в отсутствие РНК. Эти собранные частицы, подобные кольцевидным структурам («stacked-ring»), морфологически отличались от нативных спиральных вирионов потивирисов. Инкубация таких кольцевидных частиц с вирусной РНК приводила к образованию структур, подобных вирионам, что позволило предположить их роль в качестве промежуточных форм при сборке вируса. Однако прямых экспериментальных доказательств этого до сих пор нет. К другим потенциальным промежуточным продуктам сборки относятся одиночные кольца

размером 16S, состоящие из 7–8 субъединиц БО (Anindya & Savithri, 2003), а также овальные частицы диаметром 20–30 нм, содержащие около 30 субъединиц белка (Ksenofontov A., 2016) (см. ниже). Оба типа агрегатов были обнаружены в экспериментах по диссоциации и последующей реассоциации БО в условиях *in vitro*. Экспрессия белка оболочки потивирусов в гетерологичных системах демонстрирует, что БО способен к самосборке в ВПЧ различной длины независимо от присутствия других вирусных белков. Морфология формируемых ВПЧ зависит от видовой специфичности белка оболочки. Например, БО вируса мозаики Джонсонграсса (JGMV), вирусов TEV и YBK образуют кольцевидные структуры (Jagadish et al., 1991; Kezar et al., 2019; Voloudakis et al., 2004), в то время как БО вируса венозной крапчатого перца (PVBV) и ВМТу формируют спиральные ВПЧ (Anindya & Savithri, 2003; Cuesta et al., 2019). Мутационные исследования показывают, что центральный домен БО необходим для сборки ВПЧ у всех потивирусов, тогда как требования к N– и C–концевым областям различаются у разных представителей. Так, для TEV минимальным достаточным для сборки фрагментом является участок а.о. 131–206, не включающий концевые домены (Voloudakis et al., 2004). В случае ВМТу удаление 44 C–концевых остатков не нарушает сборку, однако делеция 81 N–концевого а.о. полностью блокирует формирование ВПЧ (Yuste-Calvo et al., 2020). Эти данные подчеркивают видоспецифичные различия в структурных требованиях к самосборке капсида у потивирусов.

Ограниченный протеолиз и мутагенные исследования показывают, что N– и C–концевые области БО потивирусов не являются критическими для сборки вирусных частиц (Shukla et al., 1988). Обработка протеазами демонстрирует, что удаление концевых доменов не нарушает целостность вирионов. Мутанты вирусов TEV с делециями в N–концевых (а.о. 5–29) или C–концевых (последние 17 а.о.) регионах сохраняют способность формировать полноценные вирусные частицы (Dolja et al., 1995; Dolja et al., 1994). Однако, вирионы не обнаруживались в клетках, зараженных мутантами вируса мозаики сои с делециями, затрагивающими заряженные остатки в C–концевой области БО. С

другой стороны, как упоминалось выше, усечение N– и C–концевых а.о. у некоторых потивирусных БО предотвращает их сборку в ВПЧ *in vitro*. Эти противоречия между сборкой вирионов и ВПЧ могут также указывать на наличие компенсаторных механизмов, которые отсутствуют в бесклеточных системах.

Гипотеза о специфичном сайте начала инкапсидации вирусной РНК с 5'–конца, предложенная в ранних работах, остаётся неподтверждённой из–за отсутствия точных данных о позиции инициации сборки. Аргументом против существования специфических последовательностей служат эксперименты, демонстрирующие, что БО вируса YBK *in vitro* формирует стабильные частицы как с гомологичной, так и с гетерологичной РНК (McDonald, 1977). Эта способность к неспецифической инкапсидации подтверждается феноменом гетероинкапсидации *in vivo* при смешанных инфекциях (Dolja et al., 1994). Отсутствие жёстких требований к нуклеотидной последовательности или структуре РНК указывает на существование альтернативных механизмов селекции, вероятно, основанных на пространственно–временной координации процессов трансляции, репликации и упаковки генома. Исследования на примере вируса PPV доказали, что репликация РНК является обязательным условием сборки стабильных вирионов (Gallo et al., 2018). При этом ключевым фактором выступает не происхождение БО, который может быть экспрессирован трансгенно (Dolja et al., 1994), а репликационный статус РНК: БО эффективно инкапсидирует только реплицирующиеся молекулы РНК.

Взаимодействие БО с геномной РНК критически важно на всех этапах инфекции: при распаковке вириона, формировании новых частиц и регуляции доступности РНК для трансляции и репликации. На примере вируса АБК показано, что ко–трансляционное взаимодействие накапливающегося в избытке БО с вновь синтезируемым БО ограничивает трансляцию вирусной РНК (Ivanov & Makinen, 2012; Besong-Ndika et al., 2015). Для поддержания баланса между трансляцией, репликацией и упаковкой РНК уровни БО в вирусных фабриках строго контролируются системой шаперонов HSP70 и кошаперона CIRP,

которые промотируют убиквитин–опосредованную деградацию БО (Hafren et al., 2010). Ключевую роль в регуляции играет фосфорилирование БО. У АБК фосфорилирование треонина в С–концевой области белковой киназой СК2 обратимо регулирует связывание БО с РНК: нефосфорилированная форма подавляет трансляцию (Ivanov et al., 2003), тогда как фосфорилирование приводит к отсоединению БО и запуску репликации. Однако у вируса PPV фосфорилирование имеет видоспецифичные особенности: оно затрагивает множественные сайты по всей молекуле БО и регулирует стабильность белка и сборку вирионов. Кроме того, N–концевой домен БО PPV подвергается конкурирующей посттрансляционной модификации – O–GlcN–ацилированию (Perez Jde et al., 2013), которое совместно с фосфорилированием тонко регулирует стабильность белка в соответствии с потребностями каждого этапа инфекции. Таким образом, несмотря на важность БО в регуляции инфекции, конкретные механизмы (такие как фосфорилирование) демонстрируют значительную видоспецифичность у разных потивирусов.

8. МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ БЕЛКОВ ПОТИВИРУСОВ. НАЛИЧИЕ НЕСТРУКТУРИРОВАННЫХ ОБЛАСТЕЙ.

Выявление класса так называемых нативно-развернутых, внутренне неупорядоченных белков (intrinsically disordered - ID) позволило по-новому взглянуть на структурно-функциональные особенности белков растительных вирусов. Установлено, что неупорядоченные сегменты в белках (ID-участки, не имеющие при физиологических условиях фиксированной трехмерной структуры) зачастую реализуют критически важные функции. Как правило, они задействованы в сигнальных и регуляторных каскадах через специфические белок-белковые, белок-нуклеиновые и белок-лигандные взаимодействия (Uversky, 2002, 2013). В настоящее время известно значительное число белков, содержащих ID-сегменты. Например, база данных белков с неупорядоченной структурой DisProt (версия 9.8) в 2025 г. включает более 3000 записей

(<https://disprot.org/>). Принято считать, что отсутствие термодинамически устойчивой конформации наделяет белок способностью к полифункциональности и легкой подстройке под различных «партнеров». Уникальная организация белков выступает результатом равновесия между конформационной энтропией и энергией взаимодействий боковых радикалов аминокислот (Lobanov et al., 2010). Неупорядоченность белковой конформации изначально заложена в его аминокислотной последовательности.

Оказалось, что неструктурированные области широко распространены в белках РНК-вирусов, таких как потивирусы, и представляют собой эволюционную стратегию, позволяющую компенсировать ограниченный размер генома и факт обязательной паразитической жизни (Хуе, 2014). Анализ всех белков потивирусов, проведённый Charon с использованием методов предсказания неструктурированных регионов, аннотационных алгоритмов и эволюционных исследований (Charon et al., 2016), выявил высокую долю неструктурированных ID-областей в их составе. Три белка –БО, VPg и P1 –были отнесены к категории высоко неструктурированных (Charon et al., 2016). Их неупорядоченные домены обогащены короткими линейными мотивами, имитирующими функциональные модули эукариотических белков, что позволяет вирусу взаимодействовать с широким спектром клеточных партнёров. Именно этим обусловлено то, что большинство функций белка оболочки, выходящих далеко за рамки структурной роли и защиты генома, ассоциированы с его динамичными N– и C–концами (Makarov & Kalinina, 2016). К ним относятся передача вируса насекомыми–векторами и через семена, движение по растению, подавление иммунитета хозяина и регуляция стадий репликации. Таким образом, структурная пластичность, обеспечиваемая отсутствием жёсткой третичной структуры, позволяет этим белкам формировать сложные сети взаимодействий с вирусными и хозяйскими факторами (Revers & Garcia, 2015).

Гибкость неструктурированных участков позволяет им функционировать как молекулярные «выключатели»: например, мотив DAG в N–конце БО приобретает упорядоченную конформацию только при связывании с белком

HCPro. В терминологии Charon, данная область свободна для пространственного «анализа» своего окружения, приводящего к индукционному сворачиванию при связывании с HCPro (Charon et al., 2016). Наличие многочисленных ЕК–повторов в N–концевом домене БО вируса кольцевой пятнистости папайи обеспечивает конформационную пластичность, позволяющую региону изменять свою длину по принципу аккордеона. Возникающий в результате полиморфизм размеров, вероятно, представляет собой адаптационный механизм, способствующий широкому распространению вируса (Silva-Rosales et al., 2000). Такая же динамичность позволяет вирусу избегать распознавания иммунной системой растения и адаптироваться к новым хозяевам. Важно, что эти области у потивирусов хорошо сохраняются, несмотря на высокий полиморфизм аминокислот, что подтверждает их связь с адаптационными процессами (Charon et al., 2016; Revers & Garcia, 2015).

Структурные исследования показывают, что внутренний беспорядок сохраняется даже в собранных вирионах и способствует конформационной лабильности. Экспериментально показано наличие ID– областей БО в составе собранных вирионов (Ksenofontov et al., 2013) (см. ниже). Обнаружено, что ID– области способствует переходу к β –структуре субъединиц БО А–вируса картофеля при высвобождении из вирионов путём теплового воздействия (Ksenofontov et al., 2016).

В недавних исследованиях было показано, что структурная лабильность N–концевой области БО Y–вируса картофеля, обусловленная её ID– природой, позволяет этому участку принимать различные конформации при формировании вирионов или нитевидных ВПЧ (Kezar et al., 2019) (см. выше). Таким образом, отсутствие жёсткой структуры не является недостатком – напротив, оно расширяет функциональный репертуар вирусных белков и способствует адаптации к наличию или отсутствию партнёров по взаимодействию. С другой стороны, наличие гибкой структуры с неупорядоченными областями в белках потивирусов делает их изучение структурными методами крайне затруднительным. Для изученных крио–ЭМ потивирусов – ВМА, YBK (ABK),

ВМТу, ВПКБ и РРV – не получены данные для первых 59, 43, 65, 90 и 128 остатков, соответственно.

9. НИТЕВИДНЫЕ ФИТОВИРУСЫ КАК ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ВАКЦИНАЦИИ, ИММУНОТЕРАПИИ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ.

Активно развивается направление биотехнологии, использующее вирусные и вирусоподобные частицы в качестве носителей для доставки различных соединений. Такие частицы, образованные путем самосборки структурных белков ряда вирусов, представляют собой высокоэффективный тип субъединичных вакцин. Это связано с тем, что они неинфекционны для животных и имеют регулярное, высокоплотное представление эпитопов, что вызывает повышенный иммунный ответ. Показано, что такие платформы ряда потексвирусов проявляют адъювантные свойства для чужеродных эпитопов. Достижения в исследованиях трехмерных структур БО позволило прогнозировать поверхностные участки для эффективного конструирования таких платформ. Анализ литературы показал, что к настоящему времени испытано около 80 различных икосаэдрических и филаментозных фитовирусов как системы представления эпитопов (Balke & Zeltins, 2019; Steele et al., 2017). Для создания таких платформ применяют три основных подхода. Первый заключается в получении ВПЧ путем синтеза химерных БО в бактериальных или других гетерологичных системах, где происходит их последующая самосборка. Второй подход предполагает использование модифицированных вирусов, в геном которых интегрирована последовательность чужеродного пептида, слитая с геном БО; при заражении растений такие вирусы продуцируют готовые химерные частицы, на поверхности которых экспонированы чужеродные пептиды (Lomonossoff & D'Aoust, 2016). Третий подход функционализации вирусных частиц включает в себя химическую конъюгацию поверхности вирусных частиц пептидами/эпитопами. ВТМ с известной трехмерной структурой был одним из первых использован для этих целей. Поверхностный

C–конец БО оказался наиболее благоприятным местом для прикрепления чужеродного эпитопа из 10–15 аминокислот гликопротеина вируса мышинного гепатита и полученный химерный вирус вызывал нейтрализующий иммунный ответ у мышей (Koo et al., 1999).

9.1. Потексвирусы.

С самого начала эры вирусоподобных частиц (ВПЧ) потексвирусы применялись как векторы для производства фармацевтических белков в растениях, когда ген–мишень замещал ген белка оболочки вируса. Впервые этого добились с векторами на основе генома X–вируса картофеля (Chapman et al., 1992). В 2007 г. группа ученых под руководством Yang CD создала новый тип живой вирусной вакцины (Yang et al., 2007), используя вирус мозаики бамбука (ВМБ), поверхность которого несет эпитоп белка VP1 вируса ящура (FMDV). Полученные химерные вирионы защищали свиней от инфекции FMDV и вызывали выработку нейтрализующих антител, причем однократной дозы было достаточно для полной защиты животного. Впервые показано, что такая вакцина стимулирует как гуморальный, так и клеточный иммунитет.

Ученые Chen и соавт. разработали мозаичные химерные вирионы ВМБ (Chen et al., 2017), содержащие эпитоп вируса японского энцефалита (JEV). Эпитоп был добавлен к N–концу белка оболочки ВМБ через вставку пептида 2A из FMDV, для отделения БО и эпитопа, что позволило повысить стабильность вирионов и сохранить презентацию эпитопа на поверхности. Эксперимент показал, что эта конструкция индуцирует защитные антитела против JEV у мышей.

Способность фитовирусов и их вирусоподобных частиц действовать как эффективные адъюванты впервые показана на потексвирусе мозаики папайи (ВМПп). Tremblay и коллеги впервые разработали систему производства ВПЧ ВМПп в бактериях *E. Coli* (Tremblay et al., 2006). Это сделало процесс получения больших количеств ВПЧ дешевым, простым и масштабируемым. Добавление ВПЧ к коммерческой трехвалентной инактивированной вакцине

против гриппа (Savard et al., 2011) значительно усиливало иммунный ответ на вирус гриппа. На их основе при использовании в качестве иммуногена нуклеопротеида вируса гриппа была получена достаточно эффективная противогриппозная вакцина (Savard et al., 2012). Эти частицы также стимулировали врожденный иммунитет, защищали от инфекций гриппом и пневмококковой инфекцией, действовали как активаторы Toll-подобных рецепторов (TLR7) и проявляли положительные эффекты в клинических испытаниях первой фазы на людях. Кроме того, они показали потенциальную пользу в лечении некоторых видов рака. Введение таких ВПЧ усиливало противоопухолевый иммунный ответ, значительно замедляло прогрессирование меланомы и продлевало выживаемость мышей (Lebel et al., 2016).

Denis и соавт. продемонстрировали, что химерные ВПЧ ВМПап, экспрессирующие консервативный эпитоп M2e вируса гриппа на С-конце белка оболочки, обеспечивают полную защиту мышей от гриппа (Denis et al., 2008). Rioux и соавт. систематически оценили несколько сайтов вставки (Rioux et al., 2012), используя эпитоп HA11 гемагглютиниона гриппа, и идентифицировали три толерантные позиции (С-конец и участки после а.о. 187 и 12). Babin и соавт. показали, что CTL-эпитоп (распознается цитотоксическими Т-лимфоцитами) NP147–155 гриппа более эффективно индуцирует иммунный ответ при вставке в N-конец (после а.о. 12), а не на С-конце БО (Babin et al., 2013). Решая проблему неустойчивости полноразмерной вставки M2e, Carignan и соавт. (Carignan et al., 2015) укоротили эпитоп до 9 а.о. (EVETPIRNE) и вставили его в N-конец, что позволило получить высокостабильные и иммуногенные ВПЧ, обеспечивающие защиту мышей после однократной иммунизации.

Для преодоления ограничений генетического слияния (нестабильность, размерные ограничения) группа Leclerc разработала универсальную платформу на основе ферментативной конъюгации с использованием бактериальной транспептидазы сортазы A (SrtA) (Therien et al., 2017). Суть метода заключается в том, что к заранее собранным ВПЧ ВМПап, сконструированным для экспрессии мотива узнавания SrtA (LPETGG), с помощью фермента ковалентно

присоединяются синтезированные отдельно пептиды. Этот подход позволил эффективно и специфично конъюгировать длинные пептиды (26–39 а.о.), такие как М2е гриппа и Т20 ВИЧ–1, которые проблематично было вставлять генетически. Метод был успешно масштабирован для полноразмерных белков: конъюгация с ВПЧ ВМПап значительно усилила гуморальный и CTL–ответ на антигены NP гриппа и Gag вируса иммунодефицита обезьян (Laliberte-Gagne et al., 2019), причем соединение антигенов с N–концом БО индуцировало значительно более сильный иммунный ответ по сравнению с C–концом, что было связано с лучшей доступностью для иммунных клеток.

Платформа на основе ХВК была успешно использована для презентации широкого спектра гетерологичных антигенов. Santa Cruz и соавт. (Baulcombe et al., 1995; Cruz et al., 1996) впервые создали химерные вирионы ХВК, экспрессирующие GFP на N–конце БО, используя стратегию рибосомного пропуска 2А для генерации мозаичных частиц. Этот подход был позже применен для презентации бактериальных и вирусных эпитопов, включая VP6 ротавируса (O'Brien et al., 2000) и консервативный эпитоп ВИЧ–1 gp41 ELDKWA, который индуцировал нейтрализующие антитела (Marusic et al., 2001). Пептид D2, полученный из фибронектин–связывающего белка (FnBP) *S. aureus*, остатки 1–38, был добавлен к N–концу белка оболочки ХВК, и химерные вирионы индуцировали высокие титры FnBP–специфических антител у мышей (Brennan et al., 1999).

Лико и соавт. продемонстрировали, что химерные вирионы ХВК, презентующие CTL–эпитоп 366–ASNENMETM–374 из нуклеопротеина вируса гриппа А, способны активировать эпитоп–специфичные CD8⁺ Т–клетки без использования адъюванта, подтверждая потенциал платформы ХВК для индукции клеточно–опосредованного иммунитета (Lico et al., 2009). В другом исследовании, Cerovská и соавт. использовали вектор ХВК для экспрессии эпитопа (а.о. 108–120) белка оболочки L2 ВПЧ–16 в виде N– или C–концевого слияния с БО ХВК в трансгенных растениях *N. benthamiana* (Cerovska et al., 2012). N–концевая конструкция показала значительно более высокую

эффективность: она обеспечивала высокий выход рекомбинантного белка из листьев, формировала частицы и индуцировала специфические антитела у мышей после подкожной иммунизации, в отличие от С–концевой версии. Эти работы подчеркивают критическую важность выбора сайта вставки (N–конец vs С–конец) для стабильности, сборки и иммуногенности химерных вирионов ХВК.

9.2. Потивирусы.

Первая успешная попытка использовать потивирус оспы сливы для презентации антигена из 15 аминокислот собачьего парвовируса (CPV) привела к созданию химерного вируса, способного индуцировать высокие титры антител к CPV у мышей и кроликов (Fernandez-Fernandez et al., 1998). Генетически измененные БО потивирусов Johnson grass mosaic virus (JGMV) (Jagadish et al., 1993) и Papaya ringspot virus (PRSV), экспрессированные в *E.coli*, использовали в качестве носителей чужеродных пептидов–антигенов (Chatchen et al., 2006). Показано, что такие ВПЧ из PRSV, с пептидом 87-NSENGTCYPGDFIDYEELREQLSSVS-SFEKFEIF-120 гемагглютиниона вируса гриппа (HA1-цепи), сравнимы по эффективности с гриппозной трехвалентной вакциной (Cardenas-Vargas et al., 2016).

Гибридные вирусоподобные частицы, сконструированные на основе БО JGMV, успешно продуцировались в системе *Escherichia coli* при вставке чужеродных последовательностей в N– и/или С–концевые области белка. В качестве вставляемых фрагментов использовались октопептидный эпитоп *Plasmodium falciparum* и белок Е вируса японского энцефалита (Jagadish et al., 1993; Saini & Vрати, 2003). Аналогичным образом, химерные ВПЧ YBK, содержащие в N–концевой области БО эпитоп preS1 вируса гепатита В или полноразмерный белок рубредоксин, были получены в препаративных количествах с использованием той же бактериальной системы экспрессии (Kalnciema et al., 2012). Применение альтернативной системы экспрессии на основе вектора ХВК позволило получать в растениях химерные ВПЧ вируса АВК, демонстрирующие на своей поверхности пептиды Е7 и L2 вируса

папилломы человека типа 16, слитые с N– или C–концами капсидного белка (Cеровска et al., 2008). В другом исследовании 20–аминокислотный пептид, производный от рецептора 3 фактора роста эндотелия сосудов человека, был вставлен в N–концевую область БО ВМТу на поверхности капсидов, продуцированных в условиях вирусной инфекции (Sanchez et al., 2013). В большинстве случаев антигены, представленные либо на химерных капсидах потивирусов, либо на ВПЧ, индуцировали выраженный иммуногенный ответ у экспериментальных животных (Jagadish et al., 1996; Kalnciema et al., 2012; Saini & Vratil, 2003) (Fernandez-Fernandez et al., 1998; Sanchez et al., 2013), при этом уровень иммуногенности существенно зависел от сайта вставки чужеродного эпитопа. ВПЧ ВМТу также применялись для экспрессии пептидов, производных от человеческого тромбинового рецептора (TR), вставленных в N–концевую область БО; такие частицы продемонстрировали способность к логарифмическому усилению детекции антител, специфичных к целевому пептиду (Gonzalez-Gamboa et al., 2017). На основе детальных структурных данных была успешно проведена мультифункционализация наночастиц ВПЧ ВМТу путём химической конъюгации по остатку цистеина в мотиве WCIENG и мультидериватизации нескольких лизиновых остатков на поверхности вириона без нарушения сборки или стабильности частиц (Yuste-Calvo C, 2019). Сочетание химических и генетических методов модификации подтвердило высокий потенциал частиц на основе потивирусов для реализации различных нанотехнологических стратегий.

Другим перспективным направлением в создании вакцин является использование сферических структурно модифицированных частиц (СМЧ), полученных термической обработкой палочковидного вириона ВТМ. Такие СМЧ были однородными по форме, стабильными, содержали значительное количество β – и кросс– β – структур, аминокислотный состав их поверхности отличался от вирионов повышенной гидрофобностью (Atabekov et al., 2011; Ksenofontov et al., 2019). Наличие таких свойств СМЧ позволило их использовать для получения комплексов с рекомбинантными антигенами коронавируса,

вируса краснухи, ротавируса, возбудителя сибирской язвы и вируса птичьего гриппа (Kondakova et al., 2022). Структурно модифицированные частицы также были получены при термической обработке нескольких нитевидных вирусов – ВМАльт, ХВК, и АВК, белки которых в отличие от ВТМ содержат малоупорядоченные N–концевые домены (Ksenofontov A., 2016; Tatiana I. Manukhova et al., 2021; Nikitin et al., 2016).

10. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ И ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЙЯНИЯ (МУРР).

Основная задача структурных исследований в молекулярной биологии заключается в выявлении связи между структурой и функциональными свойствами биологических макромолекул. В последние годы значительный объём данных о структуре макромолекул был получен благодаря применению методов крио-ЭМ, ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и кристаллографии. Тем не менее, эти методы высокого разрешения предъявляют особые требования к условиям эксперимента: использование ЯМР на практике ограничено верхней границей молекулярной массы образца - она не должна превышать 50 кДа, методы крио-ЭМ требуют заморозки объектов, процесс кристаллизации белков нередко оказывается неосуществимым.

В качестве действенной альтернативы выступает метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), который даёт возможность исследовать структурные характеристики биологических объектов непосредственно в растворе - с контролем температуры, уровня pH, солевого состава и иных параметров среды. При этом МУРР позволяет установить общую форму биологических макромолекул, хотя и с относительно низким разрешением.

Теоретические основы метода малоуглового рассеяния были заложены в классических трудах А. Гинье конца 1930-х годов (Guinier, 1939; Guinier A., 1955). В этих работах продемонстрировано, что метод предоставляет сведения не только о размерах и морфологии частиц, но и о внутренней организации

систем с частичной или полной неупорядоченностью. В ходе изучения сплавов А. Гинье установил: центральная область дифракционной картины демонстрирует выраженное рассеяние, если в материале присутствуют высокодисперсные зёрна размером в десятки нанометров (Guinier A., 1955).

Существенный прорыв в экспериментах с применением МУРР случился в 1970-е годы — он был обусловлен разработкой источников синхротронного (СИ) и нейтронного излучения. Синхротронное излучение имеет ряд преимуществ перед излучением традиционных рентгеновских трубок, среди которых: существенно более высокая интенсивность непрерывного рентгеновского спектра, чёткая направленность пучка, а также отсутствие характеристических линий в спектре СИ.

Данный метод не требует предварительной специальной подготовки образца и позволяет проводить исследования в условиях, близких к физиологическим. С помощью МУРР возможно изучение наноразмерных структур как упорядоченных и частично упорядоченных, так и неупорядоченных объектов в различных агрегатных состояниях.

Основная концепция МУРР заключается в том, что рассеивающий объект можно представить, как совокупность частиц, внедрённых в матрицу, причем рассеивающая способность частиц отличается от матрицы (частицы имеют контраст по отношению к матрице). Рассеивающая способность частиц для рентгеновских лучей описывается распределением электронной плотности $\rho(\mathbf{r})$, так как рентгеновское излучение рассеивается на электронах. Эффективная рассеивающая способность частиц задается разницей $\Delta\rho(\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{r}) - \rho_s$, где ρ_s является постоянной электронной плотностью матрицы.

Амплитуду рассеяния и электронную плотность связывает преобразование Фурье

$$A(s) = \int \Delta\rho(r) \exp(isr) \quad (1)$$

где $s = \frac{4\pi\sin\theta}{\lambda}$ — модуль вектора рассеяния, 2θ — угол рассеяния, λ — длина волны излучения.

В эксперименте (Рис.9) сфокусированный пучок рентгеновских фотонов попадает на раствор макромолекул, при этом интенсивность упругого рассеяния записывается как функция угла рассеяния. В результате измеряется интенсивность, пропорциональная числу фотонов, рассеянных в направлении $\mathbf{k}_1$, а вектор $\mathbf{s}$ соответствует разности волновых векторов рассеянной и падающей волн (Glatter O., 1982).

По уравнению Вульфа—Брэгга размер рассеивающего объекта $d = \frac{2\pi}{s}$. Из этого уравнения следует, что рассеяние в малых углах несет информацию о достаточно крупных по сравнению с длиной волны излучения рассеивающих объектах.

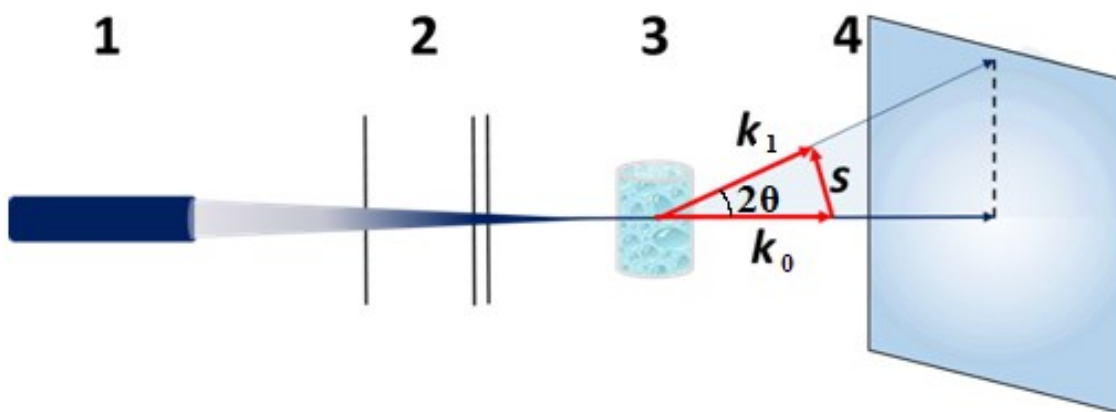


Рис. 9. Схема малоуглового эксперимента: источник излучения (1); система формирования пучка (2); камера держателя образца (3); детектор (4).

МУРР позволяет исследовать объекты, размер которых составляет от 1 до 100 нм, и благодаря этому применимо для материалов, которые используются в новейших нанотехнологиях и современной биологии. В качестве источников излучения используются лабораторные установки с рентгеновскими трубкам или синхротронное излучение высокой интенсивности (Svergun et al., 2013a; Свергун, Фейгин, 1986). В лабораторных установках, таких как АМУР–К, рентгеновское излучение возникает при возбуждении атомов металлов электронами с энергией $10^4 - 10^5$ эВ. Этот эффект реализован в рентгеновской трубке, которая представляет собой вакуумный сосуд с прямонакальным

катодом и заземленным анодом. На катод подается высокое ускоряющее напряжение порядка нескольких десятков кэВ, а анод является мишенью для ускоренных электронов. В результате торможения электронов об анод возникает тормозное рентгеновское излучение с характерным для материала анода энергетическим спектром. Как правило, для экспериментов по малоугловому рассеянию используются рентгеновские трубки с анодами из Cu, Mo, Ni.

Источники синхротронного излучения представляют собой кольцевые ускорители–накопители, где пучки электронов высокой энергии циркулируют в течение длительного времени. Ток в кольце может поддерживаться почти постоянным благодаря периодической инжекции новых электронов. Ключевые преимущества синхротронного излучения включают исключительно высокую интенсивность, линейную поляризацию в плоскости орбиты, широкий непрерывный спектр энергий и периодическую структуру импульсов, что делает его идеальным источником для рентгеновских исследований. Специальные устройства ондуляторы создают когерентное и коллимированное (параллельность лучей) излучение с высокой яркостью, генерируя узкие спектральные линии с малой угловой расходимостью. Они состоят из последовательности дипольных магнитов с переменной полярностью, установленных на прямолинейных участках кольца. Электроны, двигаясь по синусоидальной траектории в магнитном поле, излучают фотоны в узкий конус вдоль оси пучка. В данной работе использовалась станция P12 накопительного кольца Petra III, с длиной кольца 2,3 км (синхротрон DESY, Гамбург), которая характеризуется следующими параметрами: источником служит ондулятор, энергия регулируется в диапазоне 4–20 кэВ (для большинства измерений используется 10 кэВ, $\lambda = 0,124$ нм), интенсивность пучка достигает 10^{13} фотон/с, детектор – Pilatus 2M (DECTRIS), диапазон измеряемых векторов рассеяния составляет $0,08$ – $4,5$ нм⁻¹, длина пути пучка – 83 м (вся трасса под вакуумом), температура контролируется в диапазоне 7–55°C, и имеется оборудование для автоматической смены образцов. Таким образом, использование синхротронного излучения позволяет проводить эксперименты МУРР с

беспрецедентно высокой интенсивностью, скоростью и качеством данных (Blanchet et al., 2015; Svergun et al., 2013a).



Рис. 10. Малоугловая станция P12 накопительного кольца Petra III, синхротрон DESY (Гамбург, Германия).

В ряде экспериментов МУРР проводили на станции БиоМУР Курчатовского ИСИ (НИЦ «Курчатовский институт», Москва) в геометрии на пропускание (Peters, 2022, 2019).

Первичная обработка данных проводится с помощью программы PRIMUS, которая включает нормализацию, калибровку, вычитание фона и определение инвариантов с помощью графиков в координатах Гинье и Кратки (Konarev et al., 2003). Инвариантами называют структурные характеристики образца, которые могут быть в явном виде выражены через интенсивность МУРР. Важно, что вычисление инвариантов при правильно проведенном эксперименте не требует никакой априорной информации о частицах в системе.

Интенсивность рассеяния в нулевой угол $I(0)$ определяется из наклона прямолинейного участка графика Гинье – $\ln(I)$ от s^2 и характеризует общее количество рассеивающей материи. Помимо этого, она пропорциональна молекулярной массе рассеивающей частицы.

Молекулярная масса также является инвариантом и для белка может быть определена из экспериментальных данных малоуглового рассеяния по формуле: $\frac{MM}{MM_{BSA}} = \frac{I(0)}{I(0)_{BSA}}$, где MM – молекулярная масса исследуемого белка, $I(0)$ – интенсивность рассеяния в нулевой угол. Кривые МУРР для бычьего сывороточного альбумина (BSA) являются эталонными и молекулярная масса для него известна ($MM_{BSA}=66$ кДа).

Одним из инвариантов МУРР является радиус инерции R_g , который определяется с использованием приближения Гинье по начальному участку кривой рассеяния по формуле (Svergun et al., 2013a)

$$I_{exp}(s) = I(0) \exp\left(-\frac{s^2 R_g^2}{3}\right) \quad (2)$$

Радиус инерции является геометрической характеристикой, которая несет информацию о распределении материи относительно центра масс рассеивающего объекта и характеризует его средний размер.

График в координатах Кратки ($s^2 I(s)$ от s) позволяет определить компактность белка в растворе. Интенсивность рассеяния от глобулярного белка спадает примерно как s^{-4} , при этом график Кратки выглядит в форме колокола, с хорошо выраженным максимумом. Рассеяние от развернутых белков имеет существенно меньший спад, примерно, как s^{-2} , следовательно, чем менее график Кратки становится похожим на колоколообразную зависимость, тем менее компактным и структурированным является образец.

Для анализа частично упорядоченных систем используется программа РЕАК, определяющая размер упорядоченных областей и степень разупорядоченности (Konarev et al., 2003). Размер области кристалличности L (аналог области когерентного рассеяния в РСА) определяется из полуширины максимума интенсивности первого брэгговского пика в угле $2\theta_1$, используя формулу Шеррера:

$$L = \frac{\lambda}{\beta_s \cos \theta_1}, \quad (3)$$

и степень разупорядочения в образце Δ/d_1 определяется как:

$$\Delta/d_1 = \frac{1}{\pi} \cdot \sqrt{\frac{\beta_s \cdot d_1}{\lambda}}, \quad (4)$$

где $d_1=2\pi/s_1$ – период структуры, межплоскостное расстояние, β_s – полная ширина на полувывсоте максимума интенсивности рассеяния (в радианах), наблюдаемого на угле рассеяния $2\theta_1$, соответствующего волновому вектору s_1 , а Δ – среднеквадратичное отклонение от расстояния между ближайшими регулярно упакованными структурными мотивами. С помощью программы РЕАК можно определить площадь под пиком, которая отражает общее количество структурированных областей в образце.

Для многокомпонентных систем интенсивность рассеяния представляет собой линейную комбинацию вкладов от каждой компоненты (Mertens & Svergun, 2010). Такие системы могут включать частицы разного размера и формы, например, олигомерные смеси. Структурные параметры (например, Rg) определяются как усредненные величины (Mertens & Svergun, 2010).

Вычислительные методы позволяют получать трёхмерные модели низкого разрешения *ab initio* или с использованием молекулярной тектоники (метод моделирования твердыми телами) (Konarev et al., 2001; Petoukhov & Svergun, 2005). Для восстановления формы нанообъекта в растворе по данным МУРР с применением *ab initio* протокола и программы DAMMIN (Svergun, 1999) необходимо определение функции распределения по расстояниям (парной функции). С физической точки зрения функция парных расстояний описывает количество всевозможных расстояний между двумя точками в частице на интервале $[0, D_{\max}]$, где $D_{\max}$ – наибольшее расстояние между двумя точками внутри частицы, то есть ее максимальный размер. Таким образом, $p(0)=0$ и $p(D_{\max})=0$. Функции распределения по расстояниям $p(r)$ вычисляют по экспериментальным данным из интенсивности рассеяния с помощью программы обратного косвенного Фурье–преобразования (диалоговая программа GNOM (Svergun, 1992), используя интегральное уравнение

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty sr I(s) \sin(sr) ds, \quad (5)$$

где $I(s)$ – интенсивность МУРР, соответствующая волновому вектору s .

Программа DAMMIN представляет исследуемый объект в виде совокупности виртуальных атомов, расположенных в сфере, диаметр которой равен максимальному размеру объекта, $D_{\max}$, определяемому из функции распределения по расстояниям $p(r)$. Начиная с произвольной конфигурации виртуальных атомов, программа методом отжига строит модель так, чтобы минимизировать расхождение χ^2 между экспериментальными данными $I_{\exp(s)}$ и кривой рассеяния, рассчитанной для модели:

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_j \left[\frac{I_{\exp}(s_j) - c I_{\text{calc}}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right]^2, \quad (6)$$

где N – число экспериментальных точек, $I_{\exp}(s_j)$ и $\sigma(s_j)$ – экспериментальные интенсивности и их ошибки, $I_{\text{calc}}(s_j)$ – интенсивность, вычисленная от модели, c – шкалирующий множитель.

Для уменьшения проблемы неоднозначности решений в МУРР (Volkov, 2003) процедуру *ab initio* восстановления структуры по данным малоуглового рассеяния применяют к каждому образцу многократно, и полученные модели усредняют (программа DAMAVER).

Реконструкция трехмерной формы частиц в растворе по одномерной кривой малоуглового рентгеновского рассеяния – достаточно нетривиальная задача, впервые к решению которой приступили в 1960-х годах. В тот период экспериментальные кривые рассеяния сопоставляли с расчетными кривыми для простых геометрических фигур или шариковых моделей. В последующие десятилетия этот эмпирический подход был заменен благодаря использованию сферических гармоник, предложенных Штурманом (Stuhrmann, 1978). Использование суммы сферических гармоник для описание картины МУРР позволяет быстро проводить для известных структур аналитический расчет кривой МУРР, и эти подходы до сих пор применяется в современных подходах (Svergun, 1999).

Таким образом, метод малоуглового рассеяния представляет собой универсальный структурный подход для исследования широкого круга объектов, таких как биополимеры, наноккомпозиты, и биоматериалы. МУРР позволяет проводить исследования в широком диапазоне молекулярных масс от единиц кДа до ГДа в различных экспериментальных условиях. Современные методы интерпретации данных МУРР дают возможность восстанавливать четвертичную структуру макромолекул без исходной информации о строении объектов. МУРР в комбинации с методами высокого разрешения (рентгеновская кристаллография и ЯМР) позволяет выполнять гибридное моделирование для определения, например, расположения субъединиц в белковом комплексе, а также дает возможность количественно описывать равновесные смеси и неупорядоченные системы. Такие исследования стали возможны благодаря совершенствованию способов интерпретации экспериментальных данных МУРР и развитию оборудования для экспериментов, и в первую очередь за счет высокой яркости источников синхротронного излучения.

В литературе крайне мало работ, где описано применение методов МУРР для изучения растительных вирусов. В работе Costa (Costa et al., 2016) методом МУРР был измерен препарат палочковидных вирионов ВТМ на малоугловой линии BM29, (ESRF, Гренобль, $\lambda = 0,99 \text{ \AA}$) и получена кривая рассеяния вириона при концентрации вируса в 26 мг/мл, т.е. в 4 раза выше используемой нами (Ксенофонтов et al., 2020). С помощью трехцилиндровой модели вириона авторам удалось воспроизвести лишь первые два максимума пиков $s1$ и $s2$ из семи на экспериментальной кривой рассеяния.

Ранее, в работе (Hiragi et al., 1988) методом МУРР изучали препарат агрегатов белка ВТМ, сформированных в растворе с pH 7,2, ионной силе 0,1-0,2М при температуре 15-25°C на малоугловой линии (Photon Factory, КЕК, Tsukuba, Japan, $\lambda = 1,49 \text{ \AA}$). Приближение было выполнено авторами с использованием цилиндрической модели 20S-диска с наружным и внутренним диаметрами 18 и 4 нм с двумя слоями толщиной 0,23 нм с радиусом инерции $R_g=6,65$ нм. Препарат оказался в значительной степени полидисперсным,

содержащим в основном двух- и четырехслойные агрегаты и, с ростом ионной силы, температуры и концентрации, достигал $R_g=8,56$ нм в 100 мМ фосфатном буфере при 25 °C и 12 мг/мл, что близко к нашей модели РП $(AA)_4$ с $R_g=8,87$ нм (Ксенофонов et al., 2020). В последующей работах данной лаборатории с помощью МУРР сравнивали кинетику реконструкции из белка и РНК вирионов ВТМ и вируса зеленой крапчатой мозаики огурца по изменению величины R_g и показали, что для ВТМ скорость сборки значительно выше (Sano et al., 1999). Кинетику образования спиральных «завитков», возможных интермедиатов сборки ВТМ, и длинных спиральных РП в кислой среде изучали в работе Потчки и Шустер (Potschka et al., 1988) на линии DORIS-I (DESY, Гамбург, $\lambda=1,50\text{\AA}$).

В пионерской работе Emeterio (Emeterio and Pollack, 2020) авторы разработали метод контрастно-вариационного МУРР (CV-SAXS). На примере сферического бактериофага MS2 они демонстрируют, что метод позволяет селективно детектировать структуру РНК внутри вирусной частицы, полностью экранированной белковой оболочкой. Показано, что добавление сахарозы до концентрации около 60% обеспечивает подавление сигнала от капсидных белков, в результате чего в рассеянии доминирует вклад только от упакованной РНК. Полученные методом CV-SAXS структурные характеристики инкапсидированной РНК хорошо согласуются с данными крио-ЭМ. Таким образом, CV-SAXS представляет собой перспективный подход для изучения динамики упаковки РНК в процессе сборки вирусов и может быть использован для скрининга соединений, влияющих на этот процесс.

Возможности метода МУРР применительно к нитевидным и частично неупорядоченным вирусам растений проиллюстрированы в настоящей работе.

11. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ МЕТОДА ТРИТИЕВОЙ ПЛАНИГРАФИИ.

Современные успехи в изучении множества биологических процессов на молекулярном уровне стимулировали поиск и разработку новых подходов к определению размеров и состава поверхности взаимодействующих компонентов

системы, изучению механизмов специфического белок-белкового и белок-нуклеинового взаимодействия при изучении структуры надмолекулярных систем. Особый интерес и ценность представляют методы, позволяющие получать информацию о «топографии доступной поверхности биологической системы». Термин, предложенный Ли и Ричардсом в 1971 году (Lee & Richards, 1971), обозначает поверхность объекта, на которой располагаются центры контакта сферической пробы (для воды 1,4 Å). Для белков и более сложных биологических систем широко применяются подходы, связанные с введением различных модифицирующих агентов и зондов. Однако структурная информация, получаемая в этом случае, относится лишь к ближайшему окружению метки, локальным фрагментам объекта, и ничего не говорит о структуре объекта в целом. Кроме того, при введении различных зондов не исключены возмущения, искажающие исходную структуру объекта. Существуют другие подходы, основанные на использовании радиоактивных меток. В таких методах получают данные о структуре непосредственно из способа введения метки, и определяется доступность фрагментов в структуре для данного тестирующего агента. К этой группе относится метод тритиевой планиграфии (ТП), используемый в нашей работе.

В основе данного подхода лежат химические реакции с участием горячих атомов трития; подобраны условия, при которых реакция, приводящая к включению метки, происходит при однократном столкновении и характеризует стерическую доступность связи С-Н в составе вириона. Получаемые с помощью этого метода данные о стерической доступности компонентов системы характеризуют структуру всего объекта.

По сути, метод тритиевой планиграфии - это метод химической (радиоизотопной) модификации. Его главные преимущества: неселективность (водород равномерно распределён в белке), отсутствие структурных возмущений (тритий – изотоп водорода), высокое разрешение благодаря малому диаметру атома (0,9 Å), а также сравнительная простота удаления лабильного изотопа

Существуют различные способы введения тритиевой метки. В методе ТП для генерации реакционноспособных атомов трития используется термическая диссоциация (атомизация) его молекул в специальной физической установке. Изначально это устройство было предложено Лэнгмюром, который в начале XX века изучал термическую диссоциацию двуатомных газов.

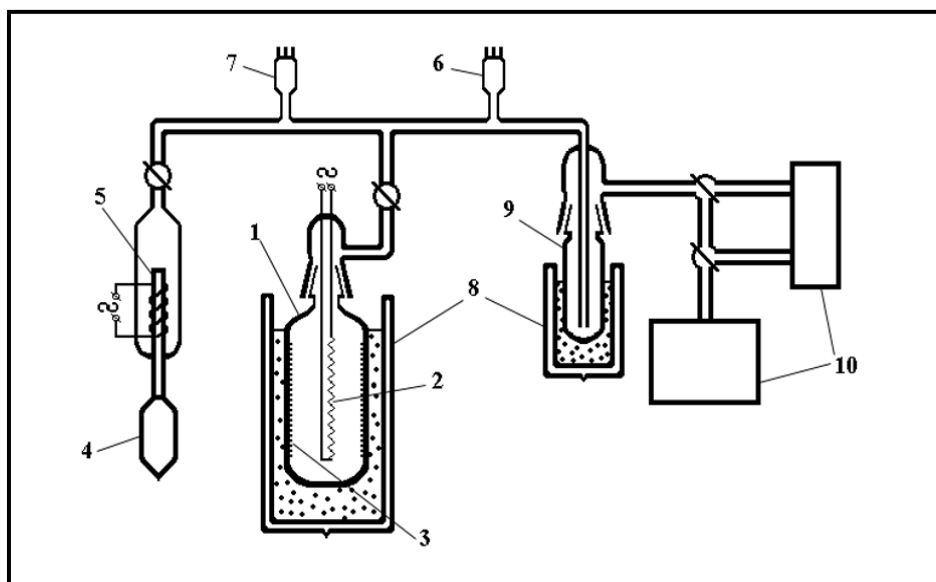


Рис. 11. Принципиальная схема установки для тритиевого мечения. 1 – реакционный сосуд, 2 – вольфрамовая нить (проволока), 3 – мишень (образец для мечения), 4 – сосуд с газообразным тритием, 5 – палладиевая трубка, 6 и 7 – вакуумные детекторы, 8 – сосуды с жидким азотом, 9 – ловушка, 10 – вакуумные насосы

На рисунке 11 приведена схема установки, используемой во всех экспериментах в методе тритиевой планиграфии. Реактор (1) - представляет собой стеклянный сосуд цилиндрической формы, вдоль оси которого натянута вольфрамовая нить (2), нагреваемая электрическим током - центральный узел установки. Белковая мишень в виде тонкой пленки (3) наносится на боковые стенки сосуда, охлаждаемого жидким азотом (8). Реактор вакуумируют до остаточного давления 10-5 мм рт. ст. (10-3 Па) и затем в систему подается газообразный тритий. В обычно используемых реакционных сосудах диаметром 60-65 мм давление молекулярного трития составляет около $5 \cdot 10^{-3}$ мм рт. ст. (0,5-1 Па). При использовании спирали от электролампы (150 Вт, 127 В)

интегральный поток атомов при 2000 К составляет примерно $3 \cdot 10^{16}$ атом/мин (Шишков А.В., 1994). Механизм атомизации заключается в растворении и диссоциации молекулярного водорода в объеме вольфрама с выходом на поверхность атомов водорода, которые при высокой температуре практически сразу покидают поверхность. Сорбция на поверхности уменьшается, а объемная концентрация возрастает с увеличением температуры, так что при 2000 К на поверхности вольфрама практически отсутствует сорбированный водород. Атомы трития с начальной энергией $E \sim 0,3$ эВ реализуют два альтернативных сценария: при первом столкновении они либо отрывают водород с замещением на тритий, либо теряют энергию и переходят в инертное состояние. Поэтому даже одно нерекционное столкновение уменьшает энергию ниже пороговой для реакции отрыва, т.е. судьба атома трития определяется сразу же при первом столкновении. Именно это делает метод ТП методом изучения поверхностного слоя молекулы. Можно сказать, что метод ТП дает «образ» доступной поверхности белковой глобулы так, как ее «видит» атом трития, бомбардирующий мишень в условиях прямого пролета. Этот образ сам по себе достаточно информативен и не нуждается в дополнительной корректировке. Данные тритиевой планиграфии, однако, могут интерпретироваться и в терминах, принятых для описания доступной поверхности в терминологии Ли и Ричардса. При этом наилучшее соответствие достигается при аппроксимации в расчетах атома трития сферой с радиусом $0,9 \text{ \AA}$ (Bogacheva et al., 1994). Внутримолекулярное распределение трития по аминокислотным остаткам коррелирует с третичной структурой белка (Gedrovich et al., 1993), что было впервые продемонстрировано при изучении методом термической активации меченого миоглобина. Этот эксперимент и ранее наблюдавшаяся на пептидах зависимость включения метки от пространственной структуры, предопределили создание нового экспериментального метода изучения топографии доступной поверхности белковых макромолекул и надмолекулярных комплексов - метода тритиевой планиграфии (Шишков А.В., 1994).

Общий принцип метода ТП представлен на рисунке 12.

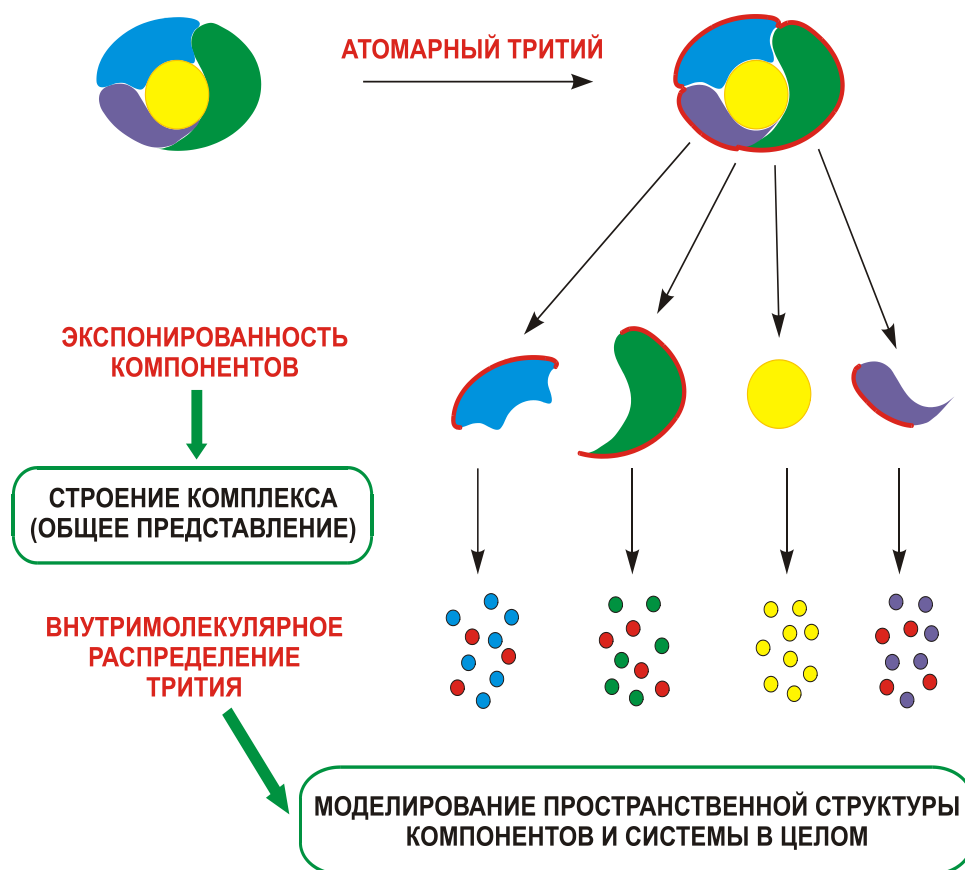


Рис. 12. Принцип метода тритиевой планиграфии.

Этот подход также успешно применялся для прямого исследования доступных поверхностей белков в ряде макромолекулярных комплексов, включая вирусы растений и животных, рибосомы и биологические мембраны (Agafonov et al., 1997; Baratova et al., 2001; Baratova et al., 1992; Goldanskii et al., 1988; Kordyukova et al., 2001; Shishkov et al., 1999; Shishkov et al., 2002; Tsetlin et al., 1988, Badun et al., 2003; Lukashina et al., 2001).

В данной работе была проведена адаптация разработанного в нашей стране метода тритиевой планиграфии «Химия горячих атомов трития как основа метода исследования поверхностных молекулярных слоев и структуры биополимеров» (Государственная премия РФ 2000г) для изучения топографии поверхности нитевидных растительных вирусов. В рамках этой задачи была разработана методика проточного измерения радиоактивности меченых 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).

Нами совместно с коллегами из Института белка РАН (Пущино на Оке) был также предложен новый способ приготовления мишени, позволяющий исключить артефакты, связанные с кристаллизацией воды и адсорбцией вещества на поверхности раздела фаз. Раствор или суспензию вещества по каплям вносили в жидкий азот. Образовавшиеся частички льда растирали непосредственно в жидком азоте, и полученную «кашицу» наносили на стенки реактора. Жидкий азот быстро выкипал, а частички льда оставались плотно «прилипшими» к стенкам реактора. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности предложенного способа, однако для его реализации требуются определенные навыки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Материалы

В работе были использованы: деионизованная вода, очищенная с помощью системы Milli-Q (Millipore, США), додецилсульфат натрия (Sigma, США), акриламид (ICN, США), метилбисакриламид (ICN, США), персульфат аммония (ICN, США), глицин (ICN, США), полиэтиленгликоль-6000 (Serva, Германия), Трис-(гидроксиметил)-аминометан (Sigma, США), Hepes кислота (Amresco, США), глицерин (Panreac, Испания), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva), CAPS, H_2SO_3 , LiCl, NaCl, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaOH, бромфеноловый синий, борная кислота, уксусная кислота, азотная кислота, хлороформ, бутанол, этанол, сахароза отечественного производства имели классификацию о.с.ч. или х.ч. В работе также использовали ферменты: трипсин (Promega, США), ТСРК-трипсин (Sigma, США), наборы белковых маркеров (Bio-Rad, США).

2. Выделение вирусных препаратов и их компонентов

Препарат вируса табачной мозаики (ВТМ), штамм U1 любезно предоставлен проф. Е.Н. Добровым. Выделение белка оболочки из препаратов дикого (U1) штамма ВТМ проводили либо стандартным солевым методом, либо ацетатным методом.

а) солевой метод («LiCl-метод») (Goodman, 1975). К нескольким мл суспензии вируса добавляли $\frac{1}{3}$ объема насыщенного (~13 М) раствора хлористого лития, смесь тщательно перемешивали и инкубировали в течение 5 часов (или ночи) при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Затем суспензию центрифугировали при 12000 g в течение 20 минут на центрифуге «Beckman J2-21» в роторе JA 20. Супернатант, содержащий вирусный белок, переносили в диализный мешок и диализовали при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ против трех смен (по 2-3 литра) 2 мМ Трис-HCl, 7,5. Для удаления возможной примеси вируса препарат после диализа подвергали ультрацентрифугированию на центрифуге «Beckman L5-50» в роторе Ti 50 (90 минут при 105000 g).

б) ацетатный метод (Fraenkel-Conrat, 1957). К суспензии вирионов, помещенной в ледяную баню, добавляли, помешивая, по каплям двойной объем охлажденной ледяной уксусной кислоты до полного разрушения вирионов и выпадения осадка РНК. Хлопьевидный осадок РНК отделяли центрифугированием при 16000 об/мин и +4 °С в течение 20 мин на центрифуге «Beckman J2-21» в роторе JA 20. К прозрачному супернатанту, содержащему белок оболочки, добавляли равный объем холодной деионизированной воды и диализовали в течение суток против двух-трех смен дистиллированной воды (по 3 л) при +4°С. При достижении рН 4,5 (что соответствует изоэлектрической точке белка оболочки ВТМ) белок выпадал в осадок, который собирали центрифугированием при 18000 об/мин в течение 20 мин на центрифуге «Beckman J2-21». Осадок растворяли в PBS. Белок осветляли центрифугированием при 16000 об/мин в течение 20 мин на центрифуге «Beckman J2-21». Выход белка составлял обычно 50-70% от расчетного. Для получения 20S дисков БО ВТМ инкубировали в 0,05 М Na-фосфатном буфере (рН 7,0). Для реполимеризации БО ВТМ в вирусоподобные частицы (ВПЧ) препараты с концентрацией 1,5-5 мг/мл выдерживали 5-7 суток для формирования «стопок дисков» при + 12 °С и центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин (22R Beckman Coulter centrifuge).

Препарат А-вируса картофеля (изолят В11) предоставлен Ярвекуль Л. (Järvekülg Lilian, Таллиннский технологический университет) и очищен, как описано нами ранее (Baratova et al., 2001). Белок оболочки АВК выделяли, используя стандартный LiCl-метод (см. выше). Белок-содержащий супернатант диализовали при 4°С против 5 мМ Трис-НСl, рН 7,8 (“рН 7,8-буфер”) или 5 мМ CAPS, рН 10,5 с 0,5 М NaCl (“рН 10,5-буфер”). Препараты Х-вируса картофеля (UK3), мутанта ХВК-ST, вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт) и транспортного белка ТГБ1 (ТГБ1) предоставлены лабораторией проф. О.В. Карповой. Белок оболочки (БО) ХВК был выделен из вируса высаливанием с помощью литиевого метода, как описано в работе Карповой и сотр. (Karpova et al., 2006).

3. УФ-спектроскопия

УФ-спектры препаратов ХВК, ВТМ, БО ХВК, БО ВТМ, РНК или их смесей измеряли в кюветах с длиной оптического пути 0,1-1,0 см на спектрофотометрах «Hitachi UV-2600» или «Shimadzu UV-1601» (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Япония) в области 240-350 нм. При расчете соответствующих коэффициентов поглощения использовали программу Sednterp (<http://sednterp.unh.edu/>). Истинные спектры поглощения (E) светорассеивающих суспензий вычисляли по методу экстраполяции (см. ниже). Для определения концентрации использованных в работе препаратов использовали следующие коэффициенты поглощения: $E^{0,1\%}_{260 \text{ nm}} = 2,3$ для АВК и $E^{0,1\%}_{280 \text{ nm}} = 0,99$ для БО АВК; $E^{0,1\%}_{260 \text{ nm}} = 2,40$ для ХВК и ВМАЛЬТ и $E^{0,1\%}_{280 \text{ nm}} = 1,20$ для их БО; $E^{0,1\%}_{260 \text{ nm}} = 2,30$ для ВТМ и $E^{0,1\%}_{280 \text{ nm}} = 1,30$ для БО ВТМ; $E^{0,1\%}_{260 \text{ nm}} = 25$ для РНК (Goodman, 1975). Все представленные коэффициенты соответствуют истинным значениям поглощения за вычетом светорассеяния.

4. Определение истинного поглощения светорассеивающих суспензий методом экстраполяции

В случае светорассеивающих препаратов спектры истинного поглощения рассчитывали с помощью метода экстраполяции (Dobrov et al., 1977; Ksenofontov et al., 2006). Сущность этого метода сводится к следующему. Спектр поглощения препарата записывается в достаточно широком диапазоне длин волн, включающем и тот интервал, в котором исследуемый материал не имеет собственного поглощения, а регистрируемое прибором поглощение обусловлено лишь светорассеянием. Полученный спектр – зависимость поглощения от длины волны – пересчитывается в двойные логарифмические координаты. Зависимость интенсивности рассеянного света от длины волны носит степенной характер. Поэтому пересчитанный спектр в области чистого рассеяния окажется прямой линией с угловым коэффициентом ≤ 4 (для крупных агрегатов эта величина может уменьшаться до $\sim 2,5$). Экстраполируя эту прямую на весь интервал регистрации и вычитая из спектра вклад, обусловленный светорассеянием,

получаем истинное поглощение препарата. Нуклеиновые кислоты и белки практически не поглощают при $\lambda > 310$ нм. Поэтому для светорассеивающих препаратов белков, нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов вклад рассеяния обычно определяют по поглощению в интервале 320—350 нм. Для выполнения необходимых расчетов написана программа, импортирующая спектральные данные в ASCII представлении (в частности, в формате «Shimadzu UV-1601», kozlovsky@genebee.msu.su), вычисляющая параметры прямой, которая представляет вклад рассеяния (E^{LS}) в общее поглощение препарата, и восстанавливающая спектр «истинного» поглощения препарата. На рисунке 13 в качестве примера представлены измеренные на спектрофотометре «Shimadzu UV-1601» спектры поглощения в области 250—350 нм препарата вируса гриппа штамма A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в буфере 10мМ Трис-HCl при pH 7,3 и 5,8. Видно, что измеренные спектры в основном состоят из вклада мутности, и собственное поглощение вируса представлено лишь небольшим «плечом» в области 250-290 нм. Для экстраполяции использовали зону 320—350 нм. На рис. 13б представлены рассчитанные спектры истинного поглощения препаратов. Видно, что, как и следовало ожидать, истинное поглощение вносит лишь небольшой вклад в измеряемые спектры. Следует подчеркнуть, что спектры истинного поглощения, измеренные при разных уровнях агрегации, должны быть одинаковыми. Известно, что вирионы вируса гриппа штамма A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) быстро агрегируют при закислении до pH 5-6.

Видно, что закисление до pH 5,8, приводящее к увеличению агрегации и “подъему” измеряемого спектра вируса гриппа, несмотря на очень высокий уровень мутности, практически не изменяет полученного спектра истинного поглощения препарата. Таким образом, наш метод определения белковой концентрации хорошо работает даже в таких мутных средах.

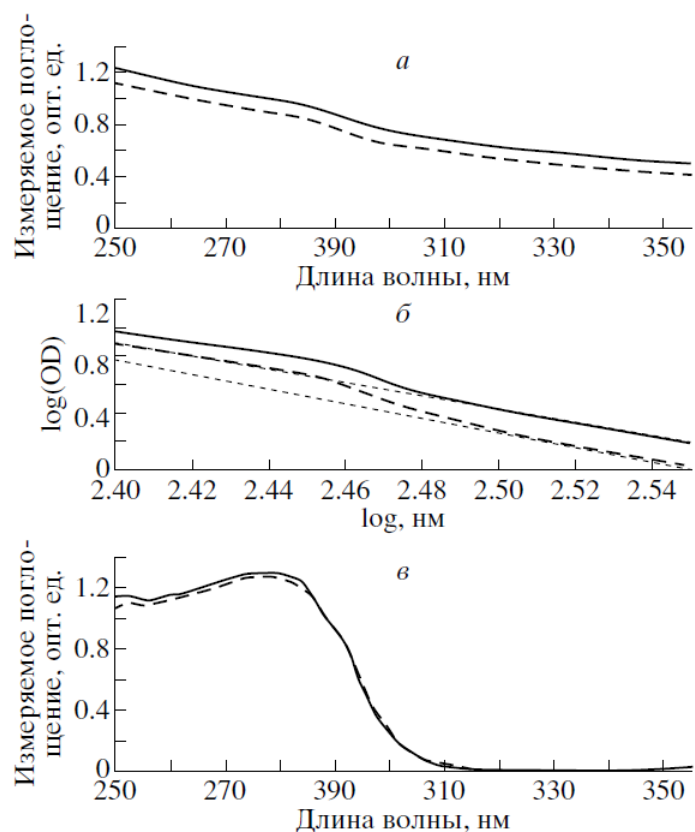


Рис.13. Спектры поглощения в области 250—360 нм препаратов вируса гриппа при pH 7,3 (пунктир) и pH5,8 (сплошная линия). а – непосредственно измеренные спектры. б – те же спектры в двойных логарифмических координатах. Прямые экстраполированы из области чистого рассеяния на область 250—320 нм. в - рассчитанные из этих кривых спектры истинного поглощения ВГ при pH 7,3 и pH 5,8 (Dobrov et al., 1977; Ksenofontov et al., 2006).

5. Флуоресцентная спектроскопия

Измерения спектров флуоресценции препаратов вирусов и БО проводили на спектрофлуориметре «FluoroMax» (HORIBA Jobin Yvon, USA) в термостатированных 1-см кюветах (конечный объем 0,2-2 мл) при концентрации препаратов 0,1-0,2 мг/мл в 10 мМ Трис-HCl, pH 7,5. В экспериментах по ступенчатому прогреву препараты инкубировали при необходимой температуре в течение 10 минут и измеряли флуоресценцию.. В ряде экспериментов образцы загружали в ячейку и нагревали до 75°C со скоростью 1°C/мин. Для измерения

спектров эмиссии в области 300-400 нм использовали УФ-свет с длиной волны 280 нм.

6. Флуоресцентный анализ связывания тиюфлавина Т (ТфТ)

Связывание ТфТ (Sigma) анализировали путем добавления свежеприготовленного тиюфлавина Т к препаратам вируса и растворам его БО в 5 мМ фосфатном буфере при pH 7,0. Конечная концентрация ТфТ составляла 0,05 мМ, а концентрация вируса – 0,05 мг/мл (LeVine, 1999; Nilsson, 2004). Спектры флуоресценции регистрировали в диапазоне от 450 до 600 нм при длине волны возбуждения 445 нм с использованием спектрофлуориметра FluoroMax (HORIBA Jobin Yvon, США). Фоновая флуоресценция ТфТ измерялась в буферном растворе, содержащем только ТфТ.

7. Спектроскопия кругового дихроизма (КД).

Спектры КД измеряли в 1-2 мм кюветах (для 185-250 нм) или в 1 см кюветах (для 250-320 нм) при 25°C на дихрографе “Chiroscan” (“Applied Photophysics”, Англия) в 5 мМ фосфатном буфере с pH 7,5. Концентрация образцов составляла от 30 до 100 мкг/мл для дальнего диапазона УФ и от 500 до 800 мкг/мл для ближнего диапазона УФ. Спектры КД записывали на скорости 0,5-1,0 нм/сек с вычетом базовой линии. Измеренные спектры обрабатывали с использованием стандартного пакета программного обеспечения, поставляемого с прибором. Для области 185-250 нм спектры КД выражали в величинах молярной эллиптичности $[\Theta]$ ($[\Theta] = 3300 \cdot \Delta\epsilon$), а для области 250-320 нм в молярных коэффициентах дихроического поглощения $\Delta\epsilon$. Расчет проводили по формуле

$$\Delta\epsilon = \frac{\Delta D}{c \cdot l}, \quad (7)$$

где ΔD - измеренная величина дихроизма, c - концентрация белка (в молях аминокислотных остатков), l - длина оптического пути (в сантиметрах). Среднюю молекулярную массу аминокислотного остатка принимали равной 110 Да. Среднюю молекулярную массу нуклеотидного остатка принимали равной

320 Да. Значения $[\theta]$ и $\Delta\epsilon$ рассчитывали на аминокислотный остаток белка (средний молекулярный вес аминокислоты принимался за 110) или нуклеотид РНК (средний молекулярный вес нуклеотида принимался за 320). Содержание РНК в вирионах ХВК принимали равным 6% (Tollin P., 1988; Semenyuk et al., 2016). 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 3-5 °С.

7. Аналитическое ультрацентрифугирование (АУЦ)

АУЦ образцов препаратов БО и вирусов (0,1–0,3 мг/мл; 10 mM Трис-НСl, рН 7,5) проводили на ультрацентрифуге «Beckman E» (Beckman, США), оборудованной сканером и мультиплексной оптикой при длине волны 280 нм, при +20 °С и скорости вращения 40-60 тыс. об/мин в роторе с шестью двухсекторными ячейками. Расчет коэффициента седиментации производили при помощи программы SEDFIT (Schuck, 2000).

8. Динамическое лазерное светорассеяние

Для определения размера частиц применяли анализ динамики флуктуаций интенсивности рассеянного света. Время корреляции трансляционных движений частиц (τ_c) непосредственно связано с коэффициентом диффузии частиц (D) следующим соотношением:

$$D = \frac{1}{2\tau_c k^2}, \quad (8)$$

где k — модуль волнового вектора рассеяния, $k = \frac{2\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$, n - показатель преломления жидкости, λ — длина волны падающего света, а θ - угол рассеяния. Из коэффициента диффузии по уравнению Стокса-Эйнштейна может быть рассчитан гидродинамический радиус частиц (R_h):

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}, \quad (9)$$

где k_B — константа Больцмана, T - температура и η - вязкость растворителя. Измерения проводили на приборе «Zetasizer Nano ZS» (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) с He-Ne лазером (633 нм, 10 мВт) в качестве источника света. Температура образцов поддерживалась с точностью до 0,1 °С с помощью системы Пельтье для термостатирования. Измерения светорассеяния проводили под углом 173°. Детекцию и обработку автокорреляционных функций осуществляли с помощью программного обеспечения Dispersion Technology Software (DTS) version 4.2.

9. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Калориметрические измерения препаратов БО и вирусов (10 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5) выполняли в дифференциальном адиабатическом сканирующем калориметре «ДАСМ-4» (Биоприбор, Россия). Эксперименты выполняли при постоянном избыточном давлении 2 атм. Скорость нагрева составляла 1 град/мин. Сбор и предварительную обработку данных осуществляли с помощью программ, специально разработанных в НИИ ФХБ МГУ (Orlov et al., 1998). Обратимость тепловых переходов проверяли путем повторного нагрева образцов.

10. Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР)

Спектры КР вирионов (концентрация $c = 0,15$ мг/мл) получали с использованием спектрометра NTEGRA Spectra нанолaborатории «Интегра-спектра» (Россия) и программного обеспечения Nova software (НТ-МДТ, Россия). Суспензии белка наносили на зеркальное стекло (30 мкл) и высушивали на воздухе. Прибор NTEGRA Spectra выполняет спектральные измерения в определенной точке и регистрирует спектральные характеристики образца с помощью CCD--камеры, охлаждаемой термоэлектрическим элементом Пельтье до температуры –50 °С. Для позиционирования лазерного луча на образце используется инвертированный оптический микроскоп Olympus IX71. Все

измерения проводились при комнатной температуре (25 °C). Для каждого образца было записано около 15–20 спектров с временем экспозиции 60 секунд каждый, с использованием лазера с длиной волны 532 нм (мощность 5,5 мВт), объектива 40× и спектральным разрешением 4 см⁻¹. Была проведена коррекция базовой линии, и спектры были нормализованы по полосе 1004 см⁻¹.

Спектры КР очищенных белков (концентрация $c = 0,6$ мг/мл, высушенных на зеркальном стекле) получали с использованием Рамановского спектрометра BWS445-785S (BWTeK, Германия). Для каждого образца было записано три спектра с временем экспозиции 200 секунд каждый, с использованием лазера с длиной волны 785 нм (мощность 120–170 мВт), объектива 20× и спектральным разрешением 4 см⁻¹. Была проведена коррекция базовой линии, и спектры были нормализованы по полосе 1004 см⁻¹.

11. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ).

Исследуемый препарат сорбировали на медных сетках, покрытых коллодиевой пленкой с углеродным напылением, и контрастировали 2%-ным водным раствором уранилацетата. 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» («Olympus», Германия). Для расчёта диаметра вирусных частиц использовали научное программное обеспечение для обработки изображений ImageJ (National Institutes of Health, США).

12. Электрофоретический анализ белков в денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ).

Для анализа белкового состава выделенных препаратов использовали метод электрофореза по методу Леммли (Laemmli, 1970). Электрофорез проводили в пластинах ПААГ с градиентом акриламида 8–20% и N, N'-

метиленбисакриламида 0,08–0,2% при силе тока 10 - 20 мА/гель на приборе «MiniPROTEAN 3 Cell» (Bio-Rad, США) в течение часа. Для съёмки окрашенных Coomassie G-250 ПААГ использовали гель-документирующую систему Chemi Doc XRS+ с программным обеспечением Image Lab Software («Bio Rad», США).

13. Эксперимент и анализ данных МУРР.

Исследования структуры вирионов с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния выполнялись на синхротроне Petra III (DESY, Гамбург) на линии P12 (см. Обзор литературы). Интенсивность рассеяния $I(s)$ была измерена в области значений волновых векторов $0,08 < s < 7 \text{ нм}^{-1}$. Для каждого образца было снято по 50 экспериментальных кривых рассеяния для контроля возможных радиационных повреждений. Повреждений излучением выявлено не было.

В ряде экспериментов эксперимент по МУРР проводился на станции БиоМУР (Peters, 2022, 2019) Курчатовского источника синхротронного излучения (НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия) в геометрии на пропускание. Растворы с образцами помещали в тонкостенные кварцевые капилляры диаметром 2 мм и толщиной стенок 0,01 мм. Для регистрации рентгенограмм использовали двухкоординатный детектор DECTRIS Pilatus3 1M («DECTRIS», Швейцария) с площадью рабочей поверхности $168,7 \times 179,4 \text{ мм}$, разрешением 981×1043 точек и размером пикселя – 172 мкм. Измерения проводили в 10 мМ Трис-НСl, рН 7,5 или PBS при нескольких различных концентрациях в диапазоне от 2,0 до 5,0 мг/мл для учета возможной концентрационной зависимости. Зависимость кривых МУРР от концентрации измеряемых образцов не наблюдалась. Измерения выполнялись в двух геометриях: с расстоянием образец - детектор 2500 мм и 700 мм, чтобы иметь качественный сигнал в районе больших ($>100 \text{ нм}$) и малых размеров. Таким образом, для каждого образца финальная кривая рассеяния получалась путём сшивки двух кривых, полученных при разных геометриях. В результате

интенсивность рассеяния $I(s)$ была измерена в области значений векторов рассеяния $0,03 < s < 4 \text{ нм}^{-1}$.

Первичная обработка кривых рассеяния была проведена с использованием программы PRIMUS (Konarev et al., 2003). Анализ брэгговских пиков на кривых МУРР выполняли с помощью программы PEAK (Konarev et al., 2003). Для построения функций распределения по расстояниям $p(r)$, которые необходимы для восстановления формы вириона в растворе по данным МУРР, использовалась компьютерная программа GNOM (Svergun, 1992). *Ab initio* метод восстановления формы низкого разрешения вириона АВК и был реализован с помощью программы DAMMIN (Svergun, 1999). В более универсальном подходе, *ab initio* модель вируса была получена путем одновременного построения как общей формы, так и структуры отдельных компонентов вириона (белок и РНК). Построение двухкомпонентной (двухфазной) модели выполнялось путем приближения кривой МУРР от вирусной частицы с использованием программы MONSA (Svergun, 1999). Программа представляет частицу как коллекцию $N \gg 1$ плотно упакованных шариков внутри заданного пользователем объема поиска. Для описания внутренней структуры сложной частицы, каждый шарик может быть либо принадлежащим растворителю (индекс = 0), либо быть одной из компонент (в нашей работе, индекс = 1 соответствует белку и индекс = 2 – вирусной РНК). Комплекс между белком и РНК поэтому представлен в низком разрешении двумя "фазами", а структура описывается строкой длиной N , содержащей фазовый индекс для каждого шарика (0, 1 или 2). Моделирование жесткими телами структуры вирионов АВК проводилось с помощью программы MASSHA (Konarev et al., 2001). Теоретическая интенсивность рассеяния построенных моделей рассчитывалась программой CRY SOL (Svergun et al., 1995).

14. Молекулярная динамика.

Чтобы найти репрезентативные структуры 1,5 витков спирали вирионов ХВК и ХВК-ST было выполнено моделирование при 300 К методами

молекулярной динамики (МД) с помощью программы Gromacs (Abraham, 2015). При моделировании использовали силовое поле CHARMM27 (Brooks et al., 2009) для вирионов и tip3p (Jorgensen WL, 1983) для воды. Исходные стартовые модели были построены из PDB структуры 6R7G (13 субъединиц белка оболочки и РНК) путем добавления 28 остатков N-конца, сгенерированного сервером AlphaFold3 (Abramson et al., 2024), к каждой субъединице БО. Стартовую модель помещали в середину бокса размером $20 \times 20 \times 20$ нм и сольватировали. Энергия полученной системы была минимизирована с помощью алгоритма наискорейшего спуска (4000 шагов по 1 фс). Траектория МД длительностью 100 нс затем была рассчитана с шагом интеграции 2 фс с использованием баростата Берендсена и давлением 1 атм. в изотропном режиме.

15. Введение трития.

Мечение тритием проводили с помощью бомбардировки пучком атомов трития, нагретых до температуры 2000 К, в условиях, описанных в «Обзоре литературы». Препараты вирусов (2–5 мг/мл) в объёме 1–3 мл в PBS (или 0,05M боратном буфере рН 8,0) распыляли в виде тонкой плёнки или «раскатывали», на предварительно охлаждённую жидким азотом внутреннюю поверхность цилиндрического реакционного сосуда, вакуумировали и наполняли молекулярным тритием до давления 0,5 Па. При нагревании до 2000 К вольфрамовой спирали, расположенной вдоль центральной оси реакционного сосуда, молекулярный тритий диссоциировал на атомы, и образующиеся атомы трития бомбардировали суспензию вирионов, охлаждаемую жидким азотом. Спираль зажигали на 15 секунд, затем остаточный тритий откачивали и процедуру напуска трития–зажигания спирали повторяли еще два раза. После введения метки препарат размораживали и вирусную суспензию концентрировали центрифугированием (105,000 g, 5°C, 100 мин). Для удаления лабильной тритиевой метки препараты меченых вирусов подвергали 1-2 циклам осаждения вирионов при 105,000 g. Контроль чистоты препаратов осуществляли

с помощью электрофореза в ПААГ (Laemmli, 1970).

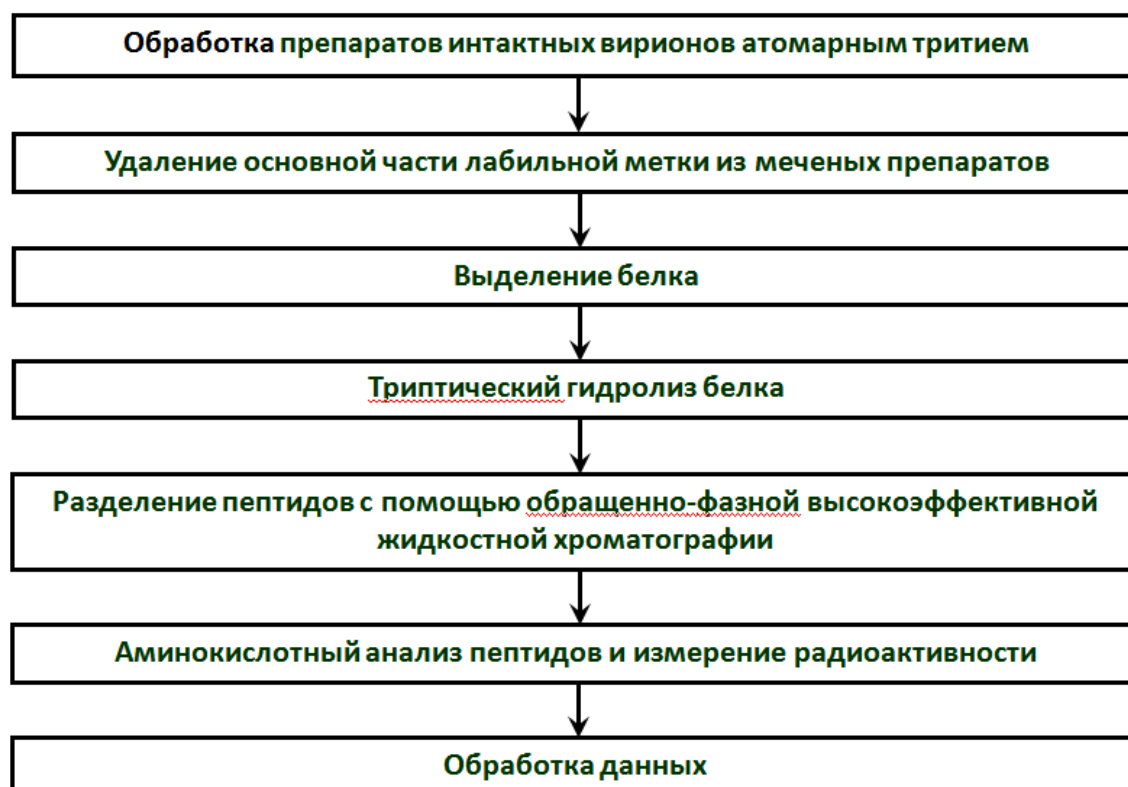
16. Высокоэффективная жидкостная хроматография и аминокислотный анализ.

Полученные в результате ферментативного гидролиза очищенного БО смеси пептидов (TPCK-trypsin, "Sigma"; фермент:субстрат=1:50; гидролиз при 37°C в течение 4 часов) разделяли при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии в обращенной фазе на колонке Ultrasphere ODS, 5μ, 250×4,6 мм, ("Beckman", США) с использованием хроматографической системы фирмы "Beckman" (США) в градиентном режиме. Для разделения использовали два элюента (А и Б): элюент А представлял собой 0,1%-ный водный раствор трифторуксусной кислоты, элюент Б состоял из 0,1%-ного раствора трифторуксусной кислоты в ацетонитриле. Использовали линейный градиент до 60% элюента Б в течение 60 минут, а затем линейный градиент до 80% элюента Б в течение 10 минут при скорости потока 1 мл/мин. Детекцию проводили по поглощению при длинах волн 215 и 280 нм. Фракции, соответствующие индивидуальным пептидам, собирали для дальнейшего анализа. Пептиды подвергали кислотному гидролизу, как описано ранее (Tsugita & Scheffler, 1982). Кислотные гидролизаты анализировали на аминокислотном анализаторе Amino Acid Analyzer L8800 ("Hitachi", Япония) с катионообменной колонкой и нингидриновой дериватизацией с нашими модификациями (Trofimova L., 2016). В отдельных экспериментах количественный анализ проводили в анализаторе АКА-1000 на базе хроматографа «Скорост» («Sevko&Co», Россия), приобретенного МГУ в рамках Программы обновления приборной базы (Национальный проект «Наука»). Разделение аминокислот осуществляли на ионообменной колонке (4,6*150 мм, 7мкм, СТ-ДВБ, Na⁺), используя градиент Na-цитратных буферов при скорости 0,45 мл/мин. Постколоночную дериватизацию проводили нингидриновым раствором.

Для одновременного измерения радиоактивности элюата использовали проточный счетчик Radiomatic 150TR Flow Scintillation Analyzer ("Packard Co", США). Элюат с аминокислотного анализатора является сложной для измерения радиоактивности смесью, что потребовало специальный подбор сцинтилляционных жидкостей и скорости их потока. Последующие модельные эксперименты со смесями меченых тритием аминокислот показали, что наиболее благоприятные величины эффективности регистрации получены для сцинтилляционной жидкости Ultima-Flo AP (Packard Instrument Co, USA) и минимальная детектируемая активность составляла примерно около 100 dpm в пике аминокислоты (при скорости потока 1 мл/мин). Такая чувствительность позволяла использовать разработанную систему анализа для измерения радиоактивности аминокислот в экспериментах по изучению структуры белков и белковых комплексов методом тритиевой планиграфии (Лукашина et al., 2002). Получаемые данные (оптическая плотность элюата при длинах волн 570 и 440 нм и его радиоактивность) обрабатывались с помощью программы "МультиХром для Windows" (ЗАО "Амперсенд", Россия).

Далее рассчитывали молярную радиоактивность аминокислот в пептиде (Lukashina et al., 2009). При этом экспериментальные данные представляли собой средние значения тритиевой метки для каждого типа а.о. в каждом пептиде. Таким образом, например, пептид T1 в БО АВК (а.о. с 1 по 13) содержит четыре остатка аланина (а.о. 1, 6, 9 и 11, см. ниже), и значения удельной радиоактивности считаются равными, составляя по четверти от общего значения метки трития аланина в пептиде T1. Следовательно, вклад отдельного остатка нельзя определить, если он не является единственным в своём роде в меченом пептиде.

Общая последовательность эксперимента представлена на следующей схеме:



17. Биоинформатический анализ первичной и вторичной структуры БО вирусов растений. Математические расчёты.

Выравнивание аминокислотных последовательностей БО выполнено с помощью программы Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Количественную оценку сходства последовательностей проводили попарным выравниванием аминокислотной последовательности БО. Пространственное выравнивание выполняли с использованием программы Swiss-Pdb Viewer 3,7 (<http://www.genebee.msu.su/spdbv/>). В качестве матрицы использовали структуру БО в составе вириона, полученную методом крио-ЭМ. Профиль RMSD по последовательности определяли для пар C_{α} -атомов согласно пространственному выравниванию.

Наличие неупорядоченных (ID) сегментов определяли с помощью программ предсказания, основанных на различных алгоритмах и предварительных условиях: POODLE-S (<http://mbs.cbrc.jp/poodle/poodle.html>), Iupred (<http://iupred.enzim.hu/>), VL3H (<http://www.dabi.temple.edu/disprot/predictor.php>) и FoldUnfold (<http://bioinfo.protres.ru/ogu/>).

Мы выбрали пять наиболее известных программ для прогнозирования вторичной структуры в соответствии с критической оценкой прогнозирования структуры белка (CASP) на <http://predictioncenter.org>. Эти программы включали GOR4 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl), APSSP2 (<http://www.imtech.res.in/raghava/apssp2/>), SCRATCH (SSPro v. 4,5) (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu>), JPred (Jnet) (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>) и PSIPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

Наличие регионов, способствующих агрегации, в БО вирусов анализировали с помощью пяти прогностических программ, доступных через веб-серверы: AGGRESCAN (<http://bioinf.uab.es/aap/>), TANGO (<http://tango.crg.es/>), Zyggregator (<http://www.vendruscolo.ch.cam.ac.uk/zyggregator.php>), Waltz (<http://waltz.switchlab.org/>) и Amylpred2 (<http://aias.biol.uoa.gr/AMYLPRED2/>) (Conchillo-Sole et al., 2007; Fernandez-Escamilla et al., 2004; Tsolis et al., 2013).

Расчет доступной поверхности вириона провели с использованием пакета GROMACS 5,1 (Abraham, 2015). Учитывали только часть доступной поверхности, занимаемую атомами водорода, присоединенными к атомам углерода (CH- поверхность); часть поверхности, занимаемую другими атомами, игнорировали. Радиус зонда составлял 0,09 нм. Для определения областей межмолекулярных контактов, аналогичным образом рассчитывали поверхность для индивидуальной субъединицы, затем определяли долю поверхности, закрываемую при сборке вирусной частицы. Для визуализации белковых структур использовали программу RasMol (<http://www.rasmol.org/>).

При использовании инструментальных методов сбор данных, их анализ и все необходимые расчёты выполняли с помощью специального программного обеспечения, которым оборудованы приборы – см. выше. Последующую обработку данных осуществляли при помощи программы Origin 7,5 (MicroCal Software, Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕКСВИРУСА Х-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ.

1.1. Поверхностная организация частично развернутых N-концевых участков белка оболочки Х-вируса картофеля и их вклад в стабильность вириона

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

Аномалии в оптических спектрах связаны со структурными различиями N-концевых доменов.

На первом этапе работы нами было проведено сравнительное исследование вторичной структуры белков оболочки трех представителей рода *Potexvirus* методом спектроскопии кругового дихроизма (КД). Изучались вирионы и изолированные белки оболочки (БО) вирусов со сходной спиральной морфологией: Х-вируса картофеля (ХВК), вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт) и вируса аукуба мозаики картофеля (ВАМК).

Впервые полученные высококачественные спектры КД вирионов ХВК в дальнем УФ-диапазоне (185–250 нм) обнаружили выраженные аномалии, не характерные для типичных α -спиральных белков (Рис.14). 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 нм ($[\theta] = +16800 \text{ град} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{дмоль}^{-1}$).

В то время как спектры вирионов ВМАльт (Рис.14 б) полностью соответствовали канонической форме для α -спиральных белков, спектры ВАМК (Рис.14 в) занимали промежуточное положение, демонстрируя сходные, но менее выраженные аномалии, чем у ХВК (Рис.14 а).

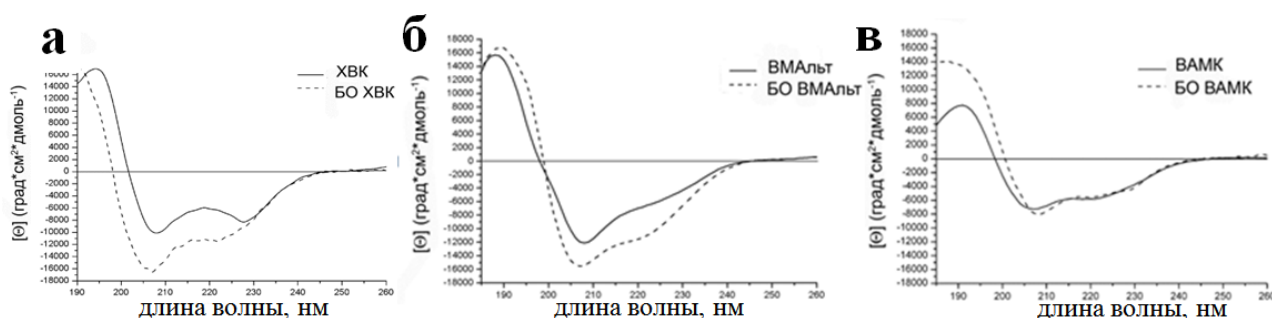


Рис.14. Сравнение спектров КД в дальнем УФ диапазоне для ХВК (а), ВМАльт (б), ВАМК (в) и выделенных белков. Спектры измерены на дихрографе «Chiroscan» при 25°C в 5 мМ фосфатном буфере с рН 7,5. Все эксперименты по КД проведены совместно с д.б.н., проф. Добровым Е.Н. и к.ф/м.н. А.М. Арутюняном.

Причина этих аномалий, как мы полагаем, связана со структурными различиями N-концевых доменов. Гомологичное моделирование показало, что центральные структурно организованные домены БО всех трёх вирусов практически идентичны. Решающее различие заключалось в длине и составе N-концевых сегментов. Биоинформатический анализ с помощью алгоритма DisoPred (Ward et al., 2004) выявил следующие особенности: если БО ВМАльт не имел предсказанных неупорядоченных регионов, то у БО ХВК и ВАМК были обнаружены протяжённые неупорядоченные участки (ID), локализованные именно в N-концевой области (Рис.15). Эти регионы характеризуются экстремально высоким содержанием гидрофильных аминокислот (главным образом треонина и серина) и критическим недостатком гидрофобных остатков,

что определяет их неспособность к формированию стабильной вторичной структуры в изолированном состоянии (Uversky, 2002; Uversky et al., 2000).

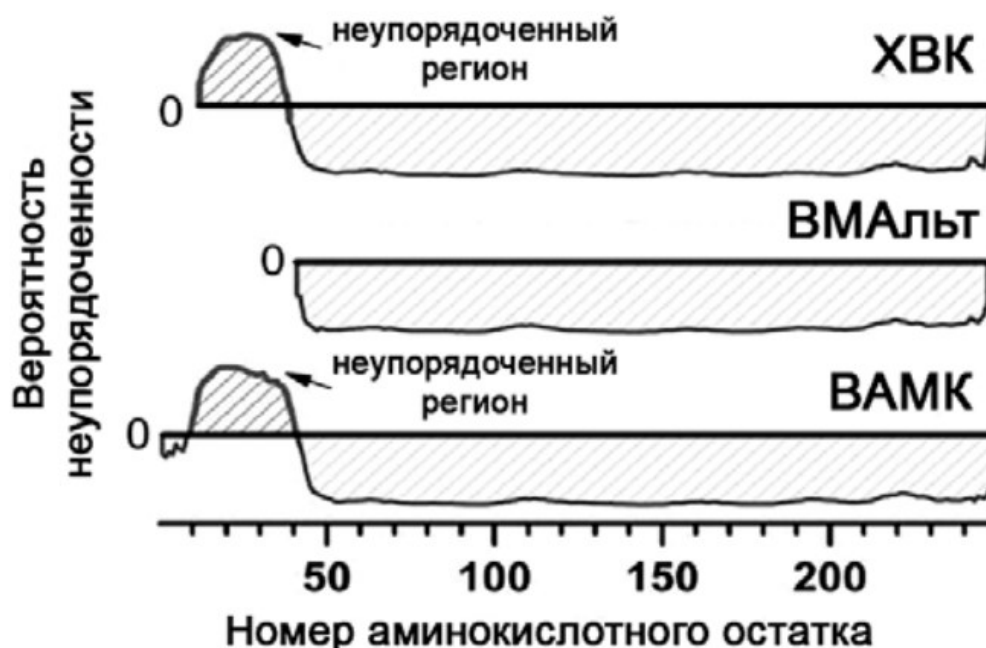


Рис. 15. Предсказание неупорядоченной структуры с помощью вэб-сервиса DisoPred для БО ХВК, ВМАльт и ВАМК.

Обсчёт спектров по формуле Гринфилда-Фасмана ($\% \text{ альфа-спиралей} = ([\theta]^{208} - 4000 \text{ град} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{дмоль}^{-1}) / 29000 \text{ град} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{дмоль}^{-1}$) предсказал высокое содержание α -спиралей в изолированном БО ХВК (43%), что впоследствии подтвердилось данными крио-ЭМ. Однако для БО ВМАльт (39%) и, особенно ВАМК (13%), предсказанное содержание спиральности было ниже, вероятно, из-за низкой стабильности этих белков в растворе, что не отражает их нативной укладки в вирионе.

Исследование ХВК методом тритиевой планиграфии

Для изучения топографии поверхности вирионов ХВК мы использовали метод тритиевой планиграфии. Данный подход основан на неселективном замещении водорода в углеводородных фрагментах молекул на его радиоактивный изотоп – тритий (см. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ). Тритий использовался как нанозонд с

эффективным радиусом 0,09 нм для определения а.о., локализованных на поверхности вириона, а также в полостях, доступных для прямого пролета атомов трития (Badun, 2001; Баратова Л.А., 1999). Метод тритиевой планиграфии успешно использовали для получения информации о пространственной организации белков и их комплексов, а также таких сложноорганизованных биологических объектов, как рибосома (Agafonov et al., 1997), растительные (Baratova et al., 2001; Baratova et al., 1992; Dobrov et al., 2003) и животные (Shishkov et al., 1999) вирусы.

Исследование Х-вируса картофеля (ХВК) методом тритиевой планиграфии однозначно подтвердило поверхностную локализацию N-концевого участка белка оболочки на вирионе. Этот вывод был основан на прямом эксперименте: сравнении включения радиоактивной метки в нативные вирионы и в вирионы, у которых был *in situ* протеолитически удален N-концевой пептид из 19/21 аминокислот (ХВКΔN). Были определены средние радиоактивности для каждого элемента вторичной структуры в вирионах ХВК и ХВКΔN (Рис. 16). Анализ распределения метки по элементам вторичной структуры, определённым в крио-ЭМ модели (PDB ID: 6R7G, (Grinzato et al., 2020)) выявил чёткую картину: после удаления N²⁰-пептида доступность для мечения элементов **α1** (а.о. 30-34), **α7** (а.о. 122-129), и **14** (а.о. 143-153) возрастала более чем в 3 раза.

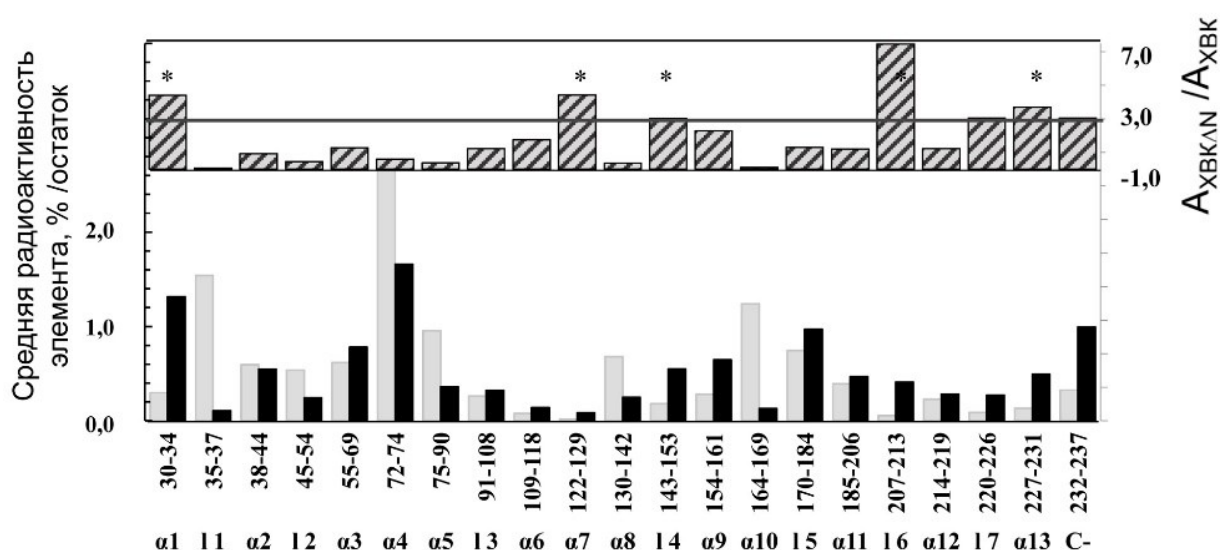


Рис.16. Доступность мечению тритием элементов вторичной структуры белков вирионов ХВК (серые столбики) и ХВКΔN (черные столбики). PDB ID:

6R7G (Grinzato et al., 2020). В верхней части графика приведены величины A_{XBKAN}/A_{XBK} . Звездочкой обозначены элементы, где $A_{XBKAN}/A_{XBK} > 3$.

Это прямо указывало, что в интактном вирионе именно N-концевой пептид стерически экранирует эти специфические участки. Более того, удаление N-концевого «экрана» привело к значительному увеличению доступности также внутреннего С-концевого домена ($I6$ и $\alpha13$), демонстрируя общее снижение плотности упаковки вирусной частицы и подтверждая, что N²⁰-пептид является важным структурным элементом.

Относительное изменение радиоактивности элементов вторичной структуры белка при удалении N²⁰-пептида вириона продемонстрировано на трехмерной модели фрагмента вириона XBK (PDB: 6R7G) (Рис. 17).

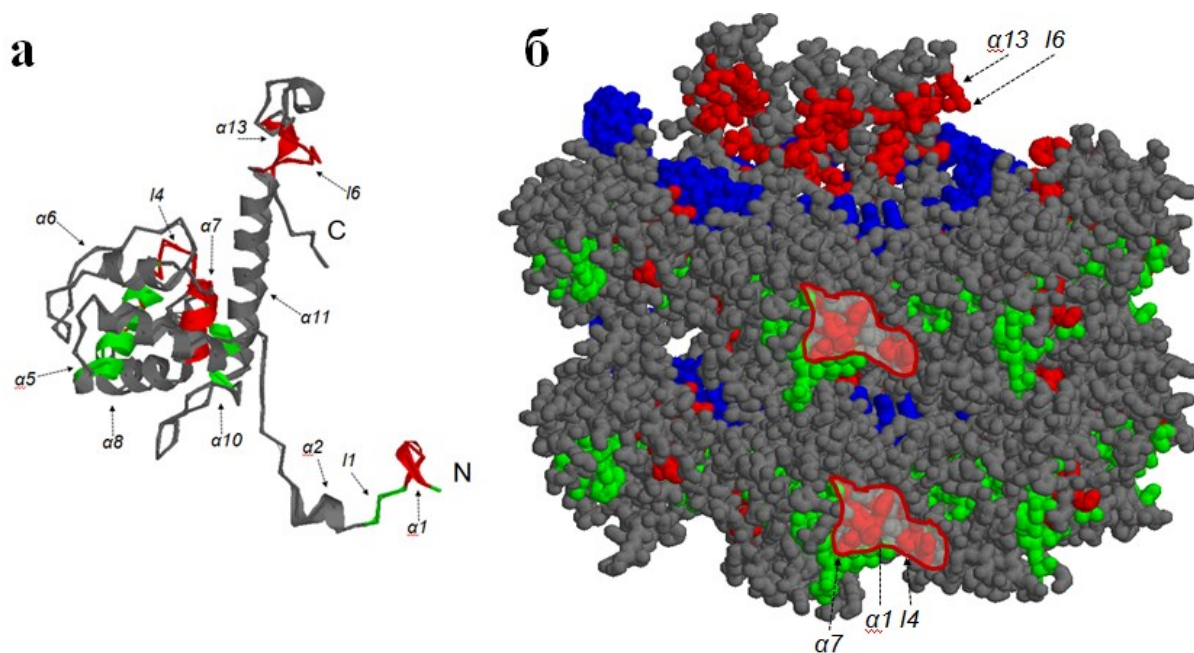


Рис. 17. Схематическое представление поверхности вириона по данным тритиевой планиграфии. (а) фрагмент, состоящий из 1-ой субъединицы, представленный в виде ленты; (б) фрагмент, состоящий из восьми субъединиц. Области со значением $A_{XBKAN}/A_{XBK} < 0,4$ – закрашены зеленым; > 3 – красным. Фрагмент молекулы РНК окрашен синим цветом.

Результаты тритиевой планиграфии, предсказавшие поверхностную, но структурно организованную локализацию N²⁰-пептида, нашли своё прямое подтверждение в независимом исследовании методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и последующего моделирования.

Сравнение структурной организации вирионов ХБК, ХБКΔN и ВМАльт методом МУРР.

БО ХБК и ВМАльт имеют некоторое сходство аминокислотной последовательности, но различаются по длине. Сравнение первичных структур БО ВМАльт и ХБК попарным выравниванием с помощью программы Clustal Omega (Рис. 18, а) подтвердило сходство в последовательности (68% подобных и 42% идентичных из 207 а.о.). Основное отличие состоит в различной длине N-концевых доменов: для БО ХБК N-концевой домен был длиннее на 28 а.о. (N²⁸-пептид).

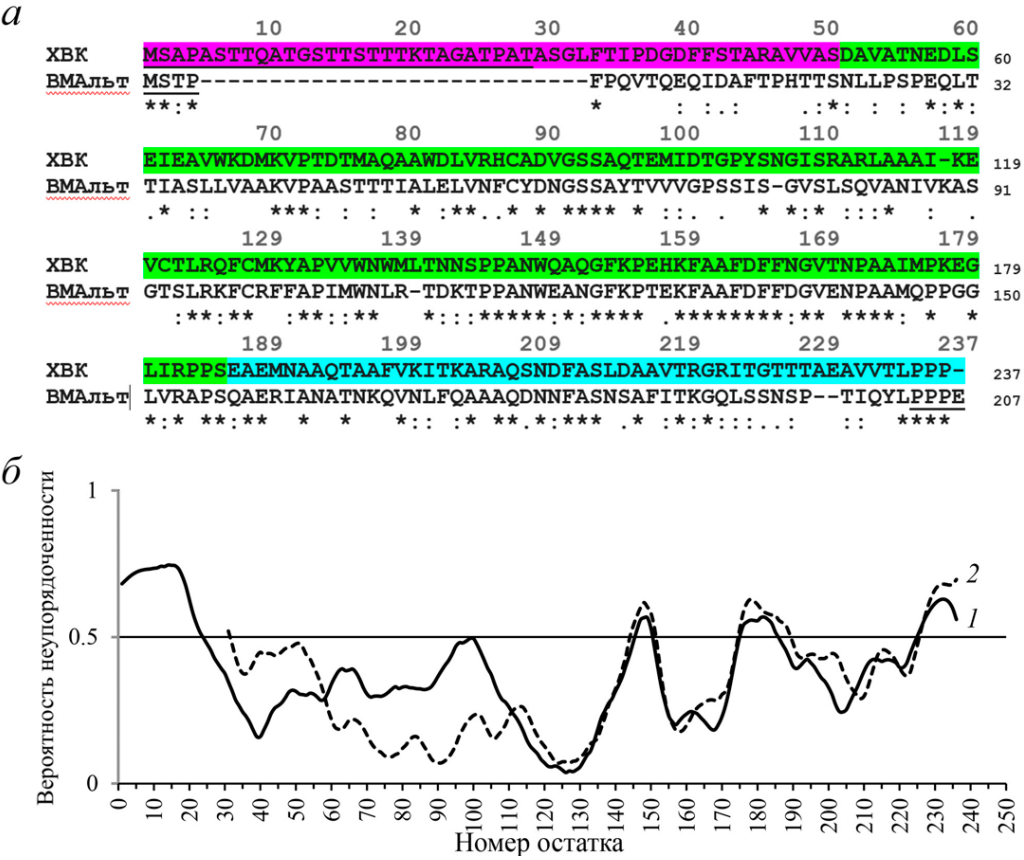


Рис. 18. Выравнивание первичных структур БО ХБК и ВМАльт с помощью

программы Clustal Omega (a). Отмечены () – идентичные остатки; (:) и (.) – консервативные и полуконсервативные замены; подчеркнуты последовательности, отсутствующие в PDB ID: 6R7G и 7OG6. N-концевой (1–50 а.о.), центральный (51–185 а.о.) и C-концевой (186–237 а.о.) домены выделены малиновым, зеленым и голубым соответственно. б – Предсказание упорядоченных/неупорядоченных структур с помощью веб-сервиса IUPred для БО ХВК (1) и ВМАльт (2). Участки со значением ординаты выше 0,5 на этом рисунке считались неупорядоченными*

Биоинформатический анализ этих потексвирусов с помощью программы предсказания структуры IUPred (Рис. 18, б), основанной на алгоритме оценки способности а.о. образовывать выгодные парные контакты, подтвердил данные других методов (Рис. 15) и показал, что БО ХВК содержал разупорядоченный N-концевой домен из 28 а.о. (ΔN -пептид N-домена). Короткие разупорядоченные участки (со значением ординаты выше 0,5) выявлялись в петлевых межспиральных (142–151 а.о.), междоменных (175–185 а.о.) участках и в C-концевой области (226–236 а.о.) БО обоих вирусов.

Сравнительное изучение структурной организации методом МУРР вирионов ХВК, ХВК ΔN (без ~20 а.о.) и ВМАльт (в сравнении с ХВК короче на 28 а.о.) выявило ключевые различия, обусловленные наличием ΔN -концевого пептида у белка целого ХВК (Рис. 15, 18 и Таблица 1). Наличие брэгговского пика в районе $1,8\text{--}1,9\text{ нм}^{-1}$ на кривых МУРР для обоих препаратов свидетельствует о наличии в образцах упорядоченных квазикристаллических областей, и их положение связано с периодичностью, т.е. шагом спирали вирионов. Несмотря на схожие спиральные параметры (шаг спирали ~3,4 нм), вирионы ХВК ΔN 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	$1,85 \pm 0,01$	$3,40 \pm 0,01$	140 ± 10	$0,05 \pm 0,01$
ХВКΔN	$1,86 \pm 0,01$	$3,38 \pm 0,01$	110 ± 10	$0,06 \pm 0,01$
ВМАльт	$1,86 \pm 0,01$	$3,37 \pm 0,01$	110 ± 10	$0,06 \pm 0,01$

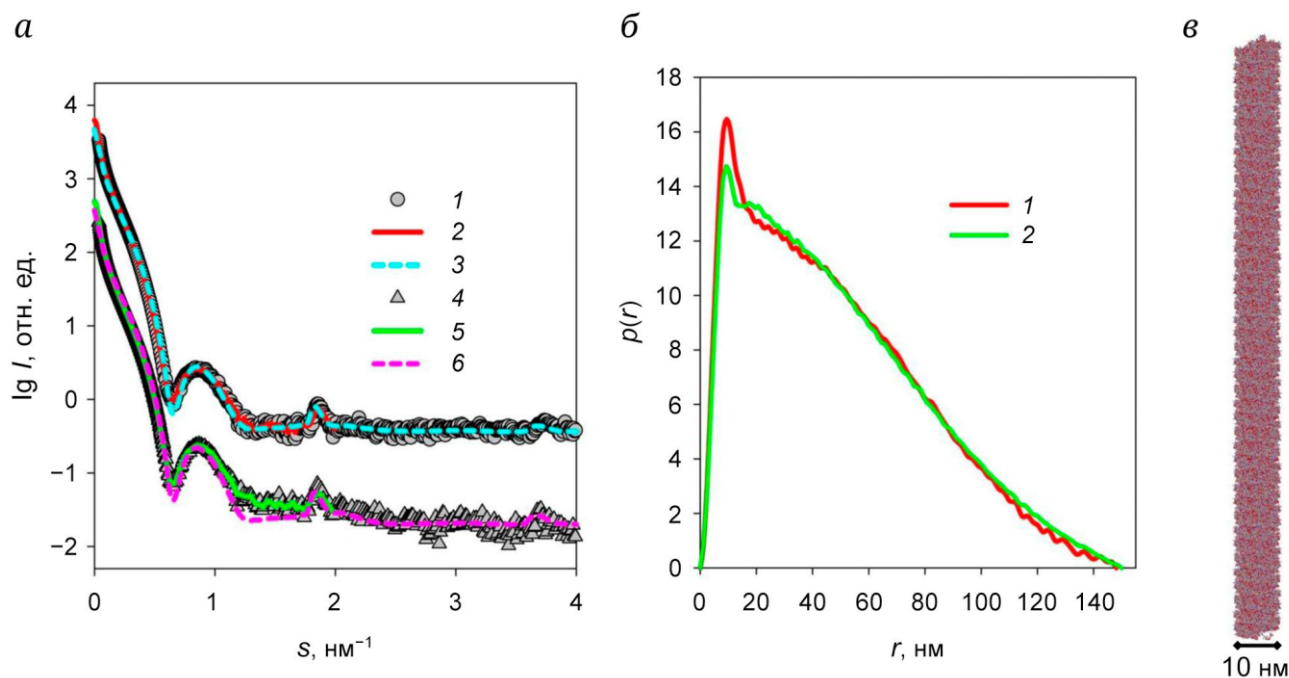


Рис. 19. Экспериментальные кривые МУРР (а) вирионов ХВК (1) и ХВКΔN (4). б – Функции распределения по расстояниям $p(r)$ для ХВК (1) и ХВКΔN (2). Приближение к экспериментальным кривым от модельных кривых, рассчитанных из функций распределения по расстояниям $p(r)$ для ХВК (а, кривая 2) и ХВКΔN (а, кривая 5). в – Структурная модель вириона ХВК, построенного из фрагмента PDB ID: 6R7G. Результаты приближения рассеяния от исходной модели (в) кривых МУРР от вириона ХВК (а, кривая 3) и ХВКΔN (а, кривая 6).

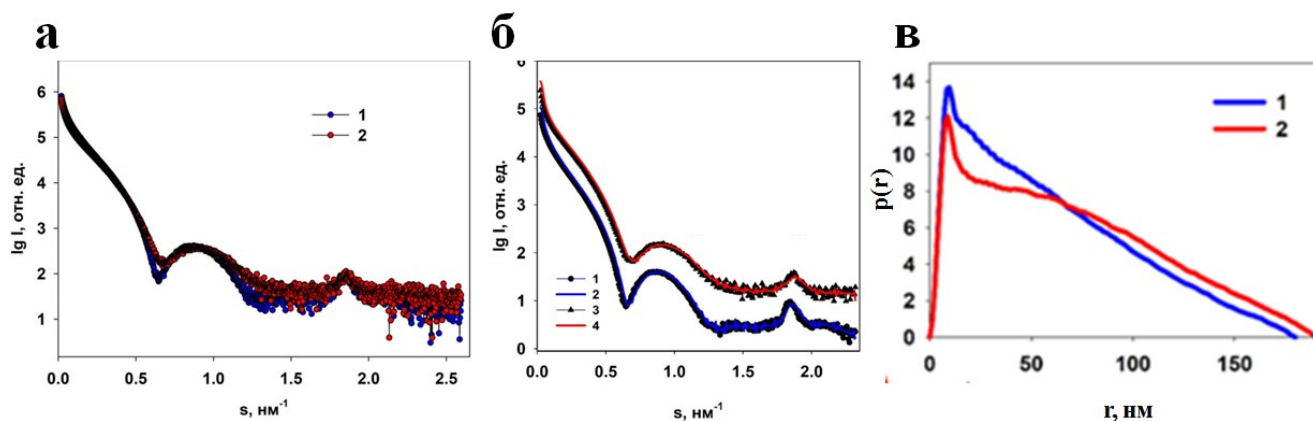


Рис. 20. (а) Экспериментальные кривые МУРР вирионов ХВК (1) и ВМальт (2). (б) Приближение к экспериментальным кривым ХВК (1) и ВМальт (3) от модельных кривых, рассчитанных из функций распределения по расстояниям $p(r)$ для ХВК (2) и ВМальт (4). (в) функции распределения по расстояниям $p(r)$ для ХВК (1) и ВМальт (2). Эксперимент по МУРР проводился на синхротроне Petra III (DESY, Гамбург) на станции P12, оснащенной двумерным детектором Pilatus 2M (фирма DECTRIS, Швейцария).

Анализ функций распределения расстояний $p(r)$ показал, что вирионы ХВК формируют более жесткие цилиндрические частицы диаметром $\sim 13,2$ нм, а вирионы ХВК Δ N и ВМальт – более гибкие структуры диаметром $\sim 12,5$ нм (Рис.19 и 20). Разница в диаметрах напрямую связана с наличием у ХВК удлиненного N-концевого пептида.

Эти данные указывали на существенный вклад Δ N-концевого пептида в структуру частицы. Дополнительным доказательством стало компьютерное моделирование, направленное на интерпретацию кривых рассеяния.

Моделирование строения вирионов на основе атомарных структур подтвердило, что центральные домены БО ХВК и ВМальт (48-210 а.о.) структурно сходны (Рис. 21).

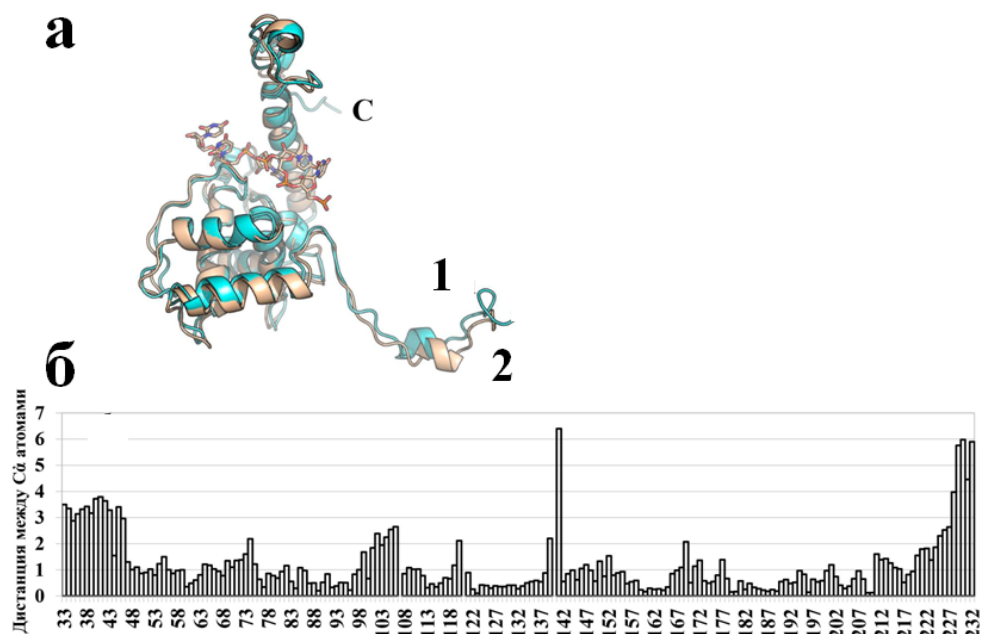


Рис. 21. (а) Пространственное выравнивание структур субъединиц вириона ХВК (1) и РНП ВМАльт (2), полученное программой Swiss-Pdb Viewer 3.7 (PDB ID: 6R7G и 7OG6, соответственно). (б) Дистанция между $C\alpha$ -атомами (Å). Нумерация остатков проведена по БО ХВК.

Исходная модель, построенная на основе крио-ЭМ структуры БО ХВК (без координат для первых 28 а.о.), не могла адекватно описать экспериментальную кривую МУРР (Рис. 20).

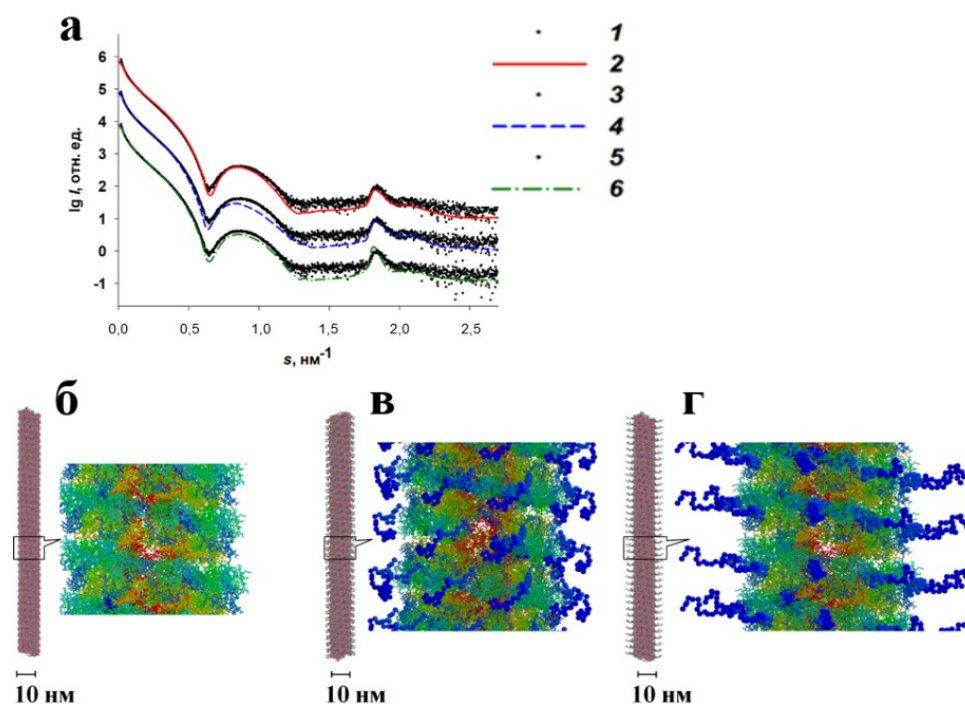


Рис. 22. Сравнение кривых МУРР от моделей вириона ХВК с ΔN^{28} -пептидами в различных конформациях с экспериментом. (а) экспериментальные данные

рассеяния (кривые 1, 3 и 5); рассеяние от исходной модели (кривая 2); приближение моделью с N²⁸-пептидами в связанном состоянии (кривая 4); приближение моделью с N²⁸-пептидами в развернутом состоянии (кривая 6). (б) Исходная модель вириона; (в) – модель ХВК с N²⁸-пептидами в сложенном состоянии; (г) модель ХВК с N²⁸-пептидами в развернутом состоянии. Увеличение на вставках: 10×

В работе был виртуально «достроен» отсутствующий N²⁸-пептид и протестированы две его гипотетические конформации (Рис. 22 в, г): «связанная» (контактирующая с поверхностью соседних субъединиц) и «развернутая» (обращенная в раствор). Результаты оказались вполне согласованными с данными тритиевой планиграфии. Модель со «связанными» пептидами, которые частично прилегают к поверхности, экранируя определённые участки, лучше описывала характерный брэгговский пик на кривых рассеяния. Именно эта конформация наилучшим образом объясняет данные тритиевой планиграфии: «связанный» N-пептид физически закрывает от потока трития те самые элементы ($\alpha 1$, $\alpha 7$, $l4$ соседней субъединицы), чья радиоактивность резко возросла после его удаления.

Таким образом, два метода – экспериментальная тритиевая планиграфия и теоретическое моделирование на основе данных МУРР – взаимно дополнили и подтвердили друг друга. Тритиевая планиграфия идентифицировала N-пептид как поверхностный и экранирующий фактор, а моделирование визуализировало его наиболее вероятную пространственную организацию - частично сложенную конформацию, стабилизирующую вирион за счёт дополнительных межсубъединичных контактов. Вероятно, в растворе сосуществуют вирионы с разными конформациями N- концевых пептидов.

Термостабильность вирионов ХВК и ХВКΔN была близкой (~68°C), тогда как у вирионов ВМАльт - ниже на 12°C (~56°C), что может указывать на стабилизирующая роль N- концевых пептидов (Рис. 23 а и б).

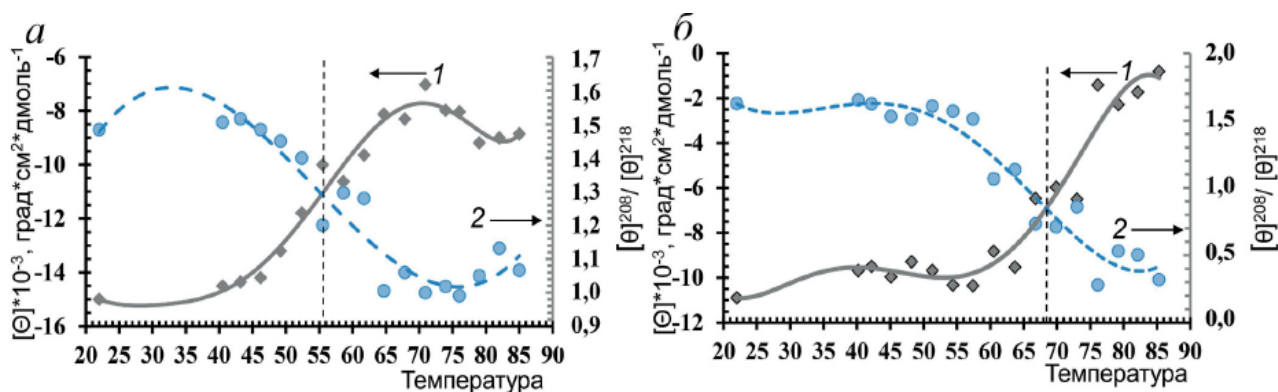


Рис. 23. Термическая денатурация препаратов ВМАльт (а) и ХВК (б) по данным КД-спектров. Приведена температурная зависимость интенсивности отрицательных максимумов $[\theta]^{208}$ при 208 нм (1) и величины отношения $[\theta]^{208}/[\theta]^{218}$ (2).

Таким образом, наличие неупорядоченного N-концевого пептида в БО ХВК – это яркий пример того, как неупорядоченный регион может приобретать определённую, функционально значимую конформацию при сборке в надмолекулярный комплекс, выступая в роли «закрепляющего элемента» в вирионе.

1.2. Структурная лабильность малоупорядоченных концевых доменов БО ХВК и её роль в трансляционной активации вирионов ХВК.

1.2.1. Структура 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 белка оболочки, что вызывает конформационные изменения, открывающие 5'-конец РНК для рибосом (Atabekov et al., 2001). Для проверки критической роли

этих остатков был создан мутант ХВК-ST, в первых 20 аминокислотных остатках которого все Ser и Thr были заменены на неспособные к фосфорилированию Ala –Gly (Козловский С.В., 2003). Неожиданно, вирионы этого мутанта приобрели способность к трансляции даже в отсутствие фосфорилирования, что указывало на глубокие структурные перестройки, имитирующие активированное состояние ХВК дикого типа. Настоящее исследование было направлено на всестороннее выявление структурных последствий этих мутаций с использованием комплекса биофизических методов.

Измерения кривых МУРР для ХВК и ХВК-ST проводились в двух геометриях: с большим (2500 мм) и меньшим (700 мм) расстоянием образец-детектор (Рис. 24 а). 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 ~ 10 нм (Рис. 24 а, вставка).

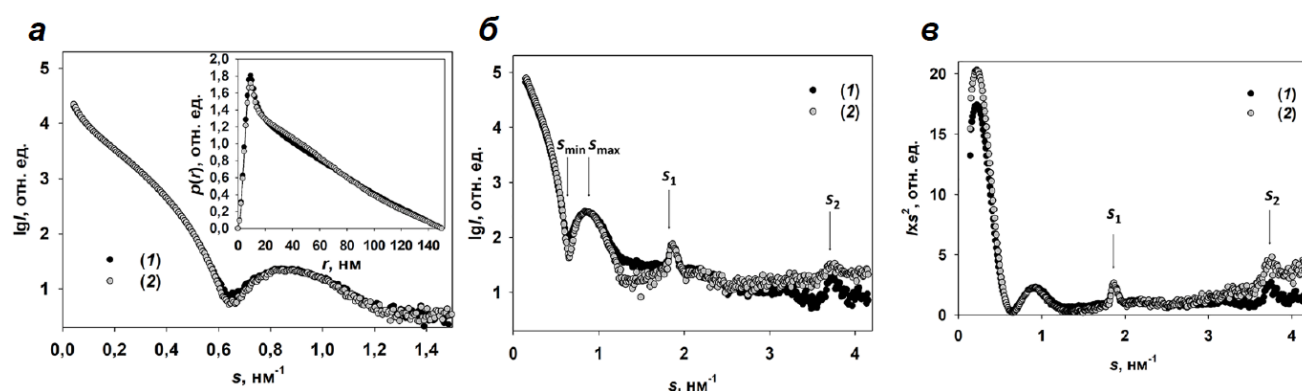


Рис.24. Экспериментальные кривые МУРР вирионов ХВК (1) и ХВК-ST (2), измеренные в геометрии с расстоянием образец - детектор 2500 мм (а) и 700 мм (б). Вставка панели (а) - функции распределения по расстояниям $p(r)$ для вирионов ХВК (1) и ХВК-ST (2). (в) - Графики Кратки кривых малоуглового рассеяния вирионов ХВК (1) и ХВК-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. 24 б). Совпадение их положений указывает на идентичность основного структурного параметра – шага спирали,

который составил $3,36 \pm 0,01$ нм для обоих вирионов. Однако в областях, отвечающих за рассеяние от элементов структуры среднего ($s = 1,3-1,7$ нм⁻¹) и малого ($s > 4$ нм⁻¹) размера, наблюдались различия в профилях кривых. Анализ в координатах Кратки (Рис. 24 в) выявил более выраженное разупорядочение для мутанта ХБК-ST именно в области высоких s (> 4 нм⁻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) программой Gromacs (Abraham, 2015) 1,5 витков спирали ХБК и ХБК-ST, построенных на основе крио-ЭМ структуры (PDB ID: 6R7G) с достроенными N-концевыми пептидами (с помощью программы Alphafold3). Пространственное выравнивание МД-моделей (Рис. 25 в) подтвердило, что наибольшие структурные отклонения (до 35 Å) локализованы в N-концевых областях. Значимые, но менее выраженные изменения (до 8 Å) наблюдались также в С-концевом домене, что указывает на перестройку межсубъединичных контактов. При этом коровый домен (а.о. 51-185) оставался стабильным, демонстрируя лишь минимальные отклонения (до 3 Å).

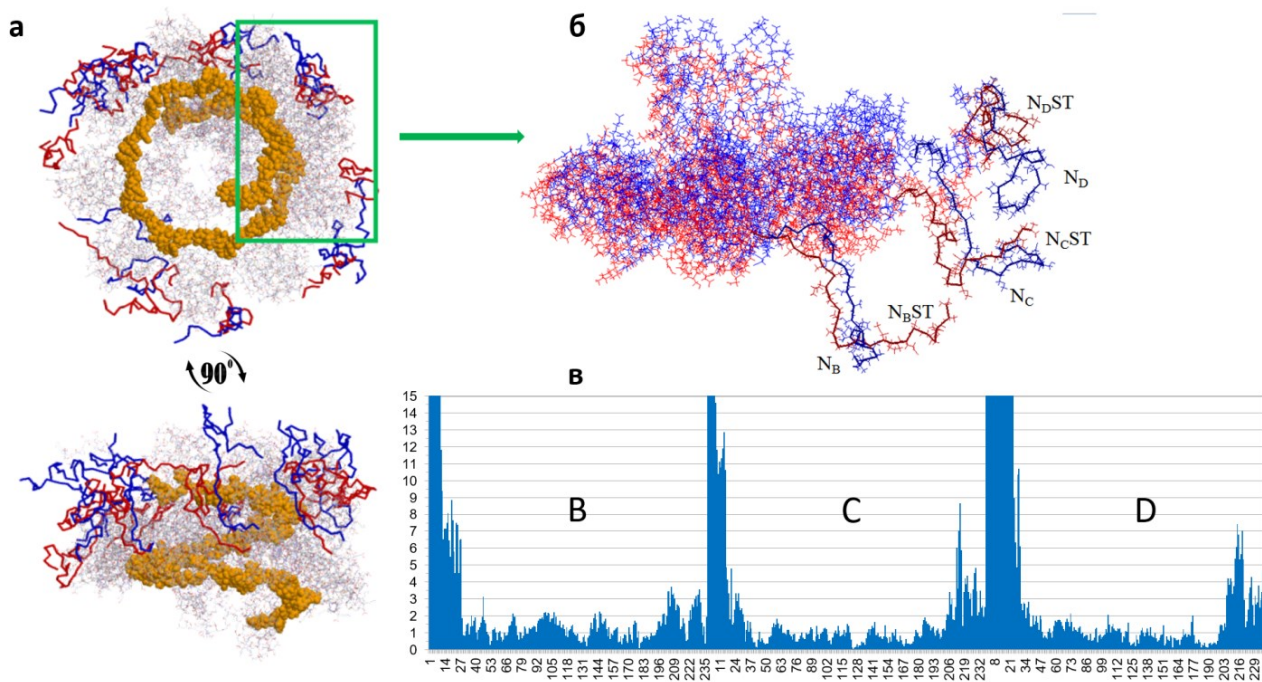


Рис.25. Молекулярное моделирование и пространственное выравнивание структур 1,5 витков спиралей ХБК и ХБК-ST. (а) – 1,5 витка спирали ХБК и

мутанта *XBK-ST*, полученные МД. Скелетом показаны 28 N-концевых аминокислотных остатка, в которых наблюдается основное различие между двумя объектами (синий - *XBK*, красный *XBK-ST*). Структура РНК показана оранжевыми шариками, а атомная структура ядра - серым каркасом. Зеленый прямоугольник выделяет область трех субъединиц, приведенных на панели (б). (в) - дистанция между C_{α} -атомами (Å) трех последовательных субъединиц (B, C, D), в соответствии с пространственным выравниванием. Обозначены их N-концы (N_B , N_C , N_D). По оси X приведена нумерация остатков БО *XBK*.

Анализ изолированных N-концевых пептидов с помощью сервера AlphaFold 3 (Abramson et al., 2024) показал, что пептид мутантного вириона обладает значительно большей склонностью к сворачиванию, чем пептид интактного *XBK*. При моделировании в отсутствии взаимодействия с окружающими аминокислотами радиус инерции R_g нативного пептида составил 1,94 нм, в то время как пептид мутантного *XBK* был почти вдвое более свернут ($R_g = 1,02$ нм), несмотря на идентичную длину (Рис. 26).

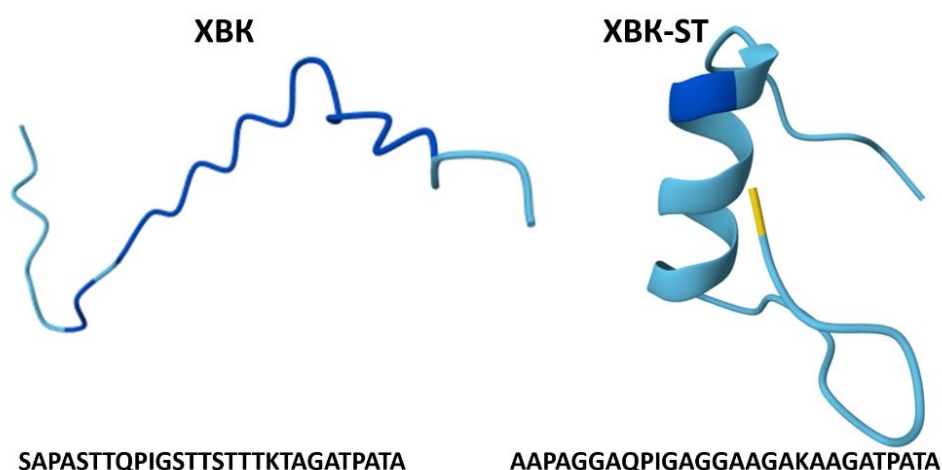


Рис. 26. Предсказанные с помощью сервера *AlphaFold 3* структуры N-концевых пептидов *XBK* и *XBK-ST*. Цветовая шкала соответствует достоверности предсказания структуры *pLDDT* (оценка достоверности для каждого атома по шкале от 0 до 100, где более высокое значение указывает на более высокую достоверность): синим показан участок с $pLDDT > 90$, голубым $90 > pLDDT > 70$, желтым с $70 > pLDDT > 50$.

Спектроскопия кругового дихроизма (КД) показала (Рис. 27 а, в), что, несмотря на сходную термостабильность ($T_{пл} \sim 67-70^{\circ}\text{C}$), вторичная структура мутанта обладает меньшей устойчивостью к действию детергента додецилсульфата натрия (ДСН). Интенсивность положительного максимума в спектрах КД у ХВК-ST была вдвое ниже ($[\theta] \sim 5000 \text{ град} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{дмоль}^{-1}$ против ~ 13000 у ХВК), что может указывать на некоторое уменьшение общей упорядоченности. Данные собственной триптофановой флуоресценции также подтвердили меньшую стабильность третичной структуры мутанта: в присутствии 0,15% ДСН денатурация вирионов ХВК-ST происходила в 2 раза быстрее уже за 8-10 минут, тогда как у ХВК дикого типа этот процесс занимал около 20 минут (Рис.27 б).

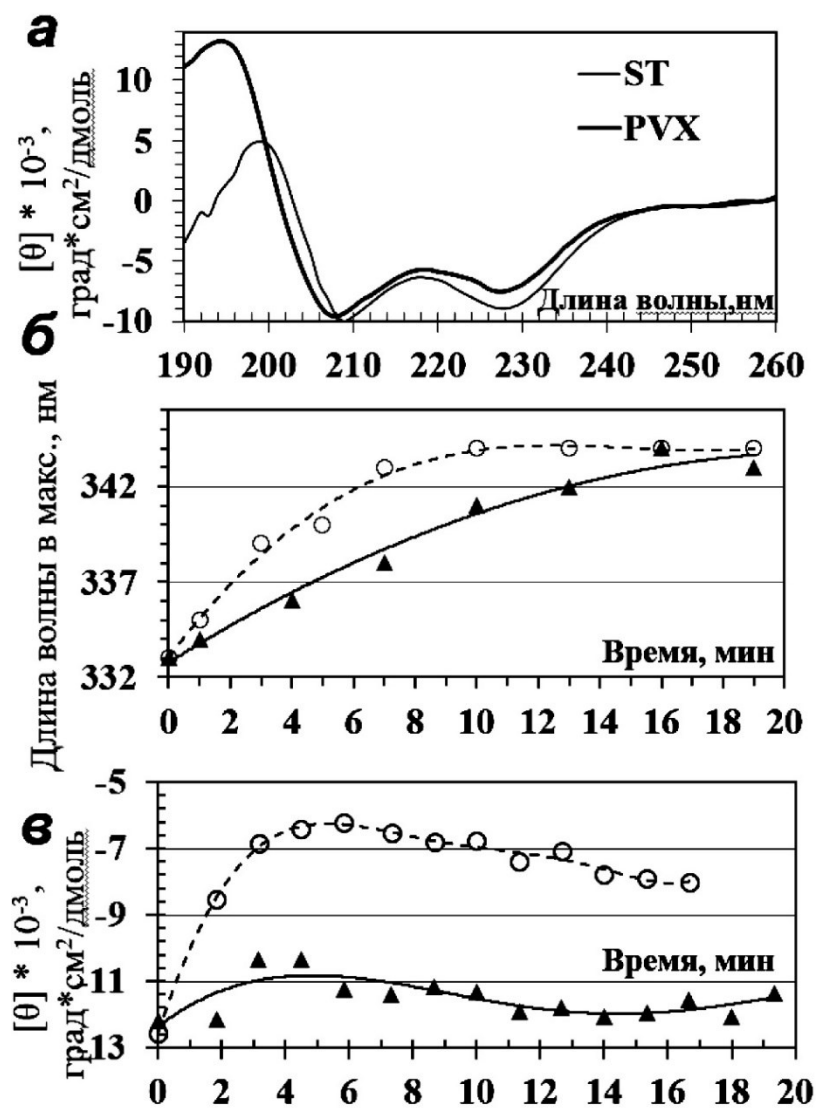


Рис. 27. Спектры кругового дихроизма ХВК и ХВК-ST (а) и влияние ДСН на стабильность вирионов по данным флуоресценции (б) и КД (в). (б)

Разрушение вирионов при инкубации в 0,15% ДСН в течение указанного времени (0-20 мин), при 25°C; Изменение $\lambda_{\text{макс}}$ флуоресценции для ХВК (треугольники), ХВК-ST (кружки). (в) Диссоциация препаратов ХВК (треугольники) и ХВК-ST (кружки) по данным КД-спектров. Приведена кривая изменения интенсивности отрицательных максимумов $[\theta]_{208}$ при инкубации в 0,1% ДСН в течение указанного времени, при 25°C. Концентрация препаратов составляла 0,1 мг/мл.

Одновременно анализ вторичной структуры по КД показал, что в 0,1% ДСН величина $[\theta]_{208}$ у ХВК-ST резко возростала (с -12000 до -6000 град·см²·дмоль⁻¹) за ~6 минут, говоря о разрушении α -спиралей, тогда как у ХВК этот показатель оставался стабильным в течение 20 минут (Рис. 27 в). Эти данные однозначно свидетельствуют о меньшей устойчивости третичной и вторичной структуры вириона ХВК-ST к денатурирующему действию детергента.

Прямые доказательства структурных изменений были получены методом тритиевой планиграфии, который позволяет картировать поверхностно-доступные участки макромолекулы. Анализ распределения радиоактивной метки по элементам вторичной структуры выявил у мутанта ХВК-ST (Рис. 28) 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 в норме экранированных внутренних областей связано с менее плотной укладкой белковой спирали капсида в мутанте. Кроме этого, обнаружено уменьшение содержания метки в 28 N-концевых остатках БО ХВК-ST по сравнению с ХВК (Рис. 28 и 29) ($A_{\text{ХВК-ST}}/A_{\text{ХВК}} = 0,76$). Это также прямо указывает на большую свернутость N-концевого пептида в мутанте.

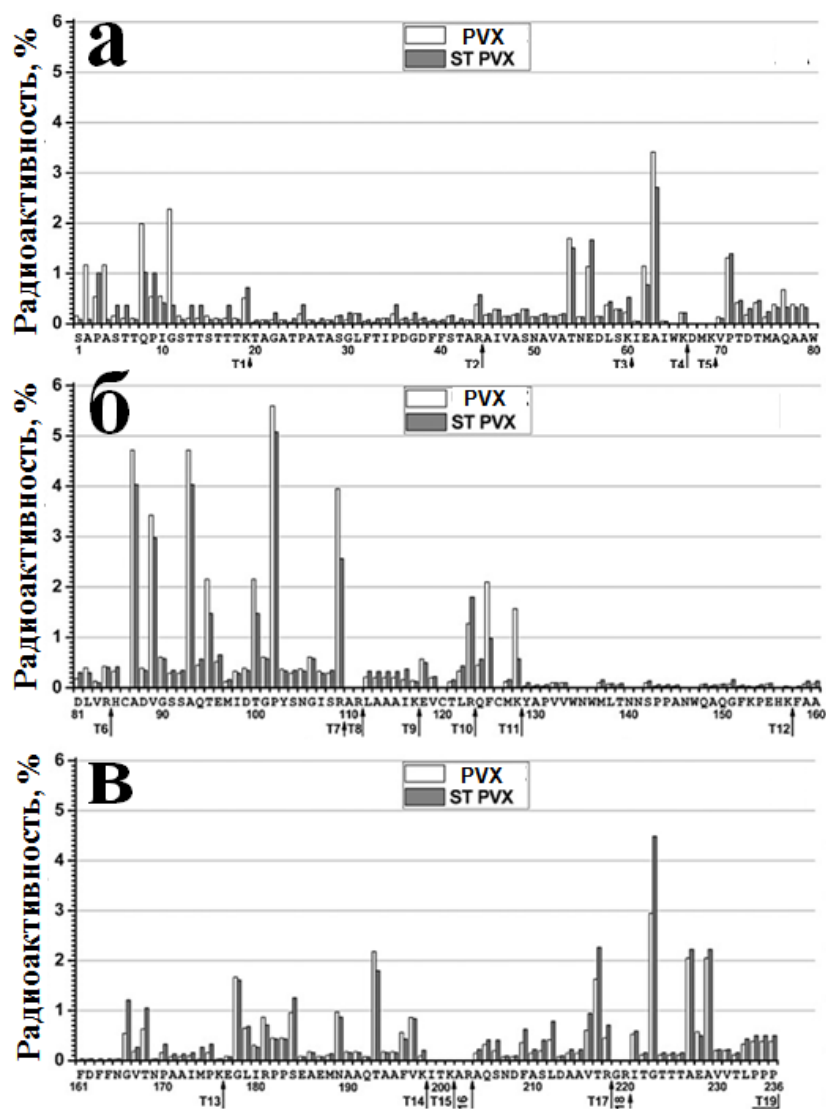


Рис.28. Распределение тритиевой метки по цепи БО ХВК дикого типа и ST-мутанта в составе вирионов. Экспериментальные данные представлены в виде A_i/A_{Σ} , отношения молярной радиоактивности данного а.о. (A_i) к суммарной радиоактивности всех остатков в белке (A_{Σ}) и выражены в процентах. Данные для ХВК представлены в виде белых столбцов, а данные для ST - в виде серых столбцов. Молярная радиоактивность - это средние значения включения тритиевой метки для каждого типа а.о. в каждом триптическом пептиде. Все эксперименты по тритиевому мечению проведены совместно зав. лаб. радионуклидов и меченых соединений кафедры радиохимии Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова Г.А. Бадунюм.

Суммирование всех полученных данных позволяет предложить следующую модель. Замена гидрофильных и способных к гликозилированию Ser и Thr на неполярные Ala и Gly кардинально меняет физико-химические свойства N-концевого пептида (Таблица 2). Резко возрастает его алифатический индекс и удельная гидрофобность, одновременно снижается молекулярная масса и исчезает возможность гликозилирования, необходимого для удержания гидратной оболочки ХБК (Baratova et al., 2004).

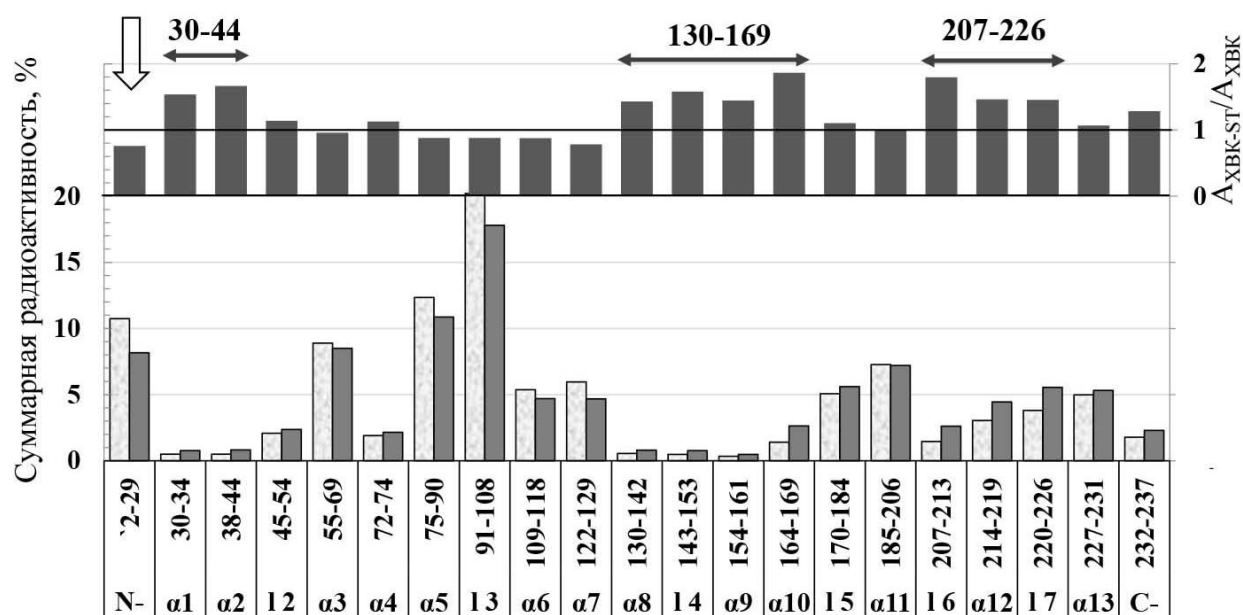


Рис.29. Распределение тритиевой метки по элементам вторичной структуры белков вирионов ХБК (серые столбики) и ХБК-ST (черные столбики). Представлена суммарная радиоактивность элементов в %. Значения A_{HBK-ST}/A_{HBK} представлены на верхней части графика. Участки с $A_{HBK-ST}/A_{HBK} > 1,5$ выделены и подписаны. Широкой стрелкой отмечен N-концевой пептид с $A_{HBK-ST}/A_{HBK} = 0,76$. По оси X приведена нумерация остатков как в модели ХБК PDB ID: 6R7G.

Согласно концепции Уверского, такое сочетание - увеличение гидрофобности при сохранении высокого заряда - способствует переходу из полностью

разупорядоченного состояния в частично упорядоченное, подобное "расплавленной глобуле" (Uversky, 2002; Uversky et al., 2000).

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

	Последовательность N-концевого пептида	М _{теор.} Да	Алифатический индекс	Удельная гидрофобность (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 N-концевых пептидов рассчитывали делением суммарной гидрофобности, определенной по шкале Kyte и Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982), на число остатков; удельный заряд получали делением суммарного заряда при pH 7,3 на число остатков; средний радиус инерции R_g определяли для структур пептидов, предсказанных с помощью AlphaFold3.*

Таким образом, замена Ser и Thr на Ala и Gly в N-концевом пептиде БО приводит к его частичной дегидратации и потере сахаров, что в сочетании с возросшей гидрофобностью индуцирует переход пептида в частично упорядоченное состояние. Это, в свою очередь, нарушает его естественные взаимодействия с соседними субъединицами, что приводит к снижению плотности укладки БО в спиральном капсиде вириона, как это показано данными МУРР, МД и тритиевого мечения. Снижение плотности упаковки белкового каркаса и потеря гидратной оболочки облегчают доступ рибосом и трансляционных факторов к вирусной РНК, что объясняет приобретение вирионами мутанта ХВК-ST способности к трансляции, имитируя эффект, который у дикого типа достигается через фосфорилирование.

1.2.2. Структурные перестройки БО ХВК при связывании ТГБ1 с вирионом.

Другим путем трансляционной активации внутривирусной РНК ХВК, нетранслируемой *in vitro*, является связывание нескольких молекул вирус-специфичного белка, кодируемого первым геном тройного генного блока ХВК (ТГБ1), с концом частицы вириона, содержащим 5'-конец РНК (Atabekov et al., 2001; Atabekov et al., 2000; Rodionova et al., 2003). Это связывание служит сигналом для быстрого кооперативного ремоделирования всей длинной частицы, которое делает возможным её последующее котрансляционное раздевание на свободную РНК и субъединицы БО уже в процессе трансляции первых кодонов. Критическая роль в этом процессе принадлежит С-концевой области белка ХВК: эксперименты с делеционными мутантами однозначно показали, что удаление последних 10-18 а.о. полностью блокирует трансляционную активацию РНК, индуцированную ТГБ1, и его связывание с вирионом, в то время как удаление 19 N-концевых остатков не оказывает подобного эффекта (Zayakina et al., 2008). Это указывает на то, что С-концевой сегмент выполняет ключевую функцию в передаче сигнала от связанного ТГБ1 к внутренним участкам белкового капсида.

Для непосредственной визуализации структурных изменений, лежащих в основе этого ремоделирования, было проведено сравнительное исследование интактных вирионов и вирионов, инкубированных с ТГБ1, методом тритиевой планиграфии (Рис. 30). На рисунке 31 показаны рассчитанные средние радиоактивности элементов вторичной структуры в вирионах ХВК и ХВК-ТГБ1, определённых в крио-ЭМ модели (PDB ID: 6R7G, Grinzato et al., 2020)

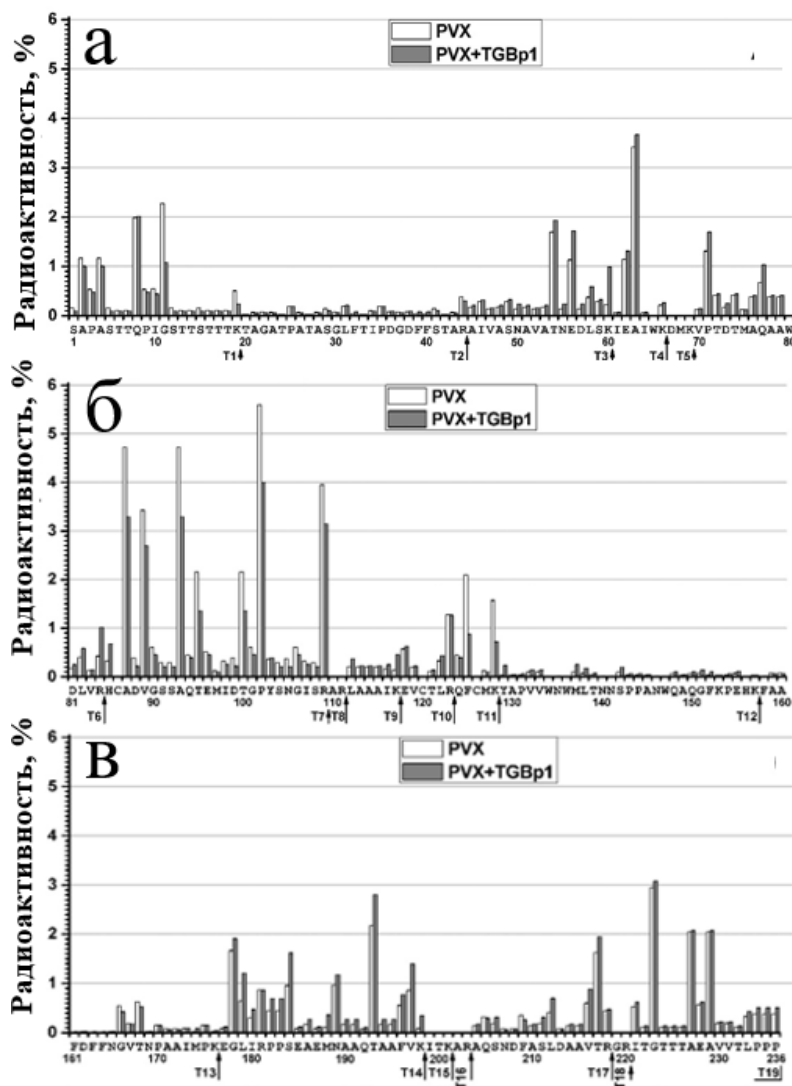


Рис. 30. Распределение тритиевой метки в цепях полипептидов ХВК и ХВК+ТГБ1. Данные для интактного ХВК – в виде белых столбцов, а данные для ХВК+ТГБ1 - в виде серых столбцов.

Последовательность БО ХВК разбита на три участка (А, В, С). Описание метода расчета значений приведено в Рис.28.

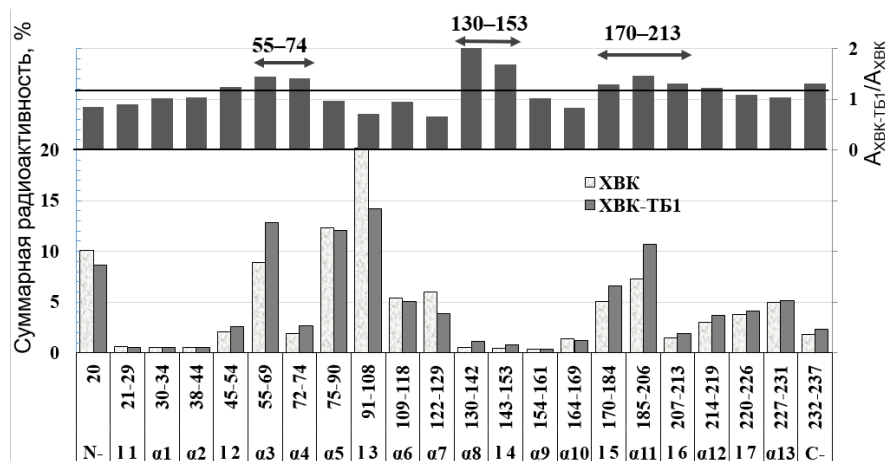


Рис.31. Распределение тритиевой метки по элементам вторичной структуры белков вирионов ХВК (серые столбики) и ХВК-ТГБ1 (черные столбики).

Представлена

суммарная радиоактивность элементов в %. Значения $A_{ХВК-ТГБ1}/A_{ХВК}$ представлены на верхней части графика. Участки с $A_{ХВК-ТГБ1}/A_{ХВК} > 1,25$ выделены и подписаны.

Полученные данные, отражающие доступность различных участков полипептидной цепи БО для растворителя, подтвердили, что связывание ТГБ1 не вызывает «раздевания» вириона. Включение тритиевой метки оставалось практически неизменным для большей части последовательности БО, что свидетельствовало о сохранении общей архитектуры капсида. Однако анализ выявил чёткие и выраженные локальные изменения доступности в строго определённых сегментах, непосредственно ассоциированных со связыванием РНК. Наблюдался значительный рост (примерно на 47%) содержания метки в области а.о. 55-74, включающей первые спирали центрального домена и расположенной рядом с Asn51, контактирующим с первым нуклеотидом РНК. Более существенный рост доступности (почти двукратный) был зафиксирован для области а.о. 130-153, входящей в состав РНК-связывающего субдомена (спираль $\alpha 8$ и петля 14). Также было обнаружено увеличение в среднем на 40% включения трития во фрагменте БО из а.о. 170-213. Ключевая область 185-213 включает спираль $\alpha 11$ и петлю 16, которые являются частью С-концевого домена и содержат критические остатки (Lys199, Ile200, Arg204, Gln206), формирующие непосредственные контакты с четырьмя из пяти нуклеотидов (Grinzato et al., 2020) в РНК-связывающем сайте каждой субъединицы БО. Фрагменты белка, в которых наблюдали увеличение мечения в частицах ХВК+ТГБ1, выделены красным цветом на трехмерной модели субъединицы (PDB: 6R7G) (Рис. 32).

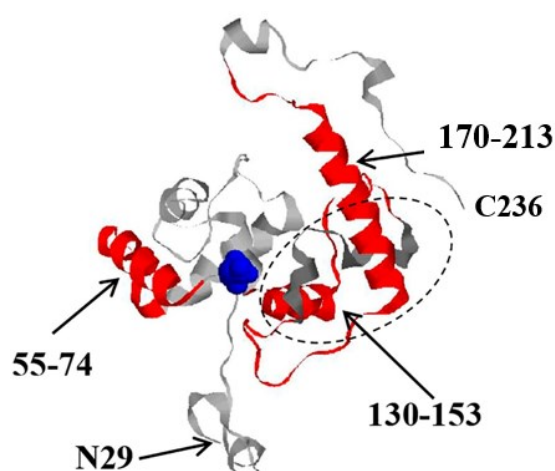


Рис.32. Крио-ЭМ модель ХВК (PDB 6R7G). Фрагменты белка (а.о. 55-74, 130-153, 170-213), в которых наблюдали увеличение мечения в частицах ХВК+ТГБ1,

выделены красным цветом, а.о. Asn51- синим цветом. Штриховой линией показан субдомен 130-169.

Таким образом, используя метод тритиевой планиграфии, 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 разделение вириона, приводящее к высвобождению трансляционно-компетентной РНК.

2. ИЗУЧЕНИЕ ПОТИВИРУСА А-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ.

2.1. Модель топологии и структуры субъединиц белка оболочки потивируса А-вируса картофеля по данным тритиевой планиграфии и предсказательных методов.

Когда мы начинали в 2000-м году эту работу мало что было известно о конформации субъединиц БО потивирусов и их расположении в вирионе. Для гибких вирусов не было определено ни одной структуры с высоким разрешением. Считалось, что N- и С-концевые остатки потивирусов находятся на поверхности. При кратковременной обработке частиц потивирусов трипсином с N- и С-концов субъединицы белка оболочки удалялось от 20 до 30 аминокислот, в результате чего оставались инфекционные и устойчивые к трипсину частицы, укороченные до 216–218 остатков (Shukla et al., 1988). О поверхностном расположении N- концевой фрагмента БО говорили исследования эпитопов с использованием моноклональных антител против АВК:

N-концевой октапептид БО оказался иммунодоминантным (Baratova et al., 2001), как и в случае с другими потивирусами (Shukla et al., 1988; Shukla et al., 1989). Кроме того, N-концевой триплет DAG участвовал в передаче вируса тлѣй-переносчиком (Atreya et al., 1995), что предполагало его поверхностное расположение.

Для изучения топографии поверхности вирионов АВК мы использовали метод тритиевой планиграфии (см. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ).

2.1.1. N-концевая область БО АВК (~50 а.о.) расположена на поверхности вириона.

Препарат А-вируса картофеля (изолят В11), предоставленный Järvekülg L. (Таллиннский технологический университет) подвергали бомбардировке термически активированными атомами трития и определяли внутримолекулярное распределение метки в аминокислотах белка оболочки, чтобы оценить их стерическую доступность. Предварительно, мы охарактеризовали очищенный препарат АВК. Белок оболочки интактных частиц АВК мигрировал в виде единственной полосы в ДСН-ПААГ (см. ниже) и реагировал с специфичным моноклональным антителом против АВК А5В6, которое распознаёт N-концевой октопептид БО. N-концевая последовательность была подтверждена методом секвенирования и масс-спектрометрии. Эти тесты показали, что N-конец БО был заблокирован. Для определения типа N-блокированной группы белок оболочки подвергали гидролизу трипсином, после чего пептид Т1 выделяли с помощью ВЭЖХ. Анализ пептида Т1 (а.о. 1—13) методом частичного секвенирования и масс-спектрометрии показал, что N-концевой аланин белка был ацетилирован.

Пептиды, полученные в результате гидролиза трипсином меченого БО, разделяли с помощью ВЭЖХ, подвергали кислотному гидролизу и определяли их аминокислотный состав с одновременным количественным определением и измерением радиоактивности (см. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ). Было выделено 24 пептида (Рис. 33), которые составляют примерно 92% всей

последовательности белка оболочки. Пептиды в основном довольно короткие: большинство из них содержат менее 10 аминокислот, шесть пептидов содержат от 13 до 22 аминокислот, и только один пептид (пептид T11, а.о. с 87 по 155) состоит из 69 аминокислот. Далее рассчитывали молярную радиоактивность для каждого аминокислотного остатка в триптических пептидах.

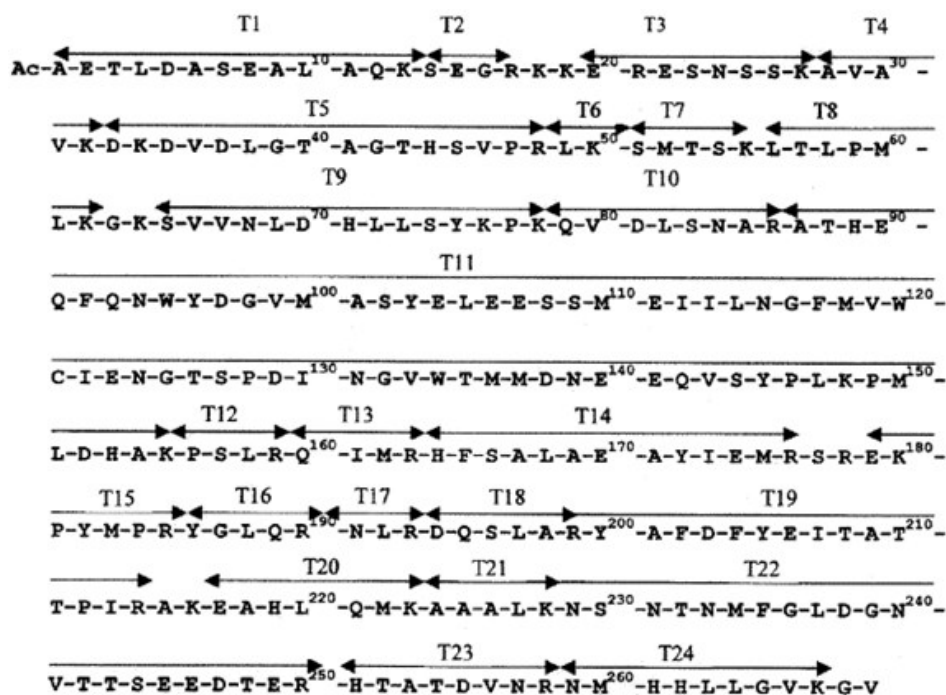


Рис.33 Аминокислотная последовательность БО АВК (EMBL ZZ21670). T1-T24 – триптические пептиды, отмеченные двусторонними стрелками.

Из гистограммы распределения тритиевой метки вдоль полипептидной цепи (Рис. 34) видно, что профиль доступности для мечения тритием аминокислот БО имеет ряд характерных особенностей. N-концевая область (первые 50 а.о.) содержит наибольшее количество стабильного трития, включенного в белок, что предполагало его поверхностное расположение. В этой области наиболее доступными участками были аминокислотные остатки с 1 по 15 (пептид T1 и часть T2) и аминокислотные остатки с 27 по 50 (С-концевой лизин пептида T3 и пептиды T4–T6). Устойчивый к трипсину основной пептид T11 (а.о. с 87 по 159) из центральной части белка содержит самый низкий уровень трития. Кроме того,

неожиданно, С-концевая область БО имела относительно низкий уровень мечения тритием. За исключением A85 и L168, длинная центральная часть молекулы белка оболочки (остатки от 60 до 180) включала довольно небольшие и однородные количества метки. Средние значения удельной радиоактивности в участках а.о. от 62 до 76, от 88 до 104, от 106 до 124, от 129 до 137 и от 150 до 176 (исключая L168) значительно ниже, чем для других частей молекулы. Это указывает на то, что эти сегменты белка оболочки АВК расположены во внутренней части субъединицы вириона.

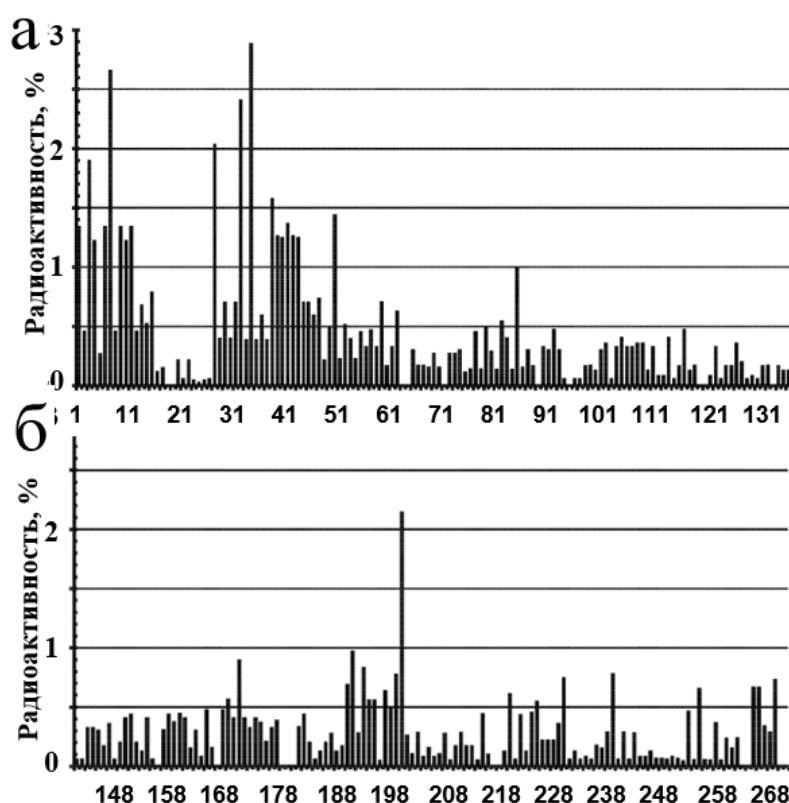


Рис.34. Распределение тритиевой метки в белке оболочки после бомбардировке тритием частиц АВК. I_i/I_Σ (%), отношение удельной радиоактивности данной аминокислоты (I_i) к общей удельной радиоактивности белка (I_Σ) (в %). Номер аминокислотного остатка указан по оси абсцисс, а предполагаемые α -спирали (прямоугольники) и β -нити (ленты) обозначены ниже оси.

2.1.2. Предсказание вторичной структуры белка и пространственная реконструкция.

Предсказание вторичной структуры белка оболочки АВК проводился стереохимическим методом, учитывая стандартные белковые структуры. Результаты показали наличие чередующихся полярных и неполярных аминокислот в β -складчатых листах и неполярных остатков каждые три-четыре позиции в α -спиралях. В каждой α -спирали должна быть минимум одна гидрофобная область, образующая гидрофобную полосу. Анализ аминокислотной последовательности БО АВК с использованием данного подхода предполагал, что белок должен состоять из трех структурных областей: N-концевой области (а.о. 1 до 60), центральной области (а.о. 61 до 180) и С-концевой области (а.о. 181 до 269) (Рис. 35). Центральная область состояла из пяти последовательных α -спиралей: $\alpha 2$ (а.о. 62 до 76), $\alpha 3$ (88 до 104), $\alpha 4$ (106 до 124), $\alpha 5$ (129 до 137) и $\alpha 6$ (150 до 176). Предсказано, что С-концевая область должна состоять из двух α -спиралей: $\alpha 7$ (а.о. 194 до 210), $\alpha 8$ (252 до 268) и трёх β -листов: $\beta 5$ (182 до 188), $\beta 6$ (218 до 227) и $\beta 7$ (235 до 241). Первые восемь аминокислот N-концевой области должны быть неструктурированными, за которыми следуют четыре последовательных β -листа: $\beta 1$ (а.о. 9 до 13), $\beta 2$ (17 до 20), $\beta 3$ (28 до 32), $\beta 4$ (35 до 40) и α -спираль $\alpha 1$ (45 до 57).

Из этих структурных прогнозов следовало, что БО АВК содержит восемь α -спиралей, составляющих 50%, и семь β -листов, составляющих 16%, от общей последовательности белка. Чтобы подтвердить эти предположения, мы измерили спектр КД белка оболочки АВК в диапазоне от 200 до 250 нм (см. ниже). Содержание α -спиралей в белке, определенное с помощью уравнения Гринфилда-Фасмана (Greenfield & Fasman, 1969), составило 46%, что хорошо согласуется с прогнозируемым значением (50%). Кроме того, границы предсказанных элементов вторичной структуры либо точно совпадали с участками гидролиза трипсином, либо расположены в непосредственной близости от этих участков. 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 модели. Модель предсказывала три домена третичной структуры: (i) открытый извне N-концевой домен, включающий неструктурированный N-конец из 8 аминокислот и два β -тяжа, (ii) C-концевой домен, включающий две спирали, а также три β -тяжа, которые образуют двухслойную структуру, называемую блоком abCd, и (iii) центральный домен, содержащий пучок из четырёх спиралей, подобный найденному в БО ВТМ.

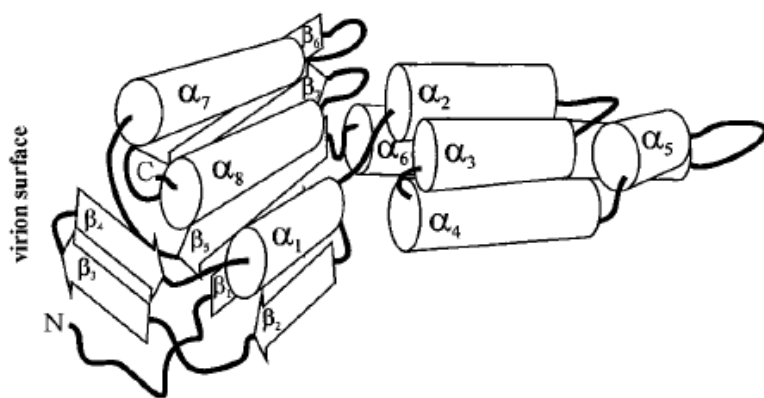


Рис.35. Схематическое изображение топологии белка оболочки АВК. α -спирали показаны в виде цилиндров, а β -нити – в виде открытых стрелок, при этом толстые сплошные линии

обозначают соединительные петли и N- и C-концы полипептидной цепи. Эксперимент и моделирование топологии БО АВК выполнено совместно с д.б.н. Добровым Е.Н. (НИИФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ) и д.х.н. Ефимовым А.В. (Институт белка РАН, Пушкино).

Предложенная пространственная организация поверхностного белка АВК в вирусных частицах отличалась от схематических моделей, предложенных для родственного потивируса – УВК, в котором как N-, так и C-концы молекулы белка оболочки расположены на поверхности (Shukla et al., 1988; Shukla et al., 1989). В течение многих лет это была единственная модель, которую использовали для объяснения трёхмерной структуры БО потивирусов. Позже, с помощью ряда структурных и предсказательных методов анализа мы и другие

авторы показали, что белки оболочки потивирусов частично разупорядочены, что затрудняет их исследование (Charon et al., 2016; Ksenofontov et al., 2013).

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

Данные, полученные в результате комплексного биофизического и структурного анализа, выявили уникальную архитектуру вириона АВК, важную роль в которой играют частично разупорядоченные N-концевые пептиды.

2.2.1. Белок оболочки АВК имеет частично разупорядоченную структуру.

В данном разделе представлены результаты нашего исследования свойств вирионов АВК и изолированного БО с использованием УФ-спектроскопии, КД-спектроскопии в дальней и ближней УФ-областях, флуоресцентной спектроскопии и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) впервые показавшие, что БО АВК принадлежит к классу белков с ID-сегментами (intrinsically disordered), так называемых нативно-развернутых, природно-неструктурированных белков. На сегодняшний день известно значительное число белков с ID-сегментами (см. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).

Вирионы АВК демонстрировали необычное сочетание физико-химических свойств. Белок оболочки АВК обладал аномально низкой электрофоретической подвижностью в ПААГ с ДСН, соответствующей примерно 35 кДа, в то время как его молекулярная масса составляет 30,4 кДа. Возможным объяснением этого феномена может служить наличие в структуре белка неупорядоченных сегментов.

Спектр кругового дихроизма (КД) вирионов в дальнем УФ-диапазоне показывал интенсивный отрицательный максимум при 203 нм, что указывало на высокое содержание неупорядоченных структур в капсидном белке (Рис. 36). После разрушения с помощью 0,15% ДСН этот максимум смещался до 208 нм, а интенсивность уменьшалась с -26000° до -15000° , и спектр КД становился похожим на типичные α -спиральные белки.

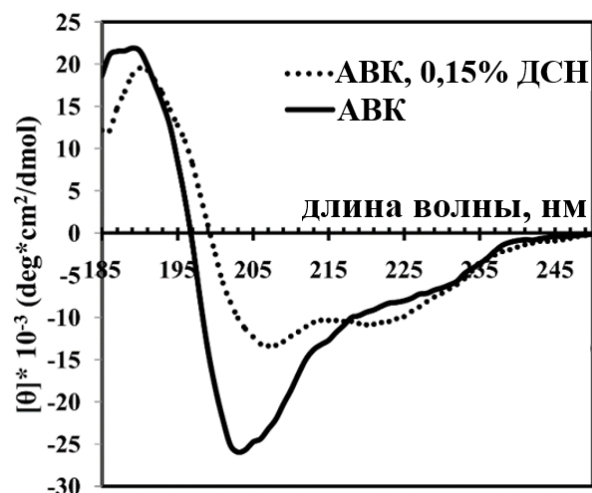


Рис.36. Спектры КД АВК указывают на наличие неупорядоченной структуры в их белках. Спектры КД вирионов (сплошная линия) и разрушенных в 0,15% ДСН вирионов АВК (пунктирная линия) в 10 мМ фосфатном буфере; измеряли при 25°C при концентрации вируса 0,14 мг/мл.

При нагревании до 55°C, еще до разрушения вириона, доля разупорядоченных конформаций возрастала, о чем свидетельствовало резкое увеличение интенсивности КД-сигнала отрицательного максимума с -26000° до -45000° (Рис. 37 в, г); одновременно сдвиг максимума собственной флуоресценции вируса смещался с 327 до 340 нм и интенсивность основного максимума снижалась вдвое (Рис. 37 а, б).

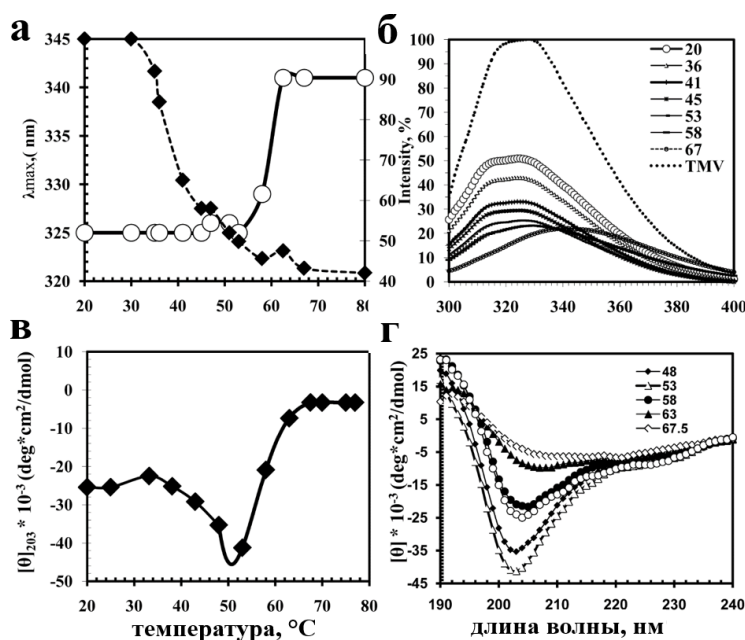


Рис.37. При нагревании вирионов фракция разупорядоченных структур в БО возрастает. Термическая денатурация БО АВК, контролируемая с помощью

флуоресценции (а и б) и КД в дальнем УФ-диапазоне (в, г). (а) Температурные зависимости положения максимума флуоресценции (кружки) и интенсивности (ромбы); (в) Температурные зависимости величины $[\theta]_{203}$. Полные спектры при указанных температурах (б и г).

Спектр КД вирионов АВК, измеренный в ближнем УФ, напоминал спектры других спиральных вирусов растений, но имел низкую интенсивность ($\Delta\epsilon \sim 3$ единицы), подобную термально денатурированной изолированной одноцепочечной РНК, что также указывает на наличие разупорядоченных структур в белке (Рис. 38).

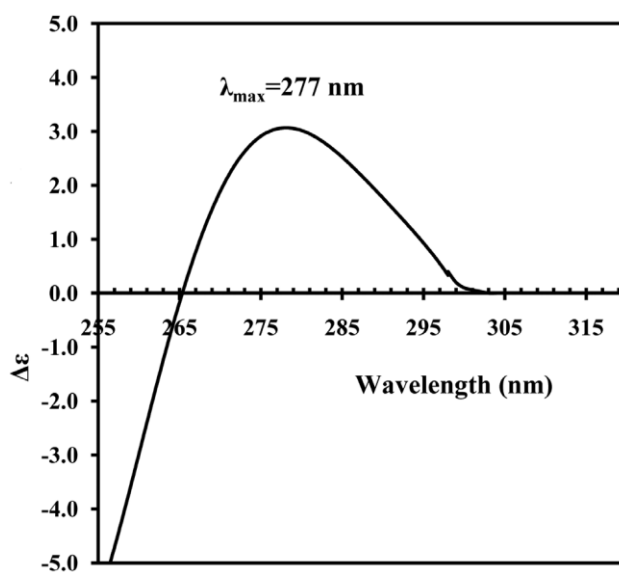


Рис.38. Спектр КД в ближней УФ-области для интактных вирионов АВК в 10 мМ фосфатном буфере, рН 7,0. Спектр измеряли при 25°C в ячейках толщиной 0,5 см при концентрации АВК 0,6 мг/мл

Термостабильность вирионов АВК, определенная методом дифференциальной сканирующей калориметрии, оказалась ниже ($T_{пл} \sim 55^\circ\text{C}$), чем у вирионов ВТМ ($80,5^\circ\text{C}$) и ХВК ($64,3^\circ\text{C}$) (Рис. 39). Ширина кривой для АВК была типична для белков, в отличие от ВТМ и ХВК, которые имели более широкие кривые, возможно, из-за неоднородности вирионов. Кривые ДСК для изолированного БО АВК не показывали надежных пиков поглощения тепла, что может указывать на низкую $T_{пл}$, либо на отсутствие плавящихся структур в изолированном БО.

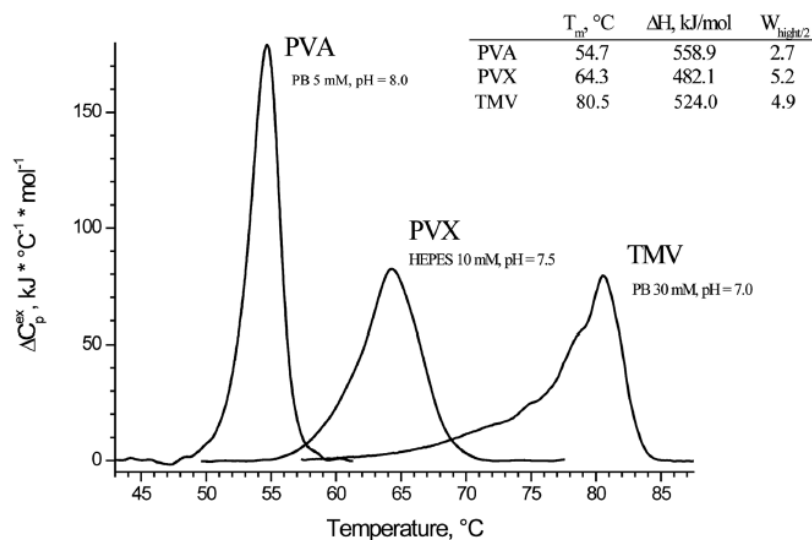


Рис.39. Кривая плавления ДСК для интактных вирионов АВК в сравнении с кривыми плавления палочковидных вирионов ВТМ и нитевидных вирионов ХВК в 10 мм фосфатном буфере, рН 7,0. Температуры плавления ($T_m, ^\circ\text{C}$), значения энтальпии (ΔH) и ширина на половине высоты ($W_{\text{высота}/2}$) показаны в правом верхнем углу.

Анализ по первичной структуре БО выявляет высокий процент неупорядоченных ID-областей (40-66%), особенно в N- и C-концевых регионах (Рис. 40), которые, вероятно, стабилизируют межсубъединичные взаимодействия. N-концевой пептид АВК (а.о. 1-32) включает большое число (~70%) гидрофильных (9 Т, S, N, Q, G) и заряженных (13 Е, D, К, R) остатков и относительно малое число гидрофобных/алифатических остатков (10 I, L, V, А) – характерный признак ID-областей, которые, вероятно, и являются причиной аномалий в КД-спектре и электрофоретической подвижности. Позже наличие ID-областей в белках потивирусов было подтверждено рядом работ (Charon et al., 2016; Solovyev & Makarov, 2016).

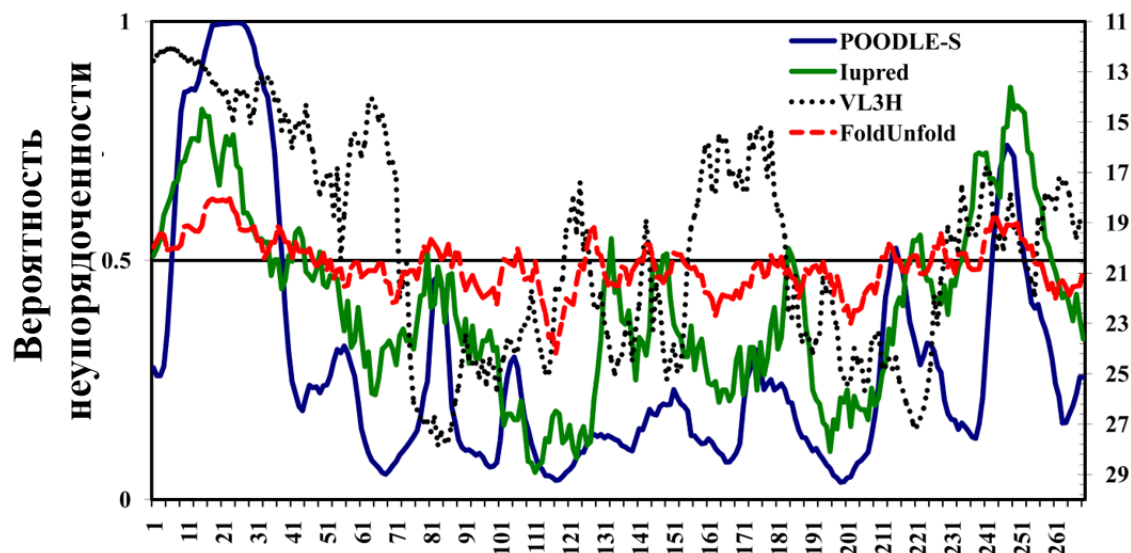


Рис.40. Предсказание развернутых ID-областей в свободном БО АВК, выполненное с использованием программ POODLE-S, Iupred, VL3H и FoldUnfold. Номера а.о. указаны по оси абсцисс

2.2.2. N-концевые пептиды встроены в спиральную упаковку и регулируют гибкость вириона

Роль N-концевых фрагментов (остатки 1-32) была исследована с помощью ограниченного протеолиза вирионов. Важно отметить, что при выделении и хранении препаратов потивирусов часто наблюдается естественный *in situ* протеолиз трипсиноподобными протеазами клеточного сока, приводящий к удалению 30–50 N-концевых остатков (Δ N-пептидов) (Jarveculg, 2000; Shukla et al., 1988). Показано, что такие частицы остаются инфекционными. Биологическая значимость этого явления предположительно связана с необходимостью высвобождения инфекционных частиц из стилетов тли для последующей передачи растению (Atreya et al., 1995; Harrison & Robinson, 1988). Ранее было показано, что расщепление молекул БО *in situ* протеазами клеточного сока происходит в положениях аминокислот 32 и 42 (Jarveculg, 2000). Ограниченный трипсинолиз препарата интактного вируса (в соотношении фермент/субстрат 1 : 500, 15 мин) также приводил к отщеплению 32 N-концевых а.о. из БО вириона, что было показано масс-спектроскопией и электрофорезом в

ПААГ (Рис.41). Это подтверждает его поверхностное расположение; кроме того, по данным ПЭМ вирионы сохраняли свою целостность (см. ниже).

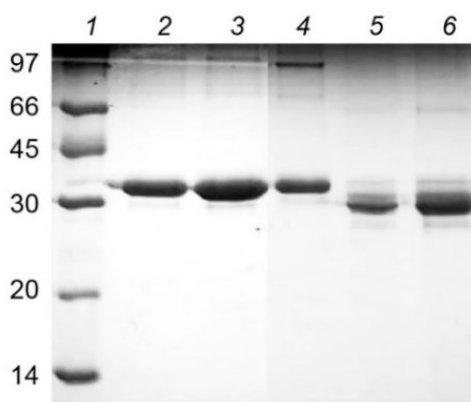


Рис.41. Электрофоретический анализ интактных вирионов (2-4) АВК и продуктов ограниченного трипсинолиза (5-6). Были использованы аликвоты по 1 мкг (4, 5), 5 мкг (2) и 10 мкг (3, 6) на полосу. Молекулярная масса указана рядом с контрольными белками (1).

Мы показали, что удаление этого N- концевой пептида трипсином (препарат АВКΔ32) не разрушает вирион, но существенно изменяет его структурные и динамические свойства.

Изменения вторичной структуры и стабильности вирионов.

КД-спектры белков АВК и АВКΔ32 демонстрируют различия как по амплитуде, так и по положению максимума (Рис. 42 а), что указывает на снижение количества ID-областей. Белок АВКΔ32 в составе вирусных частиц проявлял также повышенную термическую устойчивость (Рис. 42 б): при нагревании от 20 до 55°C наблюдался постепенный рост интенсивности $[\theta]_{\max}$ (при 203 нм), который составил -45000° для нативного АВК и -29600° для АВКΔ32, что указывало на увеличение стабильности вириона (Рис. 42 б).

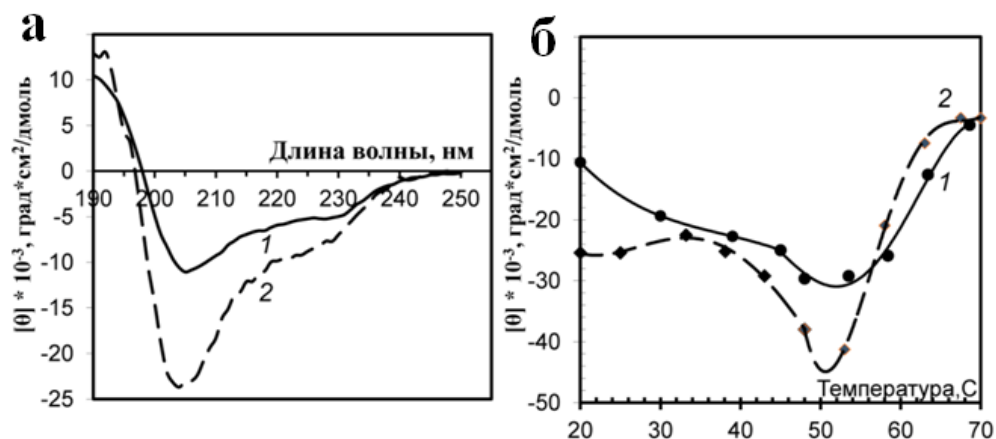


Рис. 42. Спектры КД АВК указывают на изменение структуры БО при удалении 32 N-концевых а.о. (а) Спектры кругового дихроизма препаратов АВКΔ32 (1) и вирионов АВК (2). (б) Термическая денатурация образцов АВКΔ32 (1) и вирионов (2) по данным КД- спектров. Приведены интенсивности отрицательных максимумов.

Удаление N-концевых пептидов приводило к упорядочиванию и уплотнение упаковки белкового капсида.

Данные МУРР показали, что после удаления N- концевых пептидов шаг спиральной упаковки капсида уменьшался с 3,92 нм до 3,37 нм (Рис. 43 а). Вирион АВКΔ32 становился более упорядоченным и жестким, о чем свидетельствует меньшая степень разупорядочения в образце Δ/d и больший размер кристаллических областей (Таблица 3).

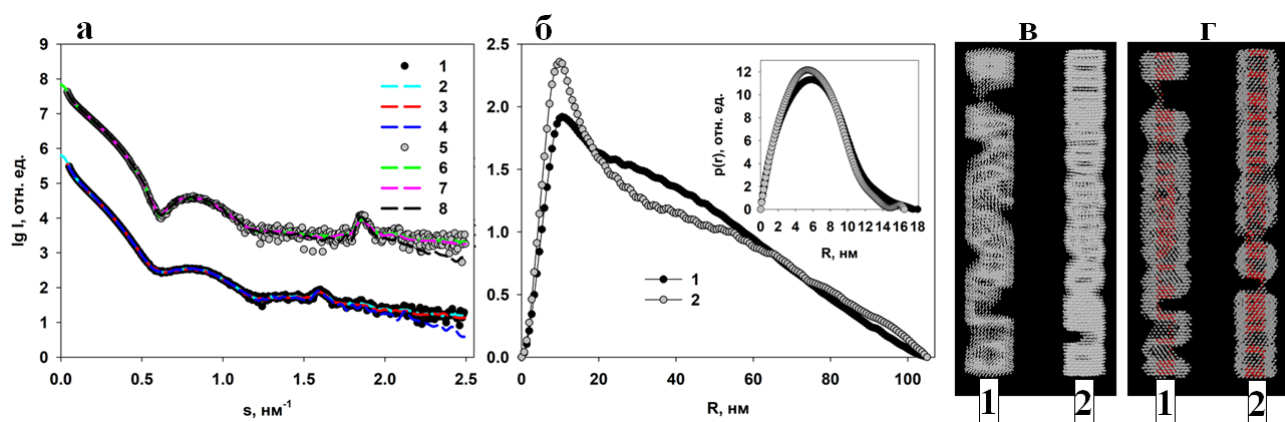


Рис. 43. Структура вирионов АВК изменяется после ограниченного протеолиза по данным МУРР.

(а) Экспериментальные кривые рассеяния АВК и АВКΔ32 (1 и 5, кружки); кривые, рассчитанные программой GNOM от функций распределения по расстояниям $p(r)$ (2, голубой и 6, зеленый); кривые рассеяния от форм, восстановленных *ab initio* программой DAMMIN (3, красный и 7, малиновый); кривые рассеяния от форм, восстановленных *ab initio* программой MONSA (4, синий и 8, черный), для АВК и АВКΔ32, соответственно. (б) Функции распределения по расстояниям для АВК (1) и АВКΔ32 (2). Вставка: функции распределения по расстояниям $p(r)$ в режиме анализа поперечного сечения для АВК (1) и АВКΔ32 (2). (в) восстановленные программой DAMMIN формы вирионов АВК (1) и АВКΔ32 (2). (г) восстановленные программой MONSA формы вирионов АВК (1) и АВКΔ32 (2). Белковая оболочка показана серыми виртуальными атомами (шариками), вирусная РНК – красными.

Таблица 3. Структурные характеристики интактных вирионов и вирионов АВКΔ32

Образец	$s, \text{нм}^{-1}$	$d, \text{нм}$	$L, \text{нм}$	$\Delta/d, \text{нм}$
Интактный вирион	$1,60 \pm 0,02$	$3,92 \pm 0,02$	125 ± 10	$0,06 \pm 0,01$
АВКΔ32	$1,86 \pm 0,01$	$3,37 \pm 0,01$	180 ± 5	$0,04 \pm 0,01$

Для анализа структуры также важно, что период d , то есть расстояние между периодически повторяющимися элементами структуры, уменьшился на 0,5 нм при удалении 32-х аминокислотных остатка из N-концевых доменов БО. Эти изменения относятся к малым, межмолекулярным размерам, то есть к изменениям внутри белковой оболочки, и не могут быть интерпретированы как взаимодействие между самими вирионами, например, при образовании упорядоченных кластеров этих крупных частиц. В этом случае период системы d был бы не меньше диаметра вирионов даже при самой плотной упаковке.

О том, что при удалении N-концевых доменов БО не происходит разрушение вириона и в основном сохраняется внешняя форма, но имеют место внутренние перестройки в белковой оболочке, свидетельствуют также кривые МУРР в координатах Кратки (Рис. 43, б). Они демонстрируют почти полное совпадение профилей рассеяния и имеют характерный колоколообразный вид, что указывает на компактность и структурированность образцов в целом (Svergun et al., 2013b), и, в то же время, из-за сдвига брэгговских пиков эти кривые отражают различия в квази-кристаллической структуре, то есть изменения на молекулярном уровне.

Определить форму вирионов АВК и АВКΔ32 с разрешением 1-2 нм можно используя *ab initio* протокол и программу DAMMIN (Svergun, 1999a). Построенные с этой целью функции распределения по расстояниям $p(r)$ представлены на рисунке 43 б. Поскольку известно, что вирионы АВК представляют собой длинные гибкие нити, функции распределения по расстояниям $p(r)$ были рассчитаны, во-первых, для *ab initio* определения формы вирионов в целом, а во-вторых, для анализа размеров их поперечного сечения. Последнее необходимо в связи с возможным изменением диаметра нитей при удалении 32-х аминокислот из N-концевой области БО, находящихся на внешней поверхности вириона.

Как видно из рисунка 43 б, функции распределения по расстояниям $p(r)$, отражающие общую форму вирионов, характерны для удлинённых рассеивающих объектов с поперечным сечением порядка 10-16 нм. Более точный анализ распределения по размерам поперечного сечения (Рис. 43 б, вставка) показывает, что максимальный размер поперечного сечения интактного вириона может достигать 18 нм, в то время как для АВКΔ32 он не превышает 16 нм. Максимум $p(r)$ для АВК расположен на $R = 6$ нм, то есть в основном диаметр интактного вириона равен 12 нм, а для АВКΔ32 $R = 5,4$ нм и, таким образом, диаметр вириона действительно становится несколько меньше после удаления 32-х N-концевых аминокислот.

Восстановленные с помощью программы DAMMIN структуры низкого разрешения АВК и АВКΔ32 представлены на рисунке 43 в, (1 и 2, соответственно). Поскольку вирионы являют собой длинные цилиндры (нити), поиск решений проводился в цилиндрической области с длиной цилиндров $D_{max} = 105$ нм (Рис. 43 б, основная панель) и диаметрами, полученными при анализе размеров поперечного сечения нитей вирионов (Рис. 43 б, вставка). Кривые рассеяния от моделей (Рис. 43 а, кривые 3 и 7) демонстрируют хорошее совпадение с экспериментальными данными с $\chi^2 = 2,3$ для АВК и 1,8 для частично деградированного вириона. В структуре АВКΔ32 заметна определенная периодичность, в то время как интактный вирион менее упорядочен и на его общую форму оказывает существенное влияние гибкость нитей.

В более универсальном подходе, впервые примененном для таких объектов, *ab initio* модель вируса была получена путем одновременного построения как общей формы, так и структуры отдельных компонентов вируса, то есть белка и РНК. Двухфазная модель, разграничивающая белковую и РНК-части, была построена программой MONSA (Svergun, 1999a). В качестве объема поиска были использованы два цилиндра. Первый, для моделирования РНК, представлял собой внутренний сплошной цилиндр с радиусом 3,2 нм и длиной 105 нм как для АВК, так и для частично деградированного вириона. Второй цилиндр являлся объемом поиска для восстановления структуры белковой оболочки и был полым и внешним по отношению к первому цилиндру с внешним радиусом 8,0 нм для интактного вириона и 7,0 нм для АВКΔ32 в соответствии с результатами анализа поперечного сечения. Внутренний радиус второго цилиндра был равен 3,5 нм для обоих вирионов. В процессе моделирования виртуальные атомы (шарики) во внешнем цилиндре могли принимать фазовые индексы 1 и 0 (т.е. белок или растворитель), а во внутреннем 2 и 0 (РНК или растворитель). Таким образом, была обеспечена непротиворечивость модели, где белок оболочки оказывался на внешней поверхности, а РНК в глубине.

Построенные двухфазные модели, показанные на Рис. 43 *з*, аппроксимируются искаженными цилиндрами соответствующих размеров и хорошо согласуются с моделями, построенными программой DAMMIN. Искажения полученных форм (неидеальность) свидетельствуют как о влиянии гибкости вирионов, так и о частичной разупорядоченности структуры в целом и белков оболочки в частности. Характерно, что шарики, соответствующие РНК, простираются вдоль всей оси цилиндра, что соответствует известным представлениям о структуре вируса. Двухфазные модели хорошо приближают экспериментальные кривые МУРР (Рис. 43 *а*, кривые 4 и 8) с $\chi^2 = 3,4$. Следует отметить, что брэгговские пики в районе $s = 1,6$ и $1,9 \text{ нм}^{-1}$ также очень хорошо воспроизведены. Присутствие брэгговских пиков отражает регулярную спиральную упаковку белков оболочки, которая присутствует в полученных моделях. При этом периодичность структуры вирионов более заметна для АВКΔ32.

В целом, *ab initio* восстановление формы вирионов по данным малоуглового рассеяния продемонстрировало заметные изменения в структуре вириона после удаления 32-х аминокислот N-концевых доменов белка оболочки. Эти изменения касаются как размера поперечного сечения нитей вириона, так и периодичности структуры БО. Уменьшение периода d предположительно связано с уменьшением шага спиральной упаковки белка в оболочке вируса.

Для того, чтобы показать правильность этого предположения, было проведено моделирование структуры АВК и АВКΔ32 геометрическими телами. Для этого были построены шариковые модели спиральных тел, внешние размеры которых определялись из анализа функций распределений по расстояниям $p(r)$. От полученных спиралей были рассчитаны интенсивности малоуглового рассеяния и проведено сравнение с экспериментальными данными МУРР от АВК и АВКΔ32 (Рис. 44 *а*).

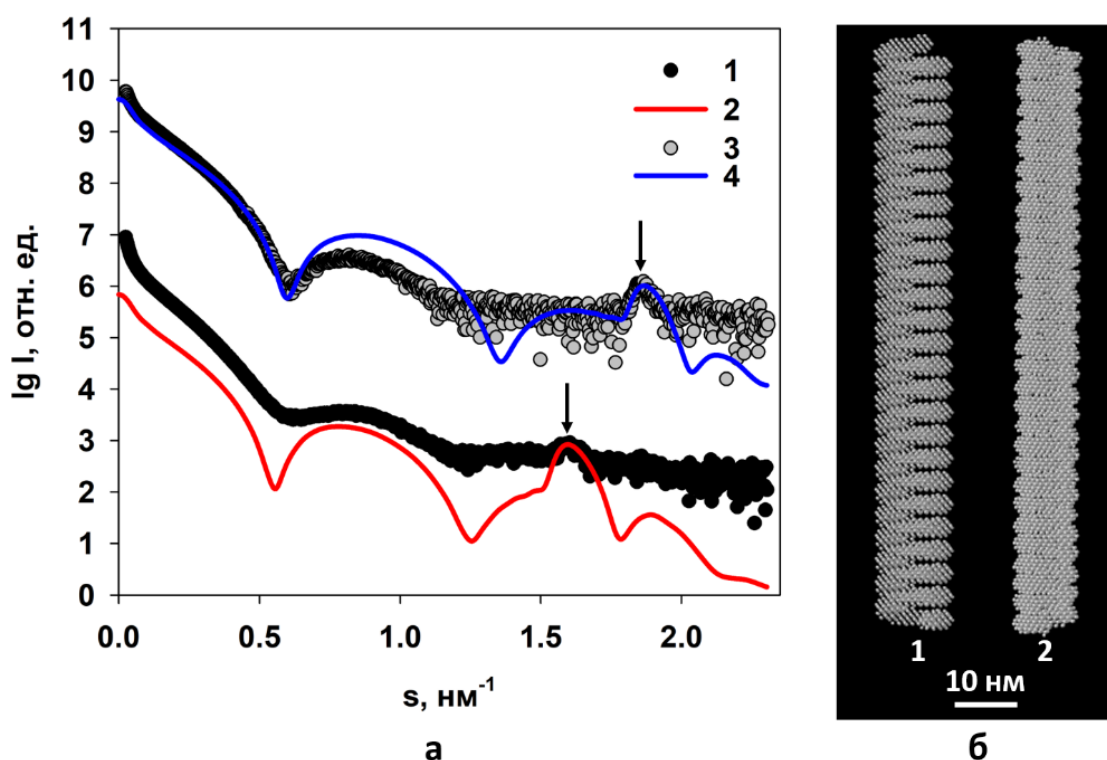


Рис. 44. Моделирование строения интактного и частично деградированного вирионов. (а) экспериментальные кривые МУРР (1 и 3) и рассеяние от спиральных тел (2 и 4) для АВК и АВКΔ32. Стрелками показаны моделируемые брэгговские пики. (б) спиральные модели, имитирующие интактный вирион (1) и АВКΔ32 (2).

Моделирование геометрическими телами представляет собой метод грубого приближения, который не может учитывать все особенности реальных структур, подвижность и гибкость их отдельных фрагментов, но позволяет построить модели выделенных, особенно важных для анализа элементов. В данном случае требовалось доказать, что «брэгговские» пики на экспериментальных кривых рассеяния отражают шаг спиральной упаковки белка в оболочке вируса. Для этого расстояние между витками модельных спиралей было задано в соответствии с характеристическим периодом $d=2\pi/s$, то есть $d=3,9$ нм для интактного вириона и $3,4$ нм для частично деградированного (Таблица 3). Толщина нитей спиралей была выбрана равной $3,4$ нм в предположении, что эта величина не может быть больше шага спирали для АВКΔ32. Небольшие изменения в меньшую сторону не влияли на результат моделирования. Как видно

из рисунка 44 *a*, максимумы интенсивности рассеяния от модельных структур хорошо описывают брэгговские пики на экспериментальных данных. Отсюда можно сделать вывод, что при удалении 32-х аминокислот N-концевого домена АВК действительно происходит изменение шага спирали белковой оболочки – спираль сжимается и вирион в целом становится более жестким и поэтому лучше аппроксимируется цилиндрической формой (Рис. 44).

Важно подчеркнуть, что неупорядоченные участки белков выполняют роль гибких адаптеров, опосредующих взаимодействия как между самими белками, так и с другими клеточными компонентами (Uversky, 2013). При этом для межклеточного переноса жизненно важных соединений растения используют плазмодесмы, однако эти же каналы могут служить «входными воротами» для растительных патогенов, которые, несмотря на значительные размеры, способны преодолевать данную барьерную систему. Известно, например, что вирусы могут целенаправленно задействовать для этой цели некоторые клеточные миозины (Amari et al., 2011). В связи с этим можно выдвинуть гипотезу, что неструктурированные подвижные фрагменты N-концевого домена белка оболочки вируса (АВК) могут участвовать в специфическом связывании с определёнными белками клетки хозяина, обеспечивая тем самым транспорт вириона между клетками. Если это так, то направленное воздействие на данные фрагменты вирусной частицы соответствующими соединениями способно блокировать процесс распространения патогена.

Отдельного внимания заслуживает роль гибкости самого вириона в процессе инфицирования. Наблюдается закономерность (Dolja et al., 2006): чем больше длина вирусной частицы, тем выше её гибкость – от тобамовирусов (около 300 нм) к потексвирусам (500–1000 нм) и далее к клостеровирусам (1400–2000 нм). Именно эта повышенная гибкость облегчает протяжённым вирионам перемещение через узкие плазмодесменные каналы. Таким образом, для успешного проникновения в клетку удлинённому вириону необходима соответствующая степень подвижности. Не исключено, что ключевую роль в

точками (.) полуконсервативные замены; подчеркнуты последовательности, удаленные трипсином (ABK) или отсутствующие в PDB ID: 6HXX для YBK. Представлены структуры БО ABK № GI:25013598 и YBK (штамм NTN) № GI:728041063.

БО YBK характеризуется спиральной симметрией, а использованный для моделирования фрагмент состоял из 35-ти белковых субъединиц, включая в себя атомные координаты аминокислот с 44 по 267 остаток, то есть без 43-х аминокислотных остатков N-концевого домена, атомные координаты которых не были определены из-за низкой электронной плотности этих разупорядоченных фрагментов. Фрагмент YBK был многократно воспроизведен с помощью программы MASSHA (Konarev et al., 2001) вдоль винтовой оси для построения модели, содержащей 30 витков (260 субъединиц) с максимальной длиной 105 нм. Число витков подбиралось таким образом, чтобы получить наилучшее соответствие между экспериментальными данными и кривой рассеяния. Сравнение профилей экспериментальной и модельной кривых (Рис. 46) демонстрирует некоторое расхождение кривых рассеяния как в интервале $0,08 < s < 1,2 \text{ нм}^{-1}$, так и небольшой сдвиг брэгговского пика с максимумом на $s = 1,9 \text{ нм}^{-1}$ ($d = 3,4 \text{ нм}$) в сторону больших размеров с $s = 1,8 \text{ нм}^{-1}$ ($d = 3,5 \text{ нм}$). Эти отклонения свидетельствуют о различии структур белковых оболочек вирионов ABK и YBK, несмотря на то, что они являются ближайшими гомологами. При этом следует учесть, что полученная модель более близка не к интактному вириону ABK, а к его частично деградированной форме. Кроме того, расхождение между экспериментальной и модельной кривой $\chi^2 \sim 25$ (Рис. 46) отражает неидеальность реальной структуры этого вириона по сравнению с его жесткой моделью на атомном уровне, не способной изменять свою конформацию. В то же время биологические измерения в малоугловом рассеянии происходят в растворе, где рассеивающие частицы сохраняют свои основные свойства, в том числе гибкость.

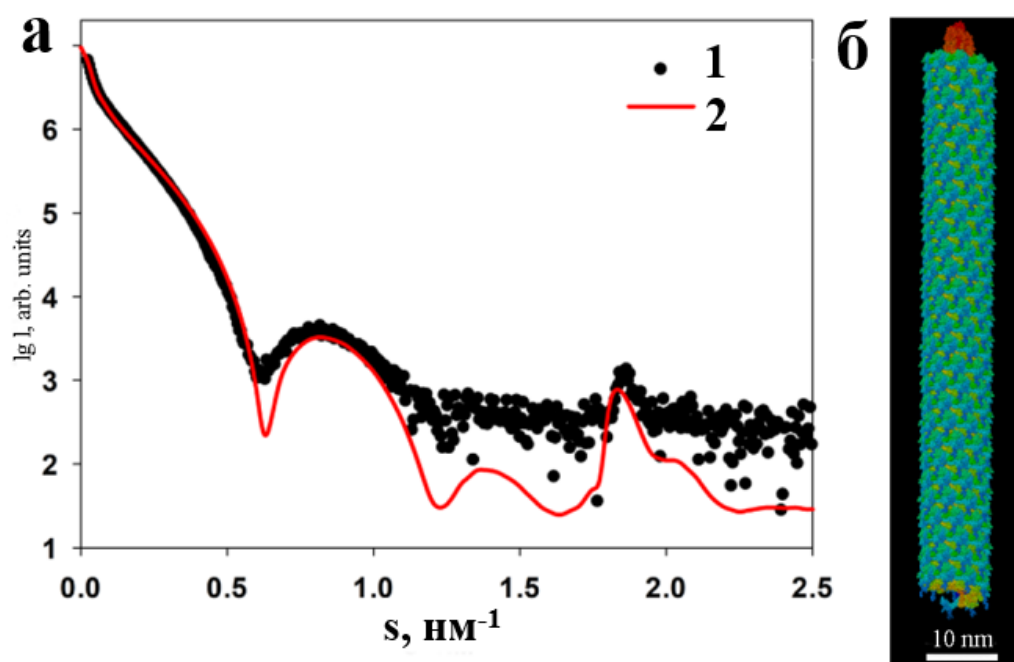


Рис. 46. Результат моделирования строения белковой оболочки вириона АВК с использованием структурных блоков высокого разрешения БО YBK (PDB: 6HXX). (а): 1 – Экспериментальная кривая малоуглового рассеяния от АВКΔ32; 2 – рассчитанный программой CRY SOL профиль рассеяния от полученной структурной модели. (б): Структурная модель белковой оболочки, имитирующая АВК. Расхождение кривых рассеяния ($\chi^2 \sim 25$) отражает отличие реальной структуры в растворе от его жесткой модели на атомном уровне.

Основным результатом данного этапа исследования стало изменение геометрии спиральной упаковки белка оболочки под действием трипсина. В результате частичной деградации АВК и отщепления 32 N-концевых аминокислот шаг спирали сократился с 3,9 нм до 3,4 нм. Подобное структурное сжатие, по аналогии с пружиной, закономерно приводит к повышению жёсткости белковой оболочки: уплотнённая спираль всегда обладает меньшей гибкостью по сравнению с её более растянутым состоянием.

Это предположение было подтверждено экспериментально. Данные, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии, наглядно

продемонстрировали изменение морфологии вирионов и подтвердили снижение их гибкости после протеолитической обработки.

Удаление N- концевых пептидов приводило к потере гибкости вирионов.

Данные ПЭМ показали переход от гибких нитевидных частиц АВК к жестким палочковидным частицам АВКΔ32 (Рис. 47), что хорошо коррелировало с данными МУРР. С помощью комплекса Gatan (Digital Micrograph software) диаметры этих частиц были измерены и оказались равными $14,4 \pm 0,2$ нм и $12,1 \pm 0,3$ нм, для интактных вирионов и частиц АВК Δ32, соответственно, что также косвенно указывало на удаление N-концевых остатков с поверхности вирионов АВК.

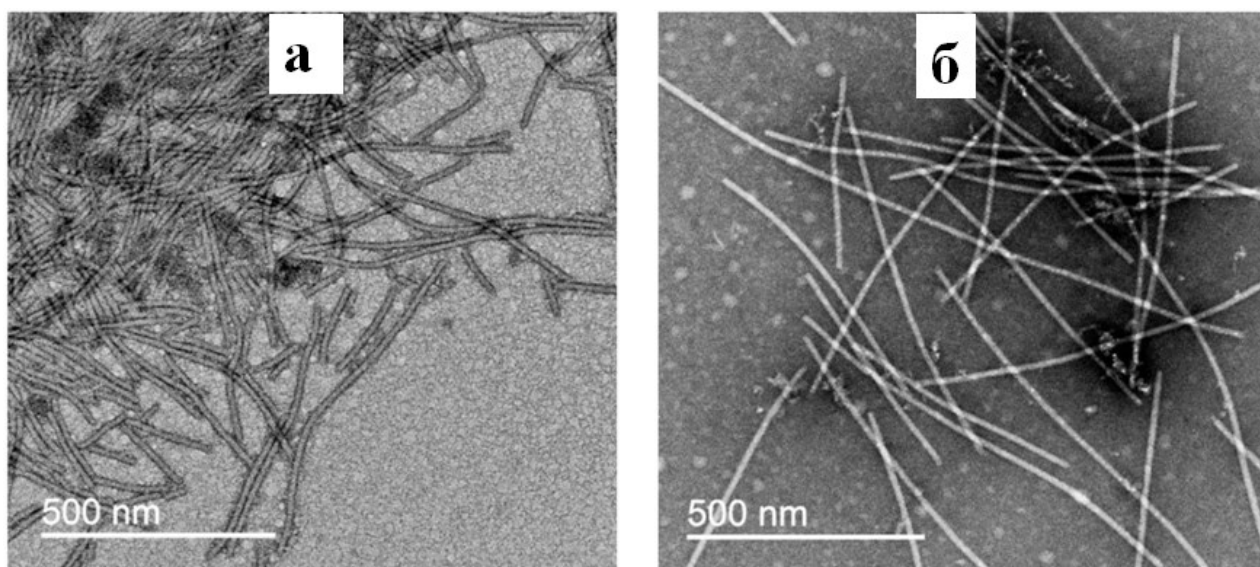


Рис. 47. Результаты электронной микроскопии вирионов АВК (а) и вирионов после ограниченного протеолиза АВКΔ32 (б). Образцы контрастировали 2% уранилацетатом (15 сек).

Таким образом, N-концевой пептид частично расположен между витками спирали, удерживая субъединицы на определенном расстоянии. Часть этого пептида выступает над поверхностью, увеличивая диаметр вириона. Его динамичность, по-видимому, способствуют локальной подвижности субъединиц, что критически важно для обеспечения гибкости всего вириона.

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

Тритиевое мечение позволило определить локализацию N-концевого пептида (1-32 а.о.) и выявить структурные изменения при его удалении.

2.3.1. N-концевые пептиды экранируют поверхность БО вириона. Часть пептида скрыта между витками спирали.

Распределение тритиевой метки в N-концевом пептиде АВК оказалось неравномерным (Рис. 48): центральный фрагмент (а.о. 16–26) был практически не мечен, в отличие от фланкирующих участков (1–15 и 27–32 а.о.). Это согласуется с моделью, согласно которой центральная часть пептида скрыта внутри вириона.

Значительные различия в распределении тритиевой метки между целым вирионом АВК и его усеченной формой АВКΔ32 (Рис. 48) указывают на экранирование его поверхности N-концевыми пептидами. Для структурного анализа использовали модель БО близкородственного вируса YBK (PDB: 6HXX). Эта модель, состоящая из трёх доменов (N-концевого, 44–77 а.о.; центрального, 78–225 а.о.; и С-концевого, 226–267 а.о.), послужила основой для интерпретации данных тритиевого мечения АВК благодаря высокой идентичности аминокислотных последовательностей и структурному сходству спиральных параметров, подтверждённому методом МУРР. В Таблице 4 представлено включение тритиевой метки (в % от общей радиоактивности) в элементы вторичной структуры для АВК и АВКΔ32.

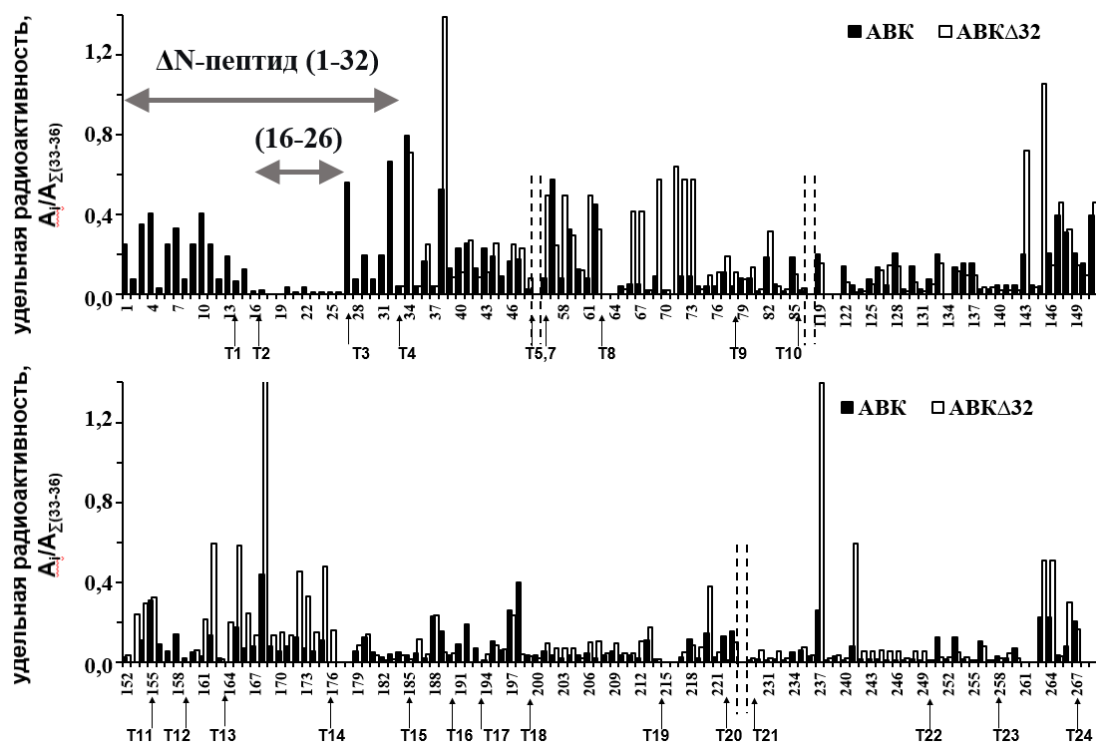


Рис. 48. Распределение тритиевой метки по а.о. белков вирионов ABK и ABKΔ32. $A_i/A_{\Sigma(33-36)}$ – удельные радиоактивности остатка (A_i), нормированные на сумму A_i поверхностных остатков 33–36. Крупными стрелками показаны N-пептид и «встроенная» его часть (а.о. 16–26). Сайты расщепления трипсином показаны стрелками. Пунктиром – положение отсутствующих пептидов.

Таблица 4. Распределение тритиевой метки по элементам вторичной структуры БО вирионов ABK и ABKΔ32 и доступная площадь СН-поверхности, рассчитанная с помощью программы GROMACS 5,1 на модели YBK (PDB: 6HXX).

Элемент вторичной структуры	№ остатков	Число а.о.	Суммарная радиоактивность элемента А, %		Относит. изменение A^a	Доступная площадь СН-поверхности элемента S^b , нм ²		Доля недоступной СН-поверхности, S^a
			ABKΔ32	ABK		БО YBK	YBK	
11	33-59	33	18,7	24,8	0,8	9,2	5,2	$\frac{(S_{\text{БО YBK}} - S_{\text{YBK}})}{S_{\text{БО YBK}}}$
β1,2	60-65	6	3,3	4,1	0,8	2,7	1,9	0,28
α1	68-74	7	6,1	2,0	3,0	3,3	2,2	0,31
12	75-87	13	4,2	5,1	0,8	4,6	2,5	0,45
α3*	119-124	5	0,8	2,4	0,3	0,8	0,5	0,42
14	125-132	8	2,0	4,3	0,5	2,0	1,1	0,41
β3	133-138	6	1,7	3,9	0,4	2,0	1,0	0,51
β4	141-146	6	6,8	3,4	2,0	2,0	1,4	0,30
α4	147-154	8	6,2	9,4	0,7	1,9	1,5	0,23
α5	157-163	7	3,0	1,4	2,2	0,9	0,6	0,34
α6	165-180	16	16,8	8,9	1,9	4,9	2,3	0,52
α7	184-191	8	1,8	3,3	0,5	2,3	1,1	0,50
α8	195-200	6	1,6	5,3	0,3	1,0	0,8	0,20
15	201--211	11	2,6	2,3	1,1	1,7	1,3	0,27
α9	212-228	17	3,5	4,4	0,8	7,5	3,3	0,56
C-	229-267	39	15,7	11,5	1,4	20,4	9,6	0,53

^а Значения $A_{ABK\Delta 32}/A_{ABK} > 1,8$ и $(S_{BO\ YBK} - S_{YBK})/S_{BO\ YBK} > 0,43$ подчеркнуты.
^б Суммарную доступную площадь СН-поверхности элемента (см. ниже) рассчитывали путём сложения доступной площади всех аминокислот элемента. Доступную СН-поверхность определяли только у атомов углерода, связанных хотя бы с одним атомом водорода.

Относительное изменение радиоактивности вириона в элементах вторичной структуры белка при удалении N-концевого пептида продемонстрировано на трёхмерной модели БО YBK двумя цветами для лучшей визуализации (Рис. 49). После удаления N-концевых пептидов мечение резко возрастает ($A_{ABK\Delta 32}/A_{ABK} > 1,8$) в элементах вторичной структуры поверхностного N-домена (спираль $\alpha 1$, 68–74 а.о.) и центрального домена ($\beta 4$ -тяж, 141–146 а.о.), что указывает на их прямое экранирование N-пептидом (Рис. 49 в). Усиление мечения спиралей $\alpha 5$, $\alpha 6$ (157–180 а.о.) свидетельствует о расположении N-пептида над межвитковой зоной, где он экранирует контакты между соседними субъединицами.

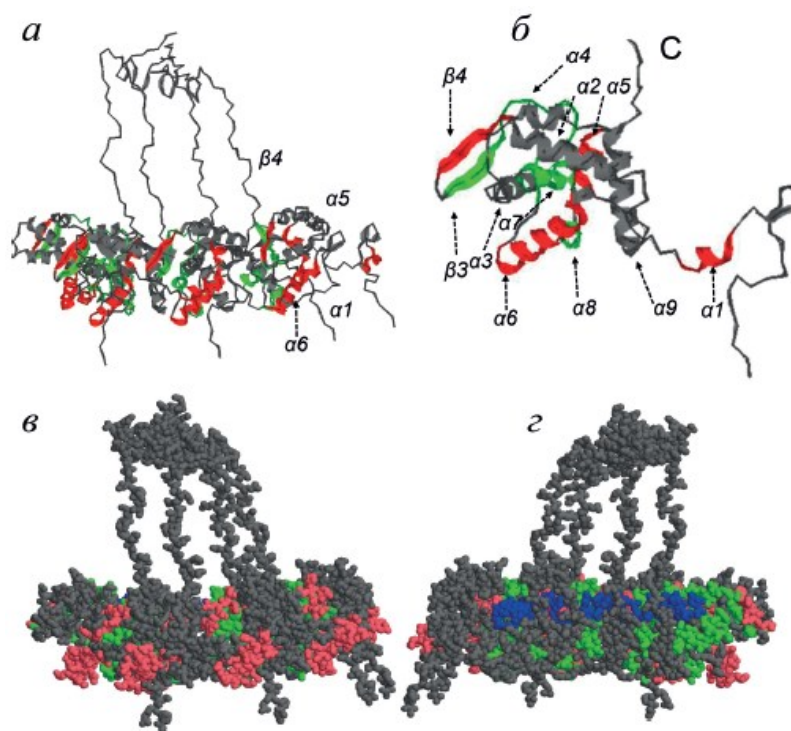


Рис. 49. Относительное изменение радиоактивности в элементах вторичной структуры белков вирионов ABK при удалении ΔN -пептида на модели БО YBK (PDB: 6HXX). Области со значением $A_{ABK\Delta 32}/A_{ABK} > 1,8$ показаны красным, $< 0,5$ – зелёным. а – Фрагмент, состоящий из 4 субъединиц; б –

фрагмент, состоящий из одной субъединицы (спирали представлены в виде ленты), С – С-конец БО; в, г – Показано 4 субъединицы (приведён скелет структуры), снаружи и изнутри вириона соответственно; РНК отмечена синим цветом (г)

Уменьшение включения метки во внутренние слои вириона у АВКΔ32 (Рис. 49 г) согласуется с данными МУРР и ПЭМ и указывает на структурную перестройку, приводящую к более плотной укладке белковой спирали вирусной частицы после протеолиза.

2.3.2. Расчёт доступных поверхностей остатков БО в вирионе и в свободном белке на модели YBK.

Для определения межсубъединичных и межвитковых элементов структуры БО и дополнительной оценки полученных экспериментальных данных были проведены расчёты доступной поверхности аминокислотных остатков БО в вирионе и в свободном виде на модели YBK, исходя из данных крио-ЭМ-структуры (PDB: 6HXX). Вычисления проводились с помощью программы GROMACS 5,1 (Abraham, 2015), использующей алгоритмы, основанные на подходе Ли и Ричардса (Lee & Richards, 1971). Поверхность молекулы определяется как её часть, доступная растворителю, молекула которого представляется в виде сферы. Размеры атомов макромолекулы определяются их Ван-дер-Ваальсовыми радиусами. В вычислениях использовали одну свободную субъединицу БО и часть вирусной частицы, состоящую из 70 БО (8 витков). Для сравнения экспериментальных данных тритиевого мечения вириона АВК с расчётными данными мы использовали сферу с радиусом трития 0,09 нм. Доступную поверхность определяли только у атомов углерода, связанных хотя бы с одним атомом водорода (СН-поверхность).

Результаты расчёта доступной СН-поверхности представлены на Рис. 50 для БО в свободном виде $S_{\text{БО УВК}}$ и в составе вириона $S_{\text{УВК}}$.

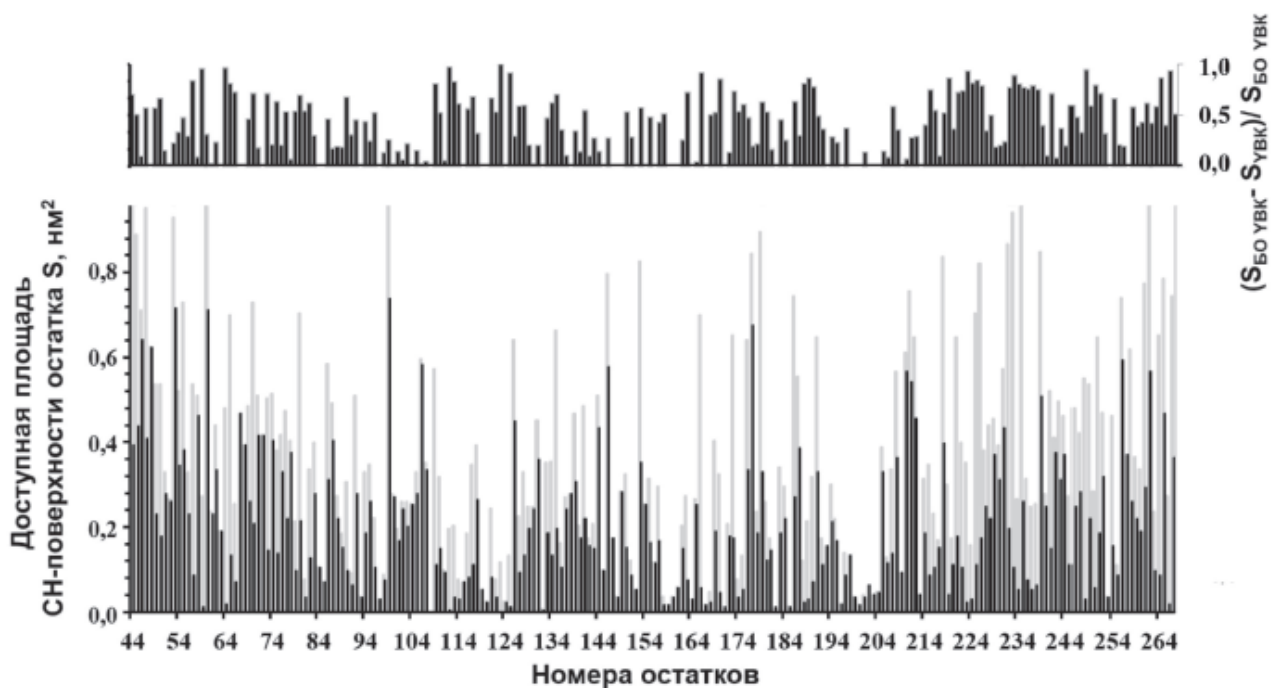


Рис. 50. Расчёт доступной СН-поверхности для БО в свободном виде $S_{\text{БО УВК}}$ (серые столбики) и в составе вириона $S_{\text{УВК}}$ (чёрные столбики) в нм^2 . На вставке приведена величина $(S_{\text{БО УВК}} - S_{\text{УВК}}) / S_{\text{БО УВК}}$ – доля поверхности остатков, относящихся к углеводородным фрагментам, которые экранированы в составе вириона (правая шкала) – области межсубъединичных и межвитковых контактов БО в составе вириона.

Суммарная доступная площадь СН-поверхности свободного белка составляет $81,6 \text{ нм}^2$, а белка в вирионе – $44,9 \text{ нм}^2$. Таким образом, 45% ($36,7 \text{ нм}^2$) поверхности БО образуют контакты между субъединицами в вирионе (без учёта 43 N-концевых остатков). Относительное изменение доступной площади СН-поверхности в элементах вторичной структуры в свободном белке и вирионе продемонстрировано на трёхмерной модели БО УВК (Рис. 51).

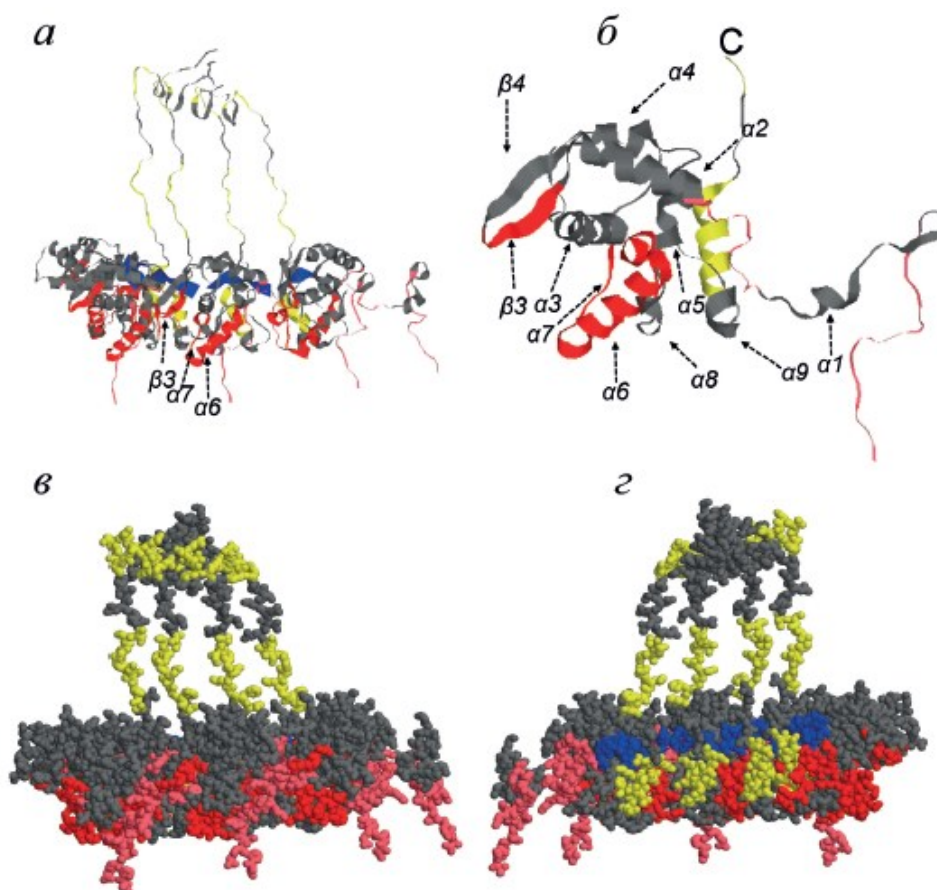


Рис. 51. Относительное изменение доступной площади СН-поверхности в элементах вторичной структуры в свободном белке и во фрагменте вириона из 70 молекул БО. Участки, для которых значения $(S_{\text{БО УВК}} - S_{\text{УВК}}) / S_{\text{БО УВК}} > 0,43$, показаны красным/жёлтым цветом. а – Приведён фрагмент, состоящий из 4 субъединиц, б – фрагмент, состоящий из одной субъединицы, с – С-конец БО; в, г – показано 4 субъединицы, снаружи и изнутри вириона соответственно; РНК показана синим цветом (а, г)

Фрагменты поверхностного домена I и центрального домена II, в которых возрастает площадь СН-поверхности (Рис. 51, а–в), показаны красным цветом. Увеличение доступности внутри вириона в С-доме показано жёлтым цветом (Рис. 51, г). В Таблице 4 рассчитаны суммарные площади СН-поверхности элементов вторичной структуры S в свободном белке и вирионе, а также доля недоступной СН-поверхности вириона $(S_{\text{БО УВК}} - S_{\text{УВК}}) / S_{\text{БО УВК}}$. Из таблицы видно, что участки со значительным изменением мечения (петли l1 и l2, $\beta 3$ -тяж,

спирали $\alpha 6$, $\alpha 7$) входят или близки к зонам межсубъединичных контактов, так как их площадь в вирионе почти вдвое меньше, чем у свободного белка.

Обращает на себя внимание значительная для тритиевой метки и доступная СН-поверхность спирали $\alpha 9$ и С-конца, расположенных в сердцевине вириона (Таблица 4), что подтверждает наличие каналов/полостей в вирионе, который оказался частично проницаемым для атомов трития.

Таким образом, Δ N-концевой пептид БО АВК, частично разупорядоченный и интегрированный в спиральную упаковку капсида, функционирует как структурный регулятор: выступающая часть экранирует специфические поверхностные элементы и межсубъединичные контакты, в то время как встроенная часть (16-26 а.о.) определяет шаг спирали и общую гибкость вириона. Удаление этого пептида приводит к иному упорядочиванию капсида: более плотной укладке белковой спирали и потере гибкости. Это повышает устойчивость вириона к внешним воздействиям и может обеспечивать защиту вирусной РНК от деградации нуклеазами. Мы наблюдали высокую стабильность наших препаратов АВК (штамм В11), хранящихся длительное время при температуре +4 °С.

Наблюдаемое изменение мечения во фрагментах БО после трипсинолиза не может быть следствием разрушения дефектных вирионов. Об этом говорит незначительное изменение концентрации вируса и сохранение величины соотношения E_{260}/E_{280} ($\sim 1,25$) препаратов после трипсинолиза (см. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ). В предыдущем разделе по результатам анализа КД-спектров было показано, что при удалении N-пептида вторичная структура молекул БО в составе вириона практически не меняется. Однако по данным МУРР и других методов в вирионе АВК при удалении N-пептида происходили изменения четвертичной структуры, сопровождающиеся уменьшением шага спирали белковой оболочки, уменьшением гибкости и возрастанием стабильности частиц, что подтверждает полученные данные. Известно, что

спиральность структуры вириона частично обуславливается спиральностью внутривирионной РНК, так как сборка БО УВК в отсутствии РНК приводит к формированию неспиральных ВПЧ в виде стопки дисков (Kezar et al., 2019). Кроме того, белок оболочки поти- и потексвирусов (Cuesta et al., 2019) взаимодействует с РНК в консервативных положениях (для АВК это S127, R159, D203). Расчёт на модели вириона УВК (Рис. 51) показал низкую доступность их СН-поверхности ($0,02-0,09 \text{ нм}^2$) для сферической пробы с радиусом трития. Мы также наблюдали низкую радиоактивность этих остатков как в интактном АВК, так и в АВКΔ32 (Рис.48), что дополнительно подтверждает правомерность использования модели вириона УВК в нашей работе.

Тритиевая метка незначительно включалась также во внутренние слои вириона (Рис. 49, з), что предполагало миграцию реакционноспособных атомов трития через межсубъединичные контакты или каналы в вирионе, заполненные водным раствором. Возможность этого явления обсуждалась ранее (Badun, 2001; Баратова Л.А., 1999). Атомы трития проникали между углеводородными цепями липидов в липосомах (Kordyukova et al., 2001) или пурпурных мембранах с бактериородопсином (Shishkov et al., 2002) без существенной потери их энергии.

Серия биохимических и биофизических исследований икосаэдрических вирусов показала, что их вирусные капсиды образуются путём динамической самосборки белков и подвергаются контролируемым конформационным переходам с изменением поверхностных структур для выполнения различных биологических функций (Chakravarty et al., 2020). У некоторых спиральных вирусов также обнаружена структурная гетерогенность. Так, среди частиц вирионов гордеивируса штриховатой мозаики ячменя (Clare et al., 2015) обнаружены «широкие» и «узкие» частицы с 22,2 и 21,2 субъединицами на виток. Ряд работ свидетельствовал о наличии нескольких функциональных и структурных состояний у вирионов потексвируса Х-вируса картофеля (Lukashina et al., 2009; Lukashina et al., 2012; Rodionova et al., 2003). Анализ вирионов потивируса ВМТу методом крио-ЭМ показал, что вирионы

растягиваются и сжимаются с амплитудой около 0,22 нм, и были обнаружены частицы с шагом спирали 3,42–3,61 нм (Cuesta et al., 2019). Удаление N-концевого пептида БО АВК, как мы показали выше, приводило к уменьшению шага спирали вириона. Таким образом, полученные данные подтверждали, что конформационная лабильность четвертичной структуры вирусов растений достаточно распространенное явление.

3. СПОСОБНОСТЬ К АЛЬТЕРНАТИВНОЙ УПАКОВКЕ ИЗОЛИРОВАННОГО БО АВК *in vitro*. РОЛЬ НЕУПОРЯДОЧЕННЫХ КОНЦЕВЫХ ДОМЕНОВ.

Лабильность белка АВК ярко проявляется *in vitro*. Изолированный белок АВК демонстрирует выраженную способность к структурному полиморфизму, формируя различные олигомерные частицы в зависимости от условий среды. Это поведение, вероятно, напрямую связано со свойствами его неупорядоченных N- и C-концевых фрагментов, регулирующих процессы ассоциации и стабилизации. В физиологических условиях (буфер 5 мМ Tris-HCl, pH 7,8) БО АВК самособирается в вирусоподобные частицы (ВПЧ), морфологически близкие к нативному вириону, что подтверждается данными электронной микроскопии (Рис. 52 а,б). Однако при переводе в диссоциирующие условия (буфер «pH10,5»: 0,5 М NaCl, 5 мМ CAPS, pH 10,5), в которых БО других потивирусов распадаются на мономеры (Anindya & Savithri, 2003; McDonald, 1977), белок АВК образует стабильные овальные частицы размером 20–30 нм (Рис. 52 в). Этот факт указывает на уникальные структурные особенности БО АВК, препятствующие его полной диссоциации.

Динамика перехода между этими состояниями регулируется электростатическими взаимодействиями. При переводе овальных частиц обратно в буфер pH 7,8 с низкой ионной силой происходит быстрая (за 10–15 мин) повторная сборка в ВПЧ (Рис. 52 г). Скорость этого процесса замедляется с

ростом ионной силы, что прямо подтверждает ключевую роль электростатики в стабилизации упаковки субъединиц в ВПЧ. Эти овальные частицы могут представлять собой промежуточные стадии сборки как *in vitro*, так и *in vivo*.

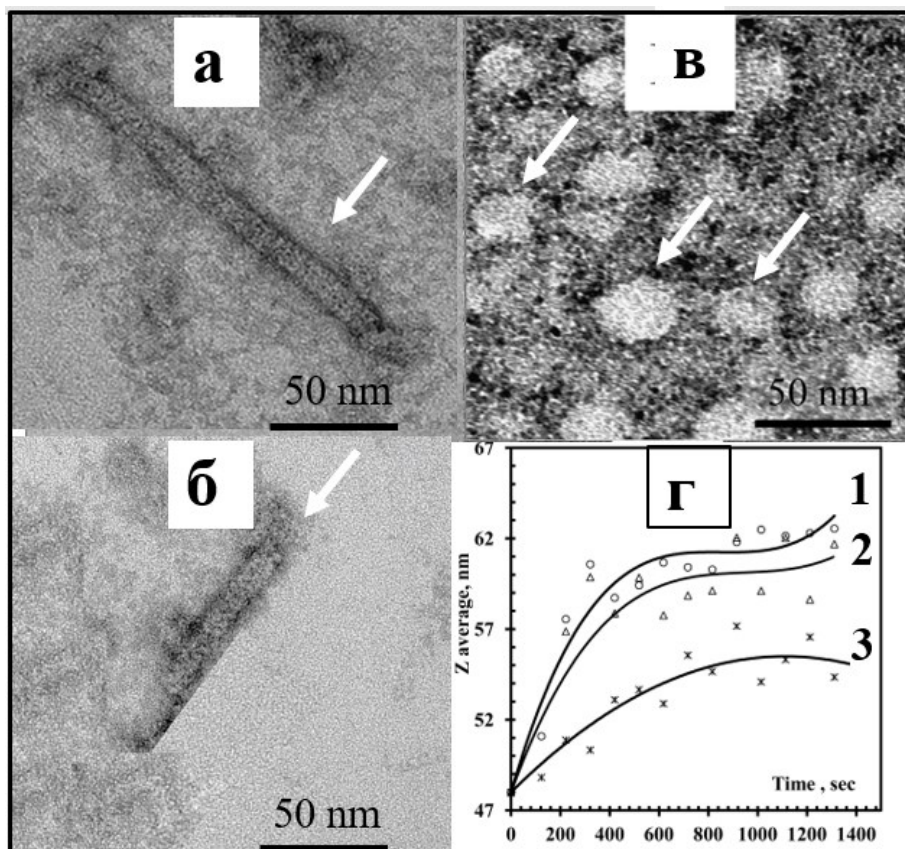


Рис. 52. Электронная микроскопия (а, б, в) частиц БО АВК. ВПЧ АВК после диализа в изолированного белка в буфер 5 мМ Tris-HCl, pH 7,8 (а) и в буфер 5 мМ Tris-HCl, pH 7,8 с 0,1 М NaCl (б) Частицы БО после диализа в буфер «рН10,5». Образцы контрастировали 2% уранилацетатом (30 сек). Увеличение 100 000×. (в) Кинетика сборки ВПЧ из частиц БО АВК. Сборку проводили путем разбавления частиц БО (в буфере «рН10,5») буфером 5 мМ Tris-HCl, pH 7,8, с концентрацией NaCl: (1) 80 мМ, (2) 215 мМ, (3) 920 мМ. Измерения интенсивности рассеяния света выполняли на приборе ZetasizerNano ZS («MALVERN»). Значения Z-среднего (гидродинамического размера) измеряли при 18 °С и концентрации БО 0,33 мг/мл.

Более глубокое понимание структурных различий между этими состояниями дал ограниченный протеолиз трипсином. Мягкая обработка трипсином вирионов некоторых потивирусов и ВПЧ удаляет N-концевые области их БО (Anindya & Savithri, 2003; Jagadish et al., 1996). Мы выполнили обработку трипсином вирионов и частиц БО в концентрации 0,1 мг/мл при соотношении фермент/субстрат 1:500, продукты протеолиза контролировали с помощью MALDI-TOF МС-анализа. Рисунок 53 иллюстрирует кинетику протеолитического расщепления вирионов АВК. Полное исчезновение пика БО (30,4 кДа) произошло в течение ~5 минут инкубации, с одновременным появлением пиков 28,6 и 27,5 кДа, соответствующих удалению 18 и 28 N-концевых аминокислот. В отличие от вирионов, протеолиз частиц БО в буфере «рН10,5» в тех же условиях наблюдался более чем в четырех сайтах (Рис 53 б). Уже через 10 минут обработки трипсином появлялись пики с m/z 25,4 [49-269], 25,1 [51-269], 23,6 [65-269] и 21,1 [87-269].

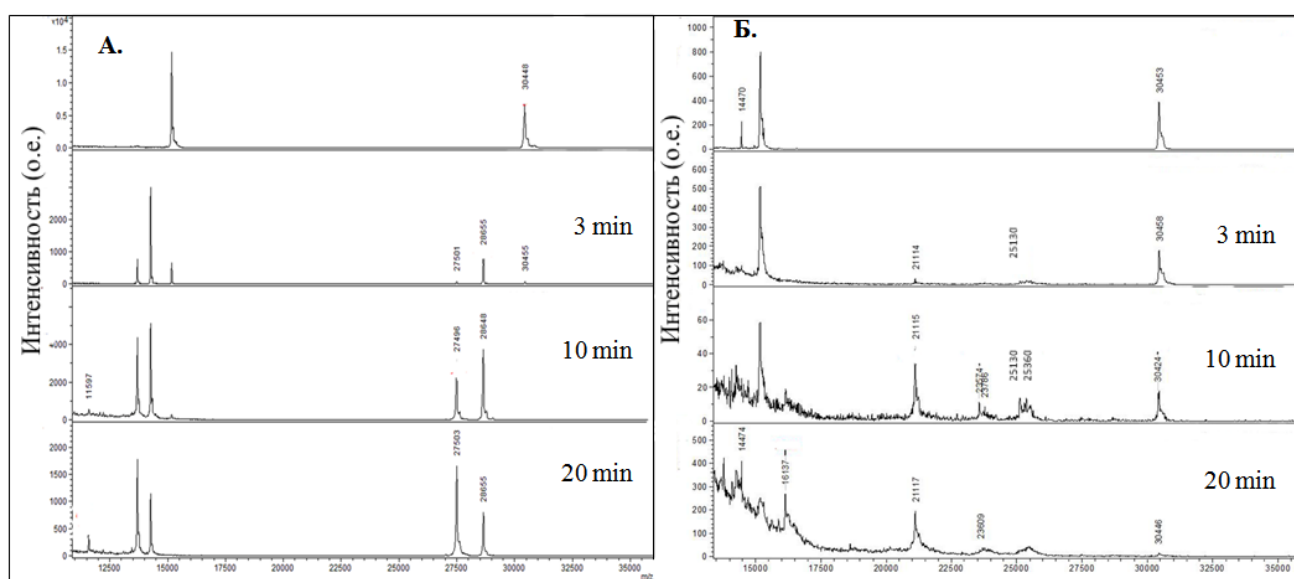


Рис. 53. MALDI- TOF МС- анализ продуктов ограниченного трипсинолиза интактного вириона АВК (а) и частиц БО (б). Интактный АВК в 5 мМ Трис, рН 7,8; частицы БО АВК в буфере «рН10,5» (после доведения до рН 7,8); соотношение фермент/субстрат 1:500, показано время инкубации при комнатной температуре. Молекулярные массы продуктов ограниченного протеолиза указаны над пиками. Аминокислотная последовательность БО АВК (NCBI NP_734 368.1, GI: 25013598). Эксперименты по MALDI-TOF МС - анализу

выполнены совместно с зав. лаб. масс-спектрометрии к.ф/м.н. М.В.Серебряковой.

Результаты протеолиза этих частиц с увеличенным количеством трипсина (фермент/субстрат - 1:100, 30 мин) подтвердили эти результаты и показали существование нерасщепляемого сегмента (Рис. 54). Если в составе интактных вирионов и ВПЧ БО защищен от глубокого расщепления (удаляется только короткий N-концевой фрагмент 28/32 а.о.), то в составе овальных частиц при pH 10,5 протеолиз проходит гораздо полнее (Рис. 54 а). Масс-спектрометрический анализ выявил, что трипсин легко удаляет не только N-концевые, но и С-концевые фрагменты полипептидной цепи (полоса f1: [14-269], f2: [28-269], f3: смесь [18-258 и 35-269], f4: смесь [18-223 и 65-269], f5: [87-223]), обнажая при этом устойчивое, нерасщепляемое структурное ядро (остатки 87–223, ~50% длины белка) (Рис. 54 б).

Таким образом, в овальных частицах N- и С-концевые домены находятся в доступной протеолизу конформации, что указывает на их частичную разупорядоченность и отсутствие жесткой третичной упаковки, характерной для вириона. Кроме того, наличие компактного протеолитически устойчивого ядра свидетельствует о том, что центральный домен БО сохраняет структурированность даже в этих альтернативных состояниях.

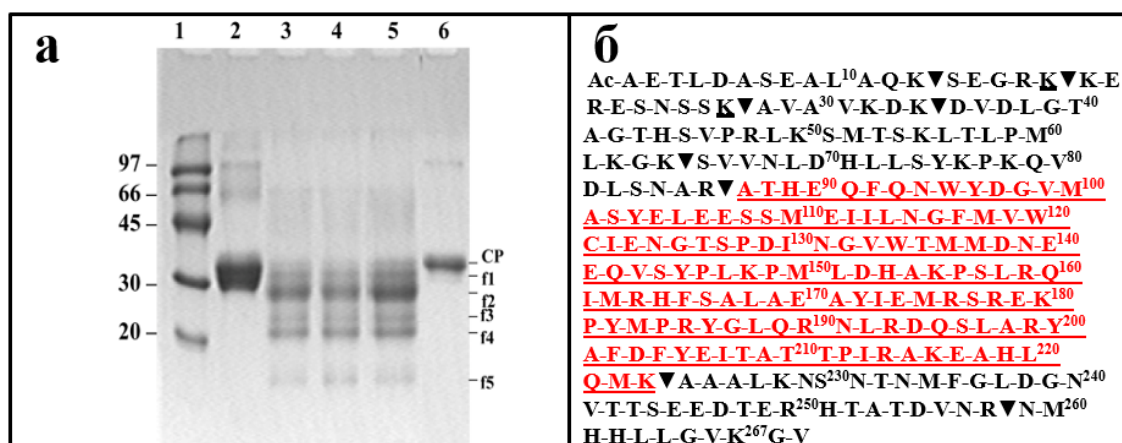


Рис. 54. N- и С-концевые фрагменты частиц БО в буфере «pH 10,5» легко гидролизуются трипсином при сохранении нерасщепляемого кора (выделено красным). (а) Анализ продуктов ограниченного протеолиза трипсином в ДСН-ПААГ. 1 – маркеры молекулярной массы; 2 – протеолиз вирионов АВК; 3 -5 протеолиз частиц БО в буфере «pH 10,5»; 6 – интактный БО АВК; (f1-f5) –

триптические фрагменты БО. Трипсинолиз (фермент/субстрат -1:100), при 25 °С в течение 15 мин (3), 30 мин (4) и 60 мин (2, 5). (б) сайты фрагментации БО АВК. Места гидролиза в частицах БО отмечены символом ▼, в вирионе – подчеркнуты. Нерасщепляемый сегмент выделен. Аминокислотная последовательность БО АВК (NCBI NP_734 368.1, GI: 25013598). Эксперименты по MALDI-TOF MS - анализу выполнены совместно с зав. лаб. масс-спектрометрии к.ф/м.н. М.В.Серебряковой.

Данные МУРР количественно подтверждают структурные различия между частицами, полученными в разных условиях. Овальные частицы, сформированные при рН 10,5, имеют низкую плотность упаковки и молекулярную массу (ММ) ~1000 кДа (эквивалентно ~30 субъединиц) (Рис. 55 а). Напротив, частицы, образованные при рН 7,8 (0,1 М NaCl) представляют собой компактные цилиндры с массой >2000 кДа (>60 субъединиц), и воспроизводят форму и плотность вириона (Рис. 55 б). *Ab initio* реконструкция формы демонстрирует структурный переход: от рыхлой овальной частицы с динамичными, неупорядоченными N- и С-концевыми фрагментами – к вытянутому цилиндру, стабильность которого обеспечивается интеграцией этих фрагментов в структуру вирусного белкового комплекса.

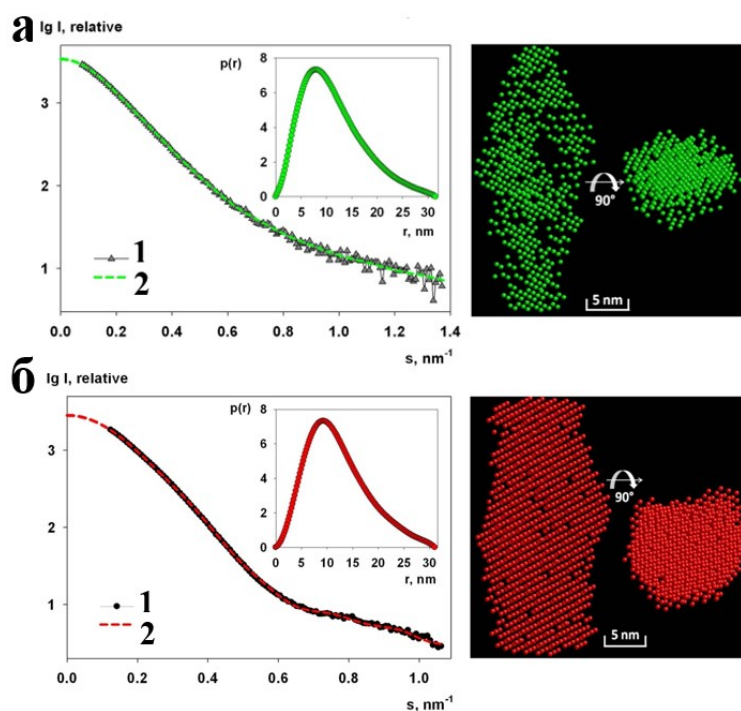


Рис. 55. Восстановление формы частиц АВК в буфере «рН 10,5» (0,5М NaCl) (а) и «рН7,8» (0,1М NaCl) (б). Экспериментальные данные МУРР (1), кривые

рассеяния от форм, восстановленных *ab initio* программой DAMMIN (2). Вставки: функция распределения по расстояниям $p(r)$, вычисленная программой GNOM. Правые панели представляют собой *ab initio* реконструированные формы частиц БО.

Отсутствие способности БО АВК к полной диссоциации, в отличие от гомологичных белков оболочки YBK и PVBV (Anindya & Savithri, 2003; McDonald, 1977), может быть объяснено особенностями его первичной структуры. Чтобы понять причину этих особенностей, мы сравнили первичные структуры этих белков. Группа Шукла (Shukla et al., 1989) показала, что гомология последовательностей среди различных представителей рода *Potyvirus* варьируется от 38 до 71% (в среднем 54%). Для множественного выравнивания последовательностей БО трех потивирусов (АВК, YBK и PVBV) мы использовали алгоритм Clustal Omega (Sievers et al., 2011) (Рис.56).

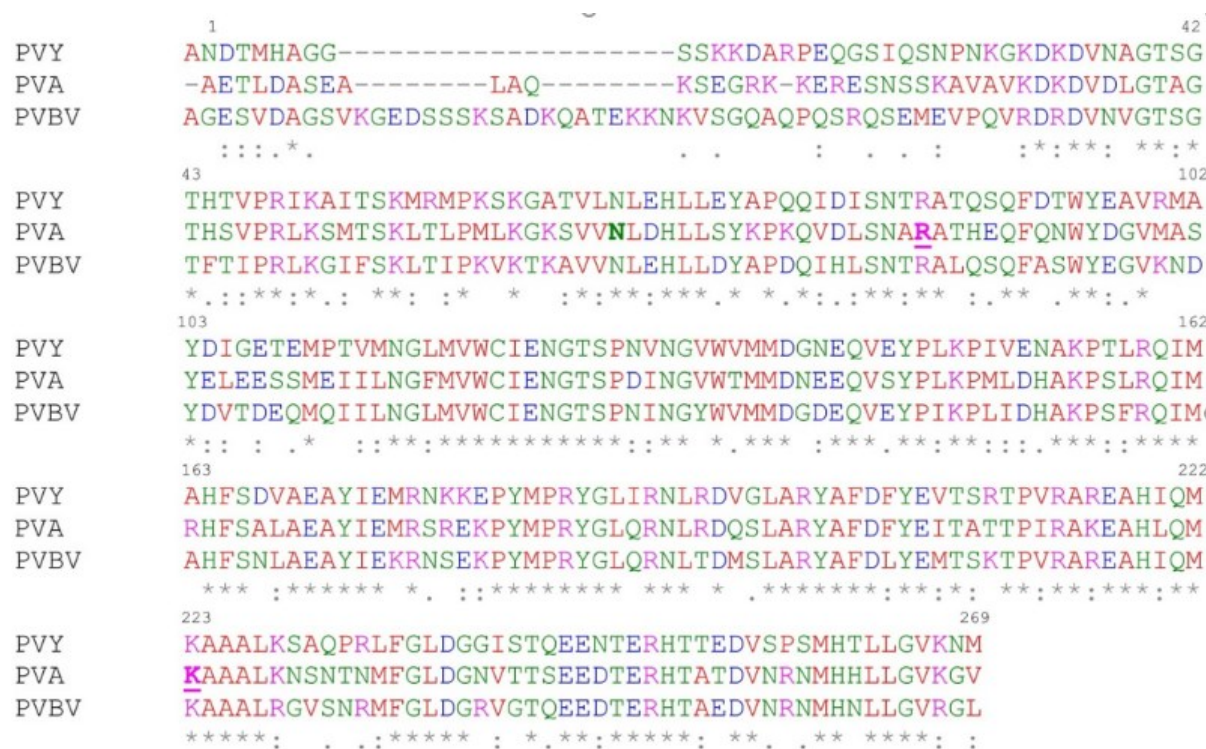


Рис. 56. Выравнивание последовательностей белков оболочки нескольких потивирусов. Звездочки: идентичные остатки; двойные точки: консервативные замены; точки: полуконсервативные замены; выделено жирным шрифтом и подчеркнуто: начало и конец фрагмента устойчивого к

трипсину кора. Нумерация приведена в соответствии с БО АВК. Номера последовательностей БО АВК, YBK и PVBV - NP_734368, AAV63981 и AJ237843.3 соответственно.

Видно, что наиболее различаются N-концевые последовательности БО, и их длина варьируется. Надежная гомология последовательностей начинается только с 32-го остатка БО АВК. Попарное выравнивание аминокислотных последовательностей БО АВК с БО YBK и PVBV показывает, что эти белки имеют 58,6% и 62,6% идентичности, соответственно. Результаты группы Уверского указывают на то, что сочетание низкой общей гидрофобности и большого заряда представляет собой уникальную структурную особенность ID-белков (Uversky et al., 2000), неупорядоченные домены которых способствуют их ассоциации, обеспечивая самосборку. Мы рассчитали эти параметры для БО АВК, YBK и PVBV при pH раствора 7,8 и 10,5 (Таблица 5).

Таблица 5. Расчетные характеристики (заряд и гидрофобность) БО трех потивирусов.

Coat proteins	Length (a.a.)	pI	Net charge		Mean net charge (Q)*		Mean net hydrophobicity (H)	Q/H (*100)	
			pH 7.8	pH 10.5	pH 7.8	pH 10.5		pH 7.8	pH 10.5
PVA**	269	6.56	-3	-23	-0.010	-0.085	0.42	-2.4	-20.0
PVY	267	7.26	-1	-19	0.003	-0.072	0.43	-0.6	-16.8
PVBV	287	6.44	-3	-23	-0.010	-0.081	0.42	-2.3	-19.2

* Используя сервер ExPASy (Gasteiger et al., 2003), гидрофобность каждой аминокислотной последовательности рассчитывали с помощью приближения Кайт и Дулиттл (Kyte & Doolittle, 1982) с использованием окна размером в 5 аминокислот. В этих расчетах гидрофобность отдельных остатков была нормализована по шкале от 0 до 1. Средняя гидрофобность определяется как сумма нормализованных гидрофобностей всех остатков, деленная на количество остатков в полипептиде. Средний чистый заряд определяется как чистый заряд при pH 7,8 и 10,5, деленный на общее количество остатков.

Оказалось, что при нейтральном pH раствора БО АВК имеет несколько большую величину значения «заряд/гидрофобность», чем БО YVK и PVBV, и это отношение сильно увеличивается при pH раствора 10,5. Невысокий уровень гомологии белков и наибольшее значение величины «заряд/гидрофобность» для БО АВК предполагают значительное различие в структурных свойствах этих белков и согласуются с нашими данными. Также, ряд алгоритмов предсказывают большее содержание ID-областей в N-/C-доменах БО АВК. Эти гибкие, богатые заряженными остатками регионы, по-видимому, способствуют образованию множественных межмолекулярных контактов, которые стабилизируют олигомерное состояние даже в диссоциирующих условиях.

Попытки добиться полной диссоциации с помощью декстран сульфата с разной молекулярной массой (Semenyuk et al., 2015) не увенчались успехом (Рис. 57 а). Только обработка додецилсульфатом натрия приводила к распаду ассоциатов на микродомены размером ~ 1 нм, как показали данные МУРР, организованные по модели «бус на нити» (Рис. 57 б, в). В этом комплексе с детергентом белок терял третичную структуру, но сохранял вторичную (данные КД и флуоресценции), что указывает на разрушение нативных контактов, стабилизированных в том числе и неупорядоченными фрагментами.

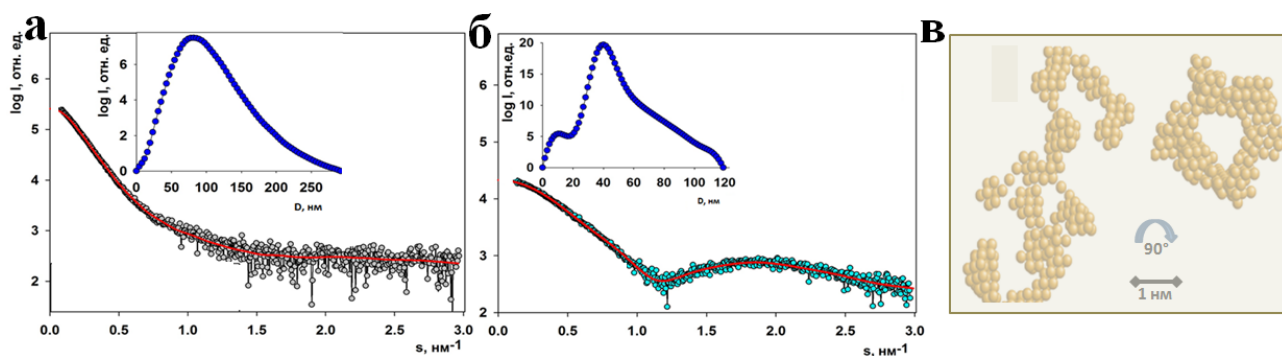


Рис. 57. Влияние декстран сульфата и ДСН на стабильность частиц БО АВК в буфере «pH10,5». Экспериментальные (кружки) и модельные (линия) кривые рассеяния и графики функций парных расстояний $p(r)$ (вставки) для частиц БО: (а) после инкубации с 10 мМ декстран сульфат с ММ 15000, pH 7,8; (б) после инкубации с 5,2 мМ ДСН. Модельные кривые получены от восстановленных по функциям $p(r)$ частиц в растворе. (в) Моделирование формы частиц образцов, представленных в (б); Подобное действие ДСН на

некоторые белки описано в литературе и получило название разворачивания в «бусины на нити» или “necklace model”(Shirahama et al., 1974).

Таким образом, неупорядоченные N- и C-концевые фрагменты БО АВК обладают функциональной двойственностью. С одной стороны, их динамичность и способность к множественным взаимодействиям стабилизирует промежуточные овальные ассоциаты. С другой стороны, в физиологических условиях они направляют кооперативную самосборку в вирусоподобные частицы. Способность этих регионов переключать свою роль в зависимости от среды и электростатических взаимодействий предполагает их ключевое значение в управлении структурными перестройками белка. Вероятно, эта лабильность была эволюционно отобрана как для обеспечения гибкости зрелого вириона, так и для точной регуляции его сборки.

Ранее предполагалось, что сборка большинства спиральных растительных вирусов происходит через образование ВТМ-подобных иницирующих комплексов (Butler, 1984). Макдональд и Банкрофт настаивают на том, что им удалось получить *in vitro* повторно собранные 200S частицы УВК, которые, как они считали, соответствуют интактным вирионам. Они предложили, что формирование вирионов происходит за счет структурной перестройки «200S» стопок дисков в нормальные спиральные вирионы. Все другие, более поздние исследования сборки спиральных растительных вирусов *in vitro* не подтвердили эту идею, поскольку не удалось наблюдать такую структурную перестройку. Макдональд и Банкрофт подчеркивали, что их повторно собранные частицы не были инфекционными (McDonald, 1977). Это резко контрастирует с механизмом стабилизации ВТМ, где взаимодействия между белковыми субъединицами опосредованы кластеризацией карбоксилатных групп, а в условиях, где происходит сборка, электростатические силы отталкивания между карбоксилатами нейтрализуются протонами или ионами кальция (Butler, 1999). В случае потекс- и потивирусов ключевую роль в сборке вирионов и ВПЧ играют их неупорядоченные N-концевые фрагменты, как было подтверждено в недавних

работах методом крио-ЭМ (Grinzato et al., 2020; Kavcic et al., 2024; Kezar et al., 2019).

4. ТЕРМОИНДУЦИРОВАННЫЙ β -ПЕРЕХОД И АГРЕГАЦИЯ БЕЛКА ВИРУСА АВК. РОЛЬ НЕУПОРЯДОЧЕННЫХ УЧАСТКОВ.

Накопленные данные свидетельствуют о том, что способность белков переходить в β -структурное состояние, включая образование кросс- β -слоёв, является широко распространённым феноменом. Этот процесс характерен не только для патологических состояний, сопровождающихся амилоидогенезом при ряде заболеваний (Chiti & Dobson, 2006; Eisenberg & Jucker, 2012), но также играет роль в нормальной регуляции клеточных функций (Fowler et al., 2007; Harrison et al., 2007; Iconomidou & Hamodrakas, 2008). Механизмы такого структурного перехода могут различаться в зависимости от исходной организации белка (Bhak et al., 2009; van der Wel et al., 2010). Один из возможных путей заключается в трансформации в β -структуру природно-развернутых (ID) белков или их ID-доменов (Chiti & Dobson, 2006; Harrison et al., 2007; Uversky, 2010). Аналогичный переход от α -спиральной организации к β -структуре при нагревании ранее был описан для филаментозных бактериофагов Pf3 и Xf, содержащих одноцепочечную ДНК (Thomas & Day, 1981). В рамках настоящего исследования показано, что капсидный белок потивируса АВК при денатурации под воздействием температуры (55–70 °C) подвергается перестройке с образованием β - и кросс- β -структур. Можно предположить, что такой переход может имитировать конформационные изменения, имеющие функциональное значение на определённых этапах жизненного цикла вируса в растении-хозяине. Кроме того, ряд работ указывает, что некоторые растительные вирусы способны *in vitro* реорганизовываться в сферические частицы, обогащённые β -структурами, что открывает перспективы для их практического применения (Atabekov et al., 2011; Kondakova et al., 2022; Nikitin et al., 2016).

Как показано выше, белок оболочки вируса АВК в нативном состоянии характеризуется наличием значительной доли неупорядоченных (ID) доменов, и

эти гибкие, динамичные участки полипептидной цепи играют ключевую роль в структурной лабильности вириона. Нагревание выше 55°C, вызывающее увеличение доли разупорядоченных структур в интактном вирионе, запускает необратимый процесс агрегации. При нагревании до 60–70 °C происходит структурный переход, в ходе которого неупорядоченные домены становятся доступными для межмолекулярных взаимодействий и реорганизуются в β - и кросс- β -структуры, что мы показали различными физико-химическими методами.

Спектры комбинационного рассеяния вирионов и белка оболочки АВК.

Спектры комбинационного рассеяния (КР) вирионов АВК были измерены на конфокальном рамановском спектрометре NTEGRA Spectra. Чувствительные к конформации пики вирионов АВК были четко разрешены. Спектры КР вирионов АВК были получены в диапазоне 400–1800 см^{-1} (Рис. 58 а).

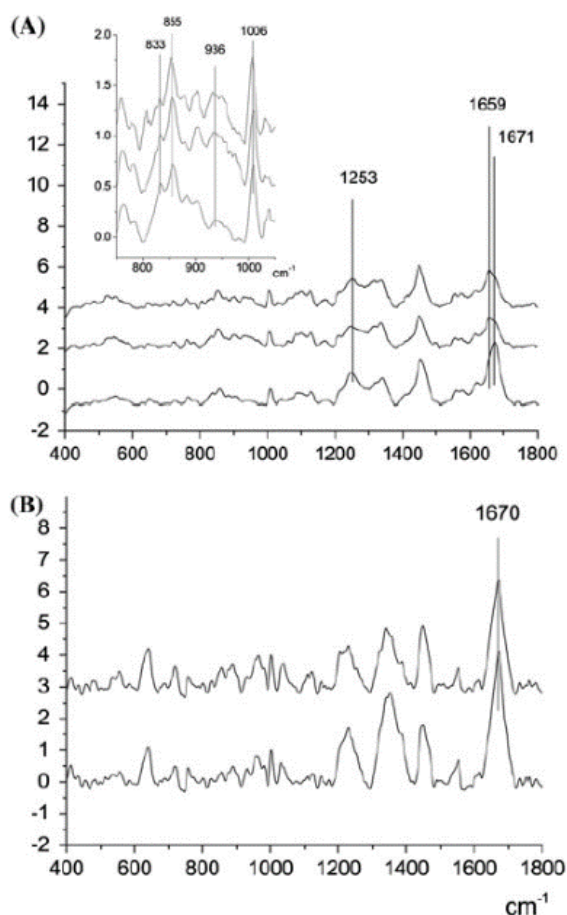


Рис 58. Спектры комбинационного рассеяния вирионов АВК (А) и белка оболочки (ВПЧ) (В), измеренные при 25 °C после нагрева до различных температур. (А) Спектры вирионов, измеренные на приборе NTEGRA (см. раздел "Материалы и методы"). Верхняя линия – спектр не нагретого образца, средняя линия – спектр после нагрева в течение 10 минут при 50 °C, нижняя линия – спектр после последовательного нагрева в течение 10 минут при 50 °C и 10 минут при 70 °C. Вставка: увеличенная область 1050–750 см^{-1} . (В) Спектры изолированного БО АВК (ВПЧ в 0,01М Трис, рН7,3), измеренные на

приборе BWS445-785S (см. раздел "Материалы и методы"). Верхняя линия –

спектр не нагретого образца, нижняя линия – спектр после нагрева в течение 10 минут при 60 °С. Препараты измеряли в 0,01М Трис, рН7,3.

После инкубации при комнатной температуре или нагревании до 50 или 70 °С в течение 10 минут все образцы высушивались при комнатной температуре (~25 °С), что позволило зафиксировать только необратимые изменения. Спектры показали высокое качество, особенно в области 400–900 см⁻¹, где все три спектра совпадали. Однако в области 900–1800 см⁻¹ спектр при 70 °С значительно отличался от спектров при 25 и 50 °С. Спектры при 25 и 50 °С обнаруживали α-спиральную и неупорядоченную структуру, тогда как после нагревания до 70 °С структура БО изменилась на преимущественно β-структуру: пик амида I сместился с 1659 до 1671 см⁻¹, пик α-спирали при 936 см⁻¹ исчез, а пик неупорядоченной структуры при 1253 см⁻¹ сместился до 1248 см⁻¹.

Таблица 6. Конформационно-чувствительные пики комбинационного рассеяния (см⁻¹) в препаратах вирионов и БО АВК (Maiti et al., 2004).

Образец	Непрогретый образец	10 мин нагревания при 60–70 °С	Отнесение	Чувствительность
Вирионы АВК	1659	1671	Амид I	1670 –маркерная полоса для β-листа; 1660 –для α-спирали
	1253	1248	Амид III	1240–1260 – неупорядоченная структура
	936	Нет	Скелетная	Маркер α-спирали
Белок оболочки	1671	1671	Амид I	1670 –маркерная полоса для β-листа
	1230	1230	Амид III	1230–1240 –β-лист

Кроме того, в спектрах АВК наблюдался дублет Ферми тирозина при 833 и 855 см⁻¹. Соотношение 833/855 см⁻¹ составило 2,31±0,1; 1,74±0,05 и 1,3±0,05 при 25,

50 и 70 °C соответственно, что указывает на изменение водородных связей тирозинов при нагревании. Это согласуется с результатами экспериментов по собственной флуоресценции вирионов (см. выше). Таким образом (Таблица 6), нагревание вирионов АВК при 70 °C сопровождается почти полной потерей α -спиральной структуры и появлением значительной доли β -структуры.

Анализ температурного перехода по тесту на связывание тиофлавина Т, спектрам КД и внутренней флуоресценции.

Для изучения возможности появления кросс- β -структуры в вирионах АВК и его белка оболочки (в виде ВПЧ) был применен тест на связывание тиофлавина Т (ТфТ), широко используемый для обнаружения амилоидоподобных структур в белках (LeVine, 1999; Nilsson, 2004). Измерялись спектры флуоресценции ТфТ для вирионов АВК при 25 °C без нагревания и после нагревания до 50 °C, 56 °C и 70 °C.

На Рисунке 59 видно, что спектры флуоресценции препаратов вируса АВК при 25 °C и 50 °C были схожи (наблюдался небольшой пик на 487 нм), но после нагревания до 70 °C появился значительный пик на 492 нм с шестикратным увеличением интенсивности флуоресценции (Рис. 59 а). Для препаратов БО АВК (в виде ВПЧ) также измерялись спектры флуоресценции ТфТ при комнатной температуре и после нагревания до 50 °C и 70 °C. В отличие от вирионов, у изолированного БО даже без нагревания наблюдался выраженный пик на 490 нм, а после нагревания до 70 °C интенсивность флуоресценции увеличилась вдвое (Рис. 59 б).

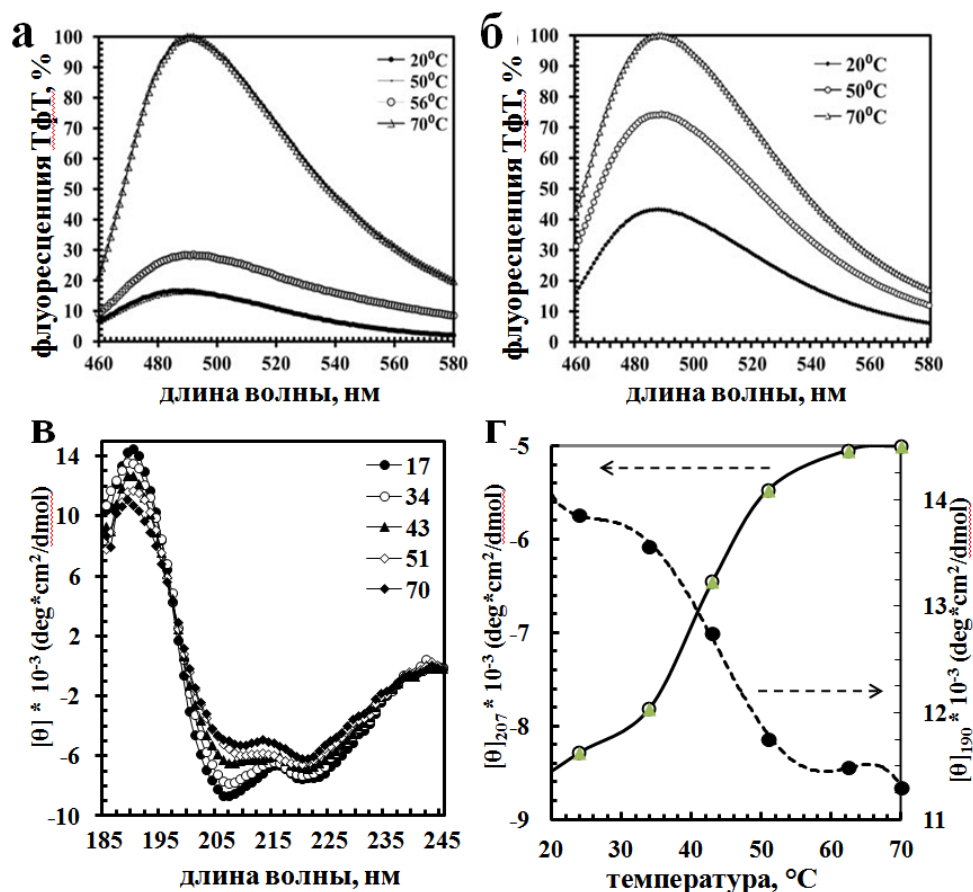


Рис. 59. Термическая денатурация вирионов (а) и свободного БО АВК (б-г). Тест на связывание тиюфлавина Т выявляет появление кросс-β-структуры при нагревании вирионов (а) и свободного БО АВК (б). Образцы предварительно нагревали в течение 10 мин при указанных температурах в концентрации 0,1 мг/мл и 5 мМ фосфатном буфере рН 7,0. (в) КД-спектры при указанных температурах. (г) Зависимость от температуры величин $[\theta]_{207}$ (открытые кружки) и $[\theta]_{190}$ (черные кружки).

Эти данные указывают на значительное увеличение содержания β- и кросс-β-структуры в вирионах и ВПЧ при нагревании до 70 °С. Появление большого количества β-структуры при 60-70 °С согласуется с данными спектроскопии КР.

Спектры КД интактных вирионов АВК в дальнем УФ-диапазоне имели высокое значение $[\theta]_{\text{-max}}$ с основным отрицательным максимумом при 203 нм, что указывает на высокое содержание неупорядоченной структуры (см. выше). Спектр белка АВК (ВПЧ) показал основной отрицательный максимум при 207 нм (Рис. 59 в) с интенсивностью в три раза ниже, чем у вирионов ($[-8600^\circ]$ против $[-26000^\circ]$). Программа K2D3 определила содержание структур: $17 \pm 2\%$ α-спиралей, $28 \pm 2\%$ β-структур и $55 \pm 2\%$ неупорядоченных участков. При

нагревании ВПЧ АВК от 17 до 65 °С интенсивность отрицательных максимумов при 207 и 218 нм и положительного при 190 нм снизилась, а соотношение $[\theta]_{218}/[\theta]_{207}$ увеличилось с 0,83 до 1,18, что указывало на рост содержания β -структур (Рис. 59 в, г). Программа K2D3 показала увеличение содержания β -структур до $38 \pm 2\%$ и снижение α -спиралей до $7 \pm 1\%$. Плавление ВПЧ происходило при ~ 42 °С, что согласуется с данными флуоресценции (Рис. 60).

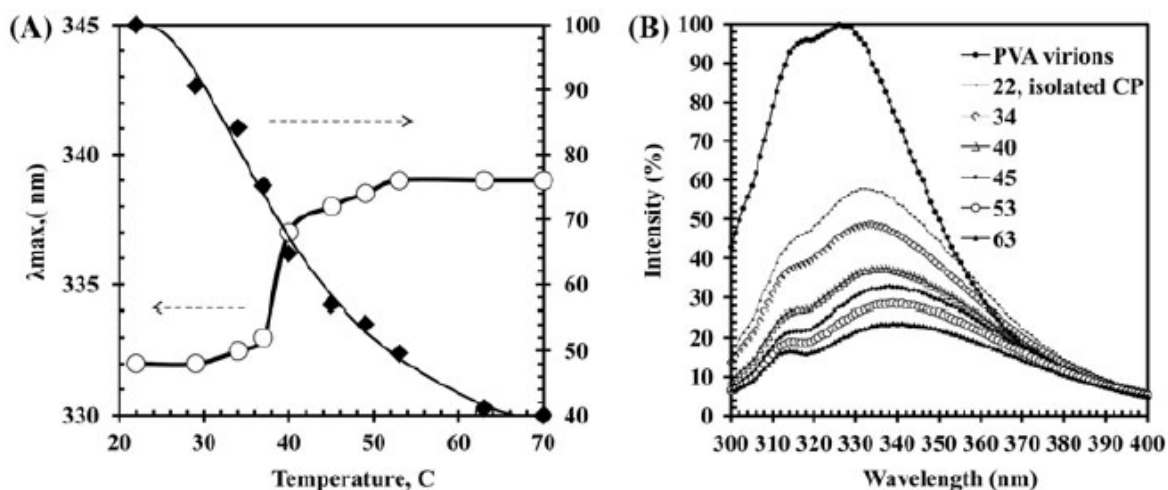


Рис. 60. Анализ процесса термической денатурации изолированного БО АВК по спектрам внутренней флуоресценции. (А) температурные зависимости положения максимума флуоресценции (кружки) и интенсивности (ромбы); (В) полные спектры при указанных температурах изолированного БО АВК (0,02 мг/мл) в 5 мМ ФБ рН 7,5.

Третичную структуру ВПЧ АВК анализировали по спектрам внутренней флуоресценции. У вирионов АВК наблюдались два максимума: на 314 и ~ 327 нм. У ВПЧ максимумы были на ~ 314 и ~ 330 нм. Причем интенсивность флуоресценции при комнатной температуре была более чем в два раза ниже, чем у вирионов (Рис. 60 а, б). При постепенном нагревании интенсивность флуоресценции ВПЧ снизилась еще в два раза после нагревания до ~ 42 °С, а основной максимум необратимо сместился с 330 до 339 нм (т.е. близко к значению разрушенных вирионов). Эти изменения указывают на одновременное изменение вторичной структуры и окружения остатков Trp и Tyr при 40-42 °С, в отличие от БО в составе вирионов, где изменения вторичной и третичной структур происходили после нагревания до ~ 55 °С.

Анализ частиц методами электронной микроскопии и динамического лазерного светорассеяния.

Результаты, полученные методом динамического светорассеяния (ДЛС), позволили охарактеризовать процесс термического перехода филаментозных вирионов АВК. В исходном состоянии кажущийся гидродинамический диаметр частиц (рассчитанный в сферическом приближении) составлял 40–50 нм, что согласуется с известными размерами других спиральных вирусов, например ВТМ или BSMV (Makarov et al., 2013). При постепенном нагревании образца до 50 °С значимых изменений размера зафиксировано не было, что свидетельствует о сохранении нативной структуры вирионов. Однако в температурном интервале 51–55 °С наблюдался резкий рост кажущегося диаметра до 150–180 нм, что указывает на начало структурной перестройки вирусных частиц. При температурах выше 55 °С ДЛС обнаруживал образование крупных агрегатов с кажущимся диаметром около 100 нм (Рис. 61). Такой скачок размера связан, вероятно, с денатурацией белка оболочки и последующей агрегацией развернутых полипептидных цепей посредством образования межмолекулярных β -слоёв.

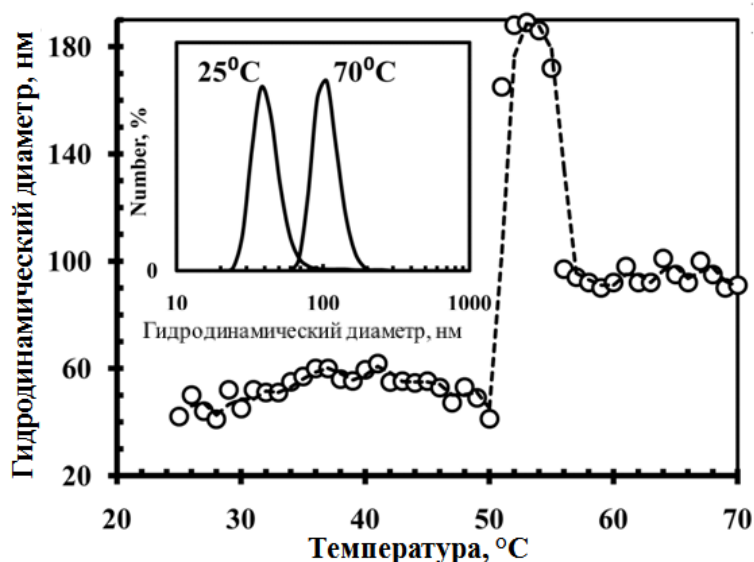


Рис. 61. Термическая агрегация вирионов АВК измеренная с помощью ДЛС. Распределение по размерам вирионов АВК в 5 мМ фосфатном буфере с pH 7,0 при ступенчатом нагревании.

Электронная микроскопия визуализирует этот процесс: при $\sim 60^\circ\text{C}$ вирионы агрегируют с торцов (Рис. 62 а), а выше 70°C превращаются в аморфные частицы (Рис. 62 б). Изолированный БО при прогреве в буфере 5 мМ Tris-HCl (pH 7,8) за 10 мин при 55°C трансформируется из ВПЧ в сферические агрегаты диаметром 45–65 нм (Рис. 62 в, г).

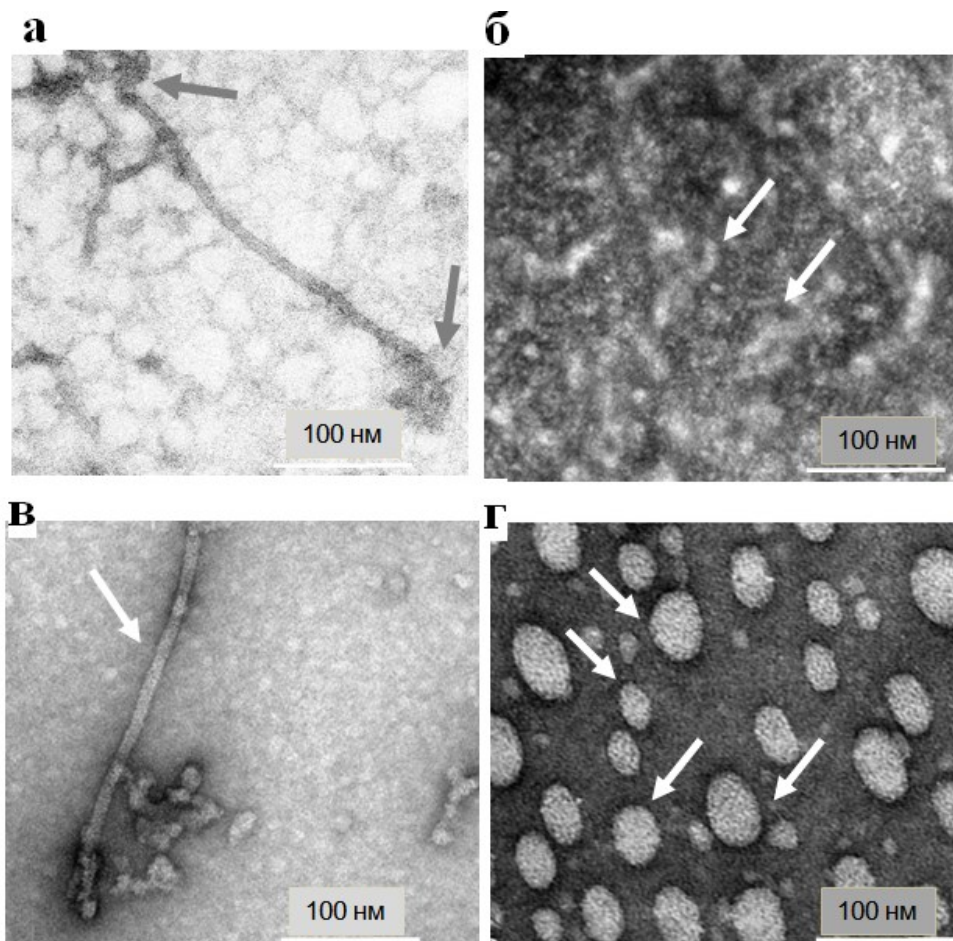


Рис.62. Структурный переход вирионов АВК (а, б) и БО АВК (в, г) при нагревании по данным электронной микроскопии. Вирусный препарат выдержан при 57°C , 10 мин (а); тот же препарат прогрет еще при 70°C , 10 мин (б). Препарат ВПЧ БО АВК при 25°C , pH7,8 (в); ВПЧ БО АВК прогрет при 55°C , 10 мин (г)

Анализ первичной структуры БО АВК с помощью алгоритмов прогнозирования (TANGO, WALTZ, AGGRESCAN, Zyggregator, AmylPred2) выявляет наличие сегментов, склонных к агрегации (Рис. 63, 64). Эти «горячие

точки», способные формировать β -структуры, часто расположены в пределах неупорядоченных доменов или на их границах (Chiti & Dobson, 2009; Conchillo-Sole et al., 2007; Fernandez-Escamilla et al., 2004). В нативном состоянии эти сегменты стабилизированы внутримолекулярными контактами, но при термической денатурации они экспонируются и становятся центрами межмолекулярного взаимодействия. По механизму, описанному в работе (Wetzel & Chrnyk, 1994), происходит замена внутримолекулярных взаимодействий на аналогичные межмолекулярные контакты с формированием устойчивых кросс- β -структур.

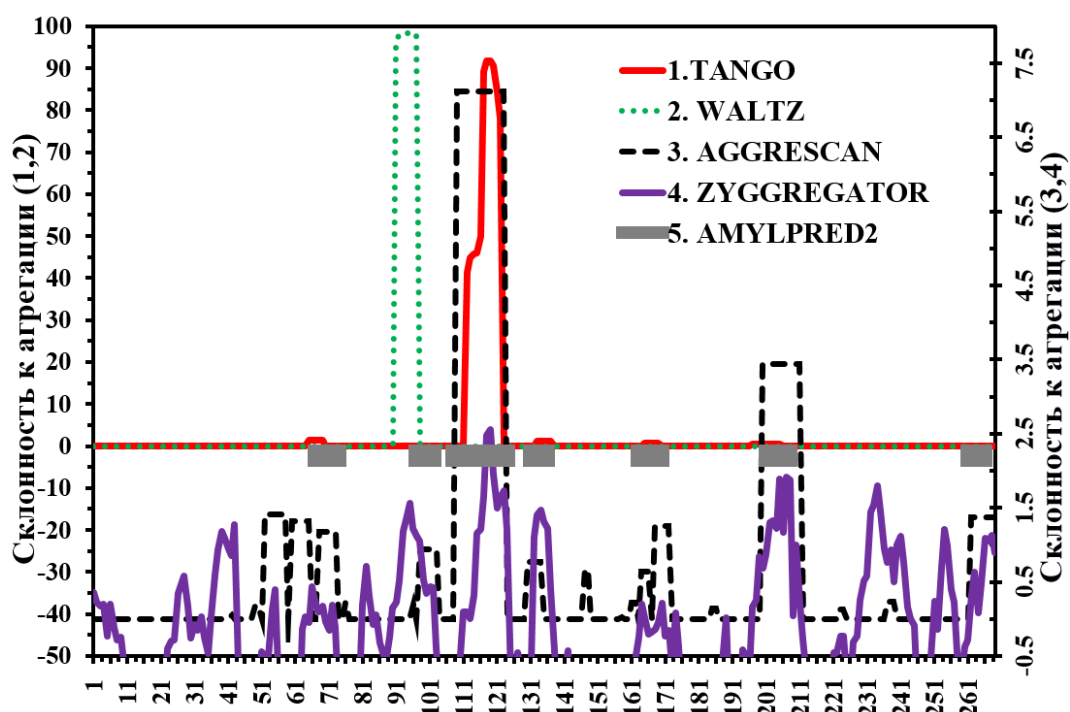


Рис. 63. Предсказание склонных к агрегации сегментов в БО АВК с помощью пяти различных алгоритмов. Программа AmylPred2 (серые сегменты) указывают на сегменты, предсказанные по меньшей мере пятью подходами (из 11).

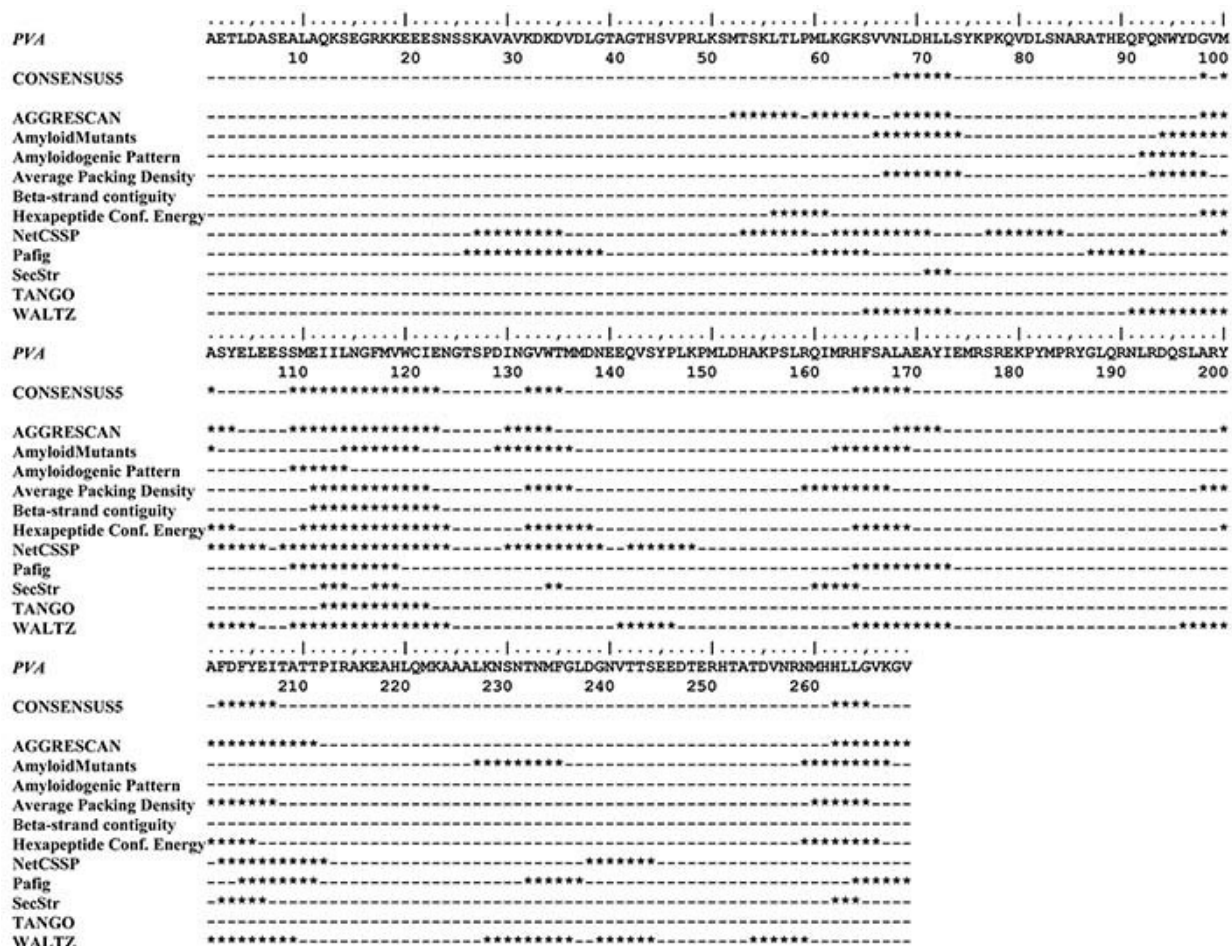


Рис. 64. Анализ распределения амилоидогенных сегментов, рассчитанный с использованием 11 программ и консенсусный прогноз в первичной структуре БО АВК (Tsolis et al., 2013).

Таким образом, неупорядоченные домены белка оболочки АВК, которые обеспечивает гибкость и сборку вирионов, при термической дестабилизации ведут к агрегации по механизму замены внутримолекулярных контактов на межмолекулярные β -слои. Этот механизм отражает общую закономерность, наблюдаемую для многих вирусных и невирусных белков (Chiti & Dobson, 2006, 2009), где ID-области служат регуляторами стабильности и агрегационного потенциала. Согласно недавнему исследованию (Bonnet et al., 2025), в белке оболочки потивируса оспы сливы (Plum pox virus) методом крио-ЭМ были выявлены амилоидоподобные структуры даже в нормальных условиях, локализованные в его С-концевой области.

Ранее было показано, что термическая обработка вызывает морфологические и структурные изменения у ряда растительных вирусов – ХВК, ВМАльт, ВТМ (Atabekov et al., 2011; Karpova et al., 2012; Ksenofontov et al., 2019; T. I. Manukhova et al., 2021; Nikitin et al., 2016). Полученные структурно-модифицированные частицы, обладающие повышенной стабильностью, адсорбционными свойствами и способностью к биodeградации, представляют интерес для биотехнологических применений, в частности для разработки вакцинных платформ (Kondakova et al., 2022; Nikitin et al., 2023).

5. АПРОБАЦИЯ МЕТОДА МУРР ДЛЯ СТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА ВИРИОНОВ СПИРАЛЬНОЙ СИММЕТРИИ (НА ПРИМЕРЕ ВТМ).

Для изучения гибких растительных вирусов со спиральной архитектурой нами были широко использованы два уникальных по своим возможностям структурных метода: метод тритиевой планиграфии и метод МУРР (см. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ). Потребовалась лишь их незначительная адаптация применительно к специфике объектов.

Метод МУРР позволяет изучать структуру частиц в растворе в условиях, близких к физиологическим, что критически важно для сохранения нативной гибкости растительных вирусов. Метод был апробирован на модельных объектах –вирионах и реполимерах белка оболочки вируса ВТМ. Частицы реполимеров (РП) не имеют спиральной симметрии и обладают уникальной амилоидоподобной стабильностью: после того, как молекулы белка собраны в такую структуру, для ее разборки требуются денатурирующие условия (Raghavendra et al., 1985; Raghavendra et al., 1986). Такие частицы по данным ПЭМ содержат гетерогенные по длине поперечно исчерченные палочковидные «стопки дисков» длиной 30-80 нм (Рис.65).

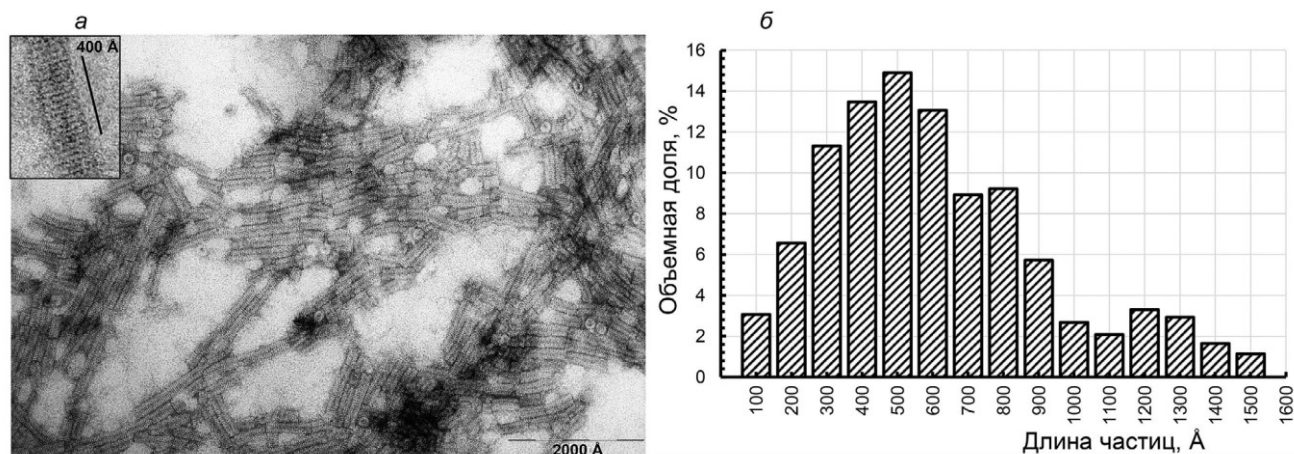


Рис.65. Электронно-микроскопический анализ препаратов реполимеров BTM (а) и распределение по размерам частиц (б). Измерена длина ~250 частиц. Препараты получали из белка BTM, выделенного литиевым методом. ПЭМ (JEM_1011, «JEOL», Япония), контрастирование 2%-ным уранилацетатом. Увеличение $\times 60\,000$ (а) и $\times 150\,000$ (врезка).

Структурное моделирование этих частиц было выполнено с использованием элемента кристаллографической модели четырехслойного агрегата (1EI7.PDB). Получившиеся модели «стопок дисков» представляли собой полые цилиндры. Экспериментальные кривые рассеяния для вирионов и реполимеров (Рис.66 а, в; кривые 1) сравнивались с кривыми, рассчитанными от атомистических моделей (Рис.66; кривые 2). Была построена модель полного вириона (~120 нм), состоящая из ~800 субъединиц БО, которая продемонстрировала убедительное согласие с экспериментом в широком диапазоне волновых векторов ($0,01 < s < 0,35$), подтвердив адекватность метода для анализа целых частиц (Ксенофонов et al., 2020).

Положение характеристических пиков на кривых рассеяния соответствовало данным, полученным методом рентгеновской дифракции (Kendall et al., 2007).

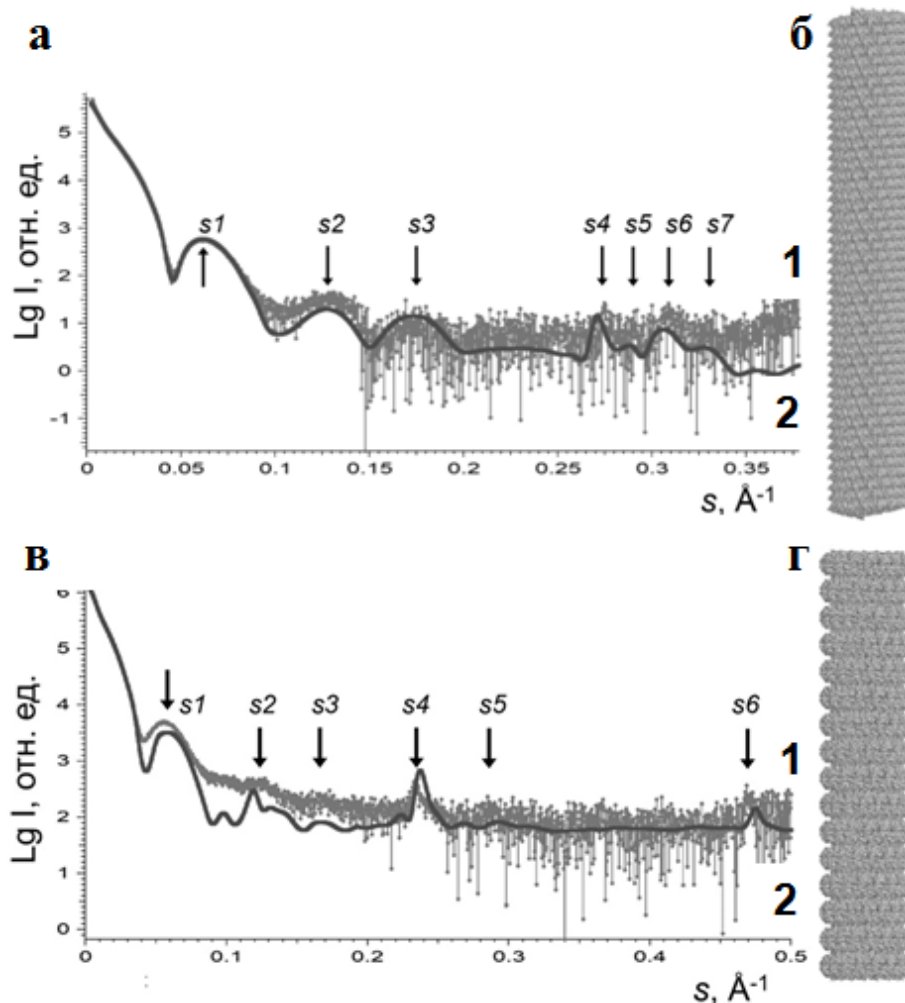


Рис. 66. Тестирование возможностей метода МУРР на модели вирионов и реполимеров ВТМ. Экспериментальные кривые МУРР вириона (а) и реполимера (в). Модель структуры вириона ВТМ (б) и модель реполимера $(AA)_{16}$ (г); кривая 1 – экспериментальные данные; кривая 2 – рассеяние, рассчитанное с помощью программы CRY SOL от модельных структур (б, г). Анализ положения пиков (s_1 - s_6) на кривых рассеяния позволил определить характерные размеры структурных элементов d (по формуле $d=2\pi/s$). Эксперимент проводился на синхротроне Petra III (DESY, Гамбург) на станции P12, оснащенной двумерным детектором Pilatus 2M (фирма DECTRIS, Швейцария). Эксперименты по МУРР выполнены совместно с к.ф./м.н. М.В. Петуховыми и д.ф./м.н. Э.В. Штыковой (Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН).

Для реполимеров ВТМ на основе структуры PDB:1EI7 были созданы три модели: (БА)₁₆, (АА)₁₆ и (БААБ)₈ (из ~550 БО, длиной ~100 нм). Наилучшее соответствие экспериментальным данным показала модель (АА)₁₆, что согласуется с литературными крио-ЭМ данными (Raghavendra et al., 1986).

Анализ положения пиков на кривых рассеяния (например, пика s₄) позволил определить ключевые структурные параметры вириона, такие как осевая периодичность ($2,6 \pm 0,1$ нм), что было независимо верифицировано методом просвечивающей электронной микроскопии (Рис.65). На рисунке видно, что фрагмент длиной 40 нм содержит ~15-16 колец «стопки» ($15,5 \pm 0,5$) (Рис.65, вставка), и осевая периодичность структуры РП будет равна $2,60 \pm 0,09$ нм. Так как длинная ось вириона ВТМ составляет порядка 300 нм, его длина не может быть измерена непосредственно при данном угловом диапазоне ($0,003 < s < 0,5 \text{ \AA}^{-1}$). Экспериментальные и рассчитанные кривые после $s=0,35 \text{ \AA}^{-1}$ расходятся (Рис. 66), что может быть связано с низкой точностью определения МУРР размеров меньше 1,5 нм.

Ограничением метода является низкая точность для объектов размером менее 1,5 нм и длиной частиц более 200 нм. Однако, из нашего изучения следует, что результаты МУРР в этом диапазоне размеров могут характеризовать весь вирион. Таким образом, МУРР доказал свою эффективность для определения формы и структурных особенностей нитевидных вирусных частиц, являясь уникальным инструментом для исследования их нативной организации в растворе, в отличие от методов, требующих кристаллизации (рентгеноструктурный анализ) или фиксации заморозкой (крио-ЭМ). Следует отметить, что интеграция методов МУРР, тритиевой планиграфии, биоинформатики и моделирования представляет собой эффективную стратегию для всестороннего изучения структуры и динамики растительных вирусов, позволяя получать взаимодополняющую информацию на разных уровнях организации.

СВОДНЫЕ ДАННЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Таблица 7. Сравнительная характеристика методов и результатов

Метод исследования	Определенные параметры и свойства	Результаты исследования
Круговой дихроизм и флуоресценция	1. Анализ вторичной и третичной структур белкового капсида. 2. Выявление аномалий, связанных с модификацией N-концевых доменов. Анализ термостабильности вирионов. Устойчивость к детергенту 0,15% ДСН.	Для ХВК: Выявление аномалий, связанных с N-концевым пептидом. Анализ вторичной и третичной структуры, термостабильности. Для ХВКАН Анализ вторичной и третичной структур белкового капсида, термостабильности. Для ХВК-ST: Анализ устойчивости к детергенту ДСН, вторичной и третичной структур белкового капсида, термостабильности, Для ВМАльт: выявление «чисто» α-спиральной структуры, снижение термостабильности. Для АВК: выявление высокой доли термостабильности, устойчивости к ДСН. Для АВКАН: снижение неупорядоченности, повышение термостабильности. Для БО АВК: Вторичная/третичная структуры; Тиофлавин Т выявляет кросс-β-структуры при нагревании
Тритиевая планиграфия	1. Локализация N-концевых сегментов капсидных белков. Степень доступности отдельных аминокислот и сайтов капсидных белков.	Для ХВК: локализация N-концевого домена, экранирование участков белковой цепи $\alpha 1$, $\alpha 7$, 14. Для ХВКАН: рост доступности участков белковой цепи 16, $\alpha 13$. Для ХВК-ST: Снижение уровня мечения N-концевого домена, рост доступности сайтов 30-44, 130-169, Для ХВК+ТГБ1: рост доступности сайтов 55-74, 130-153, 170-213. Для АВК: локализация N-пептида; экранирование сайтов белковой цепи $\alpha 1$, $\beta 4$, $\alpha 5-6$. Для АВКАН: уплотнение внутренних областей капсидного белка.

Малоугловое рентгеновское рассеяние	1. Построение 3D-структурных моделей вирионов и их N-доменов. 2. Определение структурных характеристик белковой спирали капсида: а) шаг спирали; б) размер упорядоченных областей квазикристаллич. упаковки капсида; в) степень разупорядочения спиральной упаковки капсида.	Для ХВК, ХВКАН, ХВК-ST, ВМАльт, АВК, АВКАН: Построение 3D-структурных моделей вирионов и их N-концевых доменов; Определение структурных характеристик белковой спирали капсида: шага спирали белкового капсида; размера упорядоченных областей квазикристаллич. упаковки капсида; степени разупорядочения спиральной упаковки капсида. Для АВКАН изменение шага спирали: 3,92-3,37 нм; рост упорядоченности Для БО АВК - структурный полиморфизм (рН 7,8- ВПЧ; 10,5 - овальные частицы
Электронная микроскопия	Определение особенностей морфологии вирионов и их поперечных размеров.	Для ХВК, ХВКАН, ХВК-ST, ХВК+ТГБ1 ВМАльт, АВК: наблюдались гибкие нитевидные частицы, определены их диаметры. Для АВКАН: наблюдались жесткие палочковидные частицы с меньшим диаметром. Для БО АВК: ВПЧ и овальные частицы; после нагревания сферич. агрегаты
Биоинформатический анализ и молекулярная динамика	1. Предсказание 3D структуры. 2. Моделирование спиральных участков капсида.	Для ХВК: предсказание неупорядоченности, моделирование подтверждение стабильности ядра. Для ХВК-ST: моделирование структуры с помощью AlphaFold3, выявление свернутости N-пептида и перестройки С-концевого домена. Для ВМАльт: сравнение структурного сходства корового домена с ХВК. Для АВК: предсказание природно-разупорядоченных областей.

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.

Основным достижением работы является доказательство ключевой регуляторной роли природно-неупорядоченных (ID) 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 мутации в N-концевом пептиде, имитирующие эффект фосфорилирования, или связывание вирусного белка

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

Проведённый сравнительный анализ выявил существенные различия между семействами вирусов. Для потивирусов характерны более протяжённые природно-неупорядоченные (ID) N- и C-концевые домены, более сложная сеть межсубъединичных контактов и меньшая термостабильность. У потивирусов (ABK) 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 основных 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.

Работа также имеет прикладное значение. 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 в биотехнологии для использования их в качестве платформ при создании биоконъюгатов, доставки веществ, иммуногенов препаратов или создания биоматериалов.

В методологическом аспекте работа подтвердила высокую эффективность использования сравнительно новых методов тритиевой планиграфии для

точного картирования поверхности, а также 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 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 (ВМА^Алт и ХВКΔN).
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).

БЛАГОДАРНОСТИ

В первую очередь хочу выразить искреннюю благодарность д.б.н. проф. Доброву Евгению Николаевичу, и научному консультанту д.х.н., проф. Баратовой Людмиле Алексеевне за предложение идеи – исследовать структурные свойства нитевидных вирусов растений альтернативными методами, за мотивацию и плодотворные обсуждения результатов и перспектив.

Хочу выразить огромную благодарность сотрудникам Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН д.х.н. Штыковой Элеоноре Владимировне и к.ф/м.н. Петухову Максиму Владимировичу, совместно с ними выполнены эксперименты по МУРР и написаны ряд статей.

Хочу выразить благодарность сотрудникам кафедры вирусологии Биологического факультета МГУ за ценные советы, плодотворные дискуссии и предоставленную возможность работы с вирусными препаратами: д.б.н., проф. Карповой Ольге Вячеславовне, д.б.н., проф. Никитину Николаю Александровичу, к.б.н. Скурату Е.В. и к.б.н. Архипенко Марине Владимировне.

Хочу поблагодарить д.х.н., проф. Шишкова Александра Владимировича, к.х.н. Богачеву Елену Николаевну (ФИЦ химической физики, РАН) и сотрудника кафедры радиохимии Химического факультета МГУ к.х.н. Бадуна Геннадия Александровича за помощь в проведении экспериментов по тритиевому мечению и плодотворные обсуждения результатов. Хочу поблагодарить к.х.н. Серебрякову М.В. за помощь в создании уникальных методических разработок и масс-спектрометрический анализ образцов, а также к.х.н. Орлова В.Н. за помощь в проведении опытов по ДЛС и полезные обсуждения. Большое спасибо коллективу отдела электронной микроскопии НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ и в первую очередь к.б.н. Прусову А. за техническую помощь и организацию возможности работать на электронном микроскопе.

И в заключение, спасибо членам нашего коллектива: Федоровой Наталии, Лукашиной Елене, Кордюковой Ларисе, Галкиной Светлане, Тимофеевой Алле, Карловой Надежде и моей супруге Ксенофонтовой Ольге за теплую атмосферу и помощь в работе.

**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 (SJ), 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abouhaidar, M., Erickson, J. W., & Bancroft, J. B. (1979). The inhibition of papaya mosaic virus assembly related to the effect of cations on its RNA. *Virology*, 98(1), 116-120. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(79\)90530-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(79)90530-0)
2. Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., and Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1-2, 19–25. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
3. Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Jumper, J. M. (2024). Addendum: Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 636(8042), e4, <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08416-7>
4. Adams, M. J., Antoniw, J. F., Bar-Joseph, M., Brunt, A. A., Candresse, T., Foster, G. D., Fauquet, C. M. (2004). The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Arch Virol*, 149(5), 1045-1060. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0304-0>
5. Agafonov, D. E., Kolb, V. A., & Spirin, A. S. (1997). Proteins on ribosome surface: measurements of protein exposure by hot tritium bombardment technique. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(24), 12892-12897. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.12892>
6. Agirrezabala, X., Mendez-Lopez, E., Lasso, G., Sanchez-Pina, M. A., Aranda, M., & Valle, M. (2015). The near-atomic cryoEM structure of a flexible filamentous plant virus shows homology of its coat protein with nucleoproteins of animal viruses. *Elife*, 4, e11795. <https://doi.org/10.7554/eLife.11795>
7. Amari, K., Lerich, A., Schmitt-Keichinger, C., Dolja, V. V., & Ritzenthaler, C. (2011). Tubule-guided cell-to-cell movement of a plant virus requires class XI myosin motors. *PLoS Pathog*, 7(10), e1002327. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002327>
8. Anindya, R., & Savithri, H. S. (2003). Surface-exposed amino- and carboxy-terminal residues are crucial for the initiation of assembly in Pepper vein banding virus: a flexuous rod-shaped virus. *Virology*, 316(2), 325-336. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(03\)00593-2](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(03)00593-2)
9. Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Stockinger, H. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res*, 40(Web Server issue), W597-603. <https://doi.org/10.1093/nar/gks400>
10. Atabekov, J., Dobrov, E., Karpova, O., & Rodionova, N. (2007). Potato virus X: structure, disassembly and reconstitution. *Mol Plant Pathol*, 8(5), 667-675. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00420.x>
11. Atabekov, J., Nikitin, N., Arkhipenko, M., Chirkov, S., & Karpova, O. (2011). Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into

- spherical nanoparticles. *J Gen Virol*, 92(Pt 2), 453-456. <https://doi.org/10.1099/vir.0.024356-0>
12. Atabekov, J. G., Rodionova, N. P., Karpova, O. V., Kozlovsky, S. V., Novikov, V. K., & Arkhipenko, M. V. (2001). Translational activation of encapsidated potato virus X RNA by coat protein phosphorylation. *Virology*, 286(2), 466-474. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1013>
 13. Atabekov, J. G., Rodionova, N. P., Karpova, O. V., Kozlovsky, S. V., & Poljakov, V. Y. (2000). The movement protein-triggered in situ conversion of potato virus X virion RNA from a nontranslatable into a translatable form. *Virology*, 271(2), 259-263. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0319>
 14. Atreya, P. L., Lopez-Moya, J. J., Chu, M., Atreya, C. D., & Pirone, T. P. (1995). Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *J Gen Virol*, 76 (Pt 2), 265-270. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-2-265>
 15. Babin, C., Majeau, N., & Leclerc, D. (2013). Engineering of papaya mosaic virus (PapMV) nanoparticles with a CTL epitope derived from influenza NP. *J Nanobiotechnology*, 11, 10. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-10>
 16. Badun, G. A., Fedoseev V. M. (2001). Permeability of Lipid Membranes for Atomic Tritium or Atom “Slipping” Effect and Its Role in Tritium Planigraphy. *Radiochemistry*, 43, 301-305. <https://doi.org/10.1023/A:1012872927896>
 17. Badun, G. A., Lukashina, E. V., Batuk, O. N., Ksenofontov, A. L., Fedoseev, V. M. (2003) Atomic tritium as a surface nanoprobe in a structural investigation of molecular assemblies. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems.*, 23. 797-802
 18. Balke, I., & Zeltins, A. (2019). Use of plant viruses and virus-like particles for the creation of novel vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*, 145, 119-129. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.08.007>
 19. Baratova, L. A., Efimov, A. V., Dobrov, E. N., Fedorova, N. V., Hunt, R., Badun, G. A., Ksenofontov, A.L., Torrance, L., Jarvekulg, L. (2001). In situ spatial organization of Potato virus A coat protein subunits as assessed by tritium bombardment. *J Virol*, 75(20), 9696-9702. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.20.9696-9702.2001>
 20. Baratova, L. A., Fedorova, N. V., Dobrov, E. N., Lukashina, E. V., Kharlanov, A. N., Nasonov, V. V., Rodionova, N. P. (2004). N-Terminal segment of potato virus X coat protein subunits is glycosylated and mediates formation of a bound water shell on the virion surface. *Eur J Biochem*, 271(15), 3136-3145. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04243.x>
 21. Baratova, L. A., Grebenshchikov, N. I., Dobrov, E. N., Gedrovich, A. V., Kashirin, I. A., Shishkov, A. V., Efimov, A. V., Järvekulg, L., Radavsky, Y. L., Saarma, M. (1992). The organization of potato virus X coat proteins in virus particles

- studied by tritium planigraphy and model building. *Virology*, 188(1), 175-180. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90747-d](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90747-d)
22. Baulcombe, D. C., Chapman, S., & Santa Cruz, S. (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J*, 7(6), 1045-1053. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1995.07061045.x>
 23. Besong-Ndika, J., Ivanov, K. I., Hafren, A., Michon, T., & Makinen, K. (2015). Cotranslational coat protein-mediated inhibition of potyviral RNA translation. *J Virol*, 89(8), 4237-4248. <https://doi.org/10.1128/JVI.02915-14>
 24. Bhak, G., Choe, Y. J., & Paik, S. R. (2009). Mechanism of amyloidogenesis: nucleation-dependent fibrillation versus double-concerted fibrillation. *BMB Rep*, 42(9), 541-551. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2009.42.9.541>
 25. Blanc, S., Lopez-Moya, J. J., Wang, R., Garcia-Lampasona, S., Thornbury, D. W., & Pirone, T. P. (1997). A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology*, 231(1), 141-147. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8521>
 26. Blanchet, C. E., Spilotros, A., Schwemmer, F., Graewert, M. A., Kikhney, A., Jeffries, C. M., Svergun, D. I. (2015). Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY). *J Appl Crystallogr*, 48(Pt 2), 431-443. <https://doi.org/10.1107/S160057671500254X>
 27. Bloomer, A. C., Champness, J. N., Bricogne, G., Staden, R., & Klug, A. (1978). Protein disk of tobacco mosaic virus at 2.8 Å resolution showing the interactions within and between subunits. *Nature*, 276(5686), 362-368. <https://doi.org/10.1038/276362a0>
 28. Bogacheva, E. N., Shishkov, A. A., Shishkov, A. V., & Baratova, L. A. (1994). The concept of the "accessible surface" of the protein within the framework of tritium planigraphy. Experiment and calculation. *Mol Biol (Mosk)*, 28(5), 1035-1043.
 29. Bonnet, D., Chaves-Sanjuan, A., Contaldo, N., De Stradis, A., Caliandro, R., Minafra, A., & Geuna, F. (2025). Structural characterization of plum pox virus by cryo-electron microscopy. *Arch Virol*, 171(1), 11. <https://doi.org/10.1007/s00705-025-06473-5>
 30. Brennan, F. R., Jones, T. D., Longstaff, M., Chapman, S., Bellaby, T., Smith, H., Flock, J. I. (1999). Immunogenicity of peptides derived from a fibronectin-binding protein of *S. aureus* expressed on two different plant viruses. *Vaccine*, 17(15-16), 1846-1857. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(98\)00485-x](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(98)00485-x)
 31. Brooks, B. R., Brooks, C. L., 3rd, Mackerell, A. D., Jr., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Karplus, M. (2009). CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem*, 30(10), 1545-1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>
 32. Butler, P. J. (1984). The current picture of the structure and assembly of tobacco mosaic virus. *J Gen Virol*, 65 (Pt 2), 253-279. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-65-2-253>

33. Butler, P. J. (1999). Self-assembly of tobacco mosaic virus: the role of an intermediate aggregate in generating both specificity and speed. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354(1383), 537-550. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0405>
34. Cardenas-Vargas, A., Elizondo-Quiroga, D., Gutierrez-Ortega, A., Charles-Nino, C., & Pedroza-Roldan, C. (2016). Evaluation of the Immunogenicity of a Potyvirus-Like Particle as an Adjuvant of a Synthetic Peptide. *Viral Immunol*, 29(10), 557-564. <https://doi.org/10.1089/vim.2016.0087>
35. Carignan, D., Therien, A., Rioux, G., Paquet, G., Gagne, M. L., Bolduc, M., Leclerc, D. (2015). Engineering of the PapMV vaccine platform with a shortened M2e peptide leads to an effective one dose influenza vaccine. *Vaccine*, 33(51), 7245-7253. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.10.123>
36. Cerovska, N., Hoffmeisterova, H., Moravec, T., Plchova, H., Folwarczna, J., Synkova, H., Smahel, M. (2012). Transient expression of Human papillomavirus type 16 L2 epitope fused to N- and C-terminus of coat protein of Potato virus X in plants. *J Biosci*, 37(1), 125-133. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9177-z>
37. Cerovska, N., Hoffmeisterova, H., Pecenkova, T., Moravec, T., Synkova, H., Plchova, H., & Veleminsky, J. (2008). Transient expression of HPV16 E7 peptide (aa 44-60) and HPV16 L2 peptide (aa 108-120) on chimeric potyvirus-like particles using Potato virus X-based vector. *Protein Expr Purif*, 58(1), 154-161. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.09.006>
38. Chakravarty, A., Reddy, V. S., & Rao, A. L. N. (2020). Unravelling the Stability and Capsid Dynamics of the Three Virions of Brome Mosaic Virus Assembled Autonomously In Vivo. *J Virol*, 94(8). <https://doi.org/10.1128/JVI.01794-19>
39. Chapman, S., Kavanagh, T., & Baulcombe, D. (1992). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J*, 2(4), 549-557. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1992.t01-24-00999.x>
40. Charon, J., Theil, S., Nicaise, V., & Michon, T. (2016). Protein intrinsic disorder within the Potyvirus genus: from proteome-wide analysis to functional annotation. *Mol Biosyst*, 12(2), 634-652. <https://doi.org/10.1039/c5mb00677e>
41. Chase, O., Javed, A., Byrne, M. J., Thuenemann, E. C., Lomonossoff, G. P., Ranson, N. A., & Lopez-Moya, J. J. (2023). CryoEM and stability analysis of virus-like particles of potyvirus and Ipomovirus infecting a common host. *Commun Biol*, 6(1), 433. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04799-x>
42. Chatchen, S., Juricek, M., Rueda, P., & Kertbundit, S. (2006). Papaya ringspot virus coat protein gene for antigen presentation in Escherichia coli. *J Biochem Mol Biol*, 39(1), 16-21. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2006.39.1.016>
43. Chen, T. H., Hu, C. C., Liao, J. T., Lee, Y. L., Huang, Y. W., Lin, N. S., Hsu, Y. H. (2017). Production of Japanese Encephalitis Virus Antigens in Plants Using Bamboo Mosaic Virus-Based Vector. *Front Microbiol*, 8, 788. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00788>

44. Chiti, F., & Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem*, 75, 333-366. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>
45. Chiti, F., & Dobson, C. M. (2009). Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat Chem Biol*, 5(1), 15-22. <https://doi.org/10.1038/nchembio.131>
46. Clare, D. K., Pechnikova, E. V., Skurat, E. V., Makarov, V. V., Sokolova, O. S., Solovyev, A. G., & Orlova, E. V. (2015). Novel Inter-Subunit Contacts in Barley Stripe Mosaic Virus Revealed by Cryo-Electron Microscopy. *Structure*, 23(10), 1815-1826. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.06.028>
47. Conchillo-Sole, O., de Groot, N. S., Aviles, F. X., Vendrell, J., Daura, X., & Ventura, S. (2007). AGGRESKAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics*, 8, 65. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-65>
48. Costa, L., Andriatis, A., Brennich, M., Teulon, J. M., Chen, S. W., Pellequer, J. L., & Round, A. (2016). Combined small angle X-ray solution scattering with atomic force microscopy for characterizing radiation damage on biological macromolecules. *BMC Struct Biol*, 16(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12900-016-0068-2>
49. Cruz, S. S., Chapman, S., Roberts, A. G., Roberts, I. M., Prior, D. A., & Oparka, K. J. (1996). Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(13), 6286-6290. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6286>
50. Cuesta, R., Yuste-Calvo, C., Gil-Carton, D., Sanchez, F., Ponz, F., & Valle, M. (2019). Structure of Turnip mosaic virus and its viral-like particles. *Sci Rep*, 9(1), 15396. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51823-4>
51. Denis, J., Acosta-Ramirez, E., Zhao, Y., Hamelin, M. E., Koukavica, I., Baz, M., Leclerc, D. (2008). Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform. *Vaccine*, 26(27-28), 3395-3403. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.04.052>
52. DiMaio, F., Chen, C. C., Yu, X., Frenz, B., Hsu, Y. H., Lin, N. S., & Egelman, E. H. (2015). The molecular basis for flexibility in the flexible filamentous plant viruses. *Nat Struct Mol Biol*, 22(8), 642-644. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3054>
53. Dobrov, E. N., Badun, G. A., Lukashina, E. V., Fedorova, N. V., Ksenofontov, A. L., Fedoseev, V. M., & Baratova, L. A. (2003). Tritium planigraphy comparative structural study of tobacco mosaic virus and its mutant with altered host specificity. *Eur J Biochem*, 270(16), 3300-3308. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03680.x>
54. Dobrov, E. N., Kust, S. V., Yakovleva, O. A., & Tikchonenko, T. I. (1977). Structure of single-stranded virus RNA in situ. II. Optical activity of five tobacco mosaic-like viruses and their components. *Biochim Biophys Acta*, 475(4), 623-637. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(77\)90323-9](https://doi.org/10.1016/0005-2787(77)90323-9)

55. Dolja, V. V., Boyko, V. P., Agranovsky, A. A., & Koonin, E. V. (1991). Phylogeny of capsid proteins of rod-shaped and filamentous RNA plant viruses: two families with distinct patterns of sequence and probably structure conservation. *Virology*, 184(1), 79-86. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90823-t](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90823-t)
56. Dolja, V. V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A. E., Vandebosch, K. A., & Carrington, J. C. (1995). Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology*, 206(2), 1007-1016. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1023>
57. Dolja, V. V., Haldeman, R., Robertson, N. L., Dougherty, W. G., & Carrington, J. C. (1994). Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J*, 13(6), 1482-1491. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06403.x>
58. Dolja, V. V., Kreuze, J. F., & Valkonen, J. P. (2006). Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Res*, 117(1), 38-51. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.02.002>
59. Efimov, A. V. (1999). Complementary packing of alpha-helices in proteins. *FEBS Lett*, 463(1-2), 3-6. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01507-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01507-0)
60. Emeterio, J. & Pollack, L. (2020). Visualizing a viral genome with contrast variation small angle X-ray scattering. *J Biol Chem*, 295(47), 15923-15932. doi: 10.1074/jbc.RA120.013961
61. Eisenberg, D., & Jucker, M. (2012). The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell*, 148(6), 1188-1203. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.022>
62. Erickson, J. W., & Bancroft, J. B. (1978). The self-assembly of papaya mosaic virus. *Virology*, 90(1), 36-46. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90330-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90330-6)
63. Erickson, J. W., & Bancroft, J. B. (1980). The assembly of papaya mosaic virus coat protein with DNA. *Prog Clin Biol Res*, 40, 293-300.
64. Erickson, J. W., Bancroft, J. B., & Horne, R. W. (1976). The assembly of papaya mosaic virus protein. *Virology*, 72(2), 514-517. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(76\)90180-x](https://doi.org/10.1016/0042-6822(76)90180-x)
65. Fernandez-Escamilla, A. M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., & Serrano, L. (2004). Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat Biotechnol*, 22(10), 1302-1306. <https://doi.org/10.1038/nbt1012>
66. Fernandez-Fernandez, M. R., Martinez-Torrecuadrada, J. L., Casal, J. I., & Garcia, J. A. (1998). Development of an antigen presentation system based on plum pox potyvirus. *FEBS Lett*, 427(2), 229-235. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00429-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00429-3)
67. Fowler, D. M., Koulov, A. V., Balch, W. E., & Kelly, J. W. (2007). Functional amyloid--from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci*, 32(5), 217-224. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.03.003>

68. Fraenkel-Conrat, H. (1957). Degradation of tobacco mosaic virus with acetic acid. *Virology*, 4(1), 1-4. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(57\)90038-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(57)90038-7)
69. Gabrenaite-Verkhovskaya, R., Andreev, I. A., Kalinina, N. O., Torrance, L., Taliansky, M. E., & Makinen, K. (2008). Cylindrical inclusion protein of potato virus A is associated with a subpopulation of particles isolated from infected plants. *J Gen Virol*, 89(Pt 3), 829-838. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83406-0>
70. Gallo, A., Valli, A., Calvo, M., & Garcia, J. A. (2018). A Functional Link between RNA Replication and Virion Assembly in the Potyvirus Plum Pox Virus. *J Virol*, 92(9). <https://doi.org/10.1128/JVI.02179-17>
71. Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, 31(13), 3784-3788. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg563>
72. Gedrovich, A. V., Baratova, L. A., Bogacheva, E. N., Medvedkin, V. N., & Shishkov, A. V. (1993). Quantitative determination of the accessible surface of globular proteins by tritium planigraphy. *Mol Biol (Mosk)*, 27(2), 309-315.
73. Gerken, T. A., Butenhof, K. J., & Shogren, R. (1989). Effects of glycosylation on the conformation and dynamics of O-linked glycoproteins: carbon-13 NMR studies of ovine submaxillary mucin. *Biochemistry*, 28(13), 5536-5543. <https://doi.org/10.1021/bi00439a030>
74. Glatter, O., Kratky, O. (1982). In: *Small-angle X-ray scattering*. Acad. Press., London, 515.
75. Goldanskii, V. I., Kashirin, I. A., Shishkov, A. V., Baratova, L. A., & Grebenshchikov, N. I. (1988). The use of thermally activated tritium atoms for structural-biological investigations: the topography of the TMV protein-accessible surface of the virus. *J Mol Biol*, 201(3), 567-574. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90638-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90638-9)
76. Gonzalez-Gamboa, I., Manrique, P., Sanchez, F., & Ponz, F. (2017). Plant-made potyvirus-like particles used for log-increasing antibody sensing capacity. *J Biotechnol*, 254, 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.014>
77. Goodman, R. M. (1975). Reconstitution of potato virus X *in vitro*. I. Properties of the dissociated protein structural subunits. *Virology*, 68(2), 287-298. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(75\)90272-x](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90272-x)
78. Greenfield, N., & Fasman, G. D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, 8(10), 4108-4116. <https://doi.org/10.1021/bi00838a031>
79. Grinzato, A., Kandiah, E., Lico, C., Betti, C., Baschieri, S., & Zanotti, G. (2020). Atomic structure of potato virus X, the prototype of the Alphaflexiviridae family. *Nat Chem Biol*, 16(5), 564-569. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0502-4>
80. Guinier, A. (1939). Basic discussion of X-ray scattering at small angles by small discrete particles. *Ann. Phys.*, 12, 161-237.

81. Guinier, A., Fournet, G. (1955). In: Small-angle scattering of X-rays. John Wiley and Sons, New York. 269.
82. Hafren, A., Hofius, D., Ronnholm, G., Sonnewald, U., & Makinen, K. (2010). HSP70 and its cochaperone CIP promote potyvirus infection in *Nicotiana benthamiana* by regulating viral coat protein functions. *Plant Cell*, 22(2), 523-535. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072413>
83. Harrison, B. D., & Robinson, D. J. (1988). Molecular variation in vector-borne plant viruses: epidemiological significance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 321(1207), 447-462. <https://doi.org/10.1098/rstb.1988.0102>
84. Harrison, R. S., Sharpe, P. C., Singh, Y., & Fairlie, D. P. (2007). Amyloid peptides and proteins in review. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 159, 1-77. https://doi.org/10.1007/112_2007_0701
85. Hiragi, Y., Inoue, H., Sano, Y., Kajiwara, K., Ueki, T., Kataoka, M., Amemiya, Y. (1988). Temperature dependence of the structure of aggregates of tobacco mosaic virus protein at pH 7.2. Static synchrotron small-angle X-ray scattering. *J Mol Biol*, 204(1), 129-140. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90604-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90604-3)
86. Iconomidou, V. A., & Hamodrakas, S. J. (2008). Natural protective amyloids. *Curr Protein Pept Sci*, 9(3), 291-309. <https://doi.org/10.2174/138920308784534041>
87. Ivanov, K. I., & Makinen, K. (2012). Coat proteins, host factors and plant viral replication. *Curr Opin Virol*, 2(6), 712-718. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.10.001>
88. Ivanov, K. I., Puustinen, P., Gabrenaite, R., Vihinen, H., Ronnstrand, L., Valmu, L., Kalkkinen, N., Makinen, K. (2003). Phosphorylation of the potyvirus capsid protein by protein kinase CK2 and its relevance for virus infection. *Plant Cell*, 15(9), 2124-2139. <https://doi.org/10.1105/tpc.012567>
89. Jagadish, M. N., Edwards, S. J., Hayden, M. B., Grusovin, J., Vandenberg, K., Schoofs, P., Pye, D. (1996). Chimeric potyvirus-like particles as vaccine carriers. *Intervirology*, 39(1-2), 85-92. <https://doi.org/10.1159/000150479>
90. Jagadish, M. N., Hamilton, R. C., Fernandez, C. S., Schoofs, P., Davern, K. M., Kalnins, H., Nisbet, I. T. (1993). High level production of hybrid potyvirus-like particles carrying repetitive copies of foreign antigens in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)*, 11(10), 1166-1170. <https://doi.org/10.1038/nbt1093-1166>
91. Jagadish, M. N., Ward, C. W., Gough, K. H., Tulloch, P. A., Whittaker, L. A., & Shukla, D. D. (1991). Expression of potyvirus coat protein in *Escherichia coli* and yeast and its assembly into virus-like particles. *J Gen Virol*, 72 (Pt 7), 1543-1550. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-7-1543>
92. Jarvecul, L., Baratova, L., Dobrov, E., Badun, G., Hunt, R., Andreeva, E., Rabenstein, F., Efimov, A.V. (2000). Study of the spatial structure of potato virus. A coat protein subunits and particles using tritium planigraphy *Beiträge zur Züchtungsforschung*, 6, 61-66.

93. Jones, R. A. C., & Naidu, R. A. (2019). Global Dimensions of Plant Virus Diseases: Current Status and Future Perspectives. *Annu Rev Virol*, 6(1), 387-409. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015606>
94. Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W., Klein, M.L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *Journal of Chemical Physics*, 79, 926–935.
95. Kaftanova, A. S., Kiselev, N. A., Novikov, V. K., & Atabekov, J. G. (1975). Structure of products of protein reassembly and reconstruction of potato virus X. *Virology*, 67(1), 283-287. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(75\)90426-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90426-2)
96. Kalinina, N. O., Fedorkin, O. N., Samuilova, O. V., Maiss, E., Korpela, T., Morozov, S., & Atabekov, J. G. (1996). Expression and biochemical analyses of the recombinant potato virus X 25K movement protein. *FEBS Lett*, 397(1), 75-78. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(96\)01138-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(96)01138-6)
97. Kalnciema, I., Skrastina, D., Ose, V., Pumpens, P., & Zeltins, A. (2012). Potato virus Y-like particles as a new carrier for the presentation of foreign protein stretches. *Mol Biotechnol*, 52(2), 129-139. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9480-9>
98. Karpova, O., Nikitin, N., Chirkov, S., Trifonova, E., Sheveleva, A., Lazareva, E., & Atabekov, J. (2012). Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens. *J Gen Virol*, 93(Pt 2), 400-407. <https://doi.org/10.1099/vir.0.036293-0>
99. Karpova, O. V., Zayakina, O. V., Arkhipenko, M. V., Sheval, E. V., Kiselyova, O. I., Poljakov, V. Y., Atabekov, J. G. (2006). Potato virus X RNA-mediated assembly of single-tailed ternary 'coat protein-RNA-movement protein' complexes. *J Gen Virol*, 87(Pt 9), 2731-2740. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81993-0>
100. Kavcic, L., Kezar, A., Koritnik, N., Znidaric, M. T., Klobucar, T., Vicic, Z., Podobnik, M. (2024). From structural polymorphism to structural metamorphosis of the coat protein of flexuous filamentous potato virus Y. *Commun Chem*, 7(1), 14. <https://doi.org/10.1038/s42004-024-01100-x>
101. Kendall, A., Bian, W., Maris, A., Azzo, C., Groom, J., Williams, D., Stubbs, G. (2013). A common structure for the Potexviruses. *Virology*, 436(1), 173-178. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.11.008>
102. Kendall, A., McDonald, M., & Stubbs, G. (2007). Precise determination of the helical repeat of tobacco mosaic virus. *Virology*, 369(1), 226-227. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.08.013>
103. Kezar, A., Kavcic, L., Polak, M., Novacek, J., Gutierrez-Aguirre, I., Znidaric, M. T., Podobnik, M. (2019). Structural basis for the multitasking nature of the potato virus Y coat protein. *Sci Adv*, 5(7), eaaw3808. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw3808>
104. Kiselyova, O. I., Yaminsky, I. V., Karpova, O. V., Rodionova, N. P., Kozlovsky, S. V., Arkhipenko, M. V., & Atabekov, J. G. (2003). AFM study of potato virus X

- disassembly induced by movement protein. *J Mol Biol*, 332(2), 321-325. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00835-0](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00835-0)
105. Koenig, R. (1972). Anomalous behavior of the coat proteins of potato virus X and cactus virus X during electrophoresis in dodecyl sulfate-containing polyacrylamide gels. *Virology*, 50(1), 263-266. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(72\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(72)90368-6)
106. Koenig, R., Stegemann, H., Francksen, H., & Paul, H. L. (1970). Protein subunits in the potato virus X group. Determination of the molecular weights by polyacrylamide electrophoresis. *Biochim Biophys Acta*, 207 (1), 184-189. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(70\)90150-9](https://doi.org/10.1016/0005-2795(70)90150-9)
107. Koenig, R., Tremaine, J.H., Shepard, J.F. (1978). In situ Degradation of the Protein Chain of Potato Virus X at the N- and C-termini. *Journal of General Virology*, 38(2), 329-337. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-38-2-329>
108. Konarev, P. V., Petoukhov, M. V., & Svergun, D. I. (2001). MASSHA— a graphics system for rigid-body modelling of macromolecular complexes against solution scattering data. *Journal of Applied Crystallography*, 34 (4), 527-532. <https://doi.org/10.1107/s0021889801006100>
109. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., & Svergun, D. I. (2003). PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*, 36 (5), 1277-1282. <https://doi.org/10.1107/s0021889803012779>
110. Kondakova, O. A., Evtushenko, E. A., Baranov, O. A., Nikitin, N. A., & Karpova, O. V. (2022). Structurally Modified Plant Viruses and Bacteriophages with Helical Structure. Properties and Applications. *Biochemistry (Mosc)*, 87(6), 548-558. <https://doi.org/10.1134/S0006297922060062>
111. Koo, M., Bendahmane, M., Lettieri, G. A., Paoletti, A. D., Lane, T. E., Fitchen, J. H., Beachy, R. N. (1999). Protective immunity against murine hepatitis virus (MHV) induced by intranasal or subcutaneous administration of hybrids of tobacco mosaic virus that carries an MHV epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(14), 7774-7779. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.7774>
112. Kordyukova, L. V., Ksenofontov, A. L., Badun, G. A., Baratova, L. A., & Shishkov, A. V. (2001). Studying liposomes by tritium bombardment. *Biosci. Rep*, 21(6), 711-718. <https://doi.org/10.1023/a:1015572321508>
113. Koritnik, N., Kezar, A., Kavcic, L., Znidaric, M. T., Leonardi, A., De, S., Podobnik, M. (2026). Species-specific structural adaptation of the potyviral coat protein in virions and virus-like particles. *Commun Biol*, 9(1), 226. <https://doi.org/10.1038/s42003-025-09502-w>
114. Ksenofontov, A.L., Dobrov, E.N., Fedorova, N.V., et.al. (2011) Intrinsically unstructured regions in the C-domain of the influenza virus M1 protein. *Molecular Biology*. 45 (4), 634–640

115. 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. (2019). Surface characterization of the thermal remodeling helical plant virus. *PLoS One*, 14(5), e0216905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216905>
116. Ksenofontov, A. L., Kozlovsky, V. S., Kordyukova, L. V., Radyukhin, V. A., Timofeeva, A. V., & Dobrov, E. N. (2006). Determination of concentration and aggregate size in influenza virus preparations from the true UV-absorption spectra. *Molecular Biology*, 40(1), 172-179. <https://doi.org/10.1134/s0026893306010201>
117. Ksenofontov, A. L., Paalme, V., Arutyunyan, A. M., Semenyuk, P. I., Fedorova, N. V., Rumvolt, R., Baratova, L. A., Jarvekulg, L., Dobrov, E. N. (2013). Partially disordered structure in intravirus coat protein of potyvirus potato virus A. *PLoS One*, 8(7), e67830. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067830>
118. Ksenofontov, A. L., Parshina, E. Y., Fedorova, N. V., Arutyunyan, A. M., Rumvolt, R., Paalme, V., Baratova, L. A., Jarvekulg, L., Dobrov, E. N. (2016). Heating-induced transition of Potyvirus Potato Virus A coat protein into beta-structure. *J Biomol Struct Dyn*, 34(2), 250-258. <https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1022604>
119. Kwon, S. J., Park, M. R., Kim, K. W., Plante, C. A., Hemenway, C. L., & Kim, K. H. (2005). cis-Acting sequences required for coat protein binding and *in vitro* assembly of Potato virus X. *Virology*, 334(1), 83-97. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.01.018>
120. Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 157(1), 105-132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
121. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
122. Laliberte-Gagne, M. E., Bolduc, M., Therien, A., Garneau, C., Casault, P., Savard, P., Leclerc, D. (2019). Increased Immunogenicity of Full-Length Protein Antigens through Sortase-Mediated Coupling on the PapMV Vaccine Platform. *Vaccines (Basel)*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/vaccines7020049>
123. Lebel, M. E., Chartrand, K., Tarrab, E., Savard, P., Leclerc, D., & Lamarre, A. (2016). Potentiating Cancer Immunotherapy Using Papaya Mosaic Virus-Derived Nanoparticles. *Nano Lett*, 16(3), 1826-1832. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b04877>
124. Lee, B., & Richards, F. M. (1971). The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J Mol Biol*, 55(3), 379-400. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(71\)90324-x](https://doi.org/10.1016/0022-2836(71)90324-x)

125. LeVine, H. 3rd. (1999). Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol*, 309, 274-284. [https://doi.org/ 10.1016/s0076-6879\(99\)09020-5](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(99)09020-5)
126. Lico, C., Mancini, C., Italiani, P., Betti, C., Boraschi, D., Benvenuto, E., & Baschieri, S. (2009). Plant-produced potato virus X chimeric particles displaying an influenza virus-derived peptide activate specific CD8⁺ T cells in mice. *Vaccine*, 27(37), 5069-5076. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.06.045>
127. Lobanov, M. Y., Garbuzynskiy, S. O., & Galzitskaya, O. V. (2010). Statistical analysis of unstructured amino acid residues in protein structures. *Biochemistry (Mosc)*, 75(2), 192-200. <https://doi.org/10.1134/s0006297910020094>
128. Lok, S., & Abouhaidar, M. G. (1986). The nucleotide sequence of the 5' end of papaya mosaic virus RNA: site of *in vitro* assembly initiation. *Virology*, 153(2), 289-296. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(86\)90032-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90032-2)
129. Lomonossoff, G. P., & D'Aoust, M. A. (2016). Plant-produced biopharmaceuticals: A case of technical developments driving clinical deployment. *Science*, 353(6305), 1237-1240. [https://doi.org/ 10.1126/science.aaf6638](https://doi.org/10.1126/science.aaf6638)
130. Lukashina, E.V., Badun, G.A., Fedoseev, V.M., Fedorova, N.V., Ksenofontov, A.L., et.al. (2001) The spatial arrangement of the wild-type and mutant tobacco mosaic virus coat proteins assessed by tritium planigraphy. *Molecular Biology*. 35. (3), 426-430
131. Lukashina, E., Badun, G., Fedorova, N., Ksenofontov, A., Nemykh, M., Serebryakova, M., Dobrov, E. (2009). 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*, 276(23), 7006-7015. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07408.x>
132. Lukashina, E., Ksenofontov, A., Fedorova, N., Badun, G., Mukhamedzhanova, A., Karpova, O., Rodionova, N., Baratova, L.A., Dobrov, E. (2012). Analysis of the role of the coat protein N-terminal segment in Potato virus X virion stability and functional activity. *Mol Plant Pathol*, 13(1), 38-45. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00725.x>
133. Maiti, N. C., Apetri, M. M., Zagorski, M. G., Carey, P. R., & Anderson, V. E. (2004). Raman spectroscopic characterization of secondary structure in natively unfolded proteins: alpha-synuclein. *J Am Chem Soc*, 126(8), 2399-2408. <https://doi.org/10.1021/ja0356176>
134. Makarov, V. V., & Kalinina, N. O. (2016). Structure and Noncanonical Activities of Coat Proteins of Helical Plant Viruses. *Biochemistry (Mosc)*, 81(1), 1-18. <https://doi.org/10.1134/S0006297916010016>
135. Makarov, V. V., Skurat, E. V., Semenyuk, P. I., Abashkin, D. A., Kalinina, N. O., Arutyunyan, A. M., Dobrov, E. N. (2013). Structural lability of Barley stripe mosaic virus virions. *PLoS One*, 8(4), e60942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060942>

136. Manukhova, T. I., Evtushenko, E. A., Ksenofontov, A. L., Arutyunyan, A. M., Kovalenko, A. O., Nikitin, N. A., & Karpova, O. V. (2021). Thermal remodelling of Alternanthera mosaic virus virions and virus-like particles into protein spherical particles. *PLoS One*, 16(7), e0255378-e0255378. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255378>
137. Martinez-Turino, S., Perez, J. J., Hervás, M., Navajas, R., Ciordia, S., Udeshi, N. D., Garcia, J. A. (2018). Phosphorylation coexists with O-GlcNAcylation in a plant virus protein and influences viral infection. *Mol Plant Pathol*, 19(6), 1427-1443. <https://doi.org/10.1111/mpp.12626>
138. Marusic, C., Rizza, P., Lattanzi, L., Mancini, C., Spada, M., Belardelli, F., Capone, I. (2001). Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 75(18), 8434-8439. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.18.8434-8439.2001>
139. McDonald, J. G. Bancroft, J.B. (1977). Assembly Studies on Potato Virus Y and its Coat Protein. *J Gen Virol*, 35, 261-263.
140. McKern, N. M., Edskes, H. K., Ward, C. W., Strike, P. M., Barnett, O. W., & Shukla, D. D. (1991). Coat protein of potyviruses. 7. Amino acid sequence of peanut stripe virus. *Arch Virol*, 119(1-2), 25-35. <https://doi.org/10.1007/BF01314320>
141. Mertens, H. D., & Svergun, D. I. (2010). Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *J Struct Biol*, 172(1), 128-141. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.06.012>
142. Morozov, S. Y., & Solovyev, A. G. (2003). Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *J Gen Virol*, 84(Pt 6), 1351-1366. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18922-0>
143. Namba, K., Pattanayek, R., & Stubbs, G. (1989). Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus. Refined structure of intact tobacco mosaic virus at 2.9 Å resolution by X-ray fiber diffraction. *J Mol Biol*, 208(2), 307-325. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90391-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(89)90391-4)
144. Nemykh, M. A., Novikov, V. K., Arutiunian, A. M., Kalmykov, P. V., Drachev, V. A., & Dobrov, E. N. (2007). [Comparative study of structural stability of potato virus X coat protein molecules in solution and in the virus particles]. *Mol Biol (Mosk)*, 41(4), 697-705.
145. Nikitin, N., Ksenofontov, A., Trifonova, E., Arkhipenko, M., Petrova, E., Kondakova, O., Kirpichnikov, M., Atabekov, J.G, Dobrov, E.N, Karpova, O. (2016). Thermal conversion of filamentous potato virus X into spherical particles with different properties from virions. *FEBS Lett*, 590(10), 1543-1551. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12184>
146. Nikitin, N., Vasiliev, Y., Kovalenko, A., Ryabchevskaya, E., Kondakova, O., Evtushenko, E., & Karpova, O. (2023). Plant Viruses as Adjuvants for Next-Generation Vaccines and Immunotherapy. *Vaccines (Basel)*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/vaccines11081372>

147. Nilsson, M. R. (2004). Techniques to study amyloid fibril formation *in vitro*. *Methods*, 34(1), 151-160. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.012>
148. O'Brien, G. J., Bryant, C. J., Voogd, C., Greenberg, H. B., Gardner, R. C., & Bellamy, A. R. (2000). Rotavirus VP6 expressed by PVX vectors in *Nicotiana benthamiana* coats PVX rods and also assembles into viruslike particles. *Virology*, 270(2), 444-453. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0314>
149. Orlov, V. N., Kust, S. V., Kalmykov, P. V., Krivosheev, V. P., Dobrov, E. N., & Drachev, V. A. (1998). A comparative differential scanning calorimetric study of tobacco mosaic virus and of its coat protein ts mutant. *FEBS Lett*, 433(3), 307-311. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00924-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00924-7)
150. Parker, L., Kendall, A., Berger, P. H., Shiel, P. J., & Stubbs, G. (2005). Wheat streak mosaic virus--structural parameters for a Potyvirus. *Virology*, 340(1), 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.06.022>
151. Parker, L., Kendall, A., & Stubbs, G. (2002). Surface features of potato virus X from fiber diffraction. *Virology*, 300(2), 291-295. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1483>
152. Perez Jde, J., Udeshi, N. D., Shabanowitz, J., Ciordia, S., Juarez, S., Scott, C. L., Garcia, J. A. (2013). O-GlcNAc modification of the coat protein of the potyvirus Plum pox virus enhances viral infection. *Virology*, 442(2), 122-131. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.03.029>
153. Peters, G. S., Gaponov, Y. A., Konarev, P. V., Marchenkova, M. A., Ilina, K. B., Volkov, V. V., Pisarevskiy, Y. V., and Kovalchuk, M. V. (2022). Upgrade of the BioMUR beamline at the Kurchatov synchrotron radiation source for serial small-angle X-ray scattering experiments in solutions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A*, 1025. <https://doi.org/10.1016/j.nima.2021.166170>
154. Peters, G. S., Zakharchenko, O. A., Konarev, P. V., Karmazikov, Y. V., Smirnov, M. A., Zabelin, A. V., Mukhamedzhanov, E. H., Veligzhanin, A. A., Blagov, A. E., and Kovalchuk, M. V. (2019). The small-angle X-ray scattering beamline BioMUR at the Kurchatov synchrotron radiation source. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A*, 945. <https://doi.org/10.1016/j.nima.2019.162616>
155. Petoukhov, M. V., & Svergun, D. I. (2005). Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys J*, 89(2), 1237-1250. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.064154>
156. Potschka, M., Koch, M. H., Adams, M. L., & Schuster, T. M. (1988). Time-resolved solution X-ray scattering of tobacco mosaic virus coat protein: kinetics and structure of intermediates. *Biochemistry*, 27(22), 8481-8491. <https://doi.org/10.1021/bi00422a028>
157. Raghavendra, K., Adams, M. L., & Schuster, T. M. (1985). Tobacco mosaic virus protein aggregates in solution: structural comparison of 20S aggregates with

- those near conditions for disk crystallization. *Biochemistry*, 24(13), 3298-3304. <https://doi.org/10.1021/bi00334a034>
158. Raghavendra, K., Salunke, D. M., Caspar, D. L., & Schuster, T. M. (1986). Disk aggregates of tobacco mosaic virus protein in solution: electron microscopy observations. *Biochemistry*, 25(20), 6276-6279. <https://doi.org/10.1021/bi00368a066>
 159. Raymond, D. D., Piper, M. E., Gerrard, S. R., Skinotis, G., & Smith, J. L. (2012). Phleboviruses encapsidate their genomes by sequestering RNA bases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(47), 19208-19213. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213553109>
 160. Revers, F., & Garcia, J. A. (2015). Molecular biology of potyviruses. *Adv Virus Res*, 92, 101-199. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.006>
 161. Richardson, J. F., Tollin, P., & Bancroft, J. B. (1981). The architecture of the Potexviruses. *Virology*, 112(1), 34-39. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(81\)90609-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(81)90609-7)
 162. Rioux, G., Babin, C., Majeau, N., & Leclerc, D. (2012). Engineering of papaya mosaic virus (PapMV) nanoparticles through fusion of the HA11 peptide to several putative surface-exposed sites. *PLoS One*, 7(2), e31925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031925>
 163. Rodionova, N. P., Karpova, O. V., Kozlovsky, S. V., Zayakina, O. V., Arkhipenko, M. V., & Atabekov, J. G. (2003). Linear remodeling of helical virus by movement protein binding. *J Mol Biol*, 333(3), 565-572. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.08.058>
 164. Saini, M., & Vratil, S. (2003). A Japanese encephalitis virus peptide present on Johnson grass mosaic virus-like particles induces virus-neutralizing antibodies and protects mice against lethal challenge. *J Virol*, 77(6), 3487-3494. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.6.3487-3494.2003>
 165. Sanchez, F., Saez, M., Lunello, P., & Ponz, F. (2013). Plant viral elongated nanoparticles modified for log-increases of foreign peptide immunogenicity and specific antibody detection. *J Biotechnol*, 168(4), 409-415. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.09.002>
 166. Sano, Y., Inoue, H., & Hiragi, Y. (1999). Differences of reconstitution process between tobacco mosaic virus and cucumber green mottle mosaic virus by synchrotron small angle X-ray scattering using low-temperature quenching. *J Protein Chem*, 18(7), 801-805. <https://doi.org/10.1023/a:1020689720082>
 167. Savard, C., Guerin, A., Drouin, K., Bolduc, M., Laliberte-Gagne, M. E., Dumas, M. C., Leclerc, D. (2011). Improvement of the trivalent inactivated flu vaccine using PapMV nanoparticles. *PLoS One*, 6(6), e21522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021522>
 168. Savard, C., Laliberte-Gagne, M. E., Babin, C., Bolduc, M., Guerin, A., Drouin, K., Leclerc, D. (2012). Improvement of the PapMV nanoparticle adjuvant property

- through an increased of its avidity for the antigen [influenza NP]. *Vaccine*, 30(15), 2535-2542. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.085>
169. Schuck, P. (2000). Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J*, 78(3), 1606-1619. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76713-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76713-0)
 170. Semenyuk, P. I., Moiseeva, E. V., Stroylova, Y. Y., Lotti, M., Izumrudov, V. A., & Muronetz, V. I. (2015). Sulfated and sulfonated polymers are able to solubilize efficiently the protein aggregates of different nature. *Arch Biochem Biophys*, 567, 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.021>
 171. Semenyuk, P. I., Karpova, O. V., Ksenofontov, A. L., et al. (2016). Structural properties of potexvirus coat proteins detected by optical methods. *Biochemistry (Moscow)* 81, 12, 1522–1530
 172. Seo, J. K., Kang, S. H., Seo, B. Y., Jung, J. K., & Kim, K. H. (2010). Mutational analysis of interaction between coat protein and helper component-proteinase of Soybean mosaic virus involved in aphid transmission. *Mol Plant Pathol*, 11(2), 265-276. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00603.x>
 173. Shirahama, K., Tsujii, K., & Takagi, T. (1974). Free-boundary electrophoresis of sodium dodecyl sulfate-protein polypeptide complexes with special reference to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biochem*, 75(2), 309-319. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a130398>
 174. Shishkov, A. V., Goldanskii, V. I., Baratova, L. A., Fedorova, N. V., Ksenofontov, A. L., Zhirnov, O. P., & Galkin, A. V. (1999). The in situ spatial arrangement of the influenza A virus matrix protein M1 assessed by tritium bombardment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(14), 7827-7830. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.7827>
 175. Shishkov, A. V., Ksenofontov, A. L., Bogacheva, E. N., Kordyukova, L. V., Badun, G. A., Alekseevsky, A. V., Baratova, L. A. (2002). Studying the spatial organization of membrane proteins by means of tritium stratigraphy: bacteriorhodopsin in purple membrane. *Bioelectrochemistry*, 56(1-2), 147-149. [https://doi.org/10.1016/s1567-5394\(02\)00018-x](https://doi.org/10.1016/s1567-5394(02)00018-x)
 176. Shukla, D. D., Thomas, J. E., McKern, N. M., Tracy, S. L., & Ward, C. W. (1988). Coat protein of potyviruses. 4. Comparison of biological properties, serological relationships, and coat protein amino acid sequences of four strains of potato virus Y. *Arch Virol*, 102(3-4), 207-219. <https://doi.org/10.1007/BF01310826>
 177. Shukla, D. D., Tribbick, G., Mason, T. J., Hewish, D. R., Geysen, H. M., & Ward, C. W. (1989). Localization of virus-specific and group-specific epitopes of plant potyviruses by systematic immunochemical analysis of overlapping peptide fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(21), 8192-8196. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.21.8192>
 178. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence

alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*, 7, 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>

179. Silva-Rosales, L., Becerra-Leor, N., Ruiz-Castro, S., Teliz-Ortiz, D., & Noa-Carrazana, J. C. (2000). Coat protein sequence comparisons of three Mexican isolates of papaya ringspot virus with other geographical isolates reveal a close relationship to American and Australian isolates. *Arch Virol*, 145(4), 835-843. <https://doi.org/10.1007/s007050050676>

180. Solovyev, A. G., & Makarov, V. V. (2016). Helical capsids of plant viruses: architecture with structural lability. *J Gen Virol*, 97(8), 1739-1754. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000524>

181. Steele, J. F. C., Peyret, H., Saunders, K., Castells-Graells, R., Marsian, J., Meshcheriakova, Y., & Lomonossoff, G. P. (2017). Synthetic plant virology for nanobiotechnology and nanomedicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 9(4). <https://doi.org/10.1002/wnan.1447>

182. Stubbs, G. (1999). Developments in fiber diffraction. *Curr Opin Struct Biol*, 9(5), 615-619. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(99\)00014-7](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(99)00014-7)

183. Stubbs, G., Warren, S., & Holmes, K. (1977). Structure of RNA and RNA binding site in tobacco mosaic virus from 4-A map calculated from X-ray fibre diagrams. *Nature*, 267(5608), 216-221. <https://doi.org/10.1038/267216a0>

184. Stuhmann, H. B. (1978). The use of X-ray synchrotron radiation for structural research in biology. *Q Rev Biophys*, 11(1), 71-98. <https://doi.org/10.1017/s003358350000192x>

185. Svergun, D., Barberato, C., & Koch, M. H. J. (1995). CRY SOL— a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. *Journal of Applied Crystallography*, 28(6), 768-773. <https://doi.org/10.1107/s0021889895007047>

186. Svergun, D. I. (1992). Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *Journal of Applied Crystallography*, 25(4), 495-503. <https://doi.org/10.1107/s0021889892001663>

187. Svergun, D. I. (1999). Restoring Low Resolution Structure of Biological Macromolecules from Solution Scattering Using Simulated Annealing. *Biophys J*, 76(6), 2879-2886. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(99\)77443-6](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(99)77443-6)

188. Svergun, D. I., Koch, M. H. J., Timmins, P. A., & May, R. P. (2013a). Small angle x-ray and neutron scattering from solutions of biological macromolecules [still image]. *International Union of Crystallography monographs on crystallography*(19), 358.

189. Svergun, D. I., Koch, M. H. J., Timmins, P. A., & May, R. P. (2013b). Small angle x-ray and neutron scattering from solutions of biological macromolecules (First Edition. ed.) [still image]. Oxford University Press.

190. Therien, A., Bedard, M., Carignan, D., Rioux, G., Gauthier-Landry, L., Laliberte-Gagne, M. E., Leclerc, D. (2017). A versatile papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform based on sortase-mediated antigen coupling. *J Nanobiotechnology*, 15(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0289-y>
191. Thomas, G. J., Jr., & Day, L. A. (1981). Conformational transitions in Pf3 and their implications for the structure and assembly of filamentous bacterial viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(5), 2962-2966. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.5.2962>
192. Tollin, P., Wilson, H. R. (1988). Particle structure // In: *The Filamentous Plant Viruses in the Plant Viruses 4* (Milne, R.C., ed.). 51-83.
193. Torrance, L., Andreev, I. A., Gabrenaite-Verhovskaya, R., Cowan, G., Makinen, K., & Taliansky, M. E. (2006). An unusual structure at one end of potato potyvirus particles. *J Mol Biol*, 357(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.021>
194. Tremblay, M. H., Majeau, N., Gagne, M. E., Lecours, K., Morin, H., Duvignaud, J. B., Leclerc, D. (2006). Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of papaya mosaic Potexvirus coat protein. *FEBS J*, 273(1), 14-25. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05033.x>
195. Trofimova, L., Ksenofontov, A., Mkrtchyan, G., Graf, A., Baratova, L and Bunik, V. (2016). Quantification of rat brain amino acids: Analysis of the data consistency. *Current Analytical Chemistry*, 12(4), 349-356. <https://doi.org/10.2174/1573411011666151006220356>
196. Tsetlin, V. I., Alyonycheva, T. N., Shemyakin, V. V., Neiman, L. A., & Ivanov, V. T. (1988). Tritium thermal activation study of bacteriorhodopsin topography. *Eur J Biochem*, 178(1), 123-129.
197. Tsolis, A. C., Papandreou, N. C., Iconomidou, V. A., & Hamodrakas, S. J. (2013). A consensus method for the prediction of 'aggregation-prone' peptides in globular proteins. *PLoS One*, 8(1), e54175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054175>
198. Tsugita, A., & Scheffler, J. J. (1982). A rapid method for acid hydrolysis of protein with a mixture of trifluoroacetic acid and hydrochloric acid. *Eur J Biochem*, 124(3), 585-588. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06634.x>
199. Uversky, V. N. (2002). Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci*, 11(4), 739-756. <https://doi.org/10.1110/ps.4210102>
200. Uversky, V. N. (2010). Mysterious oligomerization of the amyloidogenic proteins. *FEBS J*, 277(14), 2940-2953. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07721.x>
201. Uversky, V. N. (2013). Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1834(5), 932-951. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.12.008>

202. Uversky, V. N., Gillespie, J. R., & Fink, A. L. (2000). Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins*, 41(3), 415-427. [https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20001115\)41:3<415::aid-prot130>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20001115)41:3<415::aid-prot130>3.0.co;2-7)
203. Volkov, V.V., Svergun, D. I. (2003). Uniqueness of ab initio shape determination in small angle scattering. . *J. Appl. Crystallogr.*, 36, 860-864.
204. Valle, M. (2018). Structural Homology Between Nucleoproteins of ssRNA Viruses. *Subcell Biochem*, 88, 129-145. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8456-06>
205. van der Wel, P. C., Lewandowski, J. R., & Griffin, R. G. (2010). Structural characterization of GNNQQNY amyloid fibrils by magic angle spinning NMR. *Biochemistry*, 49(44), 9457-9469. <https://doi.org/10.1021/bi100077x>
206. Voloudakis, A. E., Malpica, C. A., Aleman-Verdaguer, M. E., Stark, D. M., Fauquet, C. M., & Beachy, R. N. (2004). Structural characterization of Tobacco etch virus coat protein mutants. *Arch Virol*, 149(4), 699-712. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0247-x>
207. Ward, J. J., McGuffin, L. J., Bryson, K., Buxton, B. F., & Jones, D. T. (2004). The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics*, 20(13), 2138-2139. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth195>
208. Wetzel, R., & Chrnyk, B. A. (1994). Inclusion body formation by interleukin-1 beta depends on the thermal sensitivity of a folding intermediate. *FEBS Lett*, 350(2-3), 245-248. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00775-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00775-6)
209. Wilson, T. M. (1984). Cotranslational disassembly of tobacco mosaic virus *in vitro*. *Virology*, 137(2), 255-265. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90217-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90217-4)
210. Wu, Z., Mo, C., Zhang, S., & Li, H. (2018). Characterization of Papaya ringspot virus isolates infecting transgenic papaya 'Huanong No.1' in South China. *Sci Rep*, 8(1), 8206. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26596-x>
211. Xue, B., Blocquel, D., Habchi, J., Uversky, A.V., Kurgan, L., Uversky, V.N., Longhi, S. (2014). Structural disorder in viral proteins. . *Chem. Rev.*, 114, 6880–6911.
212. Yang, C. D., Liao, J. T., Lai, C. Y., Jong, M. H., Liang, C. M., Lin, Y. L., Liang, S. M. (2007). Induction of protective immunity in swine by recombinant bamboo mosaic virus expressing foot-and-mouth disease virus epitopes. *BMC Biotechnol*, 7, 62. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-62>
213. Yang, S., Wang, T., Bohon, J., Gagne, M. E., Bolduc, M., Leclerc, D., & Li, H. (2012). Crystal structure of the coat protein of the flexible filamentous papaya mosaic virus. *J Mol Biol*, 422(2), 263-273. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.05.032>
214. Yuste-Calvo, C., González-Gamboa, I., Pacios LF, Sánchez F, Ponz F. (2019). Structure-based multifunctionalization of flexible elongated viral nanoparticles. . *ACS Omega*, 4, 5019–5028.
215. Yuste-Calvo, C., Ibort, P., Sanchez, F., & Ponz, F. (2020). Turnip Mosaic Virus Coat Protein Deletion Mutants Allow Defining Dispensable Protein Domains for 'in Planta' eVLP Formation. *Viruses*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/v12060661>

216. Yuste-Calvo, C., Lopez-Santalla, M., Zurita, L., Cruz-Fernandez, C. F., Sanchez, F., Garin, M. I., & Ponz, F. (2019). Elongated Flexuous Plant Virus-Derived Nanoparticles Functionalized for Autoantibody Detection. *Nanomaterials* (Basel), 9(10). <https://doi.org/10.3390/nano9101438>
217. Zamora, M., Mendez-Lopez, E., Agirrezabala, X., Cuesta, R., Lavin, J. L., Sanchez-Pina, M. A., Valle, M. (2017). Potyvirus virion structure shows conserved protein fold and RNA binding site in ssRNA viruses. *Sci Adv*, 3(9), eaao2182. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao2182>
218. Zamyatnin, A. A., Jr., Solovyev, A. G., Bozhkov, P. V., Valkonen, J. P., Morozov, S. Y., & Savenkov, E. I. (2006). Assessment of the integral membrane protein topology in living cells. *Plant J*, 46(1), 145-154. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02674.x>
219. Zayakina, O., Arkhipenko, M., Kozlovsky, S., Nikitin, N., Smirnov, A., Susi, P., Atabekov, J. (2008). Mutagenic analysis of potato virus X movement protein (TGBp1) and the coat protein (CP): *in vitro* TGBp1-CP binding and viral RNA translation activation. *Mol Plant Pathol*, 9(1), 37-44. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00445.x>
220. Баратова, Л.А., Богачева, Е. Н., Гольданский, В.И., Колб, В.А., Спирин, А.С., Шишков, А.В. (1999). Тритиевая планиграфия биологических макромолекул. Наука.
221. Гольдштейн, М.И., Гребенщиков, Н. И., Куст, С.В., Кафтанова, А.С., Добров, Е.Н., Атабеков, И.Г. (1990). Влияние протеолитического расщепления белка оболочки X-вируса картофеля на его способность к реконструкции с РНК и на инфекционность вируса. *Молек. Генет. Микробиол. Вирусол*, 2, 9-16.
222. Свергун, Д.И., Фейгин Л. А. (1986). В книге: Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. Москва, Наука, 279.
223. Козловский, С.В., Карпова, О. В., Архипенко, М.В., Заякина, О.В., Родионова Н.П., Атабеков, И.Г. (2003). Влияние N-концевой области белка оболочки X вируса картофеля на структуру вирусных частиц ДАН, 391, 1-3.
224. Ксенофонтов, А. Л., Петухов, М. В., Прусов, А. Н., Федорова, Н. В., & Штыкова, Э. В. (2020). Характеристика вирионов и реполимеров белка оболочки вируса табачной мозаики в растворе методом малоуглового рентгеновского рассеяния. *Биохимия*, 85(3), 360-368. <https://doi.org/10.31857/s0320972520030069>
225. Лукашина, Е. В., Бадун, Г. А., Ксенофонтов, А. Л., Баратова, Л. А., Добров, Е. Н., & Федосеев, В. М. (2002). Использование проточного сцинтилляционного счетчика в сочетании с аминокислотным анализатором для измерения низких радиоактивностей меченных тритием аминокислот. *Радиохимия*, 44(1), 78-82.
226. Новиков, В.К., Кимаев, В. З., Атабеков, И.Г. (1972). Реконструкция рибонуклеопротеида вируса X картофеля ДАН, 204, 1259-1262.

227. Радавский, Ю.Л., Витер, С. С., Турова, И.П., Зайцева, Л.С., Ярвекюльг, Л.В., Саарма, М.Ю., Гребенщиков, Н.И., Баратова, Л.А. (1989). Антигенная структура белка оболочки N-вируса картофеля. II. Локализация антигенной (ных) детерминант в N-концевом участке белка. Биоорг. химия, 15(5), 615-619.
228. Шишков, А.В., Богачева, Л. А. (1994). Третья планиграфия биологических систем. Успехи химии., 63(9), 825-841.