

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ N-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА БЕЛКА ОБОЛОЧКИ X-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ И ВИРУСА МОЗАИКИ АЛЬТЕРНАНТЕРЫ НА СТРУКТУРУ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИРИОНОВ

© 2023 А.Л. Ксенофонтов^{1*}, М.В. Петухов^{2,3}, В.В. Матвеев², Н.В. Федорова¹,
П.И. Семенюк¹, А.М. Арутюнян¹, Т.И. Манухова⁴, Е.А. Евтушенко⁴, Н.А. Никитин⁴,
О.В. Карпова⁴, Э.В. Штыкова²

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: ksenofon@belozersky.msu.ru

² ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова,
119333 Москва, Россия

³ Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, 119071 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.10.2022

После доработки 17.11.2022

Принята к публикации 19.11.2022

Аминокислотные последовательности белков оболочки (БО) таких потексвирусов, как X-вирус картофеля (ХВК) и вирус мозаики альтернантеры (ВМАльт), имеют около 40% идентичных аминокислотных остатков. Однако N-концевые домены БО этих вирионов отличаются как по длине, N-концевой домен БО ХВК длиннее на 28 остатков ($\Delta N = 28$), так и по аминокислотной последовательности. В настоящей работе определено влияние N-концевого домена БО на структуру и физико-химические свойства вирионов ХВК и ВМАльт. Было показано, что температура плавления препаратов ХВК выше на 10–12 °С, чем у препаратов ВМАльт, спектры кругового дихроизма этих вирусов значительно отличаются. Пространственное выравнивание имеющихся структур БО потексвирусов высокого разрешения показало, что величина RMSD C α -атомов была максимальна именно для N-концевых доменов двух сравниваемых моделей. Согласно компьютерному моделированию, ΔN -пептид N-домена БО ХВК полностью разупорядочен. По данным синхротронного малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), структура БО в составе вирионов ХВК и ВМАльт отличается, в частности, БО ХВК имеет больший размер областей кристалличности, а значит и более упорядочен. С помощью МУРР были рассчитаны диаметры вирионов и параметры спирали в растворе. Выявлено влияние конформации и локализации N-концевого домена БО ХВК относительно поверхности вириона на его структуру. Предположительно, повышенная в сравнении с ВМАльт термостабильность вирионов ХВК обеспечивается удлиненными N-концевыми доменами ($\Delta N = 28$), которые контактируют между соседними субъединицами БО в вирионе ХВК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: потексвирусы, X-вирус картофеля, вирус мозаики альтернантеры, белок оболочки, N-концевой домен, круговой дихроизм, малоугловое рентгеновское рассеяние.

DOI: 10.31857/S0320972523010050, EDN: PBSOUZ

ВВЕДЕНИЕ

Многие из нитевидных вирусов растений являются опасными патогенами сельскохозяйственных культур [1]. Поэтому их исследова-

нию (структурному и функциональному) уделяется существенное внимание. С помощью непрямых методов структурного анализа продемонстрировано, что белки оболочки (БО) потекс- и потививирусов частично неупорядочены,

Принятые сокращения: АВК – А-вирус картофеля; БО – белок оболочки; ВМАльт – вирус мозаики альтернантеры; ВТМ – вирус табачной мозаики; МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия; РНП – рибонуклеопротеид; крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия; ХВК – X-вирус картофеля.

* Адресат для корреспонденции.

вследствие чего их вирионы оказались значительно более лабильными, чем предполагалось ранее [2, 3]. Обнаружено, что БО некоторых вирусов растений имеют разупорядоченные *N*-концевые домены различной длины на поверхности вирионов. С помощью рентгеноструктурного анализа удалось получить часть структуры БО вируса мозаики папайи [4], по данным криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) получены фрагменты структур вируса мозаики бамбука, вируса мозаики пепино [5, 6] и вириона *X*-вируса картофеля (ХВК) с разрешением 2,2 Å [7]. Оказалось, что центральные части БО всех вышеперечисленных потексвирусов имеют сходную структуру, образованы семью альфа-спиралями, расположенными в довольно сложной топологии, и структурно гомологичны БО потививирусов. Несмотря на сходство пространственных структур, БО потексвирусов характеризуются различными физико-химическими свойствами. Так, например, БО ХВК, выделенный из вирусных частиц, не способен к полимеризации и формированию вирусоподобных частиц при отсутствии РНК, в отличие от капсидных белков других потекс- [8–11] и потививирусов [12]. Вирионы ХВК имеют специфические оптические свойства, выявляемые спектроскопией кругового дихроизма (КД) в дальнем и ближнем ультрафиолете (УФ) [3, 13]. Кроме того, была обнаружена функционально-структурная перестройка вирионов ХВК, «ремоделирование», в ходе которой нетранслируемые вирионы переходят в метастабильное состояние трансляционной активации, в которой участвуют *N*-концевые домены БО [14].

Изучение структуры нитевидных вирусов растений классическими методами имеет ограничения в связи с длиной и гибкостью вирусных частиц. Вследствие этого выбор методов структурного анализа приобретает особое значение. Эффективным и информативным является метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), позволяющий проводить изучение структурных свойств биологических объектов в растворе при заданных температуре, рН, солевом составе и других параметрах среды. Следует отметить серьезный прогресс последних десятилетий в развитии МУРР: появились новые подходы анализа и интерпретации данных, были разработаны эффективные программы компьютерного моделирования структуры [15] для изучения строения биологических макромолекул в растворе [16]. Ранее с помощью этого метода нами был выполнен структурный анализ вирионов и реполимеров БО палочковидного вируса табачной мозаи-

ки (ВТМ). Мы показали, что профиль МУРР выявляет ряд особенностей структуры палочковидной вирусной частицы: форму, диаметр, шаг спирали или периодичность структуры вирионов и реполимеров ВТМ [17], и полученные данные хорошо согласовывались с известными характеристиками ВТМ. Методом МУРР были также исследованы особенности строения нитевидных вирионов *A*-вируса картофеля (АВК) [18].

В настоящей работе МУРР и несколько комплементарных физико-химических методов были использованы для сравнительного анализа структуры нитевидных вирионов потексвирусов ХВК и ВМАльт в растворе. Основной задачей данного исследования было определение влияния структуры *N*-концевых доменов на строение и физико-химические свойства вирионов ХВК и ВМАльт. С этой целью по данным МУРР и доступным структурам БО (PDB ID: 6R7G для ХВК и PDB ID: 7OG6 для ВМАльт) было проведено моделирование структуры вирусных частиц в растворе с учетом подвижных *N*-концевых доменов. При этом для БО ХВК структура была дополнена отсутствующим в атомной модели подвижным фрагментом *N*-концевого домена, состоящим из дополнительных 28 а.о. — ΔN -пептидом. Для этого были использованы гибридные методы моделирования и структурного анализа МУРР [15, 16]. Полученные результаты могут позволить объяснить отличия физико-химических характеристик и свойств БО в составе вирионов ХВК и ВМАльт.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение ВМАльт и ХВК. Препараты вирусов из коллекции кафедры вирусологии МГУ имени М.В. Ломоносова — ВМАльт (штамм AltMV-Moscow University, GenBank accession No. FJ822136)) и ХВК (Русский штамм, GenBank accession No. AAA47171.1) — выделяли согласно протоколам, описанным ранее [8, 19].

Электрофоретический анализ белков в денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ). Электрофорез проводили в пластинах ПААГ с градиентом акриламида 8–20% и *N*, *N*'-метиленбисакриламида — 0,08–0,2% [20]. Для съемки окрашенных Coomassie G-250 ПААГ использовали гель-документирующую систему Chemi Doc XRS+ с программным обеспечением Image Lab Software («Bio-Rad», США).

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).

Измерение спектров кругового дихроизма.

Спектры КД измеряли в 5 мМ Tris-HCl-буфере (pH 7,8) при 20 °C в 1–2-мм кюветах на дихрографе Chirascan («Applied Photophysics», Англия). Концентрация образцов составляла 50–100 мкг/мл. Спектры КД записывали на скорости 0,5–1,0 нм/с в дальнем диапазоне УФ-спектра (185–250 нм) с вычетом базовой линии. Измеренные спектры обрабатывали с использованием стандартного пакета программного обеспечения, поставляемого с прибором. Величины КД выражали в величинах молярной эллиптичности $[\Theta]$, как описано ранее [18]. Для термического анализа каждый препарат нагревали в кюветном отделении дихрографа от 40 до 85 °C со скоростью 1 °C в минуту. Регистрацию каждого нового спектра начинали после увеличения температуры на 3 °C.

Биоинформатический анализ первичной и третичной структуры БО потексвирусов. Выравнивание аминокислотных последовательностей БО выполнено с помощью программы Clustal Omega [21]. Количественную оценку сходства последовательностей проводили попарным выравниванием аминокислотной последовательности БО без 28 N-концевых а.о. БО ХВК. Пространственное выравнивание выполняли с использованием программы Swiss-Pdb Viewer 3.7 (<http://www.genebee.msu.su/spdbv/>). В качестве матрицы использовали структуру БО ХВК в составе вириона, полученную методом крио-ЭМ [7]. Профиль RMSD по последовательности определяли для пар C_{α} -атомов согласно пространственному выравниванию. Для анализа уровня структурной организации БО использовали программу предсказания IUPred (<http://iupred.enzim.hu/>), основанную на алгоритме оценки способности остатка образовывать выгодные парные контакты.

Эксперимент и анализ данных МУРР. Эксперимент по малоугловому рентгеновскому рассеянию проводился на синхротроне Petra III (DESY, Гамбург) на станции P12 [22], которая оснащена оборудованием для автоматической смены образцов и двумерным детектором Pilatus 2M («DECTRIS», Швейцария). Интенсивность рассеяния $I(s)$ была измерена в области значений волновых векторов $0,07 < s < 7 \text{ нм}^{-1}$, где $s = (4\pi \sin \theta)/\lambda$; 2θ – угол

рассеяния и $\lambda = 0,124 \text{ нм}$ – длина волны рассеяния. При моделировании четвертичной структуры вирионов использовались кривые МУРР до $s = 2,7 \text{ нм}^{-1}$, поскольку данные на более высоких углах соответствуют рассеянию от атомной структуры, которая не менялась в процессе моделирования. Кроме того, выбранная область является наиболее информативной вследствие меньшего уровня экспериментального шума. Для каждого образца было снято по 50 экспериментальных кривых рассеяния с целью контроля возможных радиационных повреждений. Также по 50 кривых рассеяния было получено для буферных растворов перед каждой серией экспериментов на образце и после. Первичная обработка данных, включающая усреднение 50 кривых рассеяния и вычет сигнала от буфера, а также определение структурных инвариантов проводились с помощью программы PRIMUS [23]. Дальнейшая обработка полученных данных проводилась с помощью программ специального пакета ATSAS [24].

Характеристики внутренней структуры упорядоченных или частично упорядоченных полимерных образцов вычислялись с помощью интерактивной программы PEAK [23] путем приближения гауссовых профилей к выбранным брэгговским пикам на кривых рассеяния. Средний размер кристаллитов (L) и степень разупорядоченности в системе $\Delta/\bar{d}$ вычислялись в соответствии с формулами (1) и (2) [25]:

$$L = \lambda/\beta_s \cdot \cos \theta, \quad (1)$$

$$\Delta/\bar{d} = \frac{1}{\pi} \cdot \sqrt{\frac{\beta_s \cdot \bar{d}}{\lambda}}, \quad (2)$$

где β_s – полуширина брэгговского пика (в радианах) при угле рассеяния 2θ , $\bar{d} = 2\pi/s_{\max}$ – характеристический размер упорядоченных областей, соответствующий положению брэгговского пика $s_{\max}$, а Δ – среднеквадратичное отклонение расстояния между двумя ближайшими периодическими мотивами структуры.

Для определения максимального размера частиц ($D_{\max}$) и построения функций распределения по расстояниям $p(r)$ использовалась программа GNOM [26]. Для получения полноразмерных моделей вирионов ВМАлт и ХВК использовалась комбинация программ CHIMERA (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) [27], SUPPDB и MASSHA [28]. CHIMERA позволяет задать правило для разmultiplication атомной модели мономера с тем, чтобы сгенерировать спираль вириона и затем сохранить всю получившуюся структуру.

SUPPDB [29] находит матрицу трансформации одной субъединицы в другую для их оптимального наложения и может затем применить такую же трансформацию последовательно к фрагменту, состоящему из нескольких субъединиц, чтобы также получить целую спираль. MASSHA реализует метод молекулярной тектоники. Эта программа сочетает в себе интерактивный и автоматизированный поиск взаимной ориентации мономеров комплекса, оперируя ими как твердыми телами, и позволяет сохранять объекты PDB в их текущих позициях, что удобно для хранения результатов интерактивного или автоматизированного построения модели.

Для создания различных конформаций N -концевых фрагментов использовалась программа RANCH [30], которая создает набор независимых моделей со случайной конформацией участка структуры, отсутствующего в модели высокого разрешения, с учетом информации о полной аминокислотной последовательности белка и имеющейся структуре жестких доменов.

Сравнение экспериментальных данных и кривых МУРР, полученных от построенных моделей вирусов, осуществлялось программой CRY SOL [31]. Программа использует мультипольное разложение амплитуд рассеяния для расчета сферически усредненной картины рассеяния и учитывает гидратную оболочку. Экспериментальные данные МУРР (I_{exp}) прибли-

жаются путем оптимизации расчетной кривой рассеяния (I_{calc}), минимизируя расхождение χ^2 между ними (3):

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_j \left[\frac{I_{\text{exp}}(s_j) - c I_{\text{calc}}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right]^2, \quad (3)$$

где N — число экспериментальных точек, c — шкалирующий множитель, σ — экспериментальные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Физико-химическая характеристика вирионов ХВК и ВМАльт. Как было показано ранее [9], электрофоретическая подвижность вирионов ВМАльт (рис. 1, а; дорожки 2, 3) в денатурирующих условиях соответствует теоретической молекулярной массе БО ВМАльт ($M_{\text{теор.}} = 22,2$ кДа, $M_{\text{экс.}} = 23$ кДа). В тех же условиях БО ХВК проявляет аномально низкую подвижность, соответствующую примерно 31 кДа (рис. 1, а; дорожка 1), в то время как его $M_{\text{теор.}}$ равна 25 кДа. Это явление согласуется с ранее опубликованными данными [32] и может быть объяснено наличием в структуре белка неупорядоченных гидрофильных сегментов и дополнительных химических групп, полученных в результате посттрансляционной модификации [2].

Содержание вторичной структуры БО вирионов ВМАльт и ХВК оценивали по спектрам КД в дальнем диапазоне УФ-спектра (200–255 нм).

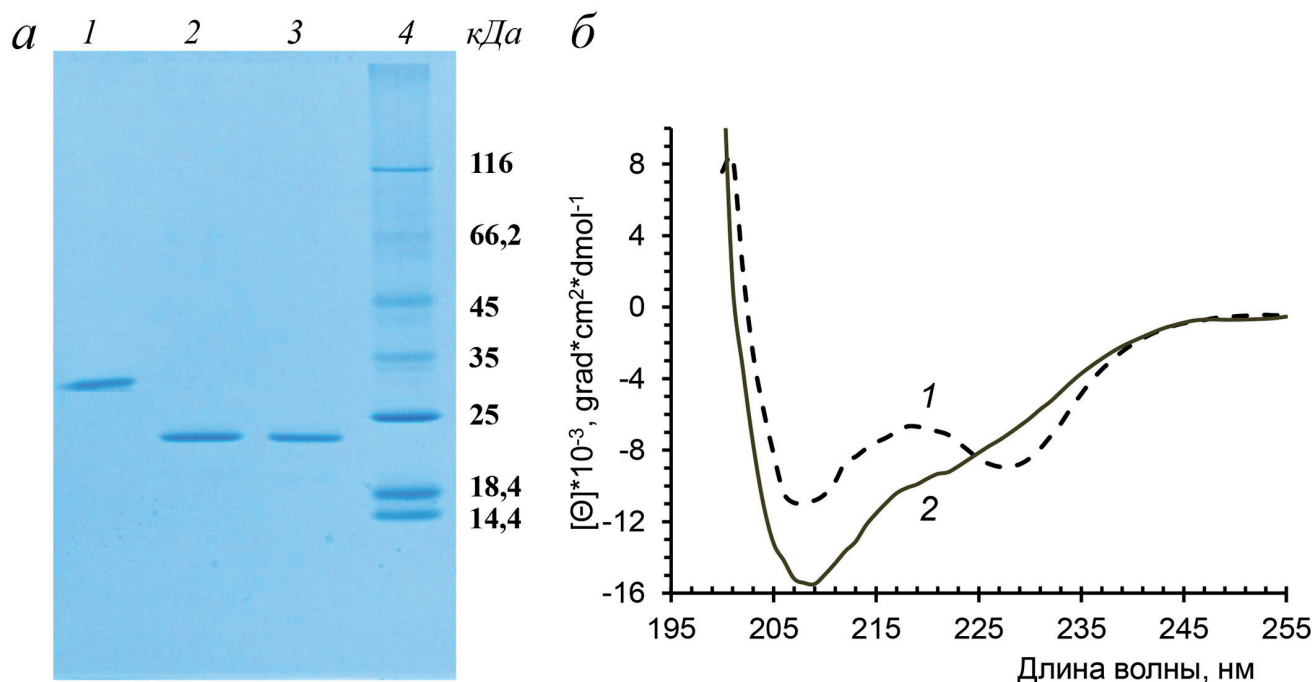


Рис. 1. Электрофоретический анализ вирионов (а). Дорожки: 1 – ХВК, 2 – ВМАльт, 3 – БО ВМАльт. Были использованы аликвоты по 1 мкг на полосу. Молекулярная масса указана рядом с контрольными белками (дорожка 4). б – Спектры кругового дихроизма вирионов ХВК (1) и ВМАльт (2)

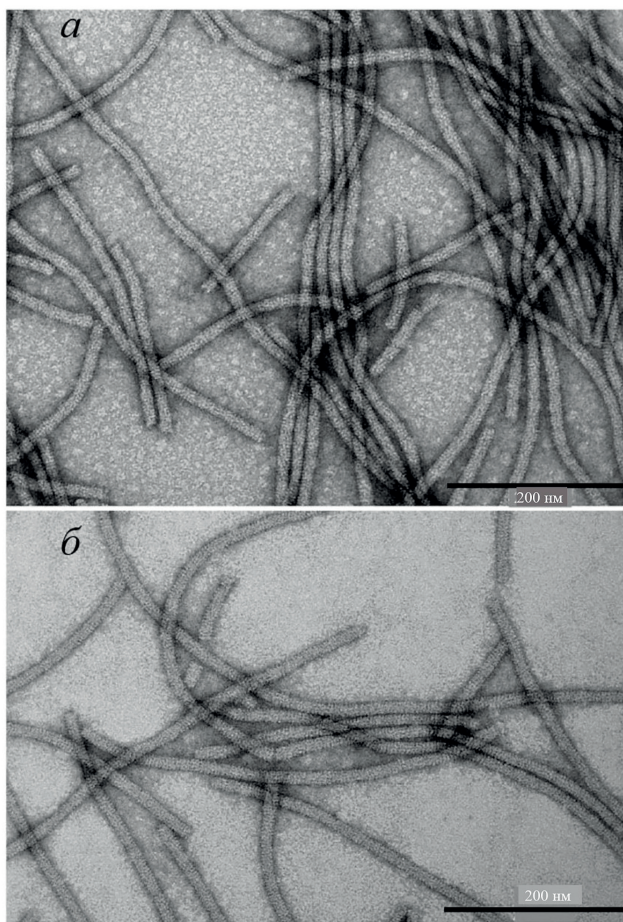


Рис. 2. Электронные микрофотографии вирионов ВМАльт (а) и ХВК (б). ПЭМ, контрастирование 2%-ным уранилацетатом. Масштаб – 200 нм

Спектр КД вирионов ВМАльт показал отрицательный максимум на 208 нм ($[\theta]_{\max} = -15\,400^\circ$) (рис. 1, б; кривая 2), характерный для альфа-спиральных белков [13]. Препараты вирионов ХВК имели необычные спектры КД (рис. 1, б; кривая 1) с малой эллиптичностью на 208 нм ($[\theta]_{\max} = -8900^\circ$) и выраженным отрицательным максимумом на 228 нм.

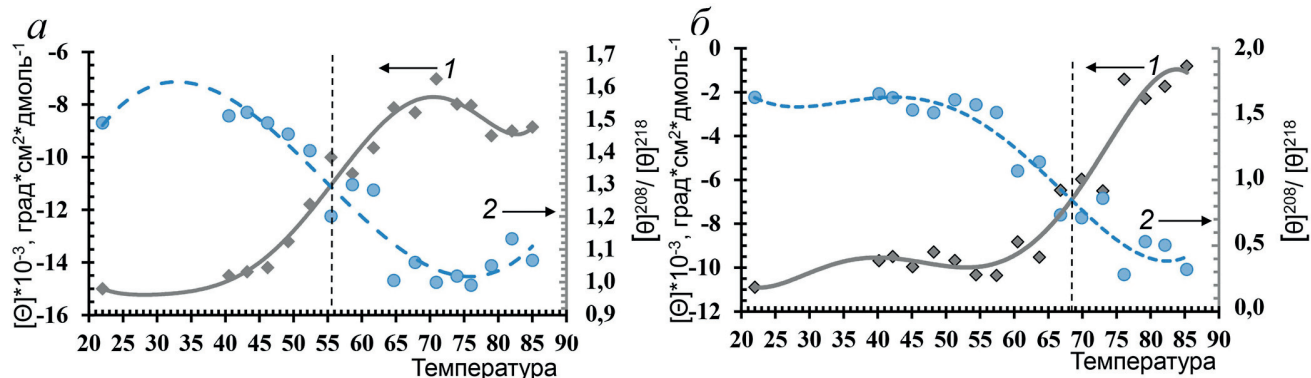


Рис. 3. Термическая денатурация препаратов ВМАльт (а) и ХВК (б) по данным КД-спектров. Приведена температурная зависимость интенсивности отрицательных максимумов $[\theta]^{208}$ при 208 нм (1) и величины отношения $[\theta]^{208}/[\theta]^{218}$ (2). Кривая аппроксимации рассчитывалась по уравнению полинома 4 степени, и величину $T_{\text{пл}}$ определяли в месте пересечения кривых (1) и (2)

Анализ данных ПЭМ показал (рис. 2, а и б), что вирионы ВМАльт и ХВК представляют собой сходные по морфологии, длинные и гибкие нитевидные частицы с диаметром $12,5 \pm 1,1$ нм и $13,6 \pm 1,4$ нм для вирионов ХВК и ВМАльт соответственно.

Анализ термостабильности вирионов по КД-спектрам. Степень термической денатурации также различалась для вирионов ВМАльт и ХВК (рис. 3, а и б). Методом сканирующей калориметрии ранее было показано, что плавление вирионов ХВК происходит при температуре ($T_{\text{пл}}$) $64\text{--}65^\circ\text{C}$ [2]. В настоящей работе при нагревании вирионов ВМАльт и ХВК были проанализированы температурные зависимости интенсивности отрицательных максимумов эллиптичности на 208 нм ($[\theta]^{208}$) (рис. 3, кривые 1 на обеих панелях) и величины отношения эллиптичностей $[\theta]^{208}/[\theta]^{218}$ (рис. 3, кривые 2 на обеих панелях), характеризующие изменения содержания α - и β -структур в белке.

Для вирионов ВМАльт и ХВК в диапазоне $50\text{--}75^\circ\text{C}$ наблюдали постепенный рост интенсивности $[\theta]^{208}$ до -8000 и -1500° соответственно. Такая разница может указывать на более крупные размеры образующихся частиц ХВК и/или повышенное содержание в них β -структуры. Плавление препаратов ВМАльт происходило при $\sim 56^\circ\text{C}$, т.е. на $10\text{--}12^\circ\text{C}$ ниже, чем препаратов ХВК ($T_{\text{пл}} \sim 68^\circ\text{C}$). Таким образом, вирионы ХВК оказались более термостабильными.

Сравнительный анализ структуры белков оболочки ВМАльт и ХВК. БО ХВК и ВМАльт имеют некоторое сходство аминокислотной последовательности, но различаются по длине [33]. Сравнение первичных структур БО ВМАльт и ХВК попарным выравниванием с помощью программы Clustal Omega (рис. 4, а) подтвердило сходство в последовательности (68% подобных и 42% идентичных из 207 а.о.). Основное отличие состоит в различной длине N-концевых

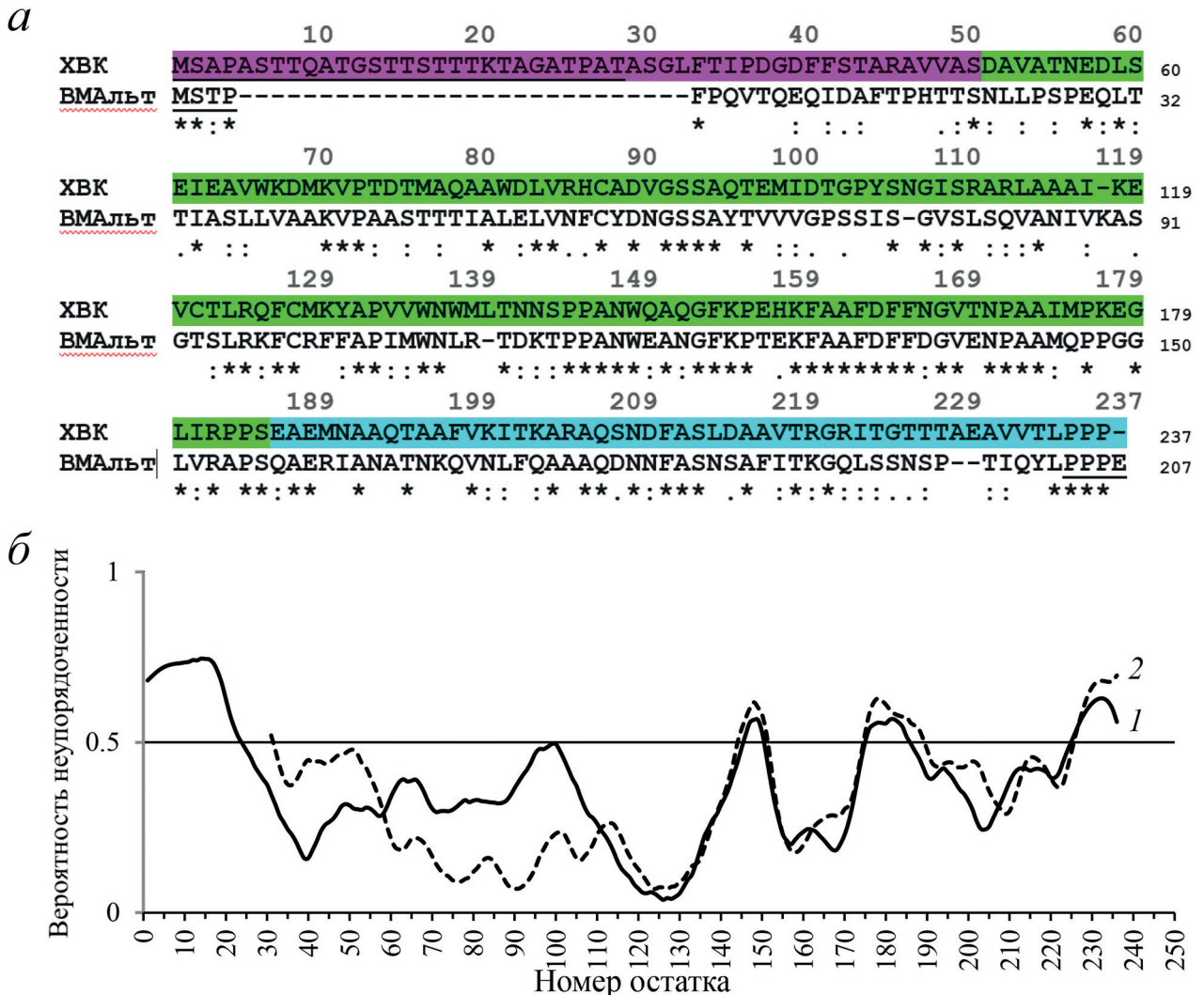


Рис. 4. Вывравнивание первичных структур БО ХВК и ВМАлт с помощью программы Clustal Omega (*a*). Отмечены (*) – идентичные остатки; (:) и (.) – консервативные и полуконсервативные замены; подчеркнуты последовательности, отсутствующие в PDB ID: 6R7G и 7OG6. *N*-концевой (1–50 а.о.), центральный (51–185 а.о.) и *C*-концевой (186–237 а.о.) домены выделены малиновым, зеленым и голубым соответственно [7]; *b* – предсказание упорядоченных/неупорядоченных структур с помощью веб-сервиса IUPred для БО ХВК (1) и ВМАлт (2). Участки со значением ординаты выше 0,5 на этом рисунке считались неупорядоченными

доменов: для БО ХВК *N*-концевой домен был длиннее на 28 а.о. (ΔN -пептид).

Биоинформатический анализ потексвирусов с помощью программы предсказания структуры IUPred (рис. 4, б), основанной на алгоритме оценки способности а.о. образовывать выгодные парные контакты, показал, что БО ХВК содержал полностью разупорядоченный *N*-концевой домен из 28 а.о. (ΔN -пептид *N*-домена) [3]. 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.

Недавно методом крио-ЭМ [7] была получена структура БО ХВК при отсутствии ΔN -участка полипептидной цепи в составе вириона.

на (PDB ID: 6R7G, а.о. 29–235). Поскольку структура БО в свободном состоянии и в составе вирионов отличаются [34], в рамках данной работы под структурой БО понимается структура белка только в составе вириона. Трехмерная структура БО ХВК включает три домена: *N*-концевой домен (I), 29–50 а.о.; центральный домен (II), 551–185 а.о.; и *C*-концевой домен (III), 186–237 а.о. (рис. 4, *a*). Домен I выступает из центрального домена и в структуре, полученной с помощью крио-ЭМ, охватывает домен II соседнего БО. Атомные координаты 1–28 а.о. (ΔN -пептид *N*-домена) не были определены предположительно из-за низкой электронной плотности и разупорядоченности.

Для БО ВМАльт на сегодняшний день определена структура (PDB ID: 7OG6, 5–203 а.о.)

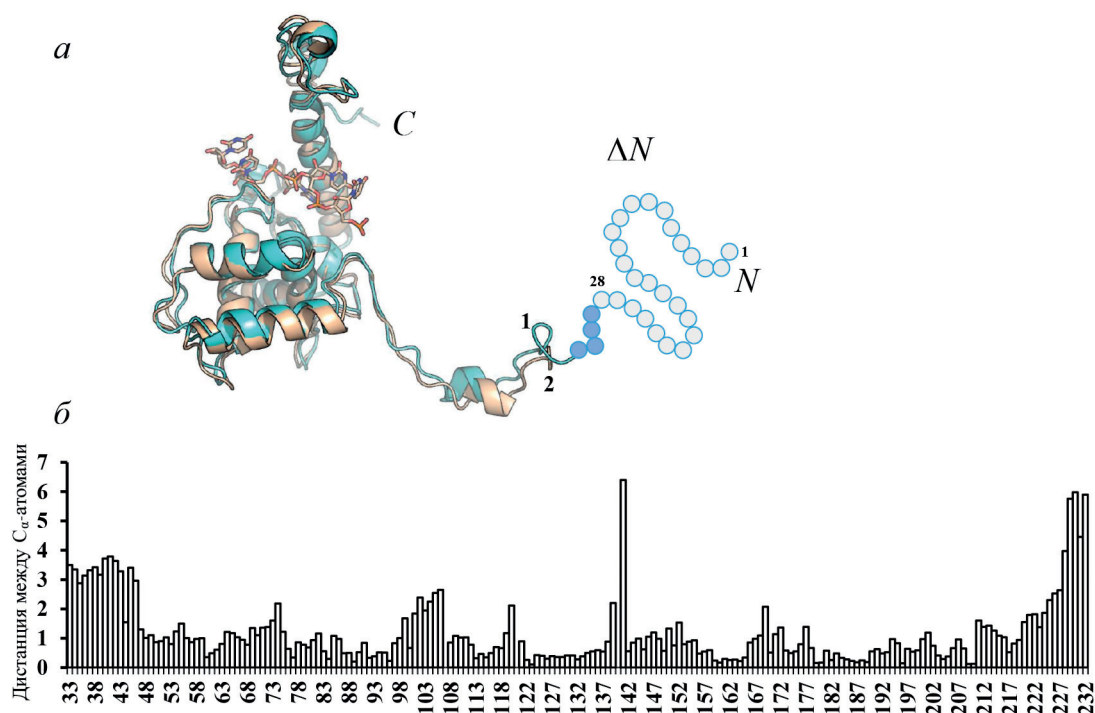


Рис. 5. Пространственное выравнивание структур мономеров БО ХВК (1) и БО РНП ВМАльт (2) с помощью программы Swiss-Pdb Viewer 3.7 (а), PDB ID: 6R7G и 7OG6 соответственно, указаны *N*- и *C*-концы. Рисунок создан в PyMol. б – Дистанция между C_{α} -атомами (Å) в соответствии с пространственным выравниванием. Нумерация остатков проведена по БО ХВК. Схематично показаны отсутствующие в структуре PDB ID: 6R7G остатки, не приведенные в выравнивании: а.о. 1–28 (ΔN -пептид *N*-домена БО ХВК – пустые кружки) и а.о. 29–32 (синие кружки)

в составе «псевдовиреонов» — гетерологичных рибонуклеопротеидов (РНП), для получения которых использовали вирусный вектор на основе ХВК, несущий ген БО ВМАльт [35].

Чтобы детально оценить пространственное структурное сходство БО ХВК и ВМАльт мы провели выравнивание третичных структур мономеров с помощью программы Swiss-Pdb Viewer 3.7 (рис. 5, а). Отклонение координат C_{α} -атомов двух сравниваемых моделей отражает величина RMSD. Средняя величина RMSD для центрального домена II и домена III были равны 1,3 и 4,1 Å соответственно, что подтверждало близкое сходство третичных структур этих доменов обоих вирусов. Однако для домена I (33–50 а.о.) эта величина равна 8,6 Å. Дистанции между C_{α} -атомами сравниваемых молекул БО ХВК и ВМАльт показаны на гистограмме (рис. 5, б). Основные отличия величин RMSD выявляются в 13 а.о. *N*-концевого фрагмента (33–46), *C*-концевых а.о. (225–232), а также в межспиральных районах центрального домена II (а.о. 101–106 и 139–141). Таким образом, несмотря на общее сходство в расположении спиралей, можно видеть значительные расхождения в топологии петлевых областей и наличии в структуре ХВК ΔN -пептида *N*-домена.

Структурный анализ вирионов ХВК и ВМАльт методом МУРР. Экспериментальные кривые МУРР вирионов ВМАльт и ХВК приведены

на рис. 6. Наличие брэгговского пика в районе 1,8–1,9 нм^{–1} на кривых МУРР для обоих вирионов свидетельствует о наличии в образцах упорядоченных, квазикристаллических областей. Наличие таких пиков мы наблюдали ранее для вирионов ВТМ и АВК и связывали их положение с периодичностью, т.е. шагом спирали вирионов [17, 18]. Эти величины для вирионов ВМАльт и ХВК оказались равны $3,37 \pm 0,01$ и $3,40 \pm 0,01$ соответственно (таблица). Из рис. 6 видно, что положение и форма брэгговских пиков практически совпадают, что говорит о схожести спиральных структур обоих вирионов. В целом, показанные на рис. 6 кривые имеют много общих черт, однако имеются и заметные различия: в области минимума на 0,64–0,67 нм^{–1}, в области широкого максимума в районе 0,7–1,2 нм^{–1} и в области центрального рассеяния < 0,5 нм^{–1}. Исходя из наблюдаемых различий — менее глубокий минимум, более размытый максимум в профиле МУРР для вирионов ВМАльт, можно предположить, что эти вирионы менее упорядочены и подвержены большему структурному полиморфизму. Анализ брэгговских пиков, проведенный с помощью программы PEAK, подтверждает это предположение (таблица). Для вирионов ВМАльт наблюдается заметно меньший размер областей кристалличности L и несколько большая степень разупорядочения $\Delta/\bar{d}$ в образце.

Структурные характеристики упорядоченных областей вирионов ВМАльт и ХВК

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

Для анализа структуры вирионов ВМАльт и ХВК в растворе были рассчитаны функции распределения по расстояниям $p(r)$ (рис. 6, б; вставка). Максимальные размеры $D_{\max}$ для вирионов ВМАльт и ХВК, которые мы можем наблюдать в растворе на доступном для МУРР угловом диапазоне, равны 190 и 180 нм, а диаметры спиралей из позиции пика на $p(r)$ вирионов оказались равны $12,7 \pm 0,1$ и $13,2 \pm 0,1$ нм соответственно. Это различие может объясняться более длинными N -концевыми доменами БО ХВК, которые поэтому занимают большую площадь на поверхности вириона, слегка увеличивая его диаметр по сравнению с короткими N -концевыми цепочками БО ВМАльт. Обращает на себя внимание существенное различие профилей функций распределения по расстояниям $p(r)$ для вирионов ВМАльт и ХВК. Форма функции $p(r)$ для вириона ХВК характерна для жесткой многогранной призмы или цилиндра, в то время как вирион ВМАльт имеет более гибкую и, следовательно, менее определенную форму, т.е. об-

ладает большим полиморфизмом в растворе. Следует подчеркнуть, что имеются в виду усредненные формы, так как оба вируса являются в той или иной степени гибкими и могут принимать в растворе различные формы, а функции распределения по расстояниям $p(r)$ являются прямым указанием на то, какие формы преобладают для каждого из образцов.

Анализ структуры вирионов в растворе был проведен сначала для ВМАльт, поскольку PDB-модель мономера БО в составе РНП является полной и практически не содержит отсутствующих фрагментов. Для моделирования строения этого вириона использовалась структурная модель БО с разрешением 3,3 Å (PDB ID: 7OG6, а.о. 5–203) [35].

Атомная модель мономера БО ВМАльт с атомными координатами а.о. 5–203 и атомными координатами РНК (PDB ID: 7OG6) была многократно воспроизведена с помощью программы CHIMERA вдоль винтовой оси, параметры которой соответствовали работе Thuenemann et al. [35]. Для того чтобы определить влияние длины спирали вириона на профиль кривых малоуглового рассеяния, было сгенерировано несколько спиралей разной длины, используя структуру мономера БО ВМАльт высокого разрешения. Затем рассеяние от полученных моделей сравнивали с экспериментальными данными МУРР. Таким образом, были построены модели различной длины, содержащие порядка

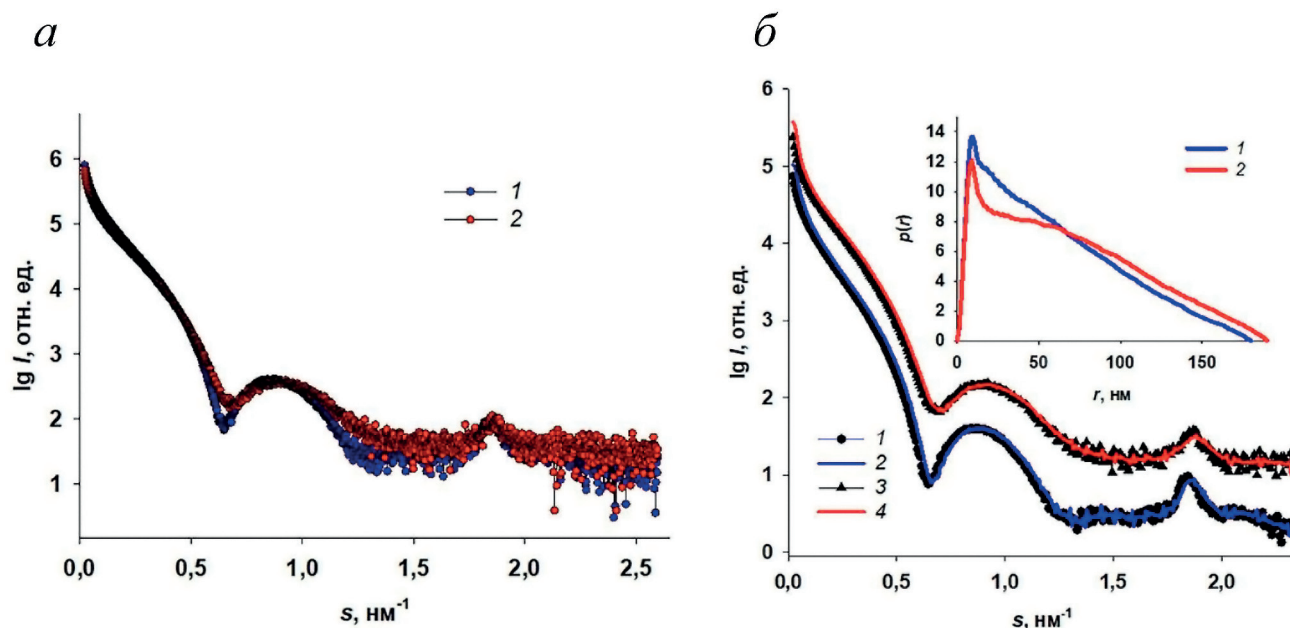


Рис. 6. Экспериментальные кривые МУРР (а) вирионов ХВК (1) и ВМАльт (2). б – Приближение к экспериментальным кривым ХВК (1) и ВМАльт (3) от модельных кривых, рассчитанных из функций распределения по расстояниям $p(r)$ для ХВК (2) и ВМАльт (4). Экспериментальные и модельные кривые для лучшей визуализации разнесены по вертикали на один логарифмический порядок. Вставка: функции распределения по расстояниям $p(r)$ для ХВК (1) и ВМАльт (2)

300–350 субъединиц. Расчет соответствующих кривых рассеяния и их приближение экспериментальных данных проводилось программой CRY SOL.

Рассеяние от сгенерированных модельных вирионов различной длины практически не отличалось друг от друга. Зато сравнение профилей экспериментальной кривой рассеяния и типичной кривой от модели, содержащей 320 субъединиц БО (рис. 7, а; кривые 1 и 2), демонстрирует расхождение практически на всем диапазоне данных (за исключением самых малых углов $0,05 < s < 0,5 \text{ нм}^{-1}$, соответствующих грубой форме вириона) и, что очень важно, включает несовпадение положений брэгговских пиков, т.е. у полученных нами моделей вирионов другой характеристический размер $d = 2\pi/s_{\text{max}}$ упорядоченных областей. Поскольку в работе Thuenemann et al. [35] использовался РНП, а не вирионы ВМАльт, а также принимая во внимание высокую гомологию ВМАльт и ХВК и схожесть структур их субъединиц (рис. 5, а), было высказано предположение, что спиральная организация ВМАльт более близка к параметрам спирали ХВК.

Для проверки этой гипотезы мономер БО ВМАльт (PDB ID: 7OG6) был последовательно совмещен с 13 субъединицами БО ХВК (фрагмент спирали, содержащий 1,5 витка), присутствующими в структуре ХВК 6R7G, программой SUPPDB. Далее, данной программой была рассчитана матрица трансформации первого мономера в последний и применена ко всему фрагменту 28 раз для получения спирали, содержащей 336 субъединиц (порядка 40 витков). Такая модель, представленная мономером БО ВМАльт в спирали ХВК, дала значительно лучшее согласие экспериментальной и расчетной кривых рассеяния (рис. 7, а; кривые 1 и 3).

Наблюдаемое расхождение между экспериментальной и модельной кривыми отражает возможное отклонение параметров реальной структуры вириона ВМАльт в растворе в сравнении с его жесткой спиральной моделью на атомном уровне.

Для моделирования строения вириона ХВК использовалась модель части структуры ХВК (PDB ID: 6R7G) с разрешением 2,2 Å. Данный участок спирали состоит из 13 белковых субъединиц, включающих в себя атомные

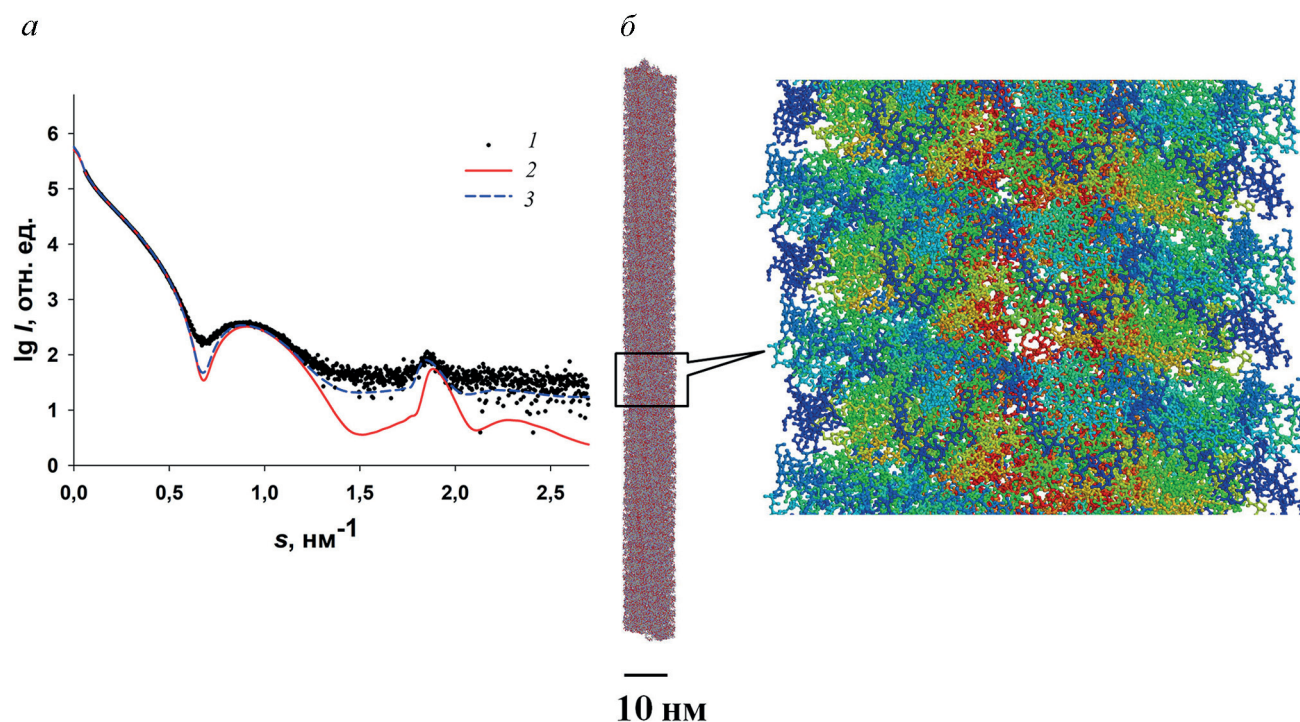


Рис. 7. Результаты моделирования строения вирионов ВМАльт с использованием структур высокого разрешения мономера БО ВМАльт в составе РНП и с применением параметров спирали ХВК (PDB ID: 7OG6 и 6R7G соответственно). а – Кривые МУРР: 1 – экспериментальные данные; 2 – теоретическое рассеяние от спиральной модели, согласно данным PDB ID:7OG6 ($\chi^2 = 15,6$); 3 – теоретическое рассеяние от мономера ВМАльт, уложенного в спиральную модель, согласно данным PDB ID: 6R7G ($\chi^2 = 13,0$). б – Структурная модель вириона ВМАльт, построенного из мономера PDB ID: 7OG6 с применением параметров спирали ХВК. Окраска а.о.: 5–31 – синий; 32–58 – голубой; 59–137 – зеленый; 138–164 – желтый; 165–177 – оранжевый; 178–203 – красный. Увеличение на вставке: 10×

координаты аминокислот с 29 по 237 остаток, а также содержит РНК. Таким образом, исходно моделирование проводилось без учета ΔN -пептида белка. Аналогично моделированию ВМАльт, имеющийся фрагмент ХВК был также размножен вдоль винтовой оси с использованием SUPPDB для построения спиральной модели, содержащей 336 субъединиц (порядка 40 витков). Сравнение профилей экспериментальной и модельной кривых (рис 8, а; кривые 1 и 2) демонстрирует небольшие сдвиги в районе первого минимума ($s_{\min} = 0,6 \text{ нм}^{-1}$) и брэгговского пика с максимумом $s_{\text{exp}} = 1,84 \text{ нм}^{-1}$ ($d_{\text{exp}} = 3,41 \text{ нм}$). Предположительно, это связано с отсутствием 28 N -концевых остатков в модели вириона ХВК (рис. 8, б), что дает ограниченное приближение экспериментальной кривой, и для построения корректной модели необходимо дополнить исходный мономер этими аминокислотными остатками.

Структурное моделирование вирионов ХВК с ΔN -пептидами. Для выяснения вклада ΔN -пептидов N -домена в рассеяние вирионов ХВК в атомную модель исходного мономера добавляли случайную цепь из 28 виртуальных аминокислотных остатков с помощью программы RANCH. Затем с помощью программы SUPPDB структура мономера с ΔN -пептидом поочередно совмещалась с каждым из 13 мономеров атомной модели ХВК (PDB ID: 6R7G). Таким образом, после объединения таких мономеров был получен фрагмент спирали, содержащий, помимо атомной структуры, также ΔN -пептиды N -домена. Аналогично моделированию ВМАльт, матрица трансформации первого мономера в 13-й последовательно применялась к интактному фрагменту 28 раз. Полученная таким размножением гибридная модель спирали (содержащая как атомы, так и виртуальные остатки) состояла из 336 субъединиц, включая также и РНК, и соответствовала примерно

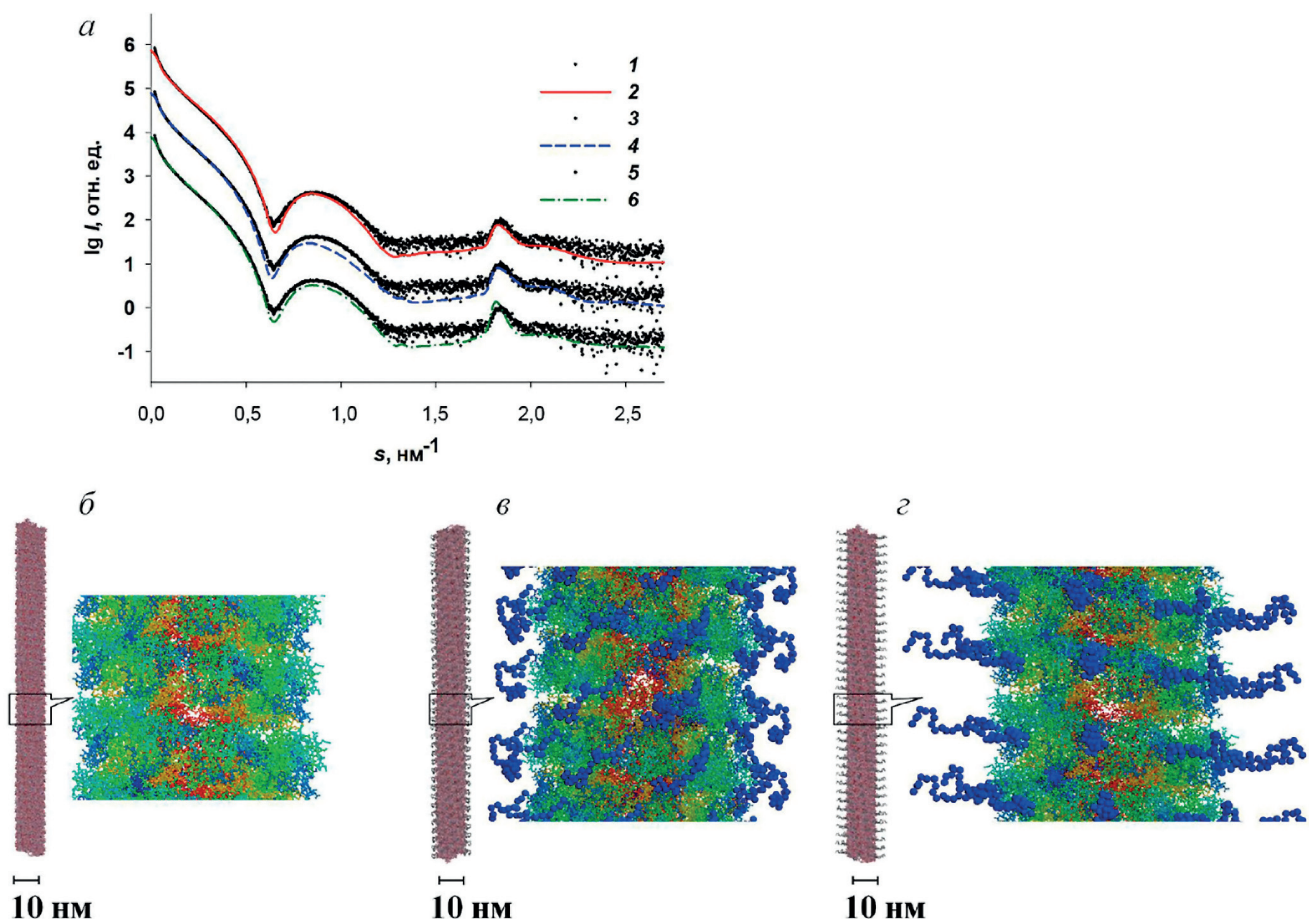


Рис. 8. Результаты приближения кривой МУРР от вириона ХВК. а – Экспериментальные данные рассеяния вириона ХВК (кривые 1, 3 и 5); рассеяние от исходной модели спирали ($\chi^2 = 70,2$) (кривая 2); приближение моделью ХВК ΔN -пептидами в сложенном состоянии ($\chi^2 = 59,7$) (кривая 4); приближение моделью ХВК с ΔN -пептидами в развернутом состоянии ($\chi^2 = 43,1$) (кривая 6). б – Исходная модель вириона; в – модель спирали ХВК с ΔN -пептидами в сложенном состоянии; з – модель спирали ХВК с ΔN -пептидами в развернутом состоянии. Окраска а.о.: 1–32 – синий; 33–64 – голубой; 65–158 – зеленый; 159–190 – желтый; 191–222 – оранжевый; 223–237 – красный. Увеличение на вставках: $10\times$

40 виткам спирали. Рассеяние от такой модели затем сравнивалось с экспериментальными данными с помощью программы CRY SOL. С помощью таких процедур вначале была построена модель 1, в которой ΔN -пептиды в сложенном состоянии и контактируют с соседними субъединицами вириона (рис. 8, в). Такая модель дала приближение (рис. 8, а; кривые 3 и 4), которое оказалось ближе к экспериментальной кривой в области брэгговского пика, чем кривая без учета ΔN -участка. С помощью описанных выше процедур была также построена модель 2 с развернутыми ΔN -пептидами (рис. 8, з). Приближение такой модели (рис. 8, а; кривые 5 и 6) в целом лучше согласуется с экспериментальными данными, в том числе с точки зрения позиций первого минимума, однако дает немного более острый брэгговский пик. Таким образом, достичь идеального приближения экспериментальной кривой МУРР моделью с рассмотренными конформациями ΔN -участка не представилось возможным.

Остающиеся даже после добавления ΔN -пептидов небольшие отклонения модельных кривых от экспериментальных данных МУРР свидетельствуют о том, что отдельные субъединицы ХВК имеют разное строение гибких участков, т.е. в растворе могут одновременно сосуществовать вирионы с разными конформациями ΔN -пептидов, как сложенных, так и развернутых. В моделях с компактной конформацией ΔN -пептиды частично прилегают к поверхности вириона, что предполагает их взаимодействие с соседними субъединицами. Это, в свою очередь, может увеличивать стабильность вириона и приводить к повышению $T_{пл}$ вирионов ХВК. Отличия модельных и экспериментальных кривых связаны с отклонением жесткой идеальной формы модели от обладающих гибкостью и полиморфностью рассеивающих объектов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Стабильность вирусных частиц почти полностью определяется межмолекулярными аксиальными и латеральными белок-белковыми взаимодействиями, а также РНК-белковыми взаимодействиями. Одним из показателей стабильности является устойчивость к термической обработке вирионов. Показано, что структурный переход нитевидных вирионов при повышении температуры происходит через образование ряда интермедиатов [36–38] и высвобождение денатурированного белка. Было обнаружено, что при нагревании некоторых фитовирусов в определенных условиях образуются структурно

модифицированные частицы сферической формы [36, 38, 39]. Было показано, что структурный переход вирионов ХВК [38] и ВМАлт [39] в сферические частицы происходит при различных условиях, что может быть связано с различием их физико-химических свойств, которые требуют дополнительных исследований.

Результаты термического анализа показали, что вирионы потексвирусов ХВК и ВМАлт по-разному реагировали на повышение температуры (рис. 3). Температура плавления препаратов ХВК была выше ВМАлт на 10–12 °С, что согласуется с результатами наших предыдущих исследований [38, 39]. Причина такой разницы между двумя вирусами, относящимися к одному семейству и имеющими близкую морфологию, вероятно, заключается в структурных различиях БО в составе вирионов этих вирусов. БО потексвирусов ХВК и ВМАлт (рис. 4, а) имеют высокую гомологию в первичной структуре (68% подобных а.о.), малая величина RMSD показывала близкое сходство и третичных структур (рис. 5, б) для центральной и С-концевой частей их БО. При этом в белке ХВК мы показали наличие разупорядоченного ΔN -пептида из 28–30 а.о. в *N*-домене (рис. 4, б) в отличие от БО ВМАлт. Этот участок в БО ХВК имел большое число гидроксилсодержащих а.о. (14 Thr/Ser) и мало гидрофобных/алифатических остатков (1 Ile, 5 Ala), что могло быть причиной аномально медленной электрофоретической подвижности ХВК в геле. Подобный феномен мы описали ранее для белка потивируса АВК [2]. Наличие гидрофильных а.о. и остатков фукозы/галактозы в ΔN -пептиде БО ХВК [40] обеспечивает формирование упорядоченного слоя связанной воды, как показано ранее методом ИК-спектроскопии [40], и могло быть причиной аномальных КД-спектров вируса. Модели, полученные в результате анализа синхротронного МУРР, показали возможность того, что гибкие ΔN -концевые участки *N*-домена могут контактировать с соседними субъединицами белка и/или скреплять витки спиральной структуры и тем самым стабилизировать структуру вириона. Обнаружено, что вирионы ХВК имеют больший размер областей кристалличности *L* в сравнении с ВМАлт, а значит и более упорядочены.

Результаты наших предыдущих исследований позволили предположить, что *N*-концевая область БО ХВК играет важную роль в формировании спиральной структуры вириона. Удаление или изменение состава *N*-концевого пептида влияло на его активность в качестве трансляционного репрессора. Было показано, что БО подавляет трансляцию РНК в соста-

ве вирионов. При этом удаление *N*-концевого пептида не приводило к потере этой активности. Однако при фосфорилировании *N*-концевого пептида или замене в его составе фосфорилируемых (Thr/Ser) на нефосфорилируемые (Ala/Gly) аминокислоты БО ХВК терял способность подавлять трансляцию РНК ХВК в составе частиц, полученных при сборке с этими белками, что подтверждает выводы о том, что *N*-концевой пептид БО ХВК оказывает влияние на конформацию участков БО, которые вовлечены в белок-белковые и/или РНК-белковые взаимодействия в составе вириона [41].

Впервые структура низкого разрешения нитевидных потексвирусов ВМАлт и ХВК была получена в растворе методом МУРР. Рассчитаны диаметры ($12,7 \pm 0,1$ и $13,2 \pm 0,1$ нм соответственно). По данным крио-ЭМ, диаметр РНП ВМАлт равен 12,0 нм [35], вирионов ВМАлт — 13,5 нм [8], вирионов ХВК — около 13,0 нм [7]. Определен шаг спирали вирионов ВМАлт и ХВК ($3,37 \pm 0,01$ и $3,40 \pm 0,01$ соответственно), величины оказались близкими к данным крио-ЭМ ($3,57$ [8] и $3,52$ [7] соответственно). Результаты малоуглового рассеяния показали повышенную плотность упаковки белков в вирионах ХВК, которая, вероятно, обеспечивается стабилизирующими структуру вириона — ΔN -пептидами, контактирующими с соседними субъединицами, и определяет повышенную термостабильность вирионов ХВК в сравнении с ВМАлт.

Вклад авторов. А.Л. Ксенофонтов, Э.В. Штыкова — концепция и руководство работой; А.Л. Ксенофонтов, М.В. Петухов, В.В. Матвеев, Н.В. Федорова, А.М. Арутюнян, Т.И. Манухова, Е.А. Евтушенко — проведение экспериментов; М.В. Петухов, О.В. Карпова, П.И. Семенюк — обсуждение результатов исследования; А.Л. Ксенофонтов, М.В. Петухов, Э.В. Штыкова — написание текста; Н.А. Никитин, О.В. Карпова — редактирование текста статьи.

Благодарности. Эксперименты по выделению и характеристике вирусных частиц были проведены при поддержке междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология» с использованием оборудования, приобретенного по Программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части проведения экспериментов МУРР.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stubbs, G., and Kendall, A. (2012) Helical viruses, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **726**, 631-658, doi: 10.1007/978-1-4614-0980-9_28.
2. Ksenofontov, A. L., Paalme, V., Arutyunyan, A. M., Semenyuk, P. I., Fedorova, N. V., Rumvolt, R., Baratova, L. A., Jarvekul, L., and Dobrov, E. N. (2013) Partially disordered structure in intravirus coat protein of potyvirus potato virus A, *PLoS One*, **8**, e67830, doi: 10.1371/journal.pone.0067830.
3. Semenyuk, P. I., Karpova, O. V., Ksenofontov, A. L., Kalinina, N. O., Dobrov, E. N., and Makarov, V. V. (2016) Structural properties of potexvirus coat proteins detected by optical methods, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1522-1530, doi: 10.1134/S0006297916120130.
4. Yang, S., Wang, T., Bohon, J., Gagne, M. E., Bolduc, M., Leclerc, D., and Li, H. (2012) Crystal structure of the coat protein of the flexible filamentous papaya mosaic virus, *J. Mol. Biol.*, **422**, 263-273, doi: 10.1016/j.jmb.2012.05.032.
5. DiMaio, F., Chen, C. C., Yu, X., Frenz, B., Hsu, Y. H., Lin, N. S., and Egelman, E. H. (2015) The molecular basis for flexibility in the flexible filamentous plant viruses, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 642-644, doi: 10.1038/nsmb.3054.
6. Agirrezabal, X., Mendez-Lopez, E., Lasso, G., Sanchez-Pina, M. A., Aranda, M., and 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, doi: 10.7554/eLife.11795.
7. Grinzato, A., Kandiah, E., Lico, C., Betti, C., Baschieri, S., and Zanotti, G. (2020) Atomic structure of potato virus X, the prototype of the Alphaflexiviridae family, *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 564-569, doi: 10.1038/s41589-020-0502-4.
8. Donchenko, E. K., Pechnikova, E. V., Mishyna, M. Y., Manukhova, T. I., Sokolova, O. S., Nikitin, N. A., Atabekov, J. G., and Karpova, O. V. (2017) Structure and properties of virions and virus-like particles derived from the coat protein of Alternanthera mosaic virus, *PLoS One*, **12**, e0183824, doi: 10.1371/journal.pone.0183824.
9. Mukhamedzhanova, A. A., Smirnov, A. A., Arkhipenko, M. V., Ivanov, P. A., Chirkov, S. N., Rodio-

- nova, N. P., Karpova, O. V., and Atabekov, J. G. (2011) Characterization of Alternanthera mosaic virus and its Coat Protein, *Open Virol. J.*, **5**, 136-140, doi: 10.2174/1874357901105010136.
10. Hammond, J., Kim, Ik.-H., and Lim, H.-S. (2017) Alternanthera mosaic virus – an alternative ‘model’ potexvirus of broad relevance, *Kor. J. Agricult. Sci.*, **44**, 145-180, doi: 10.7744/kjoas.20170016.
11. Erickson, J. W., Bancroft, J. B., and Horne, R. W. (1976) The assembly of papaya mosaic virus protein, *Virology*, **72**, 514-517, doi: 10.1016/0042-6822(76)90180-x.
12. Ksenofontov, A. L., Dobrov, E. N., Fedorova, N. V., Serebryakova, M. V., Prusov, A. N., Baratova, L. A., Paalme, V., Jarvekul, L., and Shtykova, E. V. (2018) Isolated Potato Virus A coat protein possesses unusual properties and forms different short virus-like particles, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **36**, 1728-1738, doi: 10.1080/07391102.2017.1333457.
13. Homer, R. B., and Goodman, R. M. (1975) Circular dichroism and fluorescence studies on potato virus X and its structural components, *Biochim. Biophys. Acta*, **378**, 296-304, doi: 10.1016/0005-2787(75)90117-3.
14. Atabekov, J., Dobrov, E., Karpova, O., and Rodionova, N. (2007) Potato virus X: structure, disassembly and reconstitution, *Mol. Plant Pathol.*, **8**, 667-675, doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00420.x.
15. Franke, D., Petoukhov, M. V., Konarev, P. V., Panjkovich, A., Tuukkanen, A., Mertens, H. D. T., Kikhney, A. G., Hajizadeh, N. R., Franklin, J. M., Jeffries, C. M., and Svergun, D. I. (2017) ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions, *J. Appl. Crystallogr.*, **50**, 1212-1225, doi: 10.1107/S1600576717007786.
16. Svergun, D. I., Koch, M. H. J., Timmins, P. A., and May, R. P. (2013) *Small Angle X-Ray and Neutron Scattering from Solutions of Biological Macromolecules*, First Edn., Oxford University Press, Oxford.
17. Ksenofontov, A. L., Petoukhov, M. V., Prusov, A. N., Fedorova, N. V., and Shtykova, E. V. (2020) Characterization of tobacco mosaic virus virions and re-polymerized coat protein aggregates in solution by small-angle X-ray scattering, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 310-317, doi: 10.1134/S0006297920030062.
18. Shtykova, E. V., Petoukhov, M. V., Fedorova, N. V., Arutyunyan, A. M., Skurat, E. V., Kordyukova, L. V., Moiseenko, A. V., and Ksenofontov, A. L. (2021) The structure of the potato virus a particles elucidated by small angle X-ray scattering and complementary techniques, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 230-240, doi: 10.1134/S0006297921020115.
19. Miroshnichenko, N. A., Karpova, O. V., Morozov, S., Rodionova, N. P., and Atabekov, J. G. (1988) Translation arrest of potato virus X RNA in Krebs-2 cell-free system: RNase H cleavage promoted by complementary oligodeoxynucleotides, *FEBS Lett.*, **234**, 65-68, doi: 10.1016/0014-5793(88)81304-8.
20. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
21. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D., and Higgins, D. G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 539, doi: 10.1038/msb.2011.75.
22. Blanchet, C. E., Spilotros, A., Schwemmer, F., Graewert, M. A., Kikhney, A., Jeffries, C. M., Franke, D., Mark, D., Zengerle, R., Cipriani, F., Fiedler, S., Roessle, M., and 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**, 431-443, doi: 10.1107/S160057671500254X.
23. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., and Svergun, D. I. (2003) PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Crystallogr.*, **36**, 1277-1282, doi: 10.1107/S0021889803012779.
24. Manalastas-Cantos, K., Konarev, P. V., Hajizadeh, N. R., Kikhney, A. G., Petoukhov, M. V., Molodenskiy, D. S., Panjkovich, A., Mertens, H. D. T., Gruzinov, A., Borges, C., Jeffries, C. M., Svergun, D. I., and Franke, D. (2021) ATSAS 3.0: expanded functionality and new tools for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Crystallogr.*, **54**, 343-355, doi: 10.1107/S1600576720013412.
25. Вайнштейн Б. (1963) *Дифракция рентгеновских лучей на цепных молекулах*, АН СССР, Москва.
26. Svergun, D. I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria, *J. Appl. Cryst.*, **25**, 495-503, doi: 10.1107/S0021889892001663.
27. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.*, **25**, 1605-1612, doi: 10.1002/jcc.20084.
28. Konarev, P. V., Petoukhov, M. V., and Svergun, D. I. (2001) MASSHA – a graphics system for rigid-body modelling of macromolecular complexes against solution scattering data, *J. Appl. Cryst.*, **34**, 527-532, doi: 10.1107/S0021889801006100.
29. Kozin, M. B., and Svergun, D. I. (2000) A software system for rigid-body modelling of solution scattering data, *J. Appl. Cryst.*, **33**, 775-777, doi: 10.1107/S0021889800001382.
30. Bernado, P., Mylonas, E., Petoukhov, M. V., Blackledge, M., and Svergun, D. I. (2007) Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 5656-5664, doi: 10.1021/ja069124n.
31. Svergun, D., Barberato, C., and Koch, M. H. J. (1995) CRY SOL – A program to evaluate x-ray solution

- scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *J. Appl. Cryst.*, **28**, 768-773, doi: 10.1107/S0021889895007047.
32. Tozzini, A. C., Ek, B., Palva, E. T., and Hopp, H. E. (1994) Potato virus X coat protein: a glycoprotein, *Virology*, **202**, 651-658, doi: 10.1006/viro.1994.1386.
 33. Ivanov, P. A., Mukhamedzhanova, A. A., Smirnov, A. A., Rodionova, N. P., Karpova, O. V., and Atabekov, J. G. (2011) The complete nucleotide sequence of Alternanthera mosaic virus infecting *Portulaca grandiflora* represents a new strain distinct from phlox isolates, *Virus Genes*, **42**, 268-271, doi: 10.1007/s11262-010-0556-6.
 34. Nemykh, M. A., Novikov, V. K., Arutiunian, A. M., Kalmykov, P. V., Drachev, V. A., and Dobrov, E. N. (2007) Comparative study of structural stability of potato virus X coat protein molecules in solution and in the virus particles [in Russian], *Mol. Biol.*, **41**, 697-705, doi: 10.1134/S0026893307040164.
 35. Thuenemann, E. C., Byrne, M. J., Peyret, H., Saunders, K., Castells-Graells, R., Ferriol, I., Santoni, M., Steele, J. F. C., Ranson, N. A., Avesani, L., Lopez-Moya, J. J., and Lomonosoff, G. P. (2021) A replicating viral vector greatly enhances accumulation of helical virus-like particles in plants, *Viruses*, **13**, 885, doi: 10.3390/v13050885.
 36. Atabekov, J., Nikitin, N., Arkhipenko, M., Chirkov, S., and Karpova, O. (2011) Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles, *J. Gen. Virol.*, **92**, 453-456, doi: 10.1099/vir.0.024356-0.
 37. Ksenofontov, A. L., Parshina, E. Y., Fedorova, N. V., Arutyunyan, A. M., Rumvold, R., Paalme, V., Baratova, L. A., Jarvekul, L., and Dobrov, E. N. (2016) Heating-induced transition of Potyvirus Potato Virus A coat protein into beta-structure, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **34**, 250-258, doi: 10.1080/07391102.2015.1022604.
 38. Nikitin, N., Ksenofontov, A., Trifonova, E., Arkhipenko, M., Petrova, E., Kondakova, O., Kirpichnikov, M., Atabekov, J., Dobrov, E., and Karpova, O. (2016) Thermal conversion of filamentous potato virus X into spherical particles with different properties from virions, *FEBS Lett.*, **590**, 1543-1551, doi: 10.1002/1873-3468.12184.
 39. Manukhova, T. I., Evtushenko, E. A., Ksenofontov, A. L., Arutyunyan, A. M., Kovalenko, A. O., Nikitin, N. A., and Karpova, O. V. (2021) Thermal remodelling of Alternanthera mosaic virus virions and virus-like particles into protein spherical particles, *PLoS One*, **16**, e0255378, doi: 10.1371/journal.pone.0255378.
 40. Baratova, L. A., Fedorova, N. V., Dobrov, E. N., Lukashina, E. V., Kharlanov, A. N., Nasonov, V. V., Serebryakova, M. V., Kozlovsky, S. V., Zayakina, O. V., and 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**, 3136-3145, doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04243.x.
 41. Karpova, O. V., Arkhipenko, M. V., Zaiakina, O. V., Nikitin, N. A., Kiseleva, O. I., Kozlovskii, S. V., Rodionova, N. P., and Atabekov, I. G. (2006) Translational regulation of potato virus X RNA-coat protein complexes: the key role of a coat protein N-terminal peptide [in Russian], *Mol. Biol.*, **40**, 703-710, doi: 10.1134/S0026893306040157.

INFLUENCE OF THE STRUCTURE OF THE COAT PROTEIN N-TERMINAL SEGMENT IN POTATO VIRUS X AND ALTERNANTHERA MOSAIC VIRUS ON THE STRUCTURE AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF VIRIONS

**A. L. Ksenofontov^{1*}, M. V. Petoukhov^{2,3}, V. V. Matveev², N. V. Fedorova¹, P. I. Semenyuk¹,
A. M. Arutyunyan¹, T. I. Manukhova⁴, E. A. Evtushenko⁴, N. A. Nikitin⁴,
O. V. Karpova⁴, and E. V. Shtykova²**

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; E-mail: ksenofon@belozersky.msu.ru*

² *Shubnikov Institute of Crystallography of Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics",
Russian Academy of Sciences, 119333 Moscow, Russia*

³ *A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia*

⁴ *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

The amino acid sequences of coat proteins (CPs) of potexviruses such as potato virus X (PVX) and alternanthera mosaic virus (AltMV) share about 40% sequence identity. However, the N-terminal CP domains of these virions differ both in length (the N-terminal CP domain of PVX is longer by 28 residues, $\Delta N = 28$), and in amino acid sequence. In this work, we determined the effect of the N-terminal CP domain

on the structure and physicochemical properties of the entire PVX and AltMV virions. It was shown that the melting point of PVX samples is 10-12°C higher than that of AltMV preparations; the circular dichroism spectra of these viruses also differ significantly. Spatial alignment of the existing high-resolution potexvirus CP structures showed that the RMSD value between C α -atoms was the largest for the N-terminal domains of the two compared models. From computer simulations the Δ N-terminal CP domain of PVX is completely disordered. According to synchrotron small-angle X-ray scattering (SAXS) data, the structure of CP of PVX and AltMV virions differs, in particular, CP PVX has a larger size of crystallinity regions and, therefore, is more ordered. Using SAXS, virion diameters and helix parameters in solution are calculated. The influence of the conformation and localization of the N-terminal domain of PVX CP relative to the surface of the virion on its structure was revealed. Presumably, the increased thermal stability of PVX virions compared to AltMV is provided by the elongated N-terminal domains ($\Delta N = 28$), which ensures additional contact between the adjacent CP subunits in the PVX virion.

Keywords: potexviruses, potato X-virus, alternanthera mosaic viruses, coat protein, N-terminal domain, circular dichroism, small-angle X-ray scattering