

УДК 578.32; 578.865; 539.26

ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРИОНОВ И РЕПОЛИМЕРОВ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ В РАСТВОРЕ МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ*

© 2020 А.Л. Ксенофонтов^{1**}, М.В. Петухов^{2,3},
А.Н. Прусов¹, Н.В. Федорова¹, Э.В. Штыкова²

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

² Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН,
119333 Москва, Россия; электронная почта: shtykova@ns.crys.ras.ru

³ Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
119071 Москва, Россия; электронная почта: maxim@embl-hamburg.de

Поступила в редакцию 07.11.2019

После доработки 20.12.2019

Принята к публикации 22.12.2019

Структурный анализ вирионов и реполимеров белка оболочки вируса табачной мозаики (ВТМ) в водно-солевом растворе был проведен по данным синхротронного малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с негативным контрастом. Частицы реполимеров белка оболочки обладают уникальной стабильностью и не имеют спиральной симметрии. По данным ПЭМ, такие частицы содержат гетерогенные по длине поперечно исчерченные палочковидные «стопки дисков» длиной 300–800 Å. Структурное моделирование этих частиц было выполнено с использованием элемента кристаллографической модели четырехслойного агрегата (PDB: 1EI7). Получившиеся модели «стопки дисков» представляли собой полые цилиндры, и мы сравнили их расчетное рассеяние с экспериментальным на всем измеряемом диапазоне. Показана лучшая корреляция данных МУРР с моделью из повторяющейся центральной пары дисков. Кривые МУРР практически совпадали для образцов «стопки дисков» ВТМ независимо от метода выделения белка. Положения максимумов интенсивности на кривых рассеяния могут быть использованы в качестве специфической характеристики образцов, некоторые из них соотношены с реальными элементами четвертичной структуры частиц (периодичность структуры реполимера, шаг спирали вириона). Впервые структурные данные низкого разрешения реполимеров ВТМ были получены в растворе в условиях, близких к естественным. Анализ подобных наноразмерных объектов важен для их возможного биомедицинского и биотехнологического применения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ВТМ, белок оболочки, реполимеры, вирионы, малоугловое рентгеновское рассеяние.

DOI: 10.31857/S0320972520030069

Вирус табачной мозаики (ВТМ) является хорошо охарактеризованным растительным вирусом, состоящим из 2130 идентичных субъединиц белка оболочки, расположенных спирально вокруг одноцепочечной РНК [1]. ВТМ широко изучался с использованием методов кристаллографии и электронной микроскопии. Из-за стабильности и доступности ВТМ в электронной микроскопии в качестве эталона

Принятые сокращения: ВТМ – вирус табачной мозаики, МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние, ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-321, 03.02.2020.

** Адресат для корреспонденции.

длины используется его диаметр, а также длина шага спирали 22,92 Å, которые измерены очень точно методом рентгеновской дифракции ориентированных волокон [2]. Субъединицы белка оболочки образуют полый цилиндр длиной 3000 Å и диаметром 180 Å. Особенностью выделенного белка оболочки ВТМ является его способность образовывать в растворе большое число упорядоченных агрегатов с различной структурой. В зависимости от рН, ионной силы, температуры и концентрации белок ВТМ находится в двух основных состояниях: дисковом и спиральном [3]. К числу агрегатов дискового типа относятся двухслойные 20S-диски с коэффициентом седиментации 20S и агрегаты дисков, уложенных попарно в «стопки дисков», которые образуются при выдерживании препара-

та в растворе с рН 7–9. К спиральному типу относятся прежде всего сами вирионы ВТМ и идентичный им спиральный реполимеризованный белок при рН $\leq 6,0$, а также двухвитковые фрагменты спирали [3]. Двухслойная структура 20S-диска определена кристаллографическим анализом с разрешением 2,8 Å [4]. 20S-Диски состоят из 34 белковых субъединиц (17 субъединиц на слой). Два слоя диска соединены на его периферии на больших радиусах и не соприкасаются на малых [4], образуя щель около сайта связывания РНК. Именно эти данные рентгеноструктурного анализа послужили основанием для построения модели самосборки ВТМ *in vitro* «изнутри» [5, 6], в соответствии с которой сборка инициируется связыванием диска 20S со специфическим участком РНК со стороны центрального канала, при этом происходит трансформация цилиндрического диска до спиральной структуры [6].

Необычные рентгенограммы, полученные Франклин в 1955 г. [7] для полимеризованного белка оболочки ВТМ, выделенного из инфицированных растений, дали первое указание на образование полимера из дисков, уложенных попарно в «стопки дисков» («stacked discs»). Долгое время предполагалось наличие равновесия и возможность трансформации между «стопками дисков» и спиральными агрегатами, и это подразумевало, что «стопки дисков», подобно спирали вируса, должны быть полярной структурой, в которой все субъединицы ориентированы в одном направлении [8]. Доказательство биполярности «стопок дисков» было получено с помощью моноклональных антител, которые связывались лишь с одним концом вириона ВТМ, однако эти антитела реагировали с обоими концами реполимера [9]. Дальнейшее изучение их структуры методом криоэлектронной микроскопии с разрешением 9–12 Å [10, 11] показало, что большая часть двухслойных дисков имеет четвертичную структуру, аналогичную центральной паре колец закристаллизованного четырехслойного дискового агрегата [12].

В настоящей работе с помощью синхротронного малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) впервые охарактеризована структура в растворе и выполнено моделирование вирионов и реполимеров белка оболочки ВТМ, сформированных в «стопки дисков». Мы представили набор моделей, которые были построены с использованием атомарных координат четырехслойного агрегата [12], и сравнили их расчетное рассеяние с экспериментальным, полученным с помощью метода МУРР.

Реполимеры «стопки дисков» ВТМ являются интригующим объектом из-за их амилоидопо-

добной степени стабильности: после того как молекулы белка собраны в такую структуру, для ее разборки требуются денатурирующие условия [13, 14]. Подобные наноразмерные объекты – нановолокна и наностержни – могут найти широкое применение в наноэлектронике и различных биомедицинских приложениях. Ранее нами с помощью МУРР были охарактеризованы другие вирусоподобные частицы – ассоциаты белка оболочки спирального потивируса А вируса картофеля – и изучена их диссоциация [15, 16].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение белка оболочки и реполимеров ВТМ. Препарат ВТМ (штамм U1) был любезно предоставлен В.В. Макаровым. Образцы реполимеров ВТМ получали двумя методами: 1) белок ВТМ, выделенный литиевым методом [17], диализовали в 10 mM Tris-HCl-буфер (рН 8,0) с 0,1 M NaCl; 2) белок ВТМ, полученный ацетатным методом [18], диализовали в 10 mM фосфатный буфер (рН 8,0) с 0,1 M NaCl. В обоих случаях диализ проводили в течение суток при +8 °С, далее препараты белка (1,5–5 мг/мл) выдерживали 5–7 суток при +8 °С для формирования «стопок дисков» и центрифугировали 10 мин при 14 000 об/мин (Benchtop Microfuge 22R; «Beckman Coulter», США). Выход белка ВТМ составлял 50–70% от расчетного.

Определение концентрации препаратов реполимеров и вируса ВТМ. Концентрацию препаратов определяли с помощью спектрофотометра UV-2600 («Hitachi», Япония), используя спектры поглощения в УФ-диапазоне 240–340 нм. В связи с большим вкладом рассеяния в поглощение реполимера (40–50%) вычисляли истинные спектры поглощения (E) суспензий частиц методом экстраполяции [19], применяя для экстраполяции область 320–338 нм. Коэффициенты поглощения препаратов белка и вируса принимали равными $E_{280}^{0,1\%} = 1,3$ и $E_{260}^{0,1\%} = 2,3$ соответственно. Контроль чистоты образцов осуществляли с помощью электрофореза по методу Лэммли [20], используя 15%-ный ПААГ, в камере Mini-PROTEAN 3 Cell («Bio-Rad», США). Гели окрашивали 0,22%-ным Кумасси G-250 («Serva», Германия).

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Препараты помещали на сетки с углеродным покрытием. Образцы инкубировали 1 мин при 20 °С, промывали дистиллированной водой в течение 30 с, контрастировали 2%-ным уранилацетатом в течение 10–30 с, снова промывали дистиллированной водой и высушивали. Образцы исследовали в просвечивающем

электронном микроскопе JEM-1400 («JEOL», Япония) при увеличении в 60 000 раз.

Эксперимент и анализ данных МУРР. Исследование структуры образцов ВТМ и их реполимеров с помощью малоуглового рассеяния синхротронного излучения проводили на синхротроне PetraIII (DESY, Гамбург) на линии P12. Линия P12 оснащена оборудованием для автоматической смены образцов и двумерным детектором Pilatus 2M («DECTRIS», Швейцария). Интенсивность рассеяния $I(s)$ измеряли в области значений волновых векторов $0,003 < s < 0,5 \text{ \AA}^{-1}$, где $s = (4\pi \sin\theta)/\lambda \leq 2\pi/d$ – модуль вектора рассеяния; 2θ – угол рассеяния; $\lambda = 1,24 \text{ \AA}$ – длина волны [21]; d – размер рассеивающих неоднородностей, период структуры. Измерения проводили при температуре $10 \text{ }^\circ\text{C}$, за 1 с регистрировали 20 отдельных кривых рассеяния для каждого образца с целью отслеживания возможного радиационного повреждения. Первичную обработку данных проводили с помощью программы PRIMUS [22]. Чтобы учесть концентрационную зависимость, анализировали препарат вируса и белка при нескольких различных концентрациях в диапазоне 2,0–7,0 мг/мл. Программу MASSHA [23] использовали для моделирования структур вириона и реполимера, программу CRY SOL [24] – для расчета кривых рассеяния моделей атомного разрешения и определения их радиусов инерции (R_g).

Размеры в кристаллографической модели (PDB: 1EI7) четырехслойного дискового агрегата измеряли с помощью инструментов программы RasMol (<http://www.rasmol.org/>). Для сравнения модельных структур реполимера с реальной структурой в растворе использовали усредненную величину относительных отклонений (\bar{O})

максимумов интенсивности вектора рассеяния s_m^i модели от экспериментальных величин s_{exp}^i : $\bar{O} = 1/n \times \sum (|s_m^i - s_{exp}^i| / s_{exp}^i)$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электронно-микроскопический анализ препаратов. Белок оболочки, выделенный из ВТМ, способен легко самоассоциироваться в определенных условиях в 20S-диски, которые при дальнейшей инкубации трансформируются в стабильные реполимеры, так называемые «стопки дисков» [13, 14, 25]. На первом этапе мы изучили структуру и длину образованных частиц с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Результаты ПЭМ с негативным контрастом показали, что полученные разными методами препараты реполимеров содержали гетерогенные по длине поперечно исчерченные палочковидные частицы (рис. 1, а, б). Распределение частиц по размерам (рис. 1, б) показывает, что основная объемная доля в препарате приходится на частицы длиной 300–800 Å (~70% от всех частиц). На рис. 1 видно, что фрагмент длиной 400 Å содержит ~15–16 колец «стопки» ($15,5 \pm 0,5$), что соответствует ранее полученным данным ПЭМ [8, 9, 14] (рис. 1, врезка), и осевая периодичность структуры реполимера составляет ($26,0 \pm 0,9$) Å. Таким образом, сформированные «стопки дисков» содержали 6–16 20S-дисков. Кроме того, в образце можно видеть также кластеры латерально связанных реполимеров.

В следующей части работы с помощью синхротронного МУРР мы охарактеризовали структуру в растворе и выполнили моделирование вирионов и реполимеров белка оболочки ВТМ.

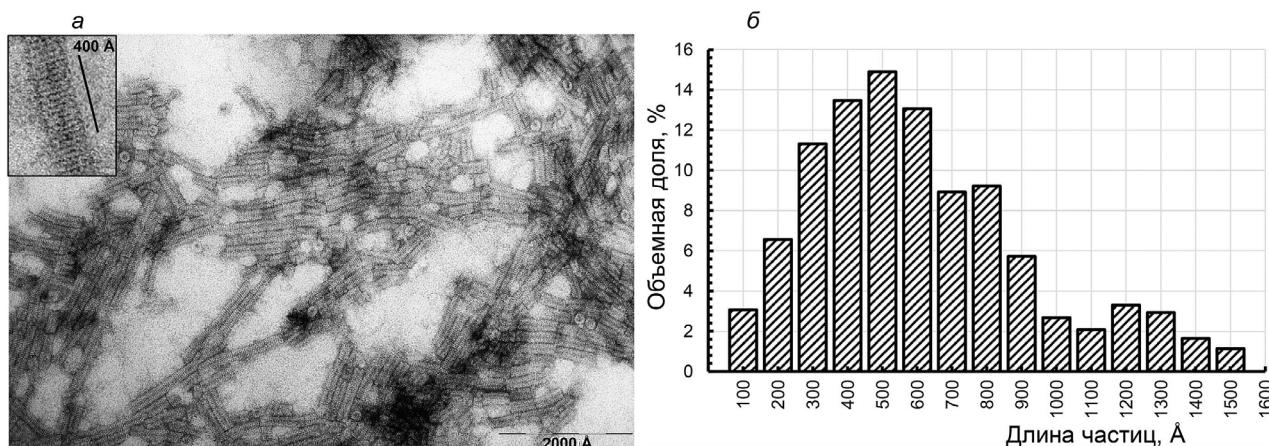


Рис. 1. Электронно-микроскопический анализ препаратов реполимеров ВТМ (а) и распределение по размерам частиц (б). Измерена длина ~250 частиц. Препараты получали из белка ВТМ, выделенного литиевым методом [17]. ПЭМ (JEM-1011, «JEOL», Япония), контрастирование 2%-ным уранилацетатом. Увеличение $\times 60\,000$ (а) и $\times 150\,000$ (врезка)

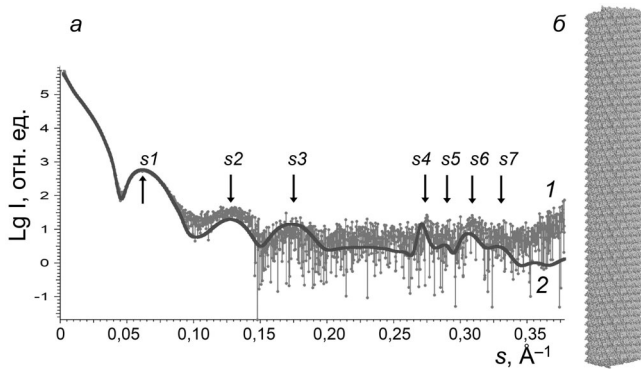


Рис. 2. Экспериментальные и модельные кривые МУРП (а), модельная структура вириона ВТМ (б); 1 – экспериментальные данные, приведенные к нулевой концентрации; 2 – рассеяние, рассчитанное с помощью программы CRY SOL, модельной структуры вириона, смоделированной с помощью программы MASSHA

Структурное моделирование вирионов ВТМ в растворе. Были получены профили рассеяния от образцов вирионов ВТМ с концентрацией 3–6 мг/мл. В качестве структурного элемента для моделирования вириона была выбрана структура PDB: 2OM3 с разрешением 4,4 \AA , полученная методом криоэлектронной микроскопии и содержащая фрагмент со спиральной симметрией из трех витков [26]. Затем этот фрагмент был воспроизведен 16 раз вдоль винтовой оси для построения модели вириона (длина ~ 1200 \AA , 784 субъединицы). Рассчитанная кривая рассеяния модели вириона с использованием программы CRY SOL [24] (рис. 2, кривая 2) коррелирует с экспериментальными данными по всем пикам и минимумам кривой рассеяния на интервале вектора рассеяния $0,03 < s < 0,35$ (рис. 2, кривая 1).

Для более точного сравнения в табл. 1 сопоставили величины вектора рассеяния s и размера рассеивающих неоднородностей d для всех семи пиков ($s1$ – $s7$) экспериментальной и модельной кривых. Анализ табл. 1 показывает, что некоторые максимумы интенсивности вектора рассеяния s хорошо соответствуют известным размерам в вирионе, например, $d4$ (линейный размер 22,9 \AA) равен длине шага спирали 22,9 \AA ,

измеренной методом рентгеновской дифракции ориентированных волокон [2].

Структурное моделирование реполимеров белка ВТМ в растворе. По данным ПЭМ, препараты реполимеров белка ВТМ содержали смесь гетерогенных по длине частиц с повторяющимися элементами структуры. Профили рассеяния от препаратов «стопок дисков» из белка ВТМ, выделенного разными методами [17, 18], практически совпадали (отклонение $< 0,2\%$ максимумов векторов рассеяния $s1$ – $s6$) на всем интервале измерения (рис. 3, врезка), и в дальнейшем мы приводим данные МУРП для реполимеров белка, полученного литиевым методом.

В качестве структурного элемента для построения модели вначале была выбрана кристаллографическая структура PDB: 1E17, состоящая из двух сложенных парных колец БА по 17 субъединиц белка в каждом [12]. Нижнее и верхнее кольцо обозначали символом Б, а центральные кольца – символом А. Структурный элемент БААБ был размножен посредством пространственной трансформации. Профиль интенсивности рассеяния структуры (БААБ) $_8$ значительно отличался от профиля, полученного в эксперименте (рис. 3, а, б; табл. 2).

В дальнейшем для моделирования реполимеров ВТМ использовали две другие модели на основе пары колец кристаллографической модели (PDB: 1E17): 1) нижняя пара колец (БА; рис. 3, з) или 2) центральная пара (АА; рис. 3, е). Эти элементы были размножены посредством пространственной трансформации с поворотом каждого элемента на $6,35^\circ$ в соответствии с данными структуры PDB: 1E17. В результате были получены модели структур «стопок дисков» в виде полых цилиндров, содержащих по 16 двухслойных дисков. Данные модели содержали 544 субъединицы и имели размер длинной оси ~ 820 \AA . Обе модели – (БА) $_{16}$ и (АА) $_{16}$ – имели неплохую корреляцию между экспериментальными данными $I_{\text{exp}}(s)$ и теоретическими кривыми рассеяния, рассчитанными для этих моделей. Положения максимумов интенсивности на кривых рассеяния ($s1$ – $s6$) могут быть использо-

Таблица 1. Сравнение характеристик рассеяния вирионов ВТМ в растворе с рассеянием от модели вириона

Вирион ВТМ*	$s1$	$d1$	$s2$	$d2$	$s3$	$d3$	$s4$	$d4$	$s5$	$d5$	$s6$	$d6$	$s7$	$d7$
Эксперимент	0,062	101	0,129	48,7	0,175	36,0	0,274	22,9	0,290	21,6	0,309	20,4	0,330	19,0
Модель	0,062	101	0,129	48,7	0,175	36,0	0,271	23,2	0,288	21,9	0,306	20,6	0,330	19,0
Costa, 2016**	0,062	101	0,130	48,7	0,175	35,9	0,275	23,2	0,294	21,8	0,311	20,5	0,336	19,0

* Использовали модель PDB: 2OM3; s (\AA^{-1}) – модуль вектора рассеяния; $d = 2\pi/s$ (\AA) – период структуры, размер рассеивающих неоднородностей.

** Экспериментальные данные, приведенные в статье Costa et al. [29].

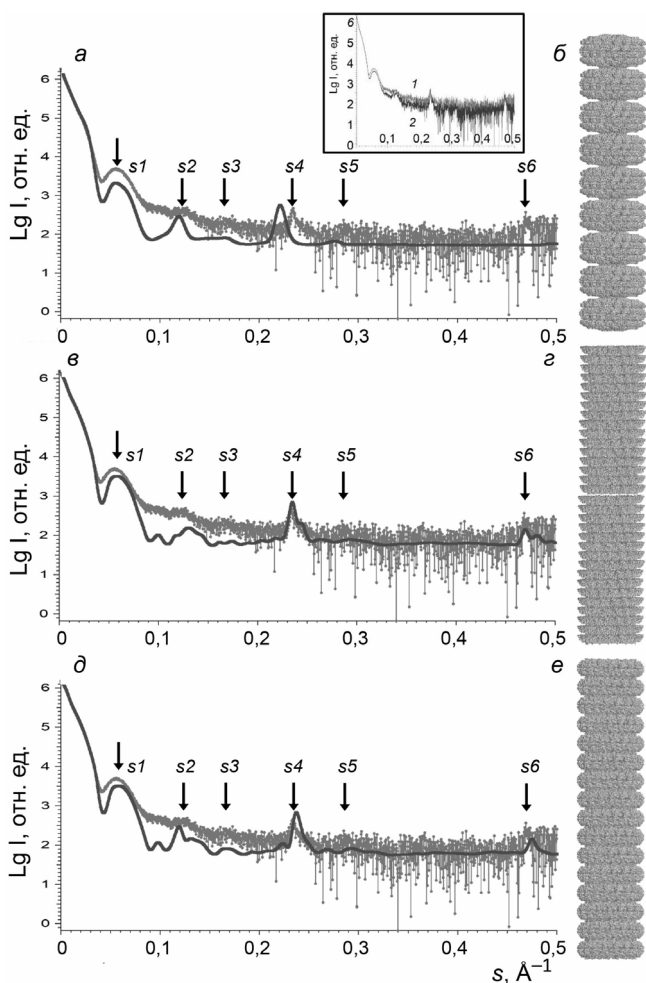


Рис. 3. Малоугловое рентгеновское рассеяние реполимеров ВТМ в виде «стопок дисков»; *a, в, д* – экспериментальные и рассчитанные данные МУРР от модельных структур (*б, з, е*). Рассеяние рассчитывали с помощью программы CRY SOL. Модели структур – (БААБ)₈ (*б*), (БА)₁₆ (*з*) и (АА)₁₆ (*е*) – были получены в программе MASSHA. Экспериментальные данные показаны точками, рассеяние моделей – сплошными линиями. Стрелки указывают на максимумы интенсивности векторов рассеяния. Врезка – кривые МУРР для препаратов реполимера из белка оболочки, полученного литиевым (кривая 1) или ацетатным (кривая 2) методом

ваны в качестве специфической характеристики образцов. Для количественной оценки сходства моделей реполимеров с реальной структурой в растворе использовали усредненную величину относительных отклонений максимумов интенсивности вектора рассеяния s_m^i модели от экспериментальных величин: $\bar{O} = 1/n \times \sum (|s_m^i - s_{\text{exp}}^i| / s_{\text{exp}}^i)$. Наименьшая величина \bar{O} оказалась у модели (АА)₁₆ ($\bar{O} = 0,02 \pm 0,01$), что указывало на наилучшее сходство с реальной структурой в растворе в сравнении с другими моделями – (БА)₁₆ ($\bar{O} = 0,03 \pm 0,01$) или (БААБ)₈ ($\bar{O} = 0,04 \pm 0,01$). Однако ни одна из модельных кривых

полностью не совпала с экспериментальной кривой.

Влияние длины модельных реполимеров на расчетные кривые МУРР. Чтобы оценить влияние длины реполимера на кривые рассеяния, мы рассчитали с помощью программы CRY SOL [24] характеристики ряда смоделированных структур: А, (АА)₁, (АА)₂, (АА)₄, (АА)₈, (АА)₁₆ кристаллической модели PDB: 1E17 [12], где А – одно кольцо из 17 субъединиц белка (рис. 4).

На кривых рассеяния моделей кольца А и диска (АА)₁ полностью отсутствуют брэгговские максимумы (рис. 4, кривые 1 и 2), тогда как в моделях реполимера (АА)₂ и (АА)₄ интенсивность рассеяния возрастает в положениях угловых векторов *s*₁, *s*₄ и *s*₅ (кривые 3, 4). В моделях реполимера (АА)₈ и (АА)₁₆ интенсивность рассеяния значительно увеличивается в положениях угловых векторов *s*₂, *s*₄ и *s*₆ (кривые 5, 6), которые соответствуют рассеивающим размерам в препарате реполимера: *d*₂ = 51 Å, *d*₄ = 26,9 Å и *d*₆ = 13,4 Å (табл. 2). Размер *d*₄ близок к определенной нами методом ПЭМ величине осевой периодичности колец реполимера (26,0 ± 0,9 Å). Удвоенная величина (52 Å) соответствует периодичности дисков в реполимерах и близка к рассеивающему размеру *d*₂. Определенная методом рентгеновской дифракции ориентированных волокон Франклин и Коммонером [7], эта величина составляла 53 Å. В табл. 3 приведены расчетные инварианты (молекулярные массы *M*_r и радиусы инерции *R*_g) для этих моделей и препарата реполимера. Величины *R*_g для моделей от 1 до 32 колец в реполимере находились в диапазоне 64,2–253,4 Å. Инварианты для модели (АА)₁₆ оказались близки к значениям препарата реполимера в растворе.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Современные методы интерпретации данных синхротронного МУРР вместе с комплементарным методом электронной микроскопии позволили нам в данной работе провести детальный структурный анализ образцов реполимеров белка оболочки ВТМ в форме «стопок дисков». По данным МУРР можно определять в многокомпонентном растворе молекулярную архитектуру белков [27] и белков с гибкими неструктурированными фрагментами [28]. Новые подходы к анализу данных МУРР позволяют получать информацию о четвертичной структуре биологических объектов. Метод способен визуализировать структуру исследуемых объектов в широком диапазоне размеров в зависимости от энергии рентгеновского излучения и анализируемого углового диапазона, который соответствует

Таблица 2. Сравнение характеристик рассеяния реполимеров ВТМ в растворе с рассеянием от моделей

Препарат	<i>s</i> 1	<i>d</i> 1	<i>s</i> 2	<i>d</i> 2	<i>s</i> 3	<i>d</i> 3	<i>s</i> 4	<i>d</i> 4	<i>s</i> 5	<i>d</i> 5	<i>s</i> 6	<i>d</i> 6
		0,054	114	0,124	51,0	0,168	37,4	0,234	26,9	0,287	21,90	0,47
Модель (БААБ) ₈ *	0,057	110	0,119	53,0	0,168	37,4	0,221	28,5	0,278	22,60	–	–
Модель (БА) ₁₆	0,058	108	0,130	48,0	0,177	35,6	0,236	26,7	0,290	21,60	0,47	13,4
Модель (АА) ₁₆	0,058	109	0,119	52,7	0,168	37,4	0,237	26,5	0,290	21,60	0,48	13,2

* Использовали кристаллографическую структуру PDB: 1E17; величины *s* (Å⁻¹) и *d* (Å) – как в табл. 1. Препарат реполимера был получен литиевым методом.

определяемому размеру частиц ~10–2100 Å. Поскольку длинная ось вириона ВТМ составляет ~3000 Å, 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. 2), что может быть связано с низкой точностью определения МУРР размеров менее 15 Å или некоторым различием структур трехвиткового фрагмента (PDB: 2OM3) и аналогичного элемента вириона в растворе. Недавно в работе Costa et al. [29] методом МУРР был измерен препарат вирионов ВТМ на малоугловой линии BM29 (ESRF, Гренобль, $\lambda = 0,99 \text{ \AA}$) и получена кривая рассеяния вириона при концентрации вируса в 4 раза выше используемой нами (26 мг/мл). Из табл. 1 видно, что величины *s* и *d* хорошо совпадают с данными нашей работы (относительное отклонение не превышает 1,5%). Приближение геометрических моделей было выполнено авторами с использованием программы Genfit [30]. С помощью трехцилиндровой модели вириона им удалось воспроизвести лишь первые два максимума пиков *s*1 и *s*2 из семи на экспериментальной кривой рассеяния.

Ранее в работе Hiragi et al. [31] методом МУРР изучали препарат агрегатов белка ВТМ, сформированных в растворе с pH 7,2, ионной силе 0,1–0,2 М при температуре 15–25 °С на малоугловой линии («Photon Factory», Япония; $\lambda = 1,49 \text{ \AA}$). Приближение было выполнено авторами с использованием цилиндрической модели 20S-диска с наружным и внутренним диаметрами 180 и 40 Å соответственно, с двумя слоями толщиной 23 Å, с радиусом инерции R_g , равным 66,5 Å. Препарат оказался в значительной степени полидисперсным, содержащим в основном двух-, четырехслойные агрегаты и небольшое количество более длинных агрегатов. Радиус инерции образца увеличивался с ростом ионной силы, температуры и концентрации и достигал 85,6 Å в 100 мМ фосфатном буфере при 25 °С и 12 мг/мл, что близко к нашей модели реполимера (АА)₄ с R_g , равным 88,7 Å (табл. 3).

В последующей работе 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 [32]. Кинетику образования спиральных «завитков», возможных интермедиатов сборки ВТМ, и длинных спиральных реполимеров в кислой среде изучали в работе Potschka et al. [33] на линии DORIS-I (DESY, Гамбург; $\lambda = 1,50 \text{ \AA}$).

В настоящей работе с помощью МУРР впервые охарактеризована структура в растворе и выполнено моделирование кривой МУРР во всем измеряемом диапазоне для вирионов и реполимеров ВТМ. По данным ПЭМ, препарат реполимеров содержал набор длинных и гетерогенных по длине частиц в виде «стопок дисков» (рис. 1). Основная часть частиц препарата включала 6–16 20S-дисков. Измеренные величины усредненного радиуса инерции $R_g = 244,1 \text{ \AA}$ и молекулярного веса $M_r = 8308 \text{ кДа}$ оказались близкими к модели (АА)₁₆: $R_g = 253,4 \text{ \AA}$ и $M_r = 9505 \text{ кДа}$ (табл. 3).

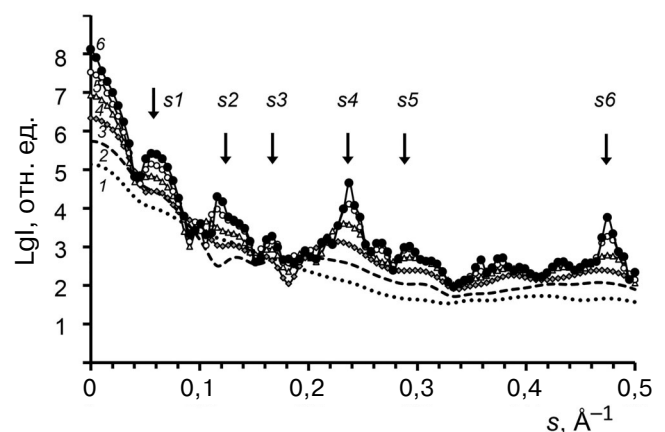


Рис. 4. Модельные кривые МУРР. Расчет модельных интенсивностей проводили с помощью программы CRY SOL [24] для ряда моделей: А, (АА)₁, (АА)₂, (АА)₄, (АА)₈, (АА)₁₆, кривые 1–6 соответственно. Стрелки указывают на максимумы интенсивности векторов рассеяния (см. рис. 3, кривая 1)

Таблица 3. Сравнение инвариант модельных структур и препарата реполимера ВТМ

Инварианты	Модели «стопок дисков»*						Образец реполимер
	A	(AA) ₁	(AA) ₂	(AA) ₄	(AA) ₈	(AA) ₁₆	
$M_{r\text{aa}}$, кДа	297,5	595	1190	2380	4760	9520	–
$M_{r\text{Crys}}$, кДа	297,0	594	1188	2376	4752	9505	8308
R_g , Å	64,2	65,5	70,8	88,7	138,4	253,4	244,1

* Величины молекулярных масс ($M_{r\text{Crys}}$) и радиусов инерции (R_g) для ряда смоделированных структур: A, (AA)₁, (AA)₂, (AA)₄, (AA)₈, (AA)₁₆ – рассчитывали с помощью программы CRY SOL [24], используя кристаллографическую структуру PDB: 1E17; величины $M_{r\text{aa}}$ – из данных аминокислотной последовательности.

Ранее с помощью криоэлектронной микроскопии «стопок дисков» белка ВТМ было показано, что их структура подобна ассоциату двух центральных колец закристиализованного четырехслойного агрегата, определен размер толщины одного кольца 26,8 Å [10, 11], что близко к определенной нами величине периода структуры $d_4 = 26,9$ Å реполимера (табл. 2).

Причиной низкой корреляции модельных и экспериментальных кривых МУРР может быть различие в длинах используемой модели (AA)₁₆ (~820 Å) и частиц в препарате реполимера (300–800 Å). На рис. 4 хорошо видно, что увеличение длины частиц приводит к возрастанию интенсивности пиков s_2 , s_4 и s_6 , соответствующих упаковке дисков в структуре реполимера. Различная гидратация 20S-дисков в кристалле и растворе реполимера также может быть одной из причин несовпадения данных. Франклин и Коммонер [7] обнаружили значительную гидратацию дисков в растворе и уменьшение размера осевой периодичности в «стопках дисков» с 53 до 43 Å при удалении воды в препаратах. Можно предположить также, что атомарные структуры белка в кристаллической модели PDB: 1E17 несколько отличаются от их структуры реполимера в растворе. Это различие в структуре может быть причиной необычной стабильности реполимера ВТМ в растворе и объяснять связывание некоторых красителей, характерное для амилоидов [13, 14].

Одним из преимуществ МУРР является возможность характеристики всех частиц в раство-

ре при условиях, близких к физиологическим, тогда как более трудоемкий метод рентгеноструктурного анализа позволяет определять структуру в кристалле, а с помощью криоэлектронной микроскопии можно проанализировать выборку замороженных частиц. Нами впервые были охарактеризованы структуры в растворе и выполнено структурное моделирование по данным МУРР во всем измеряемом диапазоне для вирионов и реполимеров белка оболочки ВТМ. Ряд максимумов интенсивности на кривых рассеяния соотнесен с реальными элементами четвертичной структуры (периодичность структуры, шаг спирали в вирионе), и наилучшее совпадение с экспериментальными данными оказалось у модели реполимера из повторяющихся 20S-дисков центральной пары колец кристаллической модели PDB: 1E17.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (18-04-00525a) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 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. Caspar, D.L., and Namba, K. (1990) Switching in the self-assembly of tobacco mosaic virus, *Adv. Biophys.*, **26**, 157–185, doi: 10.1016/0065-227x(90)90011-h.
2. Kendall, A., McDonald, M., and Stubbs, G. (2007) Precise determination of the helical repeat of tobacco mosaic virus, *Virology*, **369**, 226–227, doi: 10.1016/j.virol.2007.08.013.
3. 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**, 537–550, doi: 10.1098/rstb.1999.0405.
4. Bloomer, A.C., Champness, J.N., Bricogne, G., Staden, R., and Klug, A. (1978) Protein disk of tobacco mosaic virus at

- 2.8 Å resolution showing the interactions within and between subunits, *Nature*, **276**, 362–368, doi: 10.1038/276362a0.
5. Klug, A. (1999) The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **354**, 531–535, doi: 10.1098/rstb.1999.0404.
 6. Butler, P.J. (1984) The current picture of the structure and assembly of tobacco mosaic virus, *J. Gen. Virol.*, **65** (Pt 2), 253–279, doi: 10.1099/0022-1317-65-2-253.
 7. Franklin, R.E., and Commoner, B. (1955) Abnormal protein associated with tobacco mosaic virus; X-ray diffraction by an abnormal protein (B8) associated with tobacco mosaic virus, *Nature*, **175**, 1076–1077, doi: 10.1038/1751076a0.
 8. Unwin, P.N., and Klug, A. (1974) Electron microscopy of the stacked disk aggregate of tobacco mosaic virus protein. I. Three-dimensional image reconstruction, *J. Mol. Biol.*, **87**, 641–656, doi: 10.1016/0022-2836(74)90075-8.
 9. Dore, I., Ruhlmann, C., Oudet, P., Cahoon, M., Caspar, D.L., and Van Regenmortel, M.H. (1990) Polarity of binding of monoclonal antibodies to tobacco mosaic virus rods and stacked disks, *Virology*, **176**, 25–29, doi: 10.1016/0042-6822(90)90226-h.
 10. Diaz-Avalos, R., and Caspar, D.L. (1998) Structure of the stacked disk aggregate of tobacco mosaic virus protein, *Biophys. J.*, **74**, 595–603, doi: 10.1016/S0006-3495(98)77818-X.
 11. Diaz-Avalos, R., and Caspar, D.L. (2000) Hyperstable stacked-disk structure of tobacco mosaic virus protein: electron cryomicroscopy image reconstruction related to atomic models, *J. Mol. Biol.*, **297**, 67–72, doi: 10.1006/jmbi.1999.3481.
 12. Bhyravbhatha, B., Watowich, S.J., and Caspar, D.L. (1998) Refined atomic model of the four-layer aggregate of the tobacco mosaic virus coat protein at 2.4-Å resolution, *Biophys. J.*, **74**, 604–615, doi: 10.1016/S0006-3495(98)77819-1.
 13. Raghavendra, K., Adams, M.L., and 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**, 3298–3304, doi: 10.1021/bi00334a034.
 14. Raghavendra, K., Salunke, D.M., Caspar, D.L., and Schuster, T.M. (1986) Disk aggregates of tobacco mosaic virus protein in solution: electron microscopy observations, *Biochemistry*, **25**, 6276–6279, doi: 10.1021/bi00368a066.
 15. Ksenofontov, A.L., Dobrov, E.N., Fedorova, N.V., Arutyunyan, A.M., Golanikov, A.E., Jarvekul, L., and Shtykova, E.V. (2018) Structure of potato virus A coat protein particles and their dissociation, *Molecular Biology*, **52**, 913–921, doi: 10.1134/S0026893318060109.
 16. 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.
 17. Goodman, R.M. (1975) Reconstitution of potato virus X *in vitro*. I. Properties of the dissociated protein structural subunits, *Virology*, **68**, 287–298, doi: 10.1016/0042-6822(75)90272-x.
 18. Fraenkel-Conrat, H. (1957) Degradation of tobacco mosaic virus with acetic acid, *Virology*, **4**, 1–4, doi: 10.1016/0042-6822(57)90038-7.
 19. Ksenofontov, A.L., Kozlovskii, V.S., Kordiukova, L.V., Radiukhin, V.A., Timofeeva, A.V., and Dobrov, E.N. (2006) Determination of concentration and aggregate size in influenza virus preparations from true UV absorption spectra, *Molecular Biology*, **40**, 152–158.
 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. 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.
 22. 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.
 23. 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. Crystallogr.*, **34**, 527–532, doi: 10.1107/S0021889801006100.
 24. Svergun, D., Barberato, C., and Koch, M.H. (1995) CRYSOLE – a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *J. Appl. Crystallogr.*, **28**, 768–773, doi: 10.1107/S0021889895007047.
 25. Durham, A.C., Finch, J.T., and Klug, A. (1971) States of aggregation of tobacco mosaic virus protein, *Nat. New Biol.*, **229**, 37–42, doi: 10.1038/newbio229037a0.
 26. Sachse, C., Chen, J.Z., Coureux, P.D., Stroupe, M.E., Fandrich, M., and Grigorieff, N. (2007) High-resolution electron microscopy of helical specimens: a fresh look at tobacco mosaic virus, *J. Mol. Biol.*, **371**, 812–835, doi: 10.1016/j.jmb.2007.05.088.
 27. Blanchet, C.E., and Svergun, D.I. (2013) Small-angle X-ray scattering on biological macromolecules and nanocomposites in solution, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **64**, 37–54, doi: 10.1146/annurev-physchem-040412-110132.
 28. Shtykova, E.V., Baratova, L.A., Fedorova, N.V., Radyukhin, V.A., Ksenofontov, A.L., Volkov, V.V., Shishkov, A.V., Dolgov, A.A., Shilova, L.A., Batishchev, O.V., Jeffries, C.M., and Svergun, D.I. (2013) Structural analysis of influenza A virus matrix protein M1 and its self-assemblies at low pH, *PLoS One*, **8**, e82431, doi: 10.1371/journal.pone.0082431.
 29. Costa, L., Andriatis, A., Brennich, M., Teulon, J.M., Chen, S.W., Pellequer, J.L., and 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**, 18, doi: 10.1186/s12900-016-0068-2.
 30. Spinozzi, F., Ferrero, C., Ortore, M.G., Antolinos, A.D., and Mariani, P. (2014) GENFIT: software for the analysis of small-angle X-ray and neutron scattering data of macromolecules in solution, *J. Appl. Crystallogr.*, **47**, 1132–1139, doi: 10.1107/S1600576714005147.
 31. Hiragi, Y., Inoue, H., Sano, Y., Kajiwarra, K., Ueki, T., Kataoka, M., Tagawa, H., Izumi, Y., Muroga, Y., and 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**, 129–140, doi: 10.1016/0022-2836(88)90604-3.
 32. Sano, Y., Inoue, H., and 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**, 801–805, doi: 10.1023/a:1020689720082.
 33. Potschka, M., Koch, M.H., Adams, M.L., and Schuster, T.M. (1988) Time-resolved solution X-ray scattering of tobacco mosaic virus coat protein: kinetics and structure of intermediates, *Biochemistry*, **27**, 8481–8491, doi: 10.1021/bi00422a028.

CHARACTERIZATION OF TOBACCO MOSAIC VIRUS VIRIONS AND REPOLYMERIZED COAT PROTEIN AGGREGATES IN SOLUTION BY SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING*

A. L. Ksenofontov^{1**}, M. V. Petukhov^{2,3}, A. N. Prusov¹, N. V. Fedorova¹, 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, Federal Scientific Research Centre «Crystallography and Photonics», Russian Academy of Sciences, 119333 Moscow, Russia; E-mail: shtykova@ns.crys.ras.ru*

³ *Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia; E-mail: maxim@embl-hamburg.de*

Received November 7, 2019

Revised December 20, 2019

Accepted December 22, 2019

The structure of tobacco mosaic virus (TMV) virions and stacked disk aggregates of TMV coat protein (CP) in solution was analyzed by synchrotron-based small-angle X-ray scattering (SAXS) and negative contrast transmission electron microscopy (TEM). TMV CP aggregates had a unique stability but did not have helical symmetry. According to the TEM data, they were stacked disks associated into transversely striated rod-shaped structures 300 to 800 Å long. According to modeling based on the crystallographic model of the 4-layer TMV CP aggregate (PDB: 1E17), the stacked disks represented hollow cylinders. The calculated SAXS pattern for the disks was compared to the experimental one over the entire measured range. The best correlation with the SAXS data was found for the model with the repeating central pair of discs; the SAXS curves for the stacked disks were virtually identical irrespectively of the protein isolation method. The positions of maxima on the scatter curves could be used as characteristic features of the studied samples; some of the peaks were assigned to the existing elements of the quaternary structure (periodicity of aggregate structure, virion helix pitch). Low-resolution structural data for the repolymerized TMV CP aggregates in solution under conditions similar to natural were produced for the first time. Analysis of such nano-size objects is essential for their application in biomedicine and biotechnology.

Keywords: TMV, coat protein, stacked disk aggregates, virions, small-angle X-ray scattering