УДК 578.32;578.865;539.26

## СТРУКТУРА ВИРИОНОВ А-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ ПО ДАННЫМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ И КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ МЕТОДОВ\*

# © 2021 Э.В. Штыкова<sup>1</sup>, М.В. Петухов<sup>1</sup>, Н.В. Федорова<sup>2</sup>, А.М. Арутюнян<sup>2</sup>, Е.В. Скурат<sup>3</sup>, Л.В. Кордюкова<sup>2</sup>, А.В. Моисеенко<sup>3</sup>, А.Л. Ксенофонтов<sup>2\*\*</sup>

<sup>1</sup> Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова Федерального научно-исследовательского центра «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук, 119333 Москва, Россия; электронная почта: shtykova@ns.crys.ras.ru

<sup>2</sup> НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: ksenofon@belozersky.msu.ru

> <sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия

> > Поступила в редакцию 26.08.2020 После доработки 27.09.2020 Принята к публикации 27.09.2020

Белки оболочки вирионов А-вируса картофеля содержат на своей поверхности частично неупорядоченные N-концевые домены, структурные и функциональные характеристики которых важны для понимания механизма инфицирования растений этим вирусом. В настоящей работе исследованы свойства и строение интактных А-вирусов картофеля и частично деградированных трипсином вирионов (АВК∆32) с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния и комплементарных методов. Было показано, что при удалении 32 N-концевых аминокислот белка оболочки вирион не разрушается и остается компактным, но изменяется шаг спиральной упаковки его белковой оболочки. Для определения природы этих изменений по данным малоуглового рентгеновского рассеяния, было проведено ab initio, в том числе многофазное, моделирование геометрическими телами (спиралями) и восстановление структуры А-вируса картофеля в растворе с использованием доступных структур атомного разрешения, схожего с белками оболочки А-вируса картофеля – белка потивируса У-вируса картофеля. В результате впервые была получена структура низкого разрешения нитевидного А-вируса картофеля, интактного и частично деградированного, в условиях, близких к естественным. Дополнительные исследования показали, что спектры кругового дихроизма в дальнем УФ образцов А-вируса картофеля и ABKΔ32 значительно различались по амплитуде и по положению основного отрицательного максимума. Степень термической денатурации данных образцов в диапазоне температур 20-55 °C также была различной. Данные просвечивающей электронной микроскопии показали, что вирионы АВКЛЗ2 представляли собой преимущественно палочковидные частицы, в отличие от гибких, характерных для интактного вируса, что хорошо коррелирует с результатами малоуглового рассеяния. В целом, проведенный структурный анализ свидетельствует о значении N-концевых доменов белка оболочки для выполнения жизненно важных функций А-вируса картофеля, что следует учитывать для выработки стратегии по борьбе с этими растительными патогенами.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** потивирусы, белок оболочки, А-вирус картофеля, *N*-концевые неупорядоченные домены, малоугловое рентгеновское рассеяние, структурное моделирование. **DOI:** 10.31857/S0320972521020111

#### введение

Потивирусы представляют собой экономически важную группу вирусов растений, приносящих значительный урон сельскому хозяйству. Гибкие нитевидные вирионы потивирусов имеют спиральную симметрию со средней длиной частиц 700 нм и диаметром 11–14 нм. С помощью различных предсказательных и экспериментальных подходов было обнаружено, что белок оболочки (БО) А-вируса картофеля (АВК), типичного представителя потивирусов, имел значительное содержание неупорядоченных участков [1]. Позднее методом криоэлектрон-

\*\* Адресат для корреспонденции.

Принятые сокращения: ABK – А-вирус картофеля; БО – белок оболочки; МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия.

<sup>\*</sup> Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/ biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM20-293, 11.01.2021.

ной микроскопии это было прямо подтверждено для других представителей потивирусов: вируса мозаики арбуза (ВМА) [2], У-вируса картофеля (YBK) [3] и вируса мозаики турнепса (ВМТу) [4]. Было показано, что неупорядоченные фрагменты *N*-концевых доменов БО потивирусов расположены на поверхности вирионов и взаимодействуют с соседними субъединицами. В настоящее время общепринята концепция, что неструктурированные области белковой молекулы играют ключевую роль в различных биохимических процессах [5]. Ранее мы наблюдали участие *N*-доменов белка АВК в процессе сборки вирусоподобных частиц (ВПЧ): было показано, что субъединицы этого белка не существуют в индивидуальном виде в растворе, а часть его неупорядоченных сегментов трансформируется в β-структуры [6, 7]. Мягкая трипсиновая обработка интактных вирионов потивирусов приводит к образованию устойчивых деградированных частиц, лишенных *N*-концевого домена [8]. Для прояснения роли *N*-доменов потивирусов в ряде работ изучали процесс сборки ВПЧ из укороченных мутантных БО. Обнаружили, что для некоторых представителей потивирусов удаление 20-50 *N*-концевых остатков препятствовало процессу сборки ВПЧ [9, 10], тогда как для белка ҮВК этого не происходит [3]. В то же время у БО вируса гравировки табака (ВГТ) сборка нарушалась лишь при удалении 120 аминокислотных остатков [11]. Показана также роль *N*-доменов потивирусов в межклеточном транспорте вирионов и в процессе переноса их тлями [10].

В настоящее время отсутствует структура АВК высокого разрешения. В данной работе мы впервые детально охарактеризовали структуру вириона АВК, выполнив моделирование интактных и деградированных трипсином вирионов по данным синхротронного малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). Этот структурный метод с разрешением порядка 1-2 нм, то есть метод низкого разрешения, используется для изучения строения биологических макромолекул в растворе, в условиях близких к естественным [12]. В последние десятилетия МУРР активно развивался благодаря появлению новых методов анализа и интерпретации данных малоуглового рассеяния и компьютерного моделирования структуры [13]. Ранее нами с помощью МУРР были охарактеризованы вирусоподобные частицы АВК, собранные из выделенного свободного белка, и изучена их структура и диссоциация в различных водно-солевых растворах [7, 8]. Недавно данным методом мы исследовали и определили структуры с низким разрешением палочковидного спирального ви-

риона вируса табачной мозаики (ВТМ) и стабильных реполимеров БО ВТМ, так называемых «стопок дисков» [14]. В настоящей работе обнаруженные нами различия в структурных характеристиках интактных АВК и частично деградированных вирионов ABK∆32 были соотнесены с найденными различиями их оптических свойств. Полученные результаты свидетельствуют не только о значении *N*-концевых доменов БО для выполнения жизненно важных функций АВК, но могут также способствовать выработке стратегии по борьбе с вирусными заболеваниями растений, поскольку разупорядоченная *N*-концевая область белка оболочки является возможной мишенью для дезактивации вируса.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение препаратов интактных и деградированных вирионов АВК. Изолят В11 вириона АВК очищен, как описано ранее [8]. Коротко, молодые растения N. benthamiana были заражены препаратом вируса АВК. На 18-21 день после заражения листья с вирусными симптомами были гомогенизированы в блендере Waring в трех объемах 50 мМ фосфатного буфера рН 7,8 с добавлением 0,01%-ного β-меркаптоэтанола. После низкоскоростного центрифугирования (НСЦ) (8 000 g, 8 °C, 20 мин) супернатант перемешивали в течение 1 ч при 4 °С с Тритоном Х-100 (1% по объему); после НСЦ к супернатанту добавляли 1/5 объема хлороформа. Водную фазу отделяли НСЦ в тех же условиях. К смеси добавляли полиэтиленгликоль 6000 до 5% с добавлением 1,2% NaCl, смесь перемешивали при температуре 4 °C в течение 1,5 ч. Осадок осаждали с помощью НСЦ (12 000 g, 8 °С, 20 мин). Осадок, содержащий вирус, растворяли в 50 мМ фосфатном буфере рН 7,8 с добавлением 0,1 мМ фенилметилсульфонил фторида. Далее препарат подвергали высокоскоростному центрифугированию на ультрацентрифуге (100 000 g, 5 °C, 1,5 ч). Осадок вируса ресуспендировали в 50 мМ фосфатном буфере при pH 7,8.

Для получения деградированных вирионов ABKΔ32 препарат интактного вируса обрабатывали трипсином в соотношении фермент/ субстрат 1 : 500, 15 мин инкубировали при комнатной температуре, для остановки реакции добавляли фенилметилсульфонил фторид до концентрации 1 мМ. Контроль чистоты образцов осуществляли с помощью электрофореза с додецилсульфатом натрия (SDS) по методу Лэммли [15], используя 15%-ный полиакриламидный гель (ПААГ) в Mini-PROTEAN 3 Cell («Bio-Rad», США). Гели окрашивали 0,22%-ным Кумасси G-250 («Serva», Германия).

Определение концентрации препаратов. Концентрацию определяли на спектрофотометре UV-2600 («Ніtachi», Япония), используя спектры поглощения в УФ-диапазоне 240—340 нм. В связи с большим вкладом рассеяния в поглощение вирионов (30—40%), истинные спектры поглощения (Е) суспензий частиц вычисляли по методу экстраполяции [16] в области 320—338 нм. Коэффициенты поглощения препаратов вируса принимали равными  $E_{20,1\%}^{20,1\%} = 2,4$ .

Измерение спектров кругового дихроизма. Спектры кругового дихроизма (КД) измеряли в 5 мМ фосфатном буфере рН 7,8 при 20 °С 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 диапазоне 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  $[\Theta]$  ( $[\Theta] = 3 \ 300 \times \Delta \epsilon$ ).  $\Delta \epsilon$  – Молярный коэффициент дихроичного поглощения для препаратов белка, рассчитывали на моль аминокислотных остатков. Расчет проводили по формуле  $\Delta \varepsilon = \Delta D / (c \times l)$ , где  $\Delta D$  – измеренная величина дихроизма, с – концентрация белка (в молях аминокислотных остатков), *l* – длина оптического пути в сантиметрах. Среднюю молярную массу аминокислотного остатка принимали равной 110 г/моль. Для термического анализа каждый препарат нагревали в кюветном отделении дихрографа от 20 до 70 °C со скоростью 1 °C в минуту. Регистрацию каждого нового спектра начинали после увеличения температуры на 5 °С. Измеренные спектры обрабатывали как описано выше.

Просвечивающая электронная микроскопия. Исследования проводились с помощью электронного микроскопа JEM-2100, 200 кВ («JEOL», Япония), оснащенного источником электронов LaB6 на оборудовании Уникальной научной установки «3D-ЭМС» МГУ (идентификатор RFMEFI61919X0014). Снимки были сделаны с помощью CCD-камеры Gatan Ultrascan 1000XP 2k («Gatan», США) при параллельном освещении и расфокусировке в диапазоне 1–2 мкм. Изображения были получены и обработаны с помощью программного обеспечения Gatan DigitalMicrograph.

Эксперимент и анализ данных МУРР. Исследования структуры белка с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния были проведены на синхротроне Petra III («DESY», Германия) на линии P12. Эта линия оснащена оборудованием для автоматической смены образцов и двумерным детектором Pilatus 2M («DECTRIS», Швейцария). Интенсивность рассеяния I(s) была измерена в области значений волновых векторов 0,08 < s < 7 нм<sup>-1</sup>, где  $s = (4\pi sin\theta)/\lambda$  – вектор рассеяния,  $2\theta$  – угол рассеяния,  $\lambda = 0,124$  нм – длина волны излучения [17]. Для каждого образца было снято по 50 экспериментальных кривых рассеяния для контроля возможных радиационных повреждений. Радиационного повреждения обнаружено не было.

Измерения проводили в 15 мМ фосфатном буфере рН 7,8 с 0,05 М NaCl при температуре 10 °C при нескольких различных концентрациях в диапазоне 2,0–5,0 мг/мл для учета возможной концентрационной зависимости. Зависимость кривых МУРР от концентрации измеряемых образцов не наблюдалась.

Первичная обработка кривых рассеяния была проведена с использованием программы PRIMUS [18]. С помощью этой программы было проведено усреднение экспериментальных кривых рассеяния от образцов и соответствующего буфера, с последующим вычитанием рассеяния буфера из кривых образцов МУРР. Далее для структурного анализа и моделирования использовалась наиболее информативная часть малоугловых кривых в интервале волновых векторов 0,08 < s < 2,7 нм<sup>-1</sup>.

Оценка неоднозначности восстановления формы для заданного профиля рассеяния проводилась с помощью программы AMBIMETER [19].

Анализ брэгговских пиков на кривых малоуглового рассеяния выполняли с помощью программы PEAK [18]. Размер области кристалличности L определялся из полуширины максимума интенсивности первого брэгговского пика в угол  $2\theta_1$ :

$$L = \frac{\lambda}{\beta_s \cos \theta_1},\tag{1}$$

и степень разупорядочения в образце  $\Delta/d_1$  определялась как:

$$\Delta/d_1 = \frac{1}{\pi} \cdot \sqrt{\frac{\beta_s \cdot d_1}{\lambda}}, \qquad (2)$$

где  $d_1 = 2\pi/s_1$  — период структуры, межплоскостное расстояние,  $\beta_s$  — полная ширина на полувысоте максимума интенсивности рассеяния (в радианах), наблюдаемого на угле рассеяния  $2\theta_1$ , соответствующего волновому вектору  $s_1$ , а  $\Delta$  среднеквадратичное отклонение от расстояния

между ближайшими регулярно упакованными структурными мотивами.

Для построения функций распределения по расстояниям p(r), которые необходимы для восстановления формы вириона в растворе по данным МУРР, использовалась компьютерная программа GNOM [20]. Функции распределения по расстояниям p(r) определяются с помощью косвенного Фурье-преобразования интенсивности рассеяния в соответствии с интегральным уравнением:

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty sr I(s) \sin(sr) ds, \qquad (3)$$

где I(s) — интенсивность рассеяния, при этом максимальный размер частицы ( $D_{max}$ ) находится из условия p(r) = 0 при  $r > D_{max}$ .

Аb initio метод восстановления формы низкого разрешения вириона ABK и был реализован с помощью программы DAMMIN [21], которая использует алгоритм имитации отжига путем минимизации невязки  $\chi^2$  с экспериментальными данными

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_j \left[ \frac{l_{\exp}(s_j) - c_{l_{calc}}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right]^2, \tag{4}$$

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

В более универсальном подходе *ab initio* модель вируса была получена путем одновременного построения как общей формы, так и структуры отдельных компонентов вириона (белок и РНК). Построение двухкомпонентной (двухфазной) модели проводилось путем приближения кривой МУРР от вирусной частицы с использованием программы MONSA [21]. Программа представляет частицу как коллекцию N >> 1 плотно упакованных шариков внутри объема поиска, заданного пользователем. Для описания общей и внутренней структуры сложной частицы каждый шарик может быть назначен либо принадлежащим растворителю (индекс = 0), либо одной из компонент (в нашем случае индекс = 1 соответствует белку оболочки, индекс = 2 соответствует вирусной РНК). Комплекс между белком и РНК поэтому представлен в низком разрешении двумя «фазами», а структура описывается строкой длиной N, содержащей фазовый индекс для каждого шарика (0, 1 или 2).

Моделирование жесткими телами структуры вирионов ABK проводилось с помощью программы MASSHA [22]. Единичным элементом

БИОХИМИЯ том 86 вып. 2 2021

моделирования служил фрагмент YBK $\Delta$ 43 Y-вируса картофеля (PDB ID: 6HXX), поскольку первичная последовательность БО ABK и YBK имеют значительное сходство — 64% идентичных и 91% подобных аминокислотных остатков (со схожими физико-химическими свойствами), за исключением *N*-концевых фрагментов. Теоретическая интенсивность рассеяния построенных моделей рассчитывалась программой CRYSOL [23].

Выравнивание аминокислотных последовательностей. Выравнивание последовательностей представителей рода потивирусов выполнено на сервере Expasy с использованием алгоритма LALIGN [24]. Количественную оценку сходства последовательностей проводили попарным выравниванием структуры «коровой части» без *N*-концевых 30–32 остатков.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Электрофоретической анализ препаратов. Белок оболочки ABK обладает аномально низкой электрофоретической подвижностью [1], соответствующей примерно 35 кДа (рис. 1, дорожки 2-4), в то время как его молекулярная масса (*M*) составляет 30,4 кДа. Возможным объяснением этого феномена является наличие в структуре белка неупорядоченных сегментов. Мягкая обработка трипсином интактных вирионов (в соотношении фермент/субстрат 1 : 500, 15 мин инкубации) приводила к исчезновению полосы исходного белка, и основная доля частиц в этом случае (около 95% общей массы) приходилась



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

на полосу с  $M \sim 27$  кДа (рис. 1, дорожки 5 и 6), что по своему значению соответствует молекулярной массе БО с укороченными N-концевыми фрагментами. Недавно с помощью массспектроскопии было показано почти полное исчезновение пика m/z = 30,4 кДа (исходный БО) и появление мажорного пика 27,12 кДа, соответствующего белку без 32 N-концевых остатков (ABK $\Delta$ 32) [8]. То есть деградированный трипсином белок ABK $\Delta$ 32 относительно контрольных белков действительно имеет электрофоретическую подвижность, соответствующую молекулярной массе вириона с укороченными N-последовательностями, что косвенным образом подтверждает их удаление.

Анализ вторичной структуры вирионов по КД-спектрам. Изменения во вторичной структуре белка оболочки АВК после обработки трипсином отслеживались по спектрам кругового дихроизма. Спектр КД препарата интактных вирионов АВК в дальнем УФ характеризуется отрицательным максимумом [0]<sub>max</sub> при 203 нм (рис. 2, а, кривая 2), хотя известно, что для большинства растительных вирусов этот максимум расположен ~208 нм. Предположительно, эта аномалия объясняется необычно высоким содержанием разупорядоченных фрагментов в БО [1]. Насколько нам известно, АВК – это единственный растительный вирус с таким смещением главного отрицательного максимума КД-спектра в дальнем УФ-спектре. В препарате деградированных трипсином вирионов ABK∆32 мы обнаружили некоторое смещение отрицательного максимума  $[\theta]_{max}$  в сторону к 205 нм, и интенсивность этого максимума была значительно ниже, чем в спектре интактных вирионов (-10 600° и -25 000° соответственно). Предположительно, с удалением *N*-доменов в БО ABK $\Delta$ 32 снижается содержание неупорядоченных сегментов (рис. 2, *a*, кривая *I*).

Степень термической денатурации также различалась для интактного и деградированного трипсином вирионов ABK (рис. 2,  $\delta$ ). Ранее было показано, что плавление интактных вирионов АВК происходит при температуре Т<sub>пл</sub>≈ 55 °С [1]. В данной работе следили за изменением интенсивности отрицательных максимумов [θ]<sub>max</sub> при нагревании. Для препаратов АВК в диапазоне 20-55 °С наблюдали постепенный рост интенсивности [ $\theta$ ]<sub>max</sub> до -45 000° и -29 600° у интактного и деградированного АВК $\Delta$ 32 соответственно (рис. 2, б). Вероятно, белок оболочки АВКАЗ2 денатурировал при нагревании в меньшей степени, и вирусные частицы были более упорядоченными, чем интактные вирионы.

Анализ данных МУРР и структурное моделирование. Экспериментальные кривые малоуглового рассеяния от интактных вирионов и от деградированных трипсином вирионов АВК $\Delta$ 32, представленные на рис. 3 (кривые *1* и *2* соответственно), характеризуются двумя основными особенностями: во-первых, хорошо выраженной зависимостью рассеяния от формы вирионов и, во-вторых, присутствием на каждой кривой малоуглового рассеяния брэгговского пика в области *s* от 1,5 до 2,0 нм<sup>-1</sup>.

Форма вирионов определяется по начальной части кривых МУРР на интервале волновых векторов *s* от 0,08 до 1,25  $\text{нм}^{-1}$ . В этой области



**Рис. 2.** a — Спектры кругового дихроизма препаратов, деградированных трипсином (1) и интактных (2) вирионов ABK;  $\delta$  — термическая денатурация препаратов ABK, деградированных трипсином (1) и интактных (2), по данным КД-спектров. Приведена температурная зависимость интенсивности отрицательных максимумов [ $\theta$ ]<sub>max</sub>



**Рис. 3.** a — Экспериментальные кривые МУРР от интактных (1) и деградированных АВК $\Delta$ 32 (2) вирионов;  $\delta$  — графики Кратки для интактных (1) и деградированных АВК $\Delta$ 32 (2) вирионов

положение минимума ( $s_{min} = 0,61 \pm 0,01 \text{ нм}^{-1}$ ) и максимума ( $s_{max} = 0,81 \pm 0,01 \text{ нм}^{-1}$ ) обеих кривых совпадает, что свидетельствует о схожести форм интактных вирионов и вирионов АВК $\Delta 32$ . Однако для интактных вирионов кривая МУРР несколько более сглажена, то есть минимум и максимум менее выражены по сравнению с кривой рассеяния от АВК $\Delta 32$ . Это объясняется влиянием на кривые МУРР структурного полиморфизма и/или большей полидисперсностью интактных вирионов [25].

В самых малых углах, на интервале волновых векторов *s* от 0,08 до 0,25 нм<sup>-1</sup>, также наблюдается некоторое расхождение кривых МУРР: интактные вирионы имеют несколько большую амплитуду интенсивности рассеяния, что говорит о большем количестве рассеивающего вещества и косвенно подтверждает наличие *N*-концевых доменов в БО интактных вирионов и отсутствие таковых у ABK $\Delta$ 32. И, наконец, важным отличием профилей рассеяния является различное положение брэгговских пиков на кривых МУРР от ABK и от ABK $\Delta$ 32 (рис. 3). Появление брэгговских пиков свидетельствует об определенном упорядочении в образце. Поскольку рассеяние Брэгга характерно для кристаллов, упорядоченные области называются квази-кристаллическими, и их структурные характеристики определяются из уравнений (1) и (2) (см. «Материалы и методы»). Рассчитанные по этим уравнениям период структуры  $d = 2\pi/s$ , размеры области кристалличности *L* и степень разупорядочения в образце  $\Delta/d$  представлены в таблице.

Из таблицы следует, что вирион с 32 удаленными аминокислотными остатками, ABK $\Delta$ 32, заметно более структурирован: у него больший размер упорядоченных областей *L* и меньшая степень разупорядочения  $\Delta/d$ . Для анализа структуры также важно, что период *d*, то есть расстояние между периодически повторяющимися элементами структуры, уменьшился на 0,5 нм при удалении 32 аминокислотных остатков из *N*-концевых доменов БО. Эти изменения относятся к малым, межмолекулярным размерам, то есть к изменениям внутри белковой обо-

Образецs, нм^{-1}d, нмL, нм $\Delta/d$ , нмИнтактный вирион $1,60 \pm 0,02$  $3,92 \pm 0,02$  $125 \pm 10$  $0,06 \pm 0,01$ ABK $\Delta 32$  $1,86 \pm 0,01$  $3,37 \pm 0,01$  $180 \pm 5$  $0,04 \pm 0,01$ 

Структурные характеристики интактных вирионов и вирионов АВКΔ32

лочки, и не могут быть интерпретированы как взаимодействие между самими вирионами, например, при образовании упорядоченных кластеров этих крупных частиц. В этом случае период системы *d* был бы не меньше диаметра вирионов даже при самой плотной упаковке. Кроме того, при измерении МУРР не наблюдались ни концентрационные зависимости, ни появление пика структурного фактора в самых малых углах, что подтверждает отсутствие межчастичного взаимодействия и формирования кластеров [26].

О том, что при удалении N-концевых доменов БО не происходит разрушение вириона и в основном сохраняется внешняя форма, но имеют место внутренние перестройки в белковой оболочке, свидетельствуют также кривые МУРР в координатах Кратки (рис. 3,  $\delta$ ). Они демонстрируют почти полное совпадение профилей рассеяния и имеют характерный колоколообразный вид, что указывает на компактность и структурированность образцов в целом [12], и в то же время из-за сдвига брэгговских пиков эти кривые отражают различия в квази-кристаллической структуре, то есть изменения на молекулярном уровне.

Определить форму вирионов ABK и ABK $\Delta$ 32 с разрешением 1–2 нм можно, используя *ab initio* протокол и программу DAMMIN [21]. Построенные с этой целью функции распределения по расстояниям *p*(*r*) представлены на рис. 4, *б*.

Поскольку известно, что вирионы АВК представляют собой длинные гибкие нити,

функции распределения по расстояниям p(r)были рассчитаны, во-первых, для *ab initio* определения формы вирионов в целом, а во-вторых, для анализа размеров их поперечного сечения. Последнее необходимо в связи с возможным изменением диаметра нитей при удалении 32 аминокислот из *N*-концевой области БО, предположительно находящихся на внешней поверхности вириона. Режим анализа поперечного сечения для удлиненных частиц доступен в качестве одной из опций программы GNOM [20].

Как видно из рис. 4, б, функции распределения по расстояниям p(r), отражающие общую форму вирионов, характерны для удлиненных рассеивающих объектов с поперечным сечением порядка 10-16 нм [27]. Более точный анализ распределения по размерам поперечного сечения (рис. 4, б, вставка) показывает, что максимальный размер поперечного сечения интактного вириона может достигать 18 нм, в то время как для АВК∆32 он не превышает 16 нм. Максимум p(r) для ABK расположен на R = 6 нм, то есть в основном диаметр интактного вириона равен 12 нм, а для ABK $\Delta$ 32 R = 5,4 нм и, таким образом, диаметр вириона действительно становится несколько меньше после удаления 32 *N*-концевых аминокислот.

Восстановленные с помощью программы DAMMIN структуры низкого разрешения ABK и ABKΔ32 представлены на рис. 4, *в*, пронумерованы *1* и *2* соответственно. Поскольку вирионы представляют собой длинные цилиндры (нити), поиск решений проводился в цилиндричес-



**Рис. 4.** *а* — Экспериментальные кривые рассеяния (*1* и *5*); кривые, рассчитанные программой GNOM от функций распределения по расстояниям *p*(*r*) (*2* и *6*); кривые рассеяния от форм, восстановленных *ab initio* программой DAMMIN (*3* и *7*); кривые рассеяния от форм, восстановленных *ab initio* программой MONSA (*4* и *8*) для ABK и ABK $\Delta$ 32 соответственно. Группы кривых рассеяния для ABK и ABK $\Delta$ 32 смещены по вертикали для лучшей визуализации; *б* — функции распределения по расстояниям для ABK (*1*) и ABK $\Delta$ 32 (*2*). Вставка: функции распределения по расстояниям *p*(*r*) в режиме анализа поперечного сечения для ABK (*1*) и ABK $\Delta$ 32 (*2*); *в* — восстановленные программой DAMMIN формы вирионов ABK (*1*) и ABK $\Delta$ 32 (*2*); *в* — восстановленные программой DAMMIN формы вирионов ABK (*1*) и ABK $\Delta$ 32 (*2*); *в* — восстановленные программой DAMMIN формы вирионов ABK (*1*) и ABK $\Delta$ 32 (*2*); *в* — восстановленные программой DAMMIN формы вирионов ABK (*1*) и ABK $\Delta$ 32 (*2*); *в* — восстановленные программой DAMMIN формы вирионов ABK (*1*) и ABK $\Delta$ 32 (*2*); *в* — восстановленные программой DAMMIN формы вирионов ABK (*1*) и ABK $\Delta$ 32 (*2*); *в* — восстановленные программой DAMMIN формы вирионов ABK (*1*) и ABK $\Delta$ 32 (*2*); *в* — восстановленные программой DAMMIN формы вирионов ABK (*1*) и ABK $\Delta$ 32 (*2*); *в* — восстановленные программой DAMMIN формы вирионов ABK (*1*) и ABK $\Delta$ 32 (*2*); *в* — восстановленные программой DAMMIN формы вирионов АВК (*1*) и ABK $\Delta$ 32 (*2*); *в* — восстановленные программой DAMMIN формы вирионов АВК (*1*) и ABK $\Delta$ 32 (*2*); *в* — восстановленные программой DAMMIN формы вирионов АВК (*1*) и ABK $\Delta$ 32 (*2*); *в* = восстановленные программой DAMMIN формы вирионов АВК (*1*) и АВК $\Delta$ 32 (*2*); *в* = восстановленные программой DAMMIN формы вирионов АВК (*1*) и ABK $\Delta$ 32 (*2*); *в* = восстановленные программой DAMMIN формы вирионов АВК (*1*) и АВК $\Delta$ 32 (*2*); *в* = восстановленные программой DAMMIN формы вирионов АВК (*1*) и АВК $\Delta$ 32 (*2*); *в* = восстановленные програми и с айте https://sciencejournal

кой области с длиной цилиндров  $D_{max} = 105$  нм (рис. 4,  $\delta$ , основная панель) и диаметрами, полученными при анализе размеров поперечного сечения нитей вирионов (рис. 4,  $\delta$ , вставка). Кривые рассеяния от моделей (рис. 4, a, кривые 3 и 7) демонстрируют хорошее совпадение с экспериментальными данными с  $\chi^2 = 2,3$  для ABK и 1,8 – для частично деградированного вириона. В структуре ABK $\Delta$ 32 заметна определенная периодичность, в то время как интактный вирион менее упорядочен, и на его общую форму оказывает существенное влияние гибкость нитей.

В более универсальном подходе, *ab initio* модель вируса была получена путем одновременного построения как общей формы, так и структуры отдельных компонентов вируса, то есть белка и РНК. Двухфазная модель, разграничивающая белковую и РНК-части, была построена программой MONSA [21]. В качестве объема поиска были использованы два цилиндра. Первый, для моделирования РНК, представлял собой внутренний сплошной цилиндр с радиусом 3,2 нм и длиной 105 нм как для АВК, так и для частично деградированного вириона. Второй цилиндр являлся объемом поиска для восстановления структуры белковой оболочки и был полым и внешним по отношению к первому цилиндру с внешним радиусом 8,0 нм для интактного вириона и 7,0 нм – для ABK∆32, в соответствии с результатами анализа поперечного сечения. Внутренний радиус второго цилиндра был равен 3,5 нм для обоих вирионов. В процессе моделирования виртуальные атомы (шарики) во внешнем цилиндре могли принимать фазовые индексы 1 и 0 (т.е. белок или растворитель), а во внутреннем 2 и 0 (т.е. РНК или растворитель). Таким образом, была обеспечена разумность модели, где белок оболочки оказывался на внешней поверхности, а РНК в глубине. Построенные двухфазные модели, показанные на рис. 4, г, аппроксимируются искаженными цилиндрами соответствующих размеров и хорошо согласуются с моделями, построенными программой DAMMIN. Искажения полученных форм (неидеальность) свидетельствуют как о влиянии гибкости вирионов, так и о частичной разупорядоченности структуры в целом и белков оболочки в частности. Характерно, что шарики, моделирующие РНК, простираются вдоль всей оси цилиндра, что соответствует известным представлениям о структуре вируса. Двухфазные модели хорошо приближают экспериментальные кривые МУРР (рис. 4, а, кривые 4 и 8) с  $\chi^2 = 3,4$ . Следует отметить, что брэгговские пики в районе s = 1,6 и 1,9 нм<sup>-1</sup> также очень хорошо воспроизведены. Присутствие брэгговских пиков отражает регулярную спиральную упаковку белков оболочки, которая присутствует в полученных моделях. При этом периодичность структуры вирионов более заметна для  $ABK\Delta 32$ .

Поскольку в МУРР решение обратных задач, то есть определение трехмерной структуры рассеивающего объекта по одномерной кривой интенсивности рассеяния, является принципиально неоднозначным, необходима оценка ширины коридора возможных решений. Это производится с помощью программы AMBIME-TER [19]. Этот инструмент быстро определяет степень неоднозначности произвольного профиля рассеяния от монодисперсного раствора однородных частиц и основан на обширной библиотеке диаграмм рассеяния от каркасов формы (шаблонов), задающих многообразие топологий структуры частиц низкого разрешения. Количество шаблонов, похожих на заданные экспериментальные данные МУРР, обеспечивают меру неоднозначности, связанной с этими данными, и логарифм этого значения выражается в виде количественной оценки в программе AMBIMETER. Как правило, оценка ниже 1,5 предполагает, что найдено уникальное, то есть практически единственное решение, а оценка выше 2,5 говорит о неоднозначном восстановлении формы.

В настоящей работе для ABKΔ32 нашлась только одна совместимая топология, что свидетельствует об узком интервале близких форм структур низкого разрешения. В случае с интактным ABK совместимыми оказались 88 каркасов формы, и соответствующая оценка неоднозначности составляет 1,9, что говорит о возможной неоднозначности восстановлении формы этого образца, обусловленной гибкостью интактного вириона.

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

Для того, чтобы проверить правильность этого предположения было проведено моделирование структуры ABK и ABK $\Delta$ 32 геометрическими телами. Для этого были построены шариковые модели спиральных тел, внешние размеры которых определялись из анализа функций распределений по расстояниям p(r). От полу-



**Рис. 5.** Моделирование строения интактного и частично деградированного вирионов: a - экспериментальные кривые МУРР (*1*и 3) и рассеяние от спиральных тел (*2* $и 4) для ABK и ABK<math>\Delta$ 32 соответственно. Стрелками показаны моделируемые брэгговские пики;  $\delta$  – спиральные модели, имитирующие интактный вирион (*1*) и ABK $\Delta$ 32 (*2*)

ченных спиралей были рассчитаны интенсивности малоуглового рассеяния и проведено сравнение с экспериментальными данными МУРР от АВК и АВК $\Delta$ 32 (рис. 5, *a*).

Моделирование геометрическими телами представляет собой метод грубого приближения, который не может учитывать все особенности реальных структур, подвижность и гибкость их отдельных фрагментов, но позволяет построить модели выделенных, особенно важных для анализа элементов. В данном случае требовалось доказать, что брэгговские пики на экспериментальных кривых рассеяния отражают шаг спиральной упаковки белка в оболочке вируса. Для этого расстояние между витками модельных спиралей было задано в соответствии с характеристическим периодом  $d = 2\pi/s$ . то есть d = 3,9 нм для интактного вириона и d = 3,4 нм для частично деградированного (таблица). Толщина нитей спиралей была выбрана равной 3,4 нм в предположении, что эта величина не может быть больше шага спирали для АВКА32. Небольшие изменения в меньшую сторону не влияли на результат моделирования. Как видно из рис. 5, а, максимумы интенсивности рассеяния от модельных структур хорошо описывают брэгговские пики на экспериментальных данных. Отсюда можно сделать вывод, что при удалении 32 аминокислот *N*-концевого домена АВК действительно происходит изменение шага спирали белковой оболочки – спираль сжимается, и вирион в целом становится более жестким и поэтому лучше аппроксимируется цилиндрической формой (рис. 4).

Из полученных результатов можно также сделать предположение о том, что *N*-концевой домен частично расположен между витками спиральной упаковки белка оболочки, осуществляя взаимодействие с соседними белковыми субъединицами и удерживая витки спирали на определенном расстоянии друг от друга. С другой стороны, часть белковой цепи *N*-концевого домена выступает над поверхностью вируса, о чем свидетельствует больший диаметр интактного вириона по сравнению с частично деградированным. Важно отметить, что неструктурированные области белковых молекул являются гибким связующим звеном при взаимодействии между различными белками и другими компонентами клеток [5]. В то же время межклеточный транспорт необходимых веществ для жизнедеятельности растений происходит через плазмодесмы - и через эти же плазмодесмы в клетки могут проникать растительные патогены, несмотря на свои большие размеры. Для этого вирусы избирательно используют, например, некоторые миозины клеток [28]. Поэтому можно предположить, что разупорядоченные, гибкие фрагменты *N*-концевого домена АВК могут служить инструментом связывания с определенными клеточными белками для обеспечения межклеточного транспорта. В таком случае прямое воздействие на эти фрагменты вириона соответствующими агентами может привести к дезактивации патогена.

С другой стороны, большое значение для проникновения вируса в клетки имеет гибкость вириона. Известно, что гибкость возрастает с увеличением длины вирионов в ряду: тобамовирусы (300 нм), потексвирусы (500-1000 нм), клостеровирусы (1400-2000 нм), что облегчает их межклеточный транспорт через плазмодесмы. То есть, чем длиннее вирион, тем более гибким он должен быть для проникновения в клетку. Возможно также, что именно *N*-концевой домен определяет гибкость вирионов. Полученные в данной работе результаты свидетельствуют в пользу такого предположения.

В настоящее время не существует структуры высокого разрешения для ABK, но недавно методом криоэлектронной микроскопии была получена структура с разрешением 3,4 Å БО другого потивируса, YBK, с максимально близкой к БО ABK гомологией [3]. Поэтому нами была предпринята попытка сравнения структуры высокого разрешения YBK со структурой А-вируса картофеля, используя данные малоуглового рассеяния и метод моделирования жесткими телами. Первичные структуры БО ABK и YBK имеют значительное сходство, за исключением *N*-концевых остатков. Программа LALIGN попарным выравниванием первичных структур определяла 64% идентичных и 91% подобных остатков из 237 остатков БО (без 32 *N*-концевых остатков) [24] (рис. 6).

Таким образом, высокая идентичность первичной структуры белков оболочки этих двух вирусов позволила использовать модель с разрешением 3,4 Å БО ҮВК (PDB ID: 6НХХ) для моделирования строения белковой оболочки А-вируса картофеля. БО ҮВК характеризуется спиральной симметрией, а использованный для моделирования фрагмент состоял из 35 белковых субъединиц, включая в себя атомные координаты аминокислот с 44 по 267 остаток, то есть без 43 аминокислотных остатков *N*-концевого домена, атомные координаты которых не были определены из-за низкой электронной плотности этих разупорядоченных фрагментов. Фрагмент ҮВК был многократно воспроизведен с помощью программы MASSHA [22] вдоль винтовой оси для построения модели, содержащей 30 витков (260 субъединиц) с максимальной длиной 105 нм. Число витков подбиралось таким образом, чтобы получить наилучшее соответствие между экспериментальными данными и кривой рассеяния. Сравнение профилей

		10	20	30	40	50	60
PVA	AETLDA	SEALAQKSE	GRKKERESNS	SKAVAVKDKD	VDLGTAGTHS	VPRLKSMTSI	KLTLPM
	*.	.*	*.*. * .	. *.**	***.***.	***.****	**
PVY	GNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIKAITSKMRMPK						
		10	20	30	40	50	
		70	80	90	100	110	120
PVA	LKGKSV	VNLDHLLSY	KPKQVDLSNA	RATHEQFONW	IYDGVMASYEI	EESSMEIIL	<b>IGFMVW</b>
	** .*	.**.*** *	*.*.*.**.	***. ***	***	*. **	**.***
PVY	SKGATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVW						
	60	70	80	90	100	110	
		130	140	150	160	170	180
PVA	CIENGTSPDINGVWTMMDNEEQVSYPLKPMLDHAKPSLRQIMRHFSALAEAYIEMRSREK						
	*****	**.****.	****** *	******	*.**** **	* .******	**
PVY	CIENGTSPNINGVWVMMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKE						
	120	130	140	150	160	170	
		190	200	210	220	230	240
PVA	eq:pympryglognlrdgslary afd fye it attpirake a hlomka a lkn sn tnm fgldgn						
	*****	** *****	********	*.*. **.**	* * * * * * * * * * *	***	****.
PVY	${\tt PYMPRYGLVRNLRDGSLARYAFDFYEVTSRTPVRAREAHIQMKAAALKSAQSRLFGLDGG$						
	180	190	200	210	220	230	
		250	260				
PVA	VTTSEEDTERHTATDVNRNMHHLLGVKGV						
	*.**.****. **** *****						
PVY	ISTQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM						
	240	250	260				

Рис. 6. Выравнивание первичных структур ABK (англ. абб. РVA) и YBK (англ. абб. РVY) с помощью программы LALIGN (Expasy). Звездочками (\*) отмечены идентичные остатки, точками (.) – полуконсервативные замены. Подчеркнуты последовательности, удаленные трипсином (для ABK) или отсутствующие в PDB ID: 6HXX (для YBK). Представлены структуры БО ABK № GI:25013598 и YBK (штамм NTN) № GI:728041063



**Рис. 7.** Результат моделирования строения белковой оболочки А-вируса картофеля с использованием структурных блоков высокого разрешения БО YBK (PDB ID: 6HXX): a - (1) экспериментальная кривая малоуглового рассеяния от ABK $\Delta$ 32; (2) рассчитанный программой CRYSOL профиль рассеяния от полученной структурной модели;  $\delta$  – структурная модель белковой оболочки, имитирующая А-вирус картофеля



**Рис. 8.** Результаты электронной микроскопии интактных (a) и деградированных АВК $\Delta$ 32 ( $\delta$ ) вирионов

экспериментальной и модельной кривых демонстрирует некоторое расхождение кривых рассеяния как в интервале  $0.08 < s < 1.2 \text{ нм}^{-1}$ , так и небольшой сдвиг брэгговского пика с максимумом на  $s = 1.9 \text{ нм}^{-1}$  (d = 3.4 нм) в сторону больших размеров с  $s = 1.8 \text{ нм}^{-1}$  (d = 3.5 нм). Эти отклонения свидетельствуют о различии структур белковых оболочек вирионов ABK и YBK, несмотря на то, что они являются ближайшими гомологами. При этом следует учесть, что полученная модель более близка не к интактному вириону ABK, а к его частично деградирован-

ной форме. Кроме того, расхождение между экспериментальной и модельной кривой  $\chi^2 \sim 25$  (рис. 7) отражает неидеальность реальной структуры этого вириона по сравнению с его жесткой моделью на атомном уровне, не способной изменять свою конформацию. В то же время биологические измерения в малоугловом рассеянии происходят в растворе, где рассеивающие частицы сохраняют свои основные свойства, в том числе гибкость.

Тем не менее полученная модельная форма ABK высокого разрешения показывает несомненное структурное сходство белковых оболочек двух разных потивирусов.

Основной вывод этой части работы состоит в том, что обработка трипсином и частичная деградация ABK привела к изменению шага спиральной упаковки белковой оболочки: после удаления 32 аминокислот расстояние между витками спирали уменьшилось с 3,9 нм до 3,4 нм. Такое сжатие спирали неизбежно должно было привести к изменению гибкости частично деградированного вириона: сжатая пружина всегда значительно более жесткая, чем свободная спираль. Подтверждение этому выводу было найдено с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

Электронно-микроскопический анализ вирионов ABK. Согласно данным ПЭМ, интактные вирионы представляли собой типичные гибкие нитевидные частицы (рис. 8, *a*), тогда как деградированные трипсином вирионы ABK $\Delta$ 32 в основном представляли собой палочковидные частицы с меньшим диаметром (рис. 8, *б*), похожие на «сухие спагетти». С помощью комплекса «Gatan» (DigitalMicrograph software) диаметры этих частиц были измерены и оказались равными 14,4 ± 0,2 нм и 12,1 ± 0,3 нм, для интактных и деградированных вирионов соответственно, что также косвенно указывало на удаление *N*-концевых остатков с поверхности вирионов ABK.

В целом, полученные методом ПЭМ данные хорошо коррелируют с результатами малоуглового рассеяния с учетом разного состояния вирусов при измерениях малоуглового рассеяния и ПЭМ: в МУРР вирионы находятся в растворе, то есть в состоянии, наиболее близком к естественному, в то время как для исследования с помощью электронной микроскопии образцы вирионов были высушены на подложке.

Впервые структура низкого разрешения нитевидного растительного вируса АВК, интактного и частично деградированного, была получена в условиях, близких к естественным. Результаты малоуглового рассеяния показали, что удаление 32 *N*-концевых аминокислот привело к изменению шага спиральной упаковки белковой оболочки. Дополнительные исследования показали, что деградированные трипсином вирионы имели более упорядоченную структуру и представляли собой преимущественно палочковидные частицы меньшего диаметра в сравнении с гибкими частицами интактного вируса, что хорошо коррелировало с результатами МУРР. В целом, проведенный структурный анализ свидетельствует о значении *N*-концевых доменов белка оболочки для выполнения жизненно важных функций АВК, что следует учитывать для выработки стратегии по борьбе с этими растительными патогенами.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00525а) и Министерства науки и высшего образования РФ: в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части проведения экспериментов МУРР; в рамках соглашения №075-15-2019-1653 в части экспериментов ПЭМ.

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

- Ksenofontov, A. L., Paalme, V., Arutyunyan, A. M., Semenyuk, P. I., Fedorova, N. V., et al. (2013) Partially disordered structure in intravirus coat protein of potyvirus potato virus A, *PLoS One*, 8, e67830, doi: 10.1371/journal. pone.0067830.
- Zamora, M., Mendez-Lopez, E., Agirrezabala, X., Cuesta, R., Lavin, J. L., Sanchez-Pina, M. A., Aranda, M. A., and Valle, M. (2017) Potyvirus virion structure shows conserved protein fold and RNA binding site in

БИОХИМИЯ том 86 вып. 2 2021

ssRNA viruses, *Sci. Adv.*, **3**, eaao2182, doi: 10.1126/ sciadv.aao2182.

- Kezar, A., Kavcic, L., Polak, M., Novacek, J., Gutierrez-Aguirre, I., et al. (2019) Structural basis for the multitasking nature of the potato virus Y coat protein, *Sci. Adv.*, 5, eaaw3808, doi: 10.1126/sciadv. aaw3808.
- 4. Cuesta, R., Yuste-Calvo, C., Gil-Carton, D., Sanchez, F., Ponz, F., and Valle, M. (2019) Structure of Turnip mosaic

virus and its viral-like particles, *Sci. Rep.*, **9**, 15396, doi: 10.1038/s41598-019-51823-4.

- Uversky, V. N. (2013) Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, 1834, 932-951, doi: 10.1016/j.bbapap.2012.12.008.
- Ksenofontov, A. L., Parshina, E. Y., Fedorova, N. V., Arutyunyan, A. M., Rumvolt, R., Paalme, V., Baratova, L. A., Jarvekulg, L., and Dobrov, E. N. (2016) Heatinginduced transition of Potyvirus Potato Virus A coat protein into beta-structure, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 34, 250-258, doi: 10.1080/07391102.2015.1022604.
- Ksenofontov, A. L., Dobrov, E. N., Fedorova, N. V., Arutyunyan, A. M., Golanikov, A. E., Järvekülg, L., and Shtykova, E. V. (2018) Structure of Potato Virus A coat protein particles and their dissociation, *Mol. Biol. (Mosk.)*, 52, 1055-1065, doi: 10.1134/S0026898418060101.
- Ksenofontov, A. L., Dobrov, E. N., Fedorova, N. V., Serebryakova, M. V., Prusov, A. N., Baratova, L. A., Paalme, V., Jarvekulg, 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**, 1-11, doi: 10.1080/07391102.2017.1333457.
- Anindya, R., and Savithri, H. S. (2003) Surface-exposed amino- and carboxy-terminal residues are crucial for the initiation of assembly in Pepper vein banding virus: a flexuous rod-shaped virus, *Virology*, **316**, 325-336, doi: 10.1016/s0042-6822(03)00593-2.
- Tatineni, S., McMechan, A. J., and Hein, G. L. (2018) Wheat streak mosaic virus coat protein is a determinant for vector transmission by the wheat curl mite, *Virology*, **514**, 42-49, doi: 10.1016/j.virol.2017.10.018.
- Voloudakis, A. E., Malpica, C. A., Aleman-Verdaguer, M. E., Stark, D. M., Fauquet, C. M., and Beachy, R. N. (2004) Structural characterization of Tobacco etch virus coat protein mutants, *Arch. Virol.*, **149**, 699-712, doi: 10.1007/s00705-003-0247-x.
- 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 Ed., *Oxford University Press*, Oxford, doi: 10.1093/acprof:oso/ 9780199639533.001.0001.
- Franke, D., Petoukhov, M. V., Konarev, P. V., Panjkovich, A., Tuukkanen, A., et al. (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.
- Ksenofontov, A. L., Petoukhov, M. V., Prusov, A. N., Fedorova, N. V., and Shtykova, E. V. (2020) Characterization of tobacco mosaic virus virions and repolymerized coat protein aggregates in solution by small-angle x-ray scattering, *Biochemistry (Mosc.)*, **85**, 310-317, doi: 10.1134/s0006297920030062.
- 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.
- 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 using the true UV-absorption spectra, *Mol. Biol.*, **40**, 152-158, doi: 10.1134/ S0026893306010201.

- Blanchet, C. E., Spilotros, A., Schwemmer, F., Graewert, M. A., Kikhney, A., et al. (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.
- Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., and Svergun, D. I. (2003) PRIMUS: a Windows PCbased system for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Crystallogr.*, 36, 1277-1282, doi: 10.1107/ s0021889803012779.
- Petoukhov, M. V., and Svergun, D. I. (2015) Ambiguity assessment of small-angle scattering curves from monodisperse systems, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 71, 1051-1058, doi: 10.1107/s1399004715002576.
- Svergun, D. I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria, *J. Appl. Crystallogr.*, 25, 495-503, doi: 10.1107/ s0021889892001663.
- Svergun, D. I. (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing, *Biophys. J.*, 76, 2879-2886, doi: 10.1016/S0006-3495(99)77443-6.
- 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.
- Svergun, D., Barberato, C., and Koch, M. H. J. (1995) CRYSOL – a program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *J. Appl. Crystallogr.*, 28, 768-773, doi: 10.1107/ s0021889895007047.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., et al. (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, *Nucleic Acids Res.*, 40, W597-603, doi: 10.1093/nar/gks400.
- 25. Shtykova, E. V. (2015) Shape determination of polydisperse and polymorphic nanoobjects from small-angle X-ray scattering data (computer simulation). *Nanotechnol. Russia*, **10**, 408-419, doi: 10.1134/S1995078015030155.
- Tardieu, A. (1994) Neutron and synchrotron radiation for condensed matter studies. Applications to Soft Condensed Matter and Biology, vol III (Les editions de Physique (France)) (Berlin: Springer) pp 145-160.
- 27. Feigin, L. A., and Svergun, D. I. (1987) Structure analysis by small-angle x-ray and neutron scattering, Plenum Press, New York, p. 335.
- Amari, K., Lerich, A., Schmitt-Keichinger, C., Dolja, V. V., and Ritzenthaler, C. (2011) Tubule-guided cell-to-cell movement of a plant virus requires class XI myosin motors, *PloS Pathog.*, 7, e1002327, doi: 10.1371/journal.ppat. 1002327.

### STRUCTURE OF POTATO VIRUS A VIRIONS ACCORDING TO SMALL ANGLE X-RAY SCATTERING DATA AND COMPLEMENTARY METHODS\*

E. V. Shtykova<sup>1</sup>, M. V. Petukhov<sup>1</sup>, N. V. Fedorova<sup>2</sup>, A. M. Arutyunyan<sup>2</sup>, E. V. Skurat<sup>3</sup>,
L. V. Kordyukova<sup>2</sup>, A. V. Moiseenko<sup>3</sup>, and A. L. Ksenofontov<sup>2\*\*</sup>

<sup>1</sup> Shubnikov Institute of Crystallography of Federal Scientific Research Centre «Crystallography and Photonics», Russian Academy of Sciences, 119333 Moscow, Russia; E-mail: shtykova@ns.crys.ras.ru

<sup>2</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: ksenofon@belozersky.msu.ru

<sup>3</sup> Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Potato virus A (PVA) protein coat contains on its surface partially unstructured N-terminal domain of the viral coat protein (CP), whose structural and functional characteristics are important for understanding the mechanism of plant infection with this virus. In this work, we investigated the properties and the structure of intact PVA and partially trypsinized PVAA32 virions using small-angle X-ray scattering (SAXS) and complimentary methods. It was shown that after the removal of 32 N-terminal amino acids of the CP, the virion did not disintegrate and remained compact, but the helical pitch of the CP packing changed. To determine the nature of these changes, we performed ab initio modeling, including the multiphase procedure, with the geometric bodies (helices) and restoration of the PVA structure in solution using available high-resolution structures of the homologous CP from the PVY potyvirus, based on the SAXS data. As a result, for the first time, a low-resolution structure of the filamentous PVA virus, both intact and partially degraded, was elucidated under conditions close to natural. The far-UV circular dichroism spectra of the PVA and PVA $\Delta$ 32 samples differed significantly in the amplitude and position of the main negative maximum. The extent of thermal denaturation of these samples in the temperature range of 20-55°C was also different. The data of transmission electron microscopy showed that the PVAA32 virions were mostly rod-shaped, in contrast to the flexible filamentous particles typical of the intact virus, which correlated well with the SAXS results. In general, structural analysis indicates an importance of the CP N-terminal domain for the vital functions of PVA, which can be used to develop a strategy for combating this plant pathogen.

Keywords: potyviruses, coat protein, potato virus A, N-terminal disordered domains, small-angle X-ray scattering, structural modeling