

ВИРУСОЛОГИЯ

УДК 578.323

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ ВИРУСОВ С ИКОСАЭДРИЧЕСКИМ И СПИРАЛЬНЫМ ТИПОМ СИММЕТРИИ

Е.А. Трифонова*, Н.А. Никитин, М.В. Архипенко,
Е.К. Донченко, И.Г. Атабеков, О.В. Карпова

Кафедра вирусологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*trifonova@mail.bio.msu.ru

Изучение возможностей модификации и структурной перестройки вирионов и вирусных белков — важная задача современной молекулярной вирусологии. Ранее в нашей лаборатории был разработан метод термической обработки палочковидного вируса табачной мозаики, позволяющий получить структурно модифицированные частицы сферической формы, состоящие из вирусного белка оболочки. Такие частицы обладали уникальными адсорбционными и иммуногенными свойствами и были успешно нами использованы для создания новой кандидатной вакцины против вируса краснухи. Позднее мы продемонстрировали возможность термической перестройки нитевидных вирионов Х-вируса картофеля. Настоящая работа посвящена сравнительному изучению термической перестройки вирусов с различной структурой, относящихся к разным таксономическим группам. Показано образование структурно модифицированных частиц сферической формы при термической обработке палочковидных вирионов со спиральным типом симметрии (вирус мозаики долихоса, вирус штриховатой мозаики ячменя). Выявлена зависимость размеров сферических частиц, образующихся из вируса мозаики долихоса, от исходной концентрации вируса. Изучена возможность термической перестройки нитевидных вирионов и вирусоподобных частиц вируса мозаики альтернантеры. При термической обработке вирусов растений с икосаэдрическим типом симметрии морфологических изменений обнаружено не было.

Ключевые слова: вирусы растений, спиральные вирусы, икосаэдрические вирусы, термическая перестройка вирусов, структурно модифицированные вирусные частицы, сферические частицы

Термическая обработка палочковидных вирионов вируса табачной мозаики (ВТМ, род *Tobamovirus*, семейство *Virgaviridae*) при 94°C приводит к перестройке вирусного белка оболочки (БО) и к формированию структурно модифицированных частиц сферической формы (сферические частицы — СЧ) [1]. СЧ, в отличие от нативного вируса, не содержат вирусную РНК и биodeградируемы. Показано, что СЧ обладают свойствами эффективного адьюванта и способны неспецифически адсорбировать на своей поверхности различные белковые молекулы. Обнаружено, что СЧ могут быть получены из различных форм БО, не содержащих генетический материал вируса, в том числе из препаратов А-белка и мономерной формы БО ВТМ [1–6]. Изменяя исходную концентрацию вирусного препарата, можно получать СЧ с размером от 50 нм до более 1 мкм [1, 6]. СЧ имеют огромный потенциал для разработки новых биотехнологий [7–10]. Недавно на основе СЧ и рекомбинантного антигена вируса краснухи была получена и исследована новая кандидатная вакцина против краснухи [11].

В 2016 г. нами были опубликованы данные, свидетельствующие о возможности термической перестройки другого фитовируса со спиральным типом симметрии (Х-вирус картофеля (ХВК), род *Potexvirus*, семейство *Alphaflexiviridae*) [12]. В отличие от ВТМ, вирионы ХВК — это гибкие нитевидные частицы [13]. Образование СЧ ХВК начинается при температуре 70°C и полностью завершается при 90°C. Таким образом, было показано, что термическая перестройка ХВК требует более низких температур обработки по сравнению с ВТМ. Размеры СЧ ХВК варьируют в диапазоне от 35 до 121 нм и, в отличие от размеров СЧ ВТМ, строго не зависят от начальной концентрации вирусного препарата [12].

В настоящей работе была изучена возможность получения структурно модифицированных частиц при термической перестройке вирионов икосаэдрических и спиральных вирусов, относящихся к различным таксономическим группам. В качестве представителей вирусов с палочковидными вирионами и спиральным типом симметрии были выбраны

вирус мозаики долихоса (вирус кроталирии индийской) (ВМД), представитель рода *Tobamovirus* семейства *Virgaviridae* [14]; вирус штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ), представитель рода *Hordeivirus* семейства *Virgaviridae* [15]. Также были использованы нитевидные вирионы и вирусоподобные частицы вируса мозаики альтернантеры (ВМАлт, представитель рода *Potexvirus* семейства *Alphaflexiviridae*) [16]. Вирусы с икосаэдрическим типом симметрии были представлены вирусом мягкой мозаики фасоли (ВММФ) семейства *Tombusviridae* [17], а также вирусом мозаики цветной капусты (ВМЦК) рода *Caulimavirus* семейства *Caulimaviridae* [18].

Материалы и методы

ВМД, ВШМЯ, ВМАлт, ВММФ и ВМЦК были накоплены в растениях, выделены и очищены, как описано ранее [15–17, 19, 20].

Термическая обработка препаратов проводилась согласно протоколам, разработанным для ВТМ и ХВК при использовании термоциклера Терцик (ДНК-Технология, Россия) [1, 6, 12].

БО ВМАлт был получен с помощью метода солевой депротеинизации в присутствии 2 М LiCl (Amresco, США). Вирусоподобные частицы (ВПЧ) ВМАлт были получены при инкубации в воде высокого качества (Milli-Q, система Simplicity UV, Merck Millipore, США).

Приготовление образцов для электронной микроскопии (ЭМ) проводили в соответствии с ранее описанными методиками [1, 20]. Препараты исследовали с помощью электронных микроскопов JEM-1011 (JEOL, Япония), JEM-1400 (JEOL, Япония) и LEO-912AB (LEO, Германия).

Результаты и обсуждение

Ранее мы показали, что температурная обработка ВТМ и ХВК позволяет получить новый вид уникальных платформ-носителей. Продемонстрированы перспективы применения платформ на основе структурно модифицированных СЧ ВТМ при получении биологически активных комплексов, в частности, кандидатных вакцин и биоконтрастов [10, 11]. В настоящей работе явление термической перестройки было изучено у фитовирусов с различной морфологией вирионов (палочковидные, нитевидные, сферические).

Термическая перестройка вирусов с палочковидными вирионами была изучена на примере ВМД и ВШМЯ. ВМД — родственник ВТМ и, как все представители рода *Tobamovirus*, обладает сходными с ВТМ параметрами спирали и структурой [21]. Однако в отличие от ВТМ, у которого основными хозяевами являются представители семейства *Solanaceae*, ВМД поражает в основном зернобобовые культуры. Палочковидные вирионы ВМД имеют длину 300 нм и диаметр 17 нм (рисунок, А) [14]. Препараты ВМД неоднородны по длине и содержат

короткие вирионы (около 40 нм), несущие в своем составе субгеномные РНК [14, 22]. Данная особенность является важным отличием ВМД от ВТМ. ВШМЯ — типичный представитель рода *Hordeivirus* (рисунок, Г). Ячмень (*Hordeum vulgare*) и пшеница (*Triticum aestivum*) являются природными хозяевами этого вируса. Геном ВШМЯ (штамм ND 18) разделен на 3 молекулы одноцепочечной РНК положительной полярности [23]. Сегменты распределены по разным жестким палочковидным вирусным частицам со спиральным типом симметрии и длиной в диапазоне 110–150 нм. Недавно с помощью криоэлектронной микроскопии было продемонстрировано, что в составе препаратов ВШМЯ присутствуют вирионы с широким (22,4 нм) и узким диаметром (21,6 нм) [15]. Выдвинуто предположение, что такие вирионы являются конформационными формами ВШМЯ. Таким образом, структура ВШМЯ более лабильна и гетерогенна, чем структура представителей рода *Tobamovirus* [15, 24]. Термическую обработку палочковидных вирусов проводили по методике, отработанной ранее для ВТМ [1]. Продемонстрировано, что при термической обработке ВМД (рисунок, Б и В) и ВШМЯ (рисунок, Д и Е) при 94°C образуются СЧ. Как и в случае с ВТМ, процесс образования СЧ из ВМД и ВШМЯ является двухстадийным. На первой стадии при нагревании вируса до 90°C происходит сворачивание вириона с одного или двух концов и образование промежуточной формы (данные не приводятся). Последующее повышение температуры до 94°C приводит к 100%-ному преобразованию промежуточных форм в СЧ. Дальнейшее нагревание препаратов и увеличение температуры инкубации от 94°C до 98°C не приводило к видимым изменениям размеров или морфологии СЧ. При термической обработке ВМД и ВШМЯ при 70°C морфологических изменений вирионов отмечено не было. Таким образом, продемонстрировано, что термическая перестройка не только ВТМ, но и других палочковидных вирусов происходит при 94°C, а не при более низкой температуре, как у нитевидного ХВК (90°C). С помощью ЭМ были проанализированы СЧ, образующиеся при 94°C из препаратов ВМД с концентрацией 0,1, 1 и 10 мг/мл. Полученные микрофотографии были обработаны с помощью программы ImageJ (Национальный институт здоровья, США), которая позволила рассчитать средний диаметр СЧ. У ВМД он составил 60 ± 8 , 310 ± 15 , 690 ± 60 нм для концентраций 0,1, 1 и 10 мг/мл, соответственно. Таким образом, было обнаружено, что размеры СЧ ВМД зависят от исходной концентрации препарата вируса. Полученная зависимость была аналогична зависимости, обнаруженной ранее для ВТМ [1], что можно объяснить их сходными структурными характеристиками. Для ВШМЯ было показано, что из вируса с концентрацией 0,1 мг/мл образуются СЧ ВШМЯ со средним диаметром 265 ± 18 нм, а при концентрации 1 мг/мл образуются СЧ ВШМЯ со

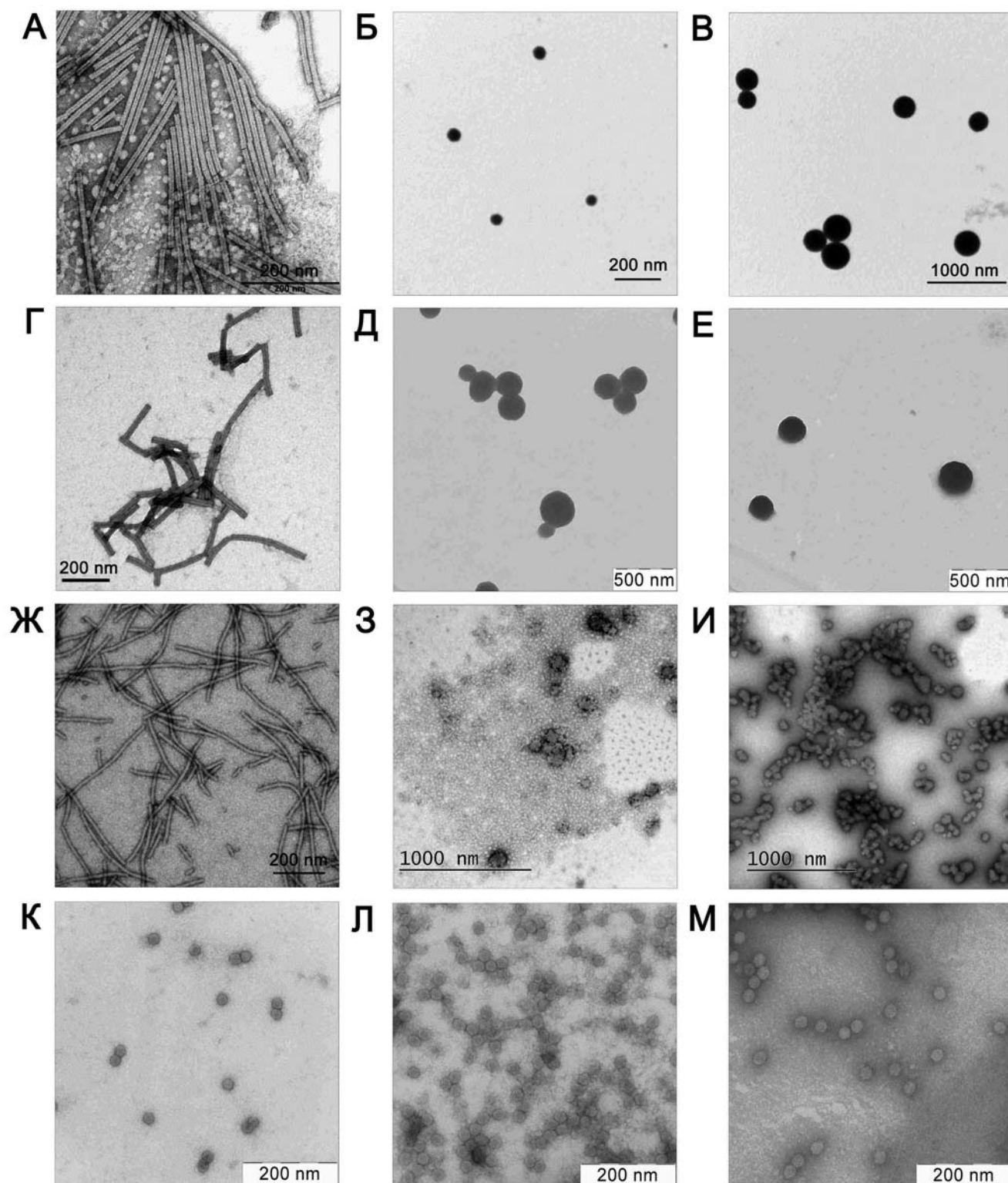


Рисунок. Результаты термической обработки вирусов растений с различной структурой. А – вирус мозаики долихоса (контроль); Б, В – сферические частицы, полученные при нагревании (94°C) препарата вируса мозаики долихоса с исходной концентрацией 0,1 мг/мл и 1 мг/мл. Г – вирус штриховатой мозаики ячменя (контроль). Д, Е – сферические частицы, полученные при нагревании (94°C) препарата вируса штриховатой мозаики ячменя с исходной концентрацией 0,1 мг/мл и 1 мг/мл. Ж – вирусоподобные частицы вируса мозаики альтернантеры (контроль). З, И – сферические частицы, полученные при нагревании (90°C) вирусоподобных частиц вируса мозаики альтернантеры с исходной концентрацией препарата 0,1 мг/мл и 1 мг/мл. К – вирус мягкой мозаики фасоли (контроль). Л, М – вирус мягкой мозаики фасоли, проинкубированный при температуре 98°C в течение 10 или 30 с. Просвечивающая электронная микроскопия, окрашивание 2%-ным уранилацетатом

средним диаметром 280 ± 16 нм. Дальнейшее повышение концентрации ВШМЯ не приводило к значимому увеличению размеров образующихся СЧ. Следовательно, в случае с СЧ ВШМЯ строгая зависимость размеров частиц от исходной концентрации вируса не выявлена. Можно предположить, что это связано с гораздо большей гетерогенностью препарата ВШМЯ по сравнению с ВМД, причем не только по длине, но и по диаметру вирусных частиц.

На следующем этапе работы была исследована возможность термической перестройки вируса с нитевидными вирионами, ВМАльт. ВМАльт – представитель рода *Potexvirus* и родственник ХВК. Вирионы ВМАльт имеют длину 570 нм и диаметр 13 нм [16]. Они по своим свойствам и размерам близки к ХВК, и можно было ожидать, что при их нагревании будут получены частицы, аналогичные СЧ ХВК. К нашему удивлению, при термической денатурации ВМАльт в условиях образования СЧ из ХВК [12] наблюдалось образование структур неправильной формы, склонных к агрегации (данные не представлены). Дальнейшее повышение температуры не приводило к каким-либо изменениям. Ранее в нашей лаборатории было показано, что БО ВМАльт, в отличие от БО ХВК, способен формировать ВПЧ *in vitro* в отсутствие РНК [16]. В настоящей работе для термической обработки были использованы ВПЧ ВМАльт (рисунок, Ж), сходные по длине с нативным вирусом (средняя длина ВПЧ – 500 нм, диаметр 13 нм). При термической

обработке ВПЧ ВМАльт с исходной концентрацией 0,1 и 1 мг/мл происходило образование СЧ с формой, близкой к сферической, и диаметром около 100 нм (рисунок, 3 и И). Зависимости размеров образующихся СЧ от исходной концентрации ВПЧ обнаружено не было.

Возможность термической модификации вирусов с икосаэдрическим типом симметрии была изучена на примере сферических вирионов ВМЦК (ДНК-содержащий вирус) и ВММФ (РНК-содержащий вирус, геном положительной полярности) (рисунок, К). При нагревании препаратов ВММФ до $94-98^\circ\text{C}$ структурная модификация не происходила, вирус сохранял свою морфологию и размеры. Изменение времени прогревания с 10 (рисунок, Л) до 30 с (рисунок, М) также не приводило к изменениям вирионов. Аналогичные результаты были получены для ВМЦК (данные не представлены). Вероятно, БО вируса, организованные в икосаэдр, обладают большей устойчивостью к термической денатурации.

Авторы выражают благодарность д.б.н. С.Н. Чиркову за помощь в получении ВММФ. Работа с ВМД, ВШМЯ, ВМЦК, ВММФ выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-34-00208 мол_а). Исследования термической перестройки ВМАльт, получение вирусоподобных частиц ВМАльт и их термоденатурация выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Atabekov J., Nikitin N., Arkhipenko M., Chirkov S., Karpova O. Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles // J. Gen. Virol. 2011. Vol. 92. N 2. P. 453–456.
2. Nikitin N.A., Malinin A.S., Rakhnyanskaya A.A., Trifonova E.A., Karpova O.V., Yaroslavov A.A., Atabekov J.G. Use of a polycation spacer for noncovalent immobilization of albumin on thermally modified virus particles // Polym. Sci. Ser. A. 2011. Vol. 53. N 11. P. 1026–1031.
3. Karpova O., Nikitin N., Chirkov S., Trifonova E., Sheveleva A., Lazareva E., Atabekov J. Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platform and foreign antigens // J. Gen. Virol. 2012. Vol. 93. N 2. P. 400–407.
4. Dobrov E.N., Nikitin N.A., Trifonova E.A., Parshina E. Yu., Makarov V.V., Maksimov G.V., Karpova O.V., Atabekov J.G. β -structure of the coat protein subunits in spherical particles generated by tobacco mosaic virus thermal denaturation // J. Biomol. Struct. Dyn. 2014. Vol. 32. N 5. P. 701–708.
5. Trifonova E., Nikitin N., Gmyl A., Lazareva E., Karpova O., Atabekov J. Complexes assembled from TMV-derived spherical particles and entire virions of heterogeneous nature // J. Biomol. Struct. Dyn. 2014. Vol. 32. N 8. P. 1193–1201.
6. Trifonova E.A., Nikitin N.A., Kirpichnikov M.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. Obtaining and characterization of spherical particles – new biogenic platforms // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2015. Vol. 70. N. 4. P. 194–197.
7. Atabekov J.G., Nikitin N.A., Karpova O.V. New type of platforms for in vitro vaccine assembly // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2015. Vol. 70. N 4. P. 177–183.
8. Nikitin N., Trifonova E., Karpova O., Atabekov J. Examination of biologically active nanocomplexes by nanoparticle tracking analysis // Microsc. Microanal. 2013. Vol. 19. N 4. P. 808–813.
9. Nikitin N.A., Malinin A.S., Trifonova E.A., Rakhnyanskaya A.A., Yaroslavov A.A., Karpova O.V., Atabekov J.G. Proteins immobilization on the surface of modified plant viral particles coated with hydrophobic polycations // J. Biomat. Sci. Polym. Ed. 2014. Vol. 25. N 16. P. 1743–1754.
10. Bruckman M.A., Czapar A.E., VanMeter A., Randolph L.N., Steinmetz N.F. Tobacco mosaic virus-based protein nanoparticles and nanorods for chemotherapy delivery targeting breast cancer // J. Control. Release. 2016. Vol. 231. P. 103–113.
11. Trifonova E.A., Zenin V.A., Nikitin N.A., Yurkova M.S., Ryabchevskaya E.M., Putlyaev E.V., Donchenko E.K., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Study of rubella candidate vaccine based on a structurally modified plant virus // Antiviral Res. 2017. Vol. 144. P. 27–33.
12. Nikitin N., Ksenofontov A., Trifonova E., Arkhipenko M., Petrova E., Kondakova O., Kirpichnikov M., Atabekov J., Dobrov E., Karpova O. Thermal conversion of filamentous potato virus X into spherical particles with different properties from virions // FEBS Lett. 2016. Vol. 590. N 10. P. 1543–1551.

13. Atabekov J., Dobrov E., Karpova O., Rodionova N. Potato virus X: structure, disassembly and reconstitution // *Mol. Plant Pathol.* 2007. Vol. 8. N 5. P. 667–675.
14. Descriptions of Plant Viruses (DPV) [Электронный ресурс]. 1975. Дата обновления: 08.2013. URL: <http://www.dpvweb.net/> (дата обращения: 16.07.2017).
15. Clare D.K., Pechnikova E.V., Skurat E.V., Makarov V.V., Sokolova O.S., Solovyev A.G., Orlova E.V. Novel inter-subunit contacts in barley stripe mosaic virus revealed by cryo-electron microscopy // *Structure*. 2015. Vol. 23. N 10. P. 1815–1826.
16. Mukhamedzhanova A.A., Smirnov A.A., Arkhipenko M.V., Ivanov P.A., Chirkov S.N., Rodionova N.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. Characterization of Alternanthera mosaic virus and its coat protein // *Open Virol. J.* 2011. Vol. 5. P. 136–140.
17. Karasev A.V., Chirkov S.N., Kaftanova A.S., Miroshnichenko N.A., Surgucheva N.A., Fedotina V.L. Characterization of bean mild mosaic virus: particle morphology, composition and RNA cell-free translation // *Intervirology*. 1989. Vol. 30. N 5. P. 285–293.
18. Yasaka R., Nguyen H.D., Simon Y.W.H., Duchêne S., Korkmaz S., Katis N., Takahashi H., Gibbs A.J., Ohshima K. The temporal evolution and global spread of cauliflower mosaic virus a plant pararetrovirus // *PLoS One*. 2014. Vol. 9. N 1. e85641.
19. Kassanis B., McCarthy D. The quality of virus as affected by the ambient temperature // *J. Gen. Virol.* 1967. Vol. 1. N 4. P. 425–440.
20. Nikitin N., Trifonova E., Evtushenko E., Kirpichnikov M., Atabekov J., Karpova O. Comparative study of non-enveloped icosahedral viruses size // *PLoS One*. 2015. Vol. 10. N 11. e0142415.
21. Stubbs G., Parker L., Junn J., Kendall A. Flexible filamentous virus structures from fiber diffraction // *Fibre Diffraction Rev.* 2005. Vol. 13. N 2. P. 38–42.
22. Silver S., Quan S., Deom M. Completion of the nucleotide sequence of sunn-hemp mosaic virus: a tobamovirus pathogenic to legumes // *Virus Genes*. 1996. Vol. 13. N 1. P. 83–85.
23. Hafez E.E., Abdel Aleem E.E., Fattouh F.A. Comparison of barley stripe mosaic virus strains // *Z. Naturforsch C*. 2008. Vol. 63. N 3–4. P. 271–276.
24. Solovyev A.G., Makarov V.V. Helical capsids of plant viruses: architecture with structural lability // *J. Gen. Virol.* 2016. Vol. 97. N 8. P. 1739–1754.

Поступила в редакцию
30.07.2017 г.

Принята к печати
09.09.2017 г.

VIROLOGY

COMPARATIVE STUDY OF THE THERMAL REMODELLING OF VIRUSES WITH ICOSAEDRAL AND HELICAL SYMMETRY

E.A. Trifonova, N.A. Nikitin, M.V. Arkhipenko, E.K. Donchenko, J.G. Atabekov, O.V. Karpova*

*Department of Virology, Faculty of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
trifonova@mail.bio.msu.ru

Study of the possibilities of virions and viral proteins modifications and structural remodeling is an important problem of the modern molecular virology. The method of thermal transformation of tobacco mosaic virus rod-like virions in structurally modified spherical particles, consisting of viral coat protein, was developed in our laboratory. These particles have unique adsorption and immunogenic properties. We developed a new candidate vaccine against rubella virus based on structurally modified spherical particles. Later we demonstrated the possibility of thermal remodelling of potato virus X filamentous virions. The present work is devoted to a comparative study of the thermal remodelling of viruses with different structure, belonging to various taxonomic groups. The formation of structurally modified spherical particles was shown during thermal treatment of rod-like virions with a helical symmetry (dolichos enation mosaic virus, barley stripe mosaic virus). The dependence of the sizes of the spherical particles (formed from dolichos enation mosaic virus) on the initial concentration of the virus was revealed. The process of thermal remodelling of alternanthera mosaic virus filamentous virions and virus-like particles was studied. Morphological changes of plant viruses with icosahedral symmetry were not observed during thermal treatment.

Keywords: *plant viruses, helical viruses, icosahedral viruses, thermal remodelling of viruses, structural modified virus particles, spherical particles*

Сведения об авторах

Трифорова Екатерина Алексеевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: trifonova@mail.bio.msu.ru

Никитин Николай Александрович — канд. биол. наук, зав. сектором прикладной фитовирусологии кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: nikitin@mail.bio.msu.ru

Архипенко Марина Владимировна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: armar74@mail.ru

Донченко Екатерина Кирилловна — канд. биол. наук, ст. преп. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: donchenko@mail.bio.msu.ru

Атабеков Иосиф Григорьевич — докт. биол. наук, академик, гл. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-55-34; e-mail: atabekov@genebee.msu.ru

Карпова Ольга Вячеславовна — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: okar@genebee.msu.ru