

УДК 578.32; 578.864.1; 544.582.3

ИЗМЕНЕНИЯ В СТРУКТУРЕ ВИРИОНА А-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ ПРИ ОГРАНИЧЕННОМ ПРОТЕОЛИЗЕ *in situ* ПО ДАННЫМ ТРИТИЕВОГО МЕЧЕНИЯ И КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

© 2023 А.Л. Ксенофонов^{1*}, Л.А. Баратова¹, П.И. Семенюк¹,
Н.В. Федорова¹, Г.А. Бадун²

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: ksenofon@belozersky.msu.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.09.2023

После доработки 02.11.2023

Принята к публикации 14.11.2023

Белки оболочки (БО) вирионов потивируса А-вируса картофеля (АВК) содержат на поверхности частично неупорядоченные *N*-концевые домены, необходимые для выполнения жизненно важных функций вируса. В данной работе на основе данных, полученных методом тритиевой планиграфии, проведён сравнительный анализ структур БО в интактных вирионах АВК и в частицах вируса, лишённых *N*-концевых 32 аминокислот (АВКΔ32). С использованием структуры атомного разрешения БО потивируса *Y* картофеля (YVK), который является гомологом АВК, проведён расчёт доступной поверхности белков вириона YVK и определены области межсубъединичных/межвитковых контактов. Для этого использовали подход, основанный на обкатке сферической пробой поверхности белка, доступной растворителю (Lee, B., and Richards, F. M. (1971) *J. Mol. Biol.*, **55**, 379–400). Сравнение профилей включения тритиевой метки в интактный и частично деградированный вирион АВКΔ32 выявило положение Δ*N*-пептида, экранирующего остатки 66–73, 141–146 и входящие в межвитковую область остатки 161–175. Было обнаружено наличие каналов/полостей в белковой оболочке вириона, благодаря которым он оказался частично проницаемым для атомов трития. При удалении Δ*N*-пептида наблюдалось уменьшение содержания метки внутри вириона (в области а.о. 184–200), что указывало на возможный структурный переход, приводящий к компактизации вириона и вследствие этого меньшей доступности для трития его внутренних регионов. На основании полученных данных можно сделать вывод, что часть поверхностного Δ*N*-пептида расположена между витками спирали вириона, это увеличивает шаг спирали и обеспечивает большую гибкость вириону, что важно для межклеточного транспорта вирусов в растениях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: потивирусы, белок оболочки, А-вирус картофеля, *N*-концевые неупорядоченные домены, структурное моделирование, тритиевая планиграфия.

DOI: 10.31857/S0320972523120151, EDN: NQXBNG

ВВЕДЕНИЕ

Потивирусы представляют собой важную группу вирусов растений, которые наносят значительный экономический ущерб сельскому хозяйству. Поэтому их структурному и функциональному исследованию уделяется существенное внимание. Гибкие нитевидные вирионы потивирусов имеют спиральную симметрию со средней длиной частиц 700 нм и

диаметром 11–14 нм. С помощью ряда структурных и предсказательных методов анализа показано, что белки оболочки (БО) потивирусов частично разупорядочены, что также затрудняет их исследование [1, 2]. Существует широкий спектр методов определения структур вирусных частиц, включая физико-химические исследования и методы электронной микроскопии (ЭМ), особенно крио-ЭМ. Несмотря на сложность изучения гибких частиц,

Принятые сокращения: АВК – А-вирус картофеля; АВКΔ32 – вирионы А-вируса картофеля, лишённые 32 *N*-концевых аминокислот; БО – белок оболочки; ЭМ – электронная микроскопия; YVK – *Y*-вирус картофеля.

* Адресат для корреспонденции.

сочетание различных подходов, изучение свойств мутантных вирусов, а также достижения в области вычислительных методов и обработки изображений [1, 3–5] привели к лучшему пониманию структуры вирионов потивирусов и роли фрагментов их БО в вирусном цикле.

Первая модель структуры БО типичного представителя потивирусов, А-вируса картофеля (АВК), была предложена в 2001 г. [3]. Частицы вируса подвергали бомбардировке термически активированными атомами трития и определяли внутримолекулярное распределение метки в аминокислотах БО, чтобы оценить их стерическую доступность *in situ*. Модель пространственного расположения полипептидной цепи БО АВК внутри вирусной частицы была предложена на основе экспериментальных данных, полученных при бомбардировке тритием, в сочетании с предсказаниями элементов вторичной структуры и принципов упаковки спиралей и структур в белках. Модель предсказывает три домена третичной структуры: (i) открытый извне *N*-концевой домен, включающий неструктурированный *N*-конец из 8 аминокислот и два β -тяжа, (ii) *C*-концевой домен, включающий две спирали, а также три β -тяжа, которые образуют двухслойную структуру, называемую блоком abCd, и (iii) центральный домен, содержащий пучок из четырёх спиралей, подобный найденному в БО вируса табачной мозаики. В течение многих лет это была единственная модель, которую использовали для объяснения трёхмерной структуры БО потивирусов.

Важным поворотным моментом в развитии представлений о структуре потивирусов стало использование крио-ЭМ. С её помощью была определена трёхмерная структура вирионов нескольких потивирусов — вируса мозаики арбуза (ВМА) [6], Y-вируса картофеля (YVK) [4] и вируса мозаики турнепса (ВМТу) [7]. Эти структуры высокого разрешения подтвердили существование консервативной трёхдоменной архитектуры, общей для неродственных потивирусов и отличающейся от гипотетической модели АВК [3]. Полученные атомные структуры ВМА, YVK и ВМТу имели идентичное лево-спиральное расположение в вирионе субъединиц БО, которые состояли из центрального ядра с семью α -спиралями и одной или двумя β -шпильками, а также *N*- и *C*-концевых доменов, не имеющих выраженной вторичной структуры. Структуры гибких разупорядоченных *N*-концевых пептидов, подверженных воздействию растворителя, не были определены, предположительно из-за раз-

упорядоченности и подвижности, поэтому в атомных структурах ВМА, YVK и ВМТу отсутствуют первые 59, 43 или 65 аминокислотных остатков соответственно. Во всех трёх потивирусах расположенные на поверхности электроположительные *N*-концевые домены взаимодействовали с электроотрицательной канавкой соседних молекул БО, устанавливая боковые контакты, а также опосредуя продольную полимеризацию частиц аналогично потексвирусам [8, 9]. По-видимому, гибкость и неструктурированность *N*-концевых доменов в сочетании с их контактами с соседними субъединицами обеспечивает дополнительную гибкость вирионам [4, 6], необходимую, например, для облегчения межклеточного транспорта [10].

Важно отметить, что при выделении и хранении препаратов потивирусов часто наблюдается естественный *in situ* протеолиз трипсиноподобными протеазами клеточного сока, приводящий к удалению 30–50 *N*-концевых остатков (ΔN -пептидов) [11, 12]. При этом такие частицы остаются инфекционными. Биологическая значимость этого явления предположительно связана с необходимостью высвобождения инфекционных частиц из стилетов тли для последующей передачи растению [13, 14].

Основной задачей данного исследования было определение точной локализации ΔN -пептидов на поверхности вириона АВК и выяснение влияния их удаления на возможное изменение структуры вирионов. Вследствие гибкости и частичной разупорядоченности БО АВК эффективным и информативным оказался метод тритиевой планиграфии [15]. Данный подход основан на неселективном замещении водорода в углеводородных фрагментах молекул на его радиоактивный изотоп — тритий. Тритий используется как нанозонд с эффективным радиусом 0,09 нм для определения аминокислотных остатков, локализованных на поверхности вириона, а также в полостях, доступных для атомов трития [16–18]. В основе метода лежат химические реакции с участием горячих атомов трития; подобраны условия, при которых реакция, приводящая к включению метки, происходит при однократном столкновении и характеризует стерическую доступность связи С–Н в составе вириона. Получаемые с помощью этого метода данные о стерической доступности компонентов системы характеризуют структуру всего объекта. Метод тритиевой планиграфии [15] успешно использовали для получения информации о пространственной организации белков,

их комплексов и таких сложноорганизованных биологических объектов, как рибосома [19], вирусы растений и животных [3, 20–22]. Бомбардировка исследуемого объекта потоком атомов трития с последующим анализом внутримолекулярного распределения метки позволяет определить доступные фрагменты – остатки аминокислот, составляющие его «поверхность», тесно связанную с пространственной структурой. В настоящей работе на основе анализа данных бомбардировки поверхности тритием мы детально охарактеризовали структуру трипсинизированных вирионов А-вируса картофеля без 32 *N*-концевых а.о. (АВКΔ32) и определили точную локализацию ΔN-пептидов на поверхности вириона АВК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение препаратов интактных и частично деградированных вирионов АВК. Изолят В11 вириона АВК очищен, как описано ранее [3]. Для получения деградированных вирионов (АВКΔ32) препарат интактного вируса обрабатывали трипсином в соотношении фермент/субстрат 1 : 500 (по массе), 15 мин инкубировали при комнатной температуре, для остановки реакции добавляли фенилметилсульфонил фторид до концентрации 1 мМ. Очистку препарата проводили осаждением вирионов при 105 000 *g* (100 мин, 5 °С). Концентрацию препарата АВК определяли, используя коэффициент поглощения $E_{260\text{ нм}}^{0,1\%} = 2,3$. Спектры поглощения в УФ-диапазоне 240–340 нм измеряли на спектрофотометре Hitachi UV-2600 («Hitachi», Япония) в кюветах с длиной оптического пути 0,1–1,0 см. Истинные спектры поглощения (*E*) светорассеивающих суспензий вычисляли по методу экстраполяции [23]. Во всех экспериментах использовались только препараты АВК с нормальным соотношением E_{260}/E_{280} (~1,25), что указывало на отсутствие дефектных вирусных частиц. Контроль чистоты образцов также осуществляли с помощью электрофореза с додецилсульфатом натрия по методу Лэммли [24], используя 15%-ный полиакриламидный гель (ПААГ) в электрофорезной камере Mini-PROTEAN 3 Cell («Bio-Rad», США). Данные просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) показывали отсутствие каких-либо дефектных вирионов в исходных и обработанных трипсином препаратах [5].

Введение трития. 1 мл суспензии вируса в 0,05 М боратном буфере (рН 8,0) с концентрацией 1–2 мг/мл распыляли из пульверизатора на стенки цилиндрического реакционного со-

уда, предварительно охлаждённого жидким азотом, вакуумировали и наполняли молекулярным тритием до давления 0,5 Па. При нагревании до 2000 К вольфрамовой спирали, расположенной вдоль центральной оси реакционного сосуда, молекулярный тритий диссоциировал на атомы, и образующиеся атомы трития бомбардировали суспензию вирионов, охлаждаемую жидким азотом. Спираль зажигали на 15 с, затем остаточный тритий откачивали и процедуру напуска трития – зажигания спирали повторяли ещё два раза. После введения метки препарат размораживали и вирусную суспензию концентрировали центрифугированием (105 000 *g*, 5 °С, 100 мин). Для удаления лабильной тритиевой метки препараты меченых вирусов подвергали 1–2 циклам осаждения вирионов при 105 000 *g*. Из очищенных вирусов выделяли белки стандартным литиевым методом [25]. Контроль чистоты препаратов осуществляли с помощью электрофореза в ПААГ [24].

Ферментативный гидролиз белков. Полученные препараты белков подвергали триптическому гидролизу. К растворам белков добавляли раствор трипсина (TPCK-trypsin, «Sigma», США) в соотношении фермент/субстрат 1 : 50 (по массе) и проводили гидролиз при 37 °С в течение 4 ч, для остановки реакции добавляли фенилметилсульфонил фторид до концентрации 1 мМ.

Аналитические методы. Полученные в результате ферментативного гидролиза смеси пептидов разделяли при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии в обращённой фазе на колонке Ultrasphere ODS, 5 мкм, 250 × 4,6 мм («Beckman», США), с использованием хроматографической системы фирмы «Beckman» в градиентном режиме. Для разделения использовали два элюента (А и Б): элюент А представлял собой 0,1%-ный водный раствор трифторуксусной кислоты, элюент Б состоял из 0,1%-ного раствора трифторуксусной кислоты в ацетонитриле. Использовали линейный градиент до 60% элюента Б в течение 60 мин, а затем линейный градиент до 80% элюента Б в течение 10 мин при скорости потока 1 мл/мин. Детекцию проводили по поглощению при длинах волн 215 и 280 нм. Фракции, соответствующие индивидуальным пептидам, собирали для дальнейшего анализа. Пептиды подвергали кислотному гидролизу, как описано ранее [26].

Кислотные гидролизаты анализировали на аминокислотном анализаторе Amino Acid Analyzer L8800 («Hitachi») с катионообменной колонкой и нингидриновой дериватизацией

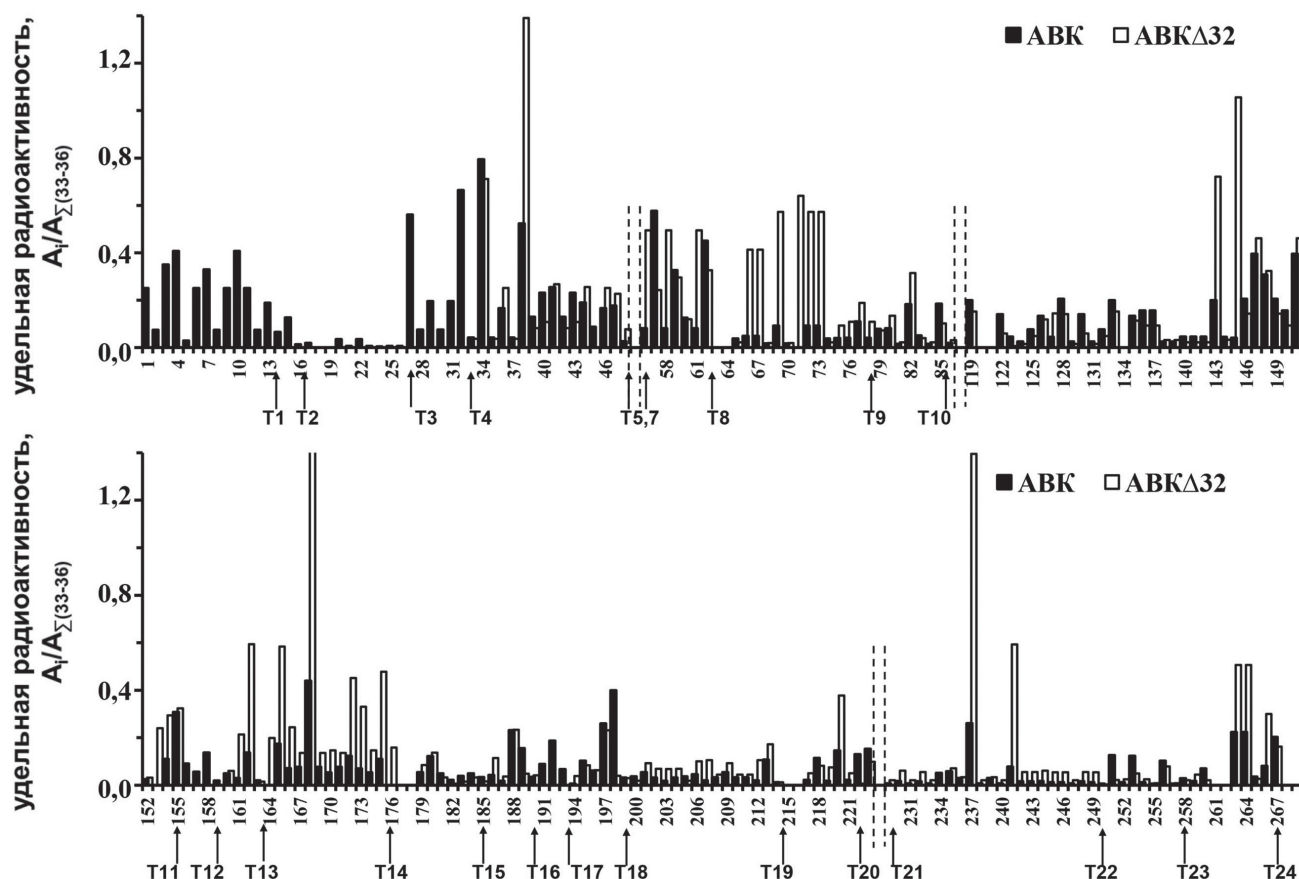


Рис. 1. Распределение тритиевой метки по аминокислотным остаткам белков вирионов АВК и АВКΔ32 с учётом реакционной способности атомов трития при реакции с разными аминокислотами. $A_i/A_{\Sigma(33-36)}$ — удельные радиоактивности остатка (A_i), нормированные на сумму удельных радиоактивностей поверхностных остатков 33–36. На оси абсцисс указана нумерация аминокислотных остатков. Сайты расщепления трипсином показаны стрелками. Данные для цистеина и триптофана не показаны, поскольку они разрушаются кислотным гидролизом. Пунктиром показано положение отсутствующих пептидов. График разделён на две последовательные части (верхнюю и нижнюю) для лучшей визуализации

с нашими модификациями [27]. Для одновременного измерения радиоактивности элюата использовали проточный счётчик Radiomatic 150TR Flow Scintillation Analyzer («Packard Co», США). Получаемые данные (оптическая плотность элюата при длинах волн 570 и 440 нм и его радиоактивность) обрабатывались с помощью программы «МультиХром для Windows» (ЗАО «Амперсенд», Россия). Далее, рассчитывали молярную радиоактивность для каждого аминокислотного остатка в пептиде [28].

Расчёт доступной поверхности вириона проведён с использованием пакета GROMACS 5.1 [29]. Учитывали только часть доступной поверхности, занимаемую атомами водорода, присоединёнными к атомам углерода (СН-поверхность); часть поверхности, занимаемую другими атомами, игнорировали. Радиус зонда составлял 0,09 нм. Для определения областей межмолекулярных контактов аналогичным образом рассчитывали поверхность для индивидуальной субъединицы, затем

определяли долю поверхности, закрываемую при сборке вирусной частицы. Для визуализации белковых структур использовали программу RasMol (<http://www.rasmol.org/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование вирусных частиц АВК и АВКΔ32 методом тритиевой планиграфии. Ранее мы наблюдали, что при хранении интактных препаратов АВК происходит расщепление молекул БО *in situ* протеазами клеточного сока в положениях аминокислот 32 и 42 [11]. Ограниченный трипсинолиз препарата интактного вируса (в соотношении фермент/субстрат 1 : 500, 15 мин) также приводил к отщеплению 32 N-концевых остатков из БО вириона, что было подтверждено масс-спектроскопией и электрофорезом в ПААГ [11], и по данным ПЭМ вирионы сохраняли свою целостность [5]. В данной работе нами проведён сравнитель-

ный анализ структур двух видов препаратов: интактных вирионов АВК и частично деградированных трипсином вирионов АВКΔ32 (Материалы и методы). Распределение тритиевой метки вдоль полипептидной цепи после мечения тритием препаратов интактных АВК и АВКΔ32 показано на рис. 1. Результаты исследования интактного вируса АВК с помощью тритиевой планиграфии опубликованы нами ранее [3]. Для определения распределения метки вдоль полипептидной цепи интактного БО АВК и его укороченного варианта были выделены и проанализированы все пептиды – продукты гидролиза трипсином, кроме трёх коротких пептидов: Т6, Т7, Т21, и части Т11 (рис. 1).

Величины удельной радиоактивности остатков были скорректированы с учётом соответствующих коэффициентов [30] для пропорциональности их доступным площадям. Построение гистограммы в процентах от общей удельной радиоактивности ($A_{уд}, \%$) или в значениях удельной радиоактивности, нормированных на один или несколько (33–36 а.о.) поверхностных, находящихся рядом с сайтом протеолиза остатков, давало схожие резуль-

таты. Как видно из рис. 1, распределение тритиевой метки в интактных вирионах АВК и АВКΔ32 заметно отличается.

В БО АВКΔ32 по сравнению с интактным АВК значения удельной радиоактивности остатков 66–73, 141–146, 161–175, 233–247 возрастали, а остатков 122–138, 184–191, 195–200 – уменьшались (рис. 1). Для того чтобы понять, в каких областях пространственной структуры БО происходят эти изменения, мы использовали имеющуюся трёхмерную структуру БО УВК, близкого гомолога АВК. Первичные структуры БО АВК и УВК имеют значительное сходство: 64% идентичных и 91% подобных остатков (из 237 остатков БО) [5]. Последовательность *N*-концевого домена в БО АВК на 2 остатка длиннее, чем в БО УВК. Трёхмерная структура БО УВК (PDB ID: 6HXX, остатки 44–267), полученная крио-ЭМ с разрешением 0,34 нм, включала три домена: *N*-концевой домен (I), остатки с 44 до 77; центральный домен (II), остатки с 78 по 225; и *C*-концевой домен (III), остатки с 226 до 267 (рис. 2). Домен I выступал из центрального домена и в структуре, полученной с помощью

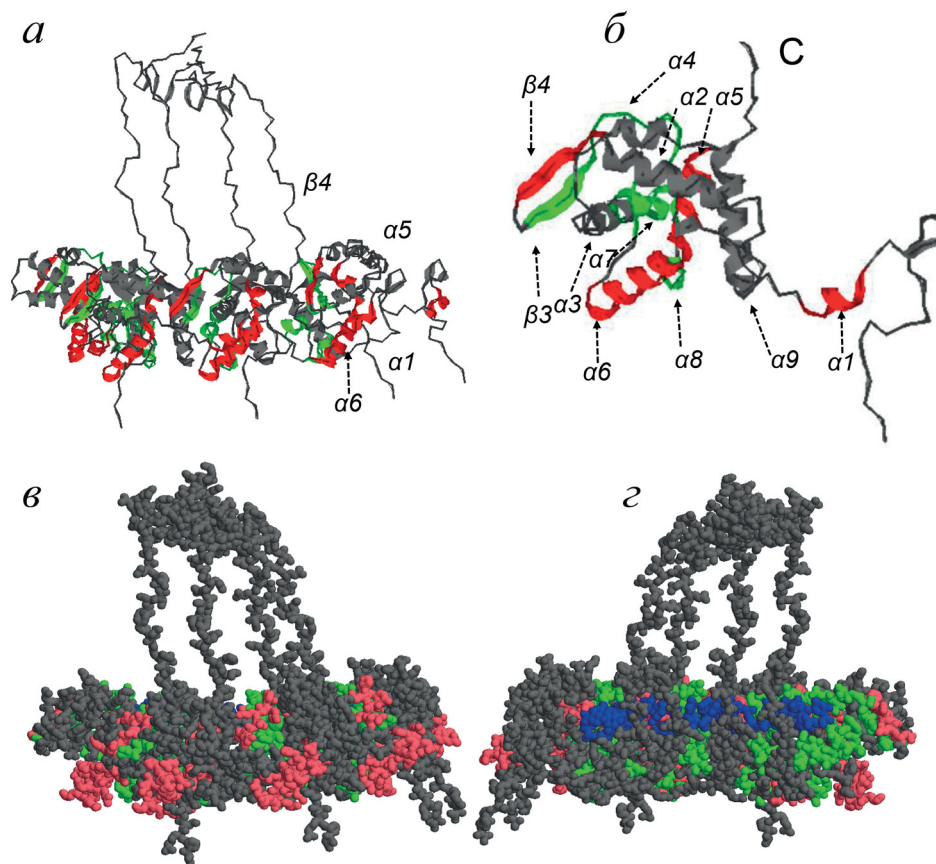


Рис. 2. Относительное изменение радиоактивности в элементах вторичной структуры белков вирионов АВК при удалении ΔN-пептида. Области со значением $A_{\text{АВК}\Delta 32}/A_{\text{АВК}} > 1,8$ показаны красным, $< 0,5$ – зелёным. *a* – Фрагмент, состоящий из 4 субъединиц; *б* – фрагмент, состоящий из одной субъединицы (спирали представлены в виде ленты), *с* – *C*-конец БО; *д, е* – показано 4 субъединицы (приведён скелет структуры) снаружи и изнутри вириона соответственно; РНК отмечена синим цветом (*г*)

Распределение тритиевой метки по элементам вторичной структуры БО вирионов АВК и АВКΔ32 и доступная площадь СН-поверхности, рассчитанная с помощью программы GROMACS 5,1 на модели YVK (PDB: 6HXX)

Элемент вторичной структуры	№ остатков	Число остатков	Суммарная радиоактивность элемента, А ^а , %		Относительное изменение, А ^б	Доступная площадь СН-поверхности элемента, S ^с , нм ²		Доля недоступной СН-поверхности, S ^б
			АВКΔ32	АВК		БО YVK	YVK	
<i>l 1</i>	33–59	33	18,7	24,8	0,8	9,2	5,2	<u>0,43</u>
<i>β1,2</i>	60–65	6	3,3	4,1	0,8	2,7	1,9	0,28
<i>α1</i>	68–74	7	6,1	2,0	<u>3,0</u>	3,3	2,2	0,31
<i>l 2</i>	75–87	13	4,2	5,1	0,8	4,6	2,5	<u>0,45</u>
<i>α3*</i>	119–124	5	0,8	2,4	0,3	0,8	0,5	0,42
<i>l 4</i>	125–132	8	2,0	4,3	0,5	2,0	1,1	0,41
<i>β3</i>	133–138	6	1,7	3,9	0,4	2,0	1,0	<u>0,51</u>
<i>β4</i>	141–146	6	6,8	3,4	<u>2,0</u>	2,0	1,4	0,30
<i>α4</i>	147–154	8	6,2	9,4	0,7	1,9	1,5	0,23
<i>α5</i>	157–163	7	3,0	1,4	<u>2,2</u>	0,9	0,6	0,34
<i>α6</i>	165–180	16	16,8	8,9	<u>1,9</u>	4,9	2,3	<u>0,52</u>
<i>α7</i>	184–191	8	1,8	3,3	0,5	2,3	1,1	<u>0,50</u>
<i>α8</i>	195–200	6	1,6	5,3	0,3	1,0	0,8	0,20
<i>l 5</i>	201–211	11	2,6	2,3	1,1	1,7	1,3	0,27
<i>α9</i>	212–228	17	3,5	4,4	0,8	7,5	3,3	<u>0,56</u>
<i>C-</i>	229–267	39	15,7	11,5	1,4	20,4	9,6	<u>0,53</u>

Примечания. ^а Суммарную радиоактивность элемента оценивали путём сложения радиоактивности всех аминокислот, входящих в состав элемента.

^б Значения $A_{ABK\Delta32}/A_{ABK} > 1,8$ и $(S_{BO\ YVK} - S_{YVK})/S_{BO\ YVK} > 0,43$ подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

^с Суммарную доступную площадь СН-поверхности элемента (см. ниже) рассчитывали с помощью программы GROMACS 5,1 путём сложения доступной площади всех аминокислот элемента.

* Данные для спирали *α2* и части *α3* отсутствуют.

крио-ЭМ, охватывал домен II двух соседних БО. Атомные координаты остатков 1–43 не были определены, предположительно из-за разупорядоченности и подвижности. Высокая идентичность первичных структур БО вирусов АВК и YVK позволила использовать модель БО YVK (PDB: 6HXX) для моделирования строения белковой оболочки АВК.

Нами рассчитано включение тритиевой метки (в % от общей радиоактивности) в элементы вторичной структуры белка [4] для вирионов АВК и АВКΔ32, которое представлено в таблице.

В таблице рассчитана суммарная радиоактивность элемента (А) в частицах АВКΔ32 и АВК, приведено относительное изменение радиоактивности $A_{ABK\Delta32}/A_{ABK}$. Из таблицы видно, что при удалении N-концевого фрагмента БО в АВКΔ32 возрастает доступность тритию спиралей *α1* (68–74 а.о.), *α5* (157–163 а.о.), *α6* (165–180 а.о.) и *β4*-тяжа (141–146 а.о.). Одновременно снижается доступность тритию фрагмента *α3-l4-β3* (119–138 а.о.) и спиралей *α7* (184–191 а.о.), *α8* (195–200 а.о.). Относительное изменение радиоактивности вириона в элементах вторичной структуры белка

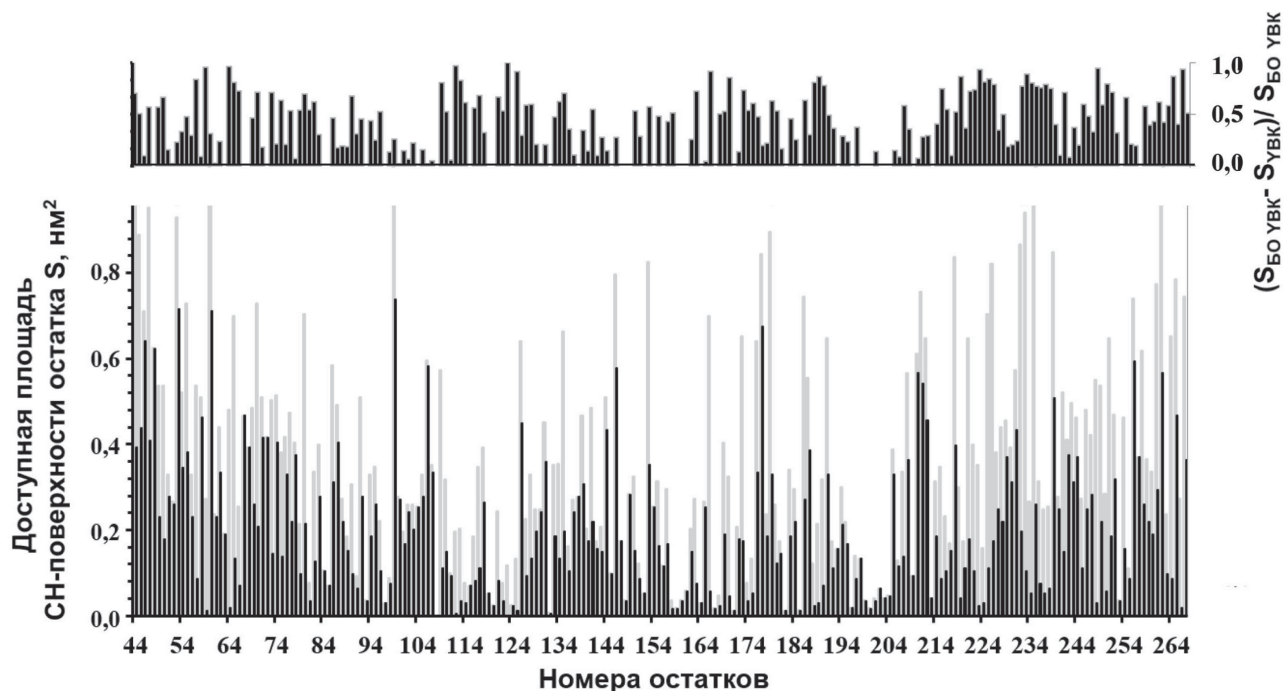


Рис. 3. Расчёт доступной СН-поверхности для БО в свободном виде, $S_{\text{БО YBK}}$ (серые столбики), и в составе вириона, S_{YBK} (чёрные столбики), в nm^2 . На вставке приведена величина $(S_{\text{БО YBK}} - S_{\text{YBK}}) / S_{\text{БО YBK}}$ — доля поверхности остатков, относящихся к углеводородным фрагментам, которые экранированы в составе вириона (правая шкала) — областям межсубъединичных и межвитковых контактов БО в составе вириона

при удалении ΔN -пептида продемонстрировано на трёхмерной модели БО YBK (PDB: 6HXX) двумя цветами для лучшей визуализации (рис. 2). Фрагменты структуры, в которых доступность тритию возрастает, показаны красным цветом; фрагменты, где доступность тритию снижается, показаны зелёным цветом.

Обращает на себя внимание тот факт, что увеличение метки при удалении ΔN -пептидов наблюдается на поверхности вириона (рис. 2, в). В поверхностный домен I (33–79 а.о.) вирионов АВК Δ 32 и АВК включалось 34% и 25% всей тритиевой метки соответственно. Это свидетельствует об экранировке домена I ΔN -пептидом. ΔN -Пептид интактного АВК был наиболее меченым участком БО, содержал 22% всей метки и составлял 12% от длины БО. Тритиевая метка незначительно включалась также во внутренние слои вириона (рис. 2, г), что предполагало проникновение атомов трития через межсубъединичные контакты и/или иные каналы в вирионе. При удалении ΔN -пептида наблюдалось уменьшение метки внутри вириона (рис. 2, г), что указывало на происходящую структурную перестройку, приводящую к компактизации вириона.

Расчёты доступной поверхности БО в вирионе YBK и в свободном виде. Для определения межсубъединичных и межвитковых элементов

структуры БО и дополнительной оценки полученных экспериментальных данных были проведены расчёты доступной поверхности аминокислотных остатков БО в вирионе и в свободном виде на модели YBK, исходя из данных крио-ЭМ-структуры (PDB: 6HXX). Вычисления проводились с помощью программы GROMACS 5.1 [29], использующей алгоритмы, основанные на подходе Ли и Ричардса [31]. Поверхность молекулы определяется как её часть, доступная растворителю, молекула которого представляется в виде сферы. Размеры атомов макромолекулы определяются их Ван-дер-Ваальсовыми радиусами. В вычислениях использовали одну свободную субъединицу БО и часть вирусной частицы, состоящую из 70 БО (8 витков). Для сравнения экспериментальных данных тритиевого мечения вириона АВК с расчётными данными мы использовали сферу с радиусом трития 0,09 нм, определённым ранее [17]. Доступную поверхность определяли только у атомов углерода, связанных хотя бы с одним атомом водорода (СН-поверхность).

Результаты расчёта доступной СН-поверхности представлены на рис. 3 для БО в свободном виде, $S_{\text{БО YBK}}$, и в составе вириона, S_{YBK} .

Суммарная доступная площадь СН-поверхности свободного белка составляет 81,6 nm^2 , а белка в вирионе — 44,9 nm^2 . Таким образом,

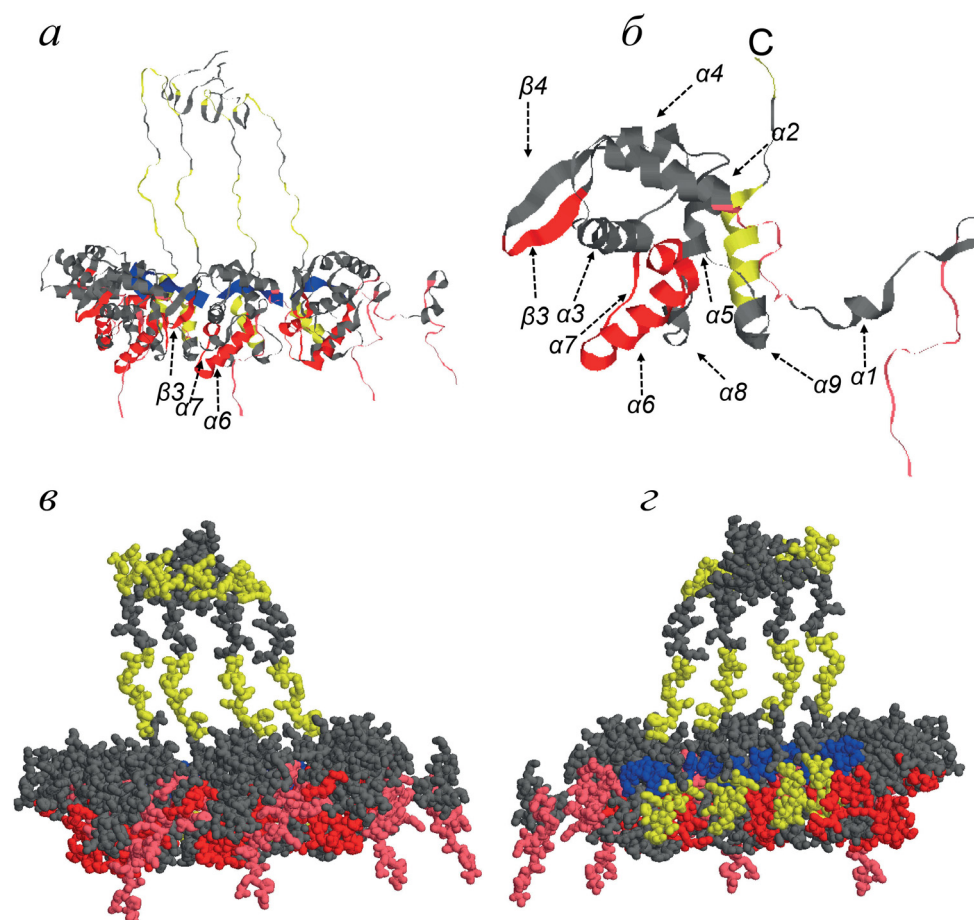


Рис. 4. Относительное изменение доступной площади СН-поверхности в элементах вторичной структуры в свободном белке и во фрагменте вириона из 70 молекул БО. Участки, для которых значения $(S_{\text{БО УВК}} - S_{\text{УВК}})/S_{\text{БО УВК}} > 0,43$, показаны красным/жёлтым цветом. *а* – Приведён фрагмент,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

45% ($36,7 \text{ nm}^2$) поверхности БО образуют контакты между субъединицами в вирионе (без учёта 43 *N*-концевых остатков).

Относительное изменение доступной площади СН-поверхности в элементах вторичной структуры в свободном белке и вирионе продемонстрировано на трёхмерной модели БО УВК (рис. 4, таблица). Фрагменты поверхностного домена I и центрального домена II, в которых возрастает площадь СН-поверхности (рис. 4, *а–в*), показаны красным цветом. Увеличение доступности внутри вириона в С-доме показано жёлтым цветом (рис. 4, *г*). В таблице рассчитаны суммарные площади СН-поверхности элементов вторичной структуры, S , в свободном белке и вирионе, а также доля недоступной СН-поверхности вириона, $(S_{\text{БО УВК}} - S_{\text{УВК}})/S_{\text{БО УВК}}$. Из таблицы видно, что в свободном белке, по сравнению с вирионом, почти в два раза больше доступная СН-поверхность петель *11* и *12*, принадлежащих поверхностному домену I, $\beta 3$ -тяжа и спиралей

$\alpha 6$ и $\alpha 7$, что подтверждает их расположение в месте контакта БО с соседним витком.

Обращает на себя внимание значительная доступная СН-поверхность спирали $\alpha 9$ и С-конца, расположенных в сердцевине вириона (таблица), что подтверждает наличие каналов/полостей в вирионе, который оказался частично проницаемым и для атомов трития (рис. 1).

Таким образом, увеличение тритиевой метки при удалении ΔN -пептида вируса АВК в элементах $\alpha 1$ и $\beta 4$ показывает экранирование ΔN -пептидом поверхностного домена I и части центрального домена II, а мечение спирали $\alpha 6$ свидетельствует о частичном экранировании межвитковой зоны поверхности соседних субъединиц и расположении ΔN -пептида над этими участками структуры БО. Уменьшение метки внутри вириона при удалении ΔN -пептида вируса (рис. 2, *г*) предполагает возможную структурную перестройку, приводящую к компактизации вириона.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее было обнаружено, что *N*-концевые домены БО потивирусов располагались на поверхности вириона [3, 4, 12] и содержали значительную долю неупорядоченных участков [1, 2]. *N*-Концевые пептиды потивирусов были наиболее иммунодоминантными и генерировали вирусспецифические антитела [32]. В процессе жизнедеятельности потивирусы взаимодействуют со многими различными белковыми и мембранными компонентами растительных клеток, и наличие значительной доли неупорядоченных последовательностей в БО может быть одним из факторов их высокой биологической эффективности [33]. ΔN -Домен включает большое число (~70%) гидрофильных (9 T/S/N/Q/G) и заряженных (13 E/D/K/R) остатков и относительно малое число гидрофобных/алифатических остатков (10 I/L/V/A), что и определяло склонность к структурным переходам и могло быть причиной аномалий в КД-спектре и электрофоретической подвижности [1]. Оказалось, что ΔN -домены БО АВК участвуют в сборке вирусоподобных частиц (ВПЧ), и часть их неструктурированных сегментов приобретает β -структуру [34, 35].

В нашей работе было показано, что ΔN -пептид (а.о. 1–32) экранировал остатки 66–73, 141–146 и входящие в межвитковую область остатки 161–175 БО АВК. Уменьшение метки внутри вириона при удалении ΔN -пептида вируса (рис. 2, з) приводило к образованию более компактной спирали вируса. Наблюдаемое изменение мечения во фрагментах БО после трипсинолиза не может быть следствием элиминирования дефектных вирионов. Об этом говорит несущественное изменение концентрации вируса и сохранение величины соотношения E_{260}/E_{280} (~1,25) препаратов после трипсинолиза (см. Материалы и методы). Ранее по результатам анализа КД-спектров нами было показано, что при удалении ΔN -пептида вторичная структура молекул БО в составе вириона практически не меняется. Однако по данным синхротронного малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и других методов в вирионе АВК при удалении ΔN -пептида происходили изменения четвертичной структуры [5], сопровождающиеся уменьшением шага спирали белковой оболочки, уменьшением гибкости и возрастанием стабильности частиц, что подтверждает наши данные. Известно, что спиральность структуры вириона частично обуславливается спиральностью расположенной внутри вириона

РНК, так как сборка БО УВК в отсутствие РНК приводит к формированию неспиральных ВПЧ в виде стопки дисков [4]. Кроме того, БО поти- и потексвирусов [7] взаимодействует с РНК в консервативных положениях (для АВК это S127, R159, D203). Расчёт на модели вириона УВК (рис. 3) показал низкую доступность их СН-поверхности (0,02–0,09 нм²) для сферической пробы с радиусом трития, и мы также наблюдали низкую радиоактивность этих остатков как в интактном АВК, так и в АВК Δ 32 (рис. 1), что дополнительно подтверждает правомерность использования модели вириона УВК в нашей работе.

Тритиевая метка незначительно включалась также во внутренние слои вириона (рис. 2, з), что предполагало миграцию реакционноспособных атомов трития через межсубъединичные контакты или каналы в вирионе, заполненные водным раствором. Возможность этого явления обсуждалась ранее [16, 17]. Атомы трития проникали между углеводородными цепями липидов в липосомах [36] или пурпурных мембранах с бактериородопсином [37] без существенной потери их энергии.

Серия биохимических и биофизических исследований икосаэдрических вирусов показала, что их вирусные капсиды образуются путём динамической самосборки белков и подвергаются контролируемым конформационным переходам с изменением поверхностных структур для выполнения различных биологических функций [38]. У некоторых спиральных вирусов также обнаружена структурная гетерогенность. Так, среди частиц вирионов гордеи-вируса штриховатой мозаики ячменя [39] обнаружены «широкие» и «узкие» частицы с 22,2 и 21,2 субъединицами на виток. Ряд работ свидетельствовал о наличии нескольких функциональных и структурных состояний у вирионов потексвируса Х-вируса картофеля [28, 40, 41]. Анализ вирионов потивируса ВМТу методом крио-ЭМ показал, что вирионы растягиваются и сжимаются с амплитудой около 0,22 нм, и были обнаружены частицы с шагом спирали 3,42–3,61 нм [7]. Удаление *N*-концевого пептида БО АВК приводило к уменьшению шага спирали вириона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе показано, что *N*-концевой пептид (ΔN -пептид) на поверхности вириона АВК экранирует поверхностный домен I, часть центрального домена II и межвитковую зону на поверхности соседних субъединиц. Удаление

ΔN -пептида вызывало снижение доступности внутренних областей вириона и приводило к образованию более компактной спирали вируса. Мы предполагаем, что часть поверхностного ΔN -пептида располагается между витками спирали вириона. Это увеличивает шаг спирали и обеспечивает большую гибкость вириона, что важно для функционирования вируса. Понимание структурных особенностей гибких фитовирусов и роли N -концевых доменов их белков необходимо для создания и использования вирусных и вирусоподобных наночастиц в качестве платформ для презентации эпитопов и разработки вакцин [42].

Вклад авторов. А.Л. Ксенофонов, Л.А. Баратова — концепция и руководство работой; А.Л. Ксенофонов, Г.А. Бадун, Н.В. Федорова,

П.И. Семенюк — проведение экспериментов, обсуждение результатов исследования; А.Л. Ксенофонов, Л.А. Баратова, Г.А. Бадун — написание и редактирование текста статьи.

Благодарности. Авторы благодарят за полезную дискуссию и обсуждение работы доктора химических наук Э.В. Штыкову (Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова).

Финансирование. Работа выполнена частично при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00525а).

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. Ksenofontov, A. L., Paalme, V., Arutyunyan, A. M., Semenyuk, P. I., Fedorova, N. V., Rumvolt, R., Baratova, L. A., Jarvekulg, L., and Dobrov, E. N. (2013) Partially disordered structure in intravirus coat protein of potyvirus potato virus A, *PLoS One*, **8**, e67830, doi: 10.1371/journal.pone.0067830.
2. Charon, J., Theil, S., Nicaise, V., and Michon, T. (2016) Protein intrinsic disorder within the *Potyvirus* genus: from proteome-wide analysis to functional annotation, *Mol. BioSystems*, **12**, 634–652, doi: 10.1039/c5mb00677e.
3. Baratova, L. A., Efimov, A. V., Dobrov, E. N., Fedorova, N. V., Hunt, R., Badun, G. A., Ksenofontov, A. L., Torrance, L., and Jarvekulg, L. (2001) In situ spatial organization of Potato virus A coat protein subunits as assessed by tritium bombardment, *J. Virol.*, **75**, 9696–9702, doi: 10.1128/JVI.75.20.9696–9702.2001.
4. Kezar, A., Kavcic, L., Polak, M., Novacek, J., Gutierrez-Aguirre, I., Znidaric, M. T., Coll, A., Stare, K., Gruden, K., Ravnkar, M., Pahovnik, D., Zagar, E., Merzel, F., Anderluh, G., and Podobnik, M. (2019) Structural basis for the multitasking nature of the potato virus Y coat protein, *Sci. Adv.*, **5**, eaaw3808, doi: 10.1126/sciadv.aaw3808.
5. Shtykova, E. V., Petoukhov, M. V., Fedorova, N. V., Arutyunyan, A. M., Skurat, E. V., Kordyukova, L. V., Moiseenko, A. V., and Ksenofontov, A. L. (2021) The structure of the potato virus A particles elucidated by small angle X-ray scattering and complementary techniques, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 230–240, doi: 10.1134/S0006297921020115.
6. 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 ssRNA viruses, *Sci. Adv.*, **3**, eaao2182, doi: 10.1126/sciadv.aao2182.
7. 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.
8. Agirrezabala, X., Mendez-Lopez, E., Lasso, G., Sanchez-Pina, M. A., Aranda, M., and Valle, M. (2015) The near-atomic cryoEM structure of a flexible filamentous plant virus shows homology of its coat protein with nucleoproteins of animal viruses, *eLife*, **4**, e11795, doi: 10.7554/eLife.11795.
9. DiMaio, F., Chen, C. C., Yu, X., Frenz, B., Hsu, Y. H., Lin, N. S., and Egelman, E. H. (2015) The molecular basis for flexibility in the flexible filamentous plant viruses, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 642–644, doi: 10.1038/nsmb.3054.
10. Tatineni, S., Kovacs, F., and French, R. (2014) Wheat streak mosaic virus infects systemically despite extensive coat protein deletions: identification of virion assembly and cell-to-cell movement determinants, *J. Virol.*, **88**, 1366–1380, doi: 10.1128/JVI.02737-13.
11. Jarvekulg, L., Baratova, L., Dobrov, E., Badun, G., Hunt, R., Andreeva, E., Rabenstein, F., Efimov, A. V. (2000) Study of the spatial structure of potato virus. A coat protein subunits and particles using tritium planigraphy, *Beiträge Züchtungsfors.*, **6**, 61–66.
12. Shukla, D. D., Thomas, J. E., McKern, N. M., Tracy, S. L., and Ward, C. W. (1988) Coat protein of potyviruses. 4. Comparison of biological properties, serological relationships, and coat protein amino acid sequences of four strains of potato virus Y, *Arch. Virol.*, **102**, 207–219, doi: 10.1007/BF01310826.

13. Atreya, P. L., Lopez-Moya, J. J., Chu, M., Atreya, C. D., and Pirone, T. P. (1995) Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids, *J. Gen. Virol.*, **76**, 265-270, doi: 10.1099/0022-1317-76-2-265.
14. Harrison, B. D., and Robinson, D. J. (1988) Molecular variation in vector-borne plant viruses: epidemiological significance, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, **321**, 447-462, doi: 10.1098/rstb.1988.0102.
15. Goldanskii, V. I., Kashirin, I. A., Shishkov, A. V., Baratova, L. A., and Grebenshchikov, N. I. (1988) The use of thermally activated tritium atoms for structural-biological investigations: the topography of the TMV protein-accessible surface of the virus, *J. Mol. Biol.*, **201**, 567-574, doi: 10.1016/0022-2836(88)90638-9.
16. Баратова Л. А., Богачева Е. Н., Гольдманский В. И., Колб В. А., Спирин А. С., Шишков А. В. (1999) *Тритиевая планиграфия биологических макромолекул*, Наука, Москва.
17. Badun, G. A., and Fedoseev, V. M. (2001) Permeability of lipid membranes for atomic tritium or atom "slipping" effect and its role in tritium planigraphy, *Radiochemistry*, **43**, 301-305, doi: 10.1023/A:1012872927896.
18. Badun, G. A., and Chernysheva, M. G. (2023) Tritium thermal activation method. Features of application, modern achievements, and further development prospects, *Radiochemistry*, **65**, 185-197, doi: 10.1134/S1066362223020054.
19. Agafonov, D. E., Kolb, V. A., and Spirin, A. S. (1997) Proteins on ribosome surface: measurements of protein exposure by hot tritium bombardment technique, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12892-12897, doi: 10.1073/pnas.94.24.12892.
20. Dobrov, E. N., Badun, G. A., Lukashina, E. V., Fedorova, N. V., Ksenofontov, A. L., Fedoseev, V. M., and Baratova, L. A. (2003) Tritium planigraphy comparative structural study of tobacco mosaic virus and its mutant with altered host specificity, *Eur. J. Biochem.*, **270**, 3300-3308, doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03680.x.
21. Baratova, L. A., Grebenshchikov, N. I., Dobrov, E. N., Gedrovich, A. V., Kashirin, I. A., Shishkov, A. V., Efimov, A. V., Jarvekul, L., Radavsky, Y. L., and Saarma, M. (1992) The organization of potato virus X coat proteins in virus particles studied by tritium planigraphy and model building, *Virology*, **188**, 175-180, doi: 10.1016/0042-6822(92)90747-d.
22. Shishkov, A. V., Goldanskii, V. I., Baratova, L. A., Fedorova, N. V., Ksenofontov, A. L., Zhirnov, O. P., and Galkin, A. V. (1999) The *in situ* spatial arrangement of the influenza A virus matrix protein M1 assessed by tritium bombardment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7827-7830, doi: 10.1073/pnas.96.14.7827.
23. 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 [in Russian], *Mol. Biol.*, **40**, 172-179.
24. 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.
25. 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.
26. Tsugita, A., and Scheffler, J. J. (1982) A rapid method for acid hydrolysis of protein with a mixture of trifluoroacetic acid and hydrochloric acid, *Eur. J. Biochem.*, **124**, 585-588, doi: 10.1111/j.1432-1033.1982.tb06634.x.
27. Trofimova, L., Ksenofontov, A., Mkrtchyan, G., Graf, A., Baratova, L. A., and Bunik, V. I. (2016) Quantification of rat brain amino acids: Analysis of the data consistency, *Curr. Anal. Chem.*, **12**, 349-356, doi: 10.2174/1573411011666151006220356.
28. Lukashina, E., Ksenofontov, A., Fedorova, N., Badun, G., Mukhamedzhanova, A., Karpova, O., Rodionova, N., Baratova, L., and Dobrov, E. (2012) Analysis of the role of the coat protein N-terminal segment in *Potato virus X* virion stability and functional activity, *Mol. Plant Pathol.*, **13**, 38-45, doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00725.x.
29. Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., and Lindahl, E. (2015) GRO-MACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX*, **1-2**, 19-25, doi: 10.1016/j.softx.2015.06.001.
30. Gedrovich, A. V., and Badun, G. A. (1992) Study of the spatial structure of globular proteins by tritium planigraphy. Short peptides as a model of a fully extended polypeptide chain [in Russian], *Mol. Biol.*, **26**, 558-564.
31. Lee, B., and Richards, F. M. (1971) The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility, *J. Mol. Biol.*, **55**, 379-400, doi: 10.1016/0022-2836(71)90324-x.
32. Shukla, D. D., Tribbick, G., Mason, T. J., Hewish, D. R., Geysen, H. M., and Ward, C. W. (1989) Localization of virus-specific and group-specific epitopes of plant potyviruses by systematic immunochemical analysis of overlapping peptide fragments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8192-8196, doi: 10.1073/pnas.86.21.8192.
33. Wei, T., Huang, T. S., McNeil, J., Laliberte, J. F., Hong, J., Nelson, R. S., and Wang, A. (2010) Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication, *J. Virol.*, **84**, 799-809, doi: 10.1128/JVI.01824-09.
34. Ksenofontov, A. L., Parshina, E. Y., Fedorova, N. V., Arutyunyan, A. M., Rumvolt, R., Paalme, V., Baratova, L. A., Jarvekul, L., and Dobrov, E. N. (2016) Heating-induced transition of Potyvirus

- Potato Virus A coat protein into beta-structure, *J. Biomol. Struct. Dynamics*, **34**, 250-258, doi: 10.1080/07391102.2015.1022604.
35. Ksenofontov, A. L., Dobrov, E. N., Fedorova, N. V., Arutyunyan, A. M., Golanikov, A. E., Jarvekulg, L., and Shtykova, E. V. (2018) Structure of potato virus A coat protein particles and their dissociation [in Russian], *Mol. Biol.*, **52**, 1055-1065, doi: 10.1134/S0026898418060101.
 36. Kordyukova, L. V., Ksenofontov, A. L., Badun, G. A., Baratova, L. A., and Shishkov, A. V. (2001) Studying liposomes by tritium bombardment, *Biosci. Rep.*, **21**, 711-718, doi: 10.1023/a:1015572321508.
 37. Shishkov, A. V., Ksenofontov, A. L., Bogacheva, E. N., Kordyukova, L. V., Badun, G. A., Alekseevsky, A. V., Tsetlin, V. I., and Baratova, L. A. (2002) Studying the spatial organization of membrane proteins by means of tritium stratigraphy: bacteriorhodopsin in purple membrane, *Bioelectrochemistry*, **56**, 147-149, doi: 10.1016/s1567-5394(02)00018-x.
 38. Chakravarty, A., Reddy, V. S., and Rao, A. L. N. (2020) Unravelling the stability and capsid dynamics of the three virions of brome mosaic virus assembled autonomously *in vivo*, *J. Virol.*, **94**, doi: 10.1128/JVI.01794-19.
 39. Clare, D. K., Pechnikova, E. V., Skurat, E. V., Makarov, V. V., Sokolova, O. S., Solov'yev, A. G., and Orlova, E. V. (2015) Novel inter-subunit contacts in barley stripe mosaic virus revealed by cryo-electron microscopy, *Structure*, **23**, 1815-1826, doi: 10.1016/j.str.2015.06.028.
 40. Rodionova, N. P., Karpova, O. V., Kozlovsky, S. V., Zayakina, O. V., Arkhipenko, M. V., and Atabekov, J. G. (2003) Linear remodeling of helical virus by movement protein binding, *J. Mol. Biol.*, **333**, 565-572, doi: 10.1016/j.jmb.2003.08.058.
 41. Lukashina, E., Badun, G., Fedorova, N., Ksenofontov, A., Nemykh, M., Serebryakova, M., Mukhamedzhanova, A., Karpova, O., Rodionova, N., Baratova, L., and Dobrov, E. (2009) Tritium planigraphy study of structural alterations in the coat protein of *Potato virus X* induced by binding of its triple gene block 1 protein to virions, *FEBS J.*, **276**, 7006-7015, doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07408.x.
 42. Steele, J. F. C., Peyret, H., Saunders, K., Castells-Graells, R., Marsian, J., Meshcheriakova, Y., and Lomonosoff, G. P. (2017) Synthetic plant virology for nanobiotechnology and nanomedicine, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, **9**, e1447, doi: 10.1002/wnan.1447.

CHANGES IN THE STRUCTURE OF POTATO VIRUS A VIRIONS DURING LIMITED PROTEOLYSIS *in situ* ACCORDING TO TRITIUM LABELING DATA AND COMPUTER SIMULATION

A. L. Ksenofontov^{1*}, L. A. Baratova¹, P. I. Semenyuk¹, N. V. Fedorova¹, and G. A. Badun²

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: ksenofon@belozersky.msu.ru

² Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The coat proteins (CP) of potato virus A virions (PVA) contain partially disordered N-terminal domains, which are necessary for performing vital functions of the virus. A comparative analysis of the structures of coat proteins (CPs) in intact PVA virions and in virus particles lacking the N-terminal 32 amino acids (PVA Δ 32) was carried out in this work based on the tritium planigraphy data. Using the atomic resolution structure of the potato virus Y potyvirus (PVY) protein, which is a homolog of CP PVA, the available CP surfaces in the PVY virion were calculated and the areas of intersubunit/ interhelix contacts were determined. For this purpose, the approach of Lee and Richards (Lee, B., and Richards, F. M. (1971) *J. Mol. Biol.*, **55**, 379-400) was used. Comparison of the incorporation profiles of the tritium label in intact and trypsin-degraded PVA Δ 32 revealed the position of the Δ N-peptide shielding the surface domain (a.a. 66-73, 141-146) and the interhelix zone (a.a. 161-175) of the PVA CP. The presence of channels/cavities was found in the virion, which turned out to be partially permeable to tritium atoms. Upon removal of the Δ N-peptide, a decrease in the label within the virion (a.a. 184-200) was also observed, indicating a possible structural transition leading to virion compactization. Based on the data obtained, we can conclude that part of the surface Δ N-peptide is located between the coils of the virion helix, which increases the helix pitch and provides greater flexibility of the virion, which is important for the intercellular transport of the viruses in the plants.

Keywords: potyviruses, coat protein, potato virus A, N-terminal disordered domains, structural modeling, tritium planigraphy